

T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İN VİTRO ORTAMDA İNSÜLİN RESEPTÖR SUBSTRAT 1 (IRS 1)
BAĞIMLI SİNYAL İLETİM AĞININ GLİOBLASTOMA
MULTİFORME GELİŞİMİNDEKİ ROLÜNÜN BELİRLENMESİ**

Biyolog Zafer YAREN
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üyesi Gökhan GÖRGİŞEN

VAN-2019

Bu araştırma Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı tarafından TYL 2018-7427 numaralı proje ile desteklenmiştir.

KABUL VE ONAY

Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında Biyolog Zafer YAREN tarafından hazırlanan “*In Vitro Ortamda İnsülin Reseptör Substrat 1 (IRS1) Bağımlı Sinyal İletim Ağının Glioblastoma Multifforme Gelişimindeki Rolünün Belirlenmesi*” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak OY BİRLİĞİ/~~OY ÇOKLUĞU~~ ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:/..../.....


İmza

Prof. Dr. Yasin Tülüce

Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi

Jüri Başkanı


İmza

Doç. Dr. Zafer Çetin

SANKO Üniversitesi

Jüri Üyesi


İmza

Dr. Öğr. Üyesi Gökhan Görgişen

Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi

Jüri Üyesi

Tez hakkında alınan jüri kararı, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.


İmza
Unvanı Adı ve Soyadı

ETİK BEYAN

T.C.

VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Yüksek Lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum "*In Vitro Ortamda İnsülin Reseptör Substrat 1 (IRS1) Bağımlı Sinyal İletim Ağının Glioblastoma Multiforme Gelişimindeki Rolünün Belirlenmesi*" başlıklı tezim; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir. Bu tezdeki bütün bilgiler akademik kurallara ve etik ilkelere uygun olarak hazırlanıp, bu kural ve ilkeler gereği, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce ve sonuçlara atıf yapılmış ve kaynak gösterilmiştir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Zafer YAREN

Tarih: 17/07/2019

İmza: 

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince desteklerini ve değerli bilgilerini benden hiçbir zaman esirgemeyen, genç ve başarılı bir bilim adamı olan değerli danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Gökhan GÖRGİŞEN'e,

Tez çalışmam esnasında bilgilerinden istifade ettiğim ve çalışmalarımın her aşamasında laboratuvar imkanlarını sonuna kadar kullanmama müsaade eden bölümümüzün değerli hocaları Prof. Dr. Yasin TÜLÜCE, Prof. Dr. Halil Özkol ve Dr. Öğr. Üyesi Zehra KAYA'ya ve Tıbbi Parazitoloji bölümünden değerli Doç. Dr. Yunus Emre BEYHAN hocama,

Çalışmalarım esnasında bilgisinden ve tecrübelerinden istifade ettiğim Arş. Gör. İsmail Musab GÜLAÇAR'a

Tez çalışması ile ilgili gerekli resmi işlemleri yürüten Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsünün tüm çalışanlarına,

Çalışmam esnasında bana her zaman destek olan ve bana katlanan oda arkadaşım Burak Muğdat KARAN'a,

Tezimin tüm aşamalarında çok büyük emekleri geçen yüksek lisans arkadaşlarım Aysun ARSLAN, Yılmaz ECER, Uğur KARATAŞ, Hüda ALHAMMUD, Selva TUFAN ve bölümümüzün diğer yüksek lisans öğrencilerine,

Maddi manevi desteklerini esirgemeyen abilerim Yahya YAREN ve Zeki YAREN'e ve hayatımın her aşamasında yanımda olan, her türlü desteklerini, sevgilerini bana seferber eden canım anneme, merhum babama ve ailemizin diğer bireylerine sonsuz minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

YAREN Z, İn vitro ortamda İnsülin Reseptör Substrat 1 (IRS1) Bağımlı Sinyal İletim Ağının Glioblastoma Multiforme Gelişimindeki Rolünün Belirlenmesi, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Van, 2019. Beynin temel enerji kaynağı glukozdur ve beyin, glukozu yoğun bir şekilde kullanmaktadır. Dolayısıyla beynin fizyolojik rolünü yerine getirmesi, glukoz metabolizmasının sıkı bir şekilde kontrolü ile sağlanmaktadır. İnsülin Reseptör Substrat (IRS) proteinleri, glukoz metabolizmasının regülasyonunda rol alan en önemli adaptör proteinlerdir. IRS1 bu protein ailesinin üzerinde en çok çalışılan elemanıdır. IRS1, kanserle ilgili birçok reseptörle etkileşime geçmektedir ve literatürde IRS1'in meme, akciğer, prostat, böbrek gibi birçok kanser türünde ekspresyon artışı gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarda merkezi sinir sistemi tümörlerinden biri olan medulloblastomda da IRS1 ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir. Bizde bu bilgiler ışığında, IRS1'in merkezi sinir sisteminin bir diğer önemli tümörü olan glioblastoma multiforme (GBM) gelişiminde de böyle bir ekspresyon artışı olabileceğini düşündük. Buradan yola çıkarak in vitro ortamda IRS1 bağımlı sinyal iletim ağının GBM gelişimindeki rolünü belirlemeyi amaçladık. Çalışmada, U-87 MG hücre hattı kullanıldı. IRS1 proteinin ekspresyonunu U-87 MG hücrelerinde arttırmak amacıyla pcDNA3.1-flag tagged-insan IRS1 ekspresyon vektörü lipofektamin aracılığı ile hücrelere transfekte edildi. Ektopik IRS1 ekspresyon artışının GBM hücrelerinin sağkalımı üzerindeki fonksiyonel etkisi MTT analizi, insülin sinyali üzerindeki moleküler etkisi western blot analizi ile belirlendi. Elde ettiğimiz sonuçlar, ektopik IRS1 ekspresyon artışının GBM hücre sağkalımını arttırdığını göstermektedir. Ayrıca, IRS1 ekspresyon artışının, insülin indüklü Grb2, ERK ve AKT proteinlerinin aktivasyonlarında artış gerçekleştirdiği saptanmıştır. Çalışmamız, GBM hücrelerinde IRS1 ekspresyon ve aktivasyon artışının, hücre sağkalımını AKT aktivasyonu aracılığıyla arttırdığını ortaya koymaktadır.

Anahtar Kelimeler: Beyin Tümörleri, Glioblastoma Multiforme, IRS1, İnsülin Reseptör Substrat Proteinleri (IRS), İnsülin Sinyali.

ABSTRACT

YAREN Z, Understanding the Role of Insulin Receptor Substrate 1 (IRS1) Dependent Signal Transduction Network in Development of Glioblastoma Multiforme in In Vitro. University of Van Yuzuncu Yil, Institute of Health Sciences, Department of Medical Biology, M.Sc. Thesis, Van, 2019.

Glucose is the primary energy source in brain and it is extensively used in brain cells. Therefore, the brain performs its physiological role through the strict regulations of glucose metabolism. Insulin Receptor Substrate (IRS) proteins are the most important adapter proteins involved in the regulation of glucose metabolism. IRS1 is the most studied member of this family. It interacts with many cancer-related receptors and studies have shown that its overexpression is associated with many cancer types such as breast, lung, prostate and kidney. In addition to these cancer types, increased IRS1 expression has also been shown in medullablastoma is one of the central nervous tumors. Under the light of these studies, we thought that IRS1 expression might increase in Glioblastoma Multiforme (GBM) is one of the most important type of central nervous system tumors. Therefore, we aimed to figure out the role of IRS1 signaling network in the development of GBM. In this study, U-87 MG cell line was used. In order to increase the expression of IRS1 in GBM cells, U-87 MG cells were transfected with pcDNA3.1 flag-tagged-human IRS1 expression vector by lipofectamine. Functional and molecular effects of ectopic IRS1 overexpression on survival of GBM cells and insulin signaling were determined by MTT analysis and western blotting, respectively. Our results suggested that ectopic IRS1 overexpression led a increase in cell survival. We also detected that expressions/activations of Grb2, ERK and AKT proteins increased through IRS1 overexpression in U-87 MG cells. Our study showed that increased IRS1 expression and activation promote cell viability via AKT activation.

Keywords: Brain Tumors, Glioblastoma Multiforme, IRS1, Insulin Receptor Substrate Proteins (IRS), Insülin Signal.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY.....	II
ETİK BEYAN.....	III
TEŞEKKÜR.....	IV
ÖZET.....	V
ABSTRACT.....	VI
İÇİNDEKİLER.....	VII
SİMGELER VE KISALTMALAR	X
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	XI
TABLolar LİSTESİ.....	XII
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. İnsülin Hormonu.....	2
2.2. İnsülin Reseptörü.....	3
2.2.1. İnsülin reseptörünün yapısı.....	3
2.3. İnsülin Sinyal Yolağı.....	4
2.4. İnsülin Reseptör Substrat (IRS) Proteinleri.....	5
2.4.1. İnsülin reseptör substrat protein ailesi.....	7
2.4.2. İnsülin reseptör substrat proteinlerinin yapısı.....	8
2.5. IRS Proteinleri ve Kanser	11
2.6. Glioblastoma Multiforme	14
2.6.1. Primer ve sekonder GBM'ler.....	15
2.6.2. GBM'lerde moleküler mekanizmalar	16
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	20
3.1. Kompetan Hücre Hazırlanması.....	20
3.2. E. coli DH5 α Suşuna Plazmid Transformasyonu	21
3.3. E. coli Hücrelerinden Plazmid İzolasyonu	21
3.4. Hücre Kültürü	22
3.4.1. U-87 MG hücrelerinin çözdürülmesi.....	23
3.4.2. U-87 MG hücrelerinin beslenmesi.....	23

3.4.3. U-87 MG hücrelerinin dondurulması.....	24
3.4.4. U-87 MG hücrelerinin pasajlanması.....	24
3.4.5. U-87 MG hücrelerine plazmid transfeksiyonu	25
3.5. U-87 MG Hücrelerinin Sayımı	25
3.6. MTT (Hücre Canlılık) Testi.....	26
3.7. U-87 MG Hücrelerinin İnsülinle Muamele Edilmesi	26
3.8. Protein Lizatlarının Hazırlanması	27
3.9. Protein Miktar Tayini (Bradford Analizi).....	28
3.10. Western Blot	28
3.10.1. Jelin hazırlanması	29
3.10.2. Protein lizatlarının hazırlanması	30
3.10.3. Örneklerin jele yüklenmesi ve jelde yürütülmesi	30
3.10.4. Proteinlerin jelden PVDF membrana transferi	31
3.10.5. PVDF membranın işaretlenmesi.....	31
3.10.6. PVDF membranın görüntülenmesi	32
4. BULGULAR.....	34
4.1. Yabancı Tip IRS Proteininin U-87 MG Hücrelerinde Ektopik Ekspresyonunun Gösterilmesi	34
4.2. Ektopik IRS1 Ekspresyonu Yapan U-87 MG Hücrelerinde İnsülinin IRS1 Tirozin Fosforilasyonu Üzerine Etkisi.....	35
4.3. Ektopik IRS1 Ekspresyonu Yapan U-87 MG Hücrelerinde İnsülinin Grb2 Ekspresyonu Üzerine Etkisi.....	36
4.4. Ektopik IRS1 Ekspresyonu Yapan U-87 MG Hücrelerinde İnsülinin ERK1/2 Ekspresyonu ve Fosforilasyonu Üzerine Etkisi.....	37
4.5. Ektopik IRS1 Ekspresyonu Yapan U-87 MG Hücrelerinde İnsülinin AKT1 Ekspresyonu ve Fosforilasyonu Üzerine Etkisi.....	38
4.6. Ektopik IRS1 ekspresyonu yapan U-87 MG Hücrelerinde Sağkalım Oranlarının Belirlenmesi	39
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	41
KAYNAKLAR	46
ÖZGEÇMİŞ.....	52
EKLER.....	53

EK1. Etik Kurul Belgesi.....	53
EK2. Tez Orjinallik Raporu.....	54



SİMGELER VE KISALTMALAR

APS	: Amonyum Persülfat
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
EGFR	: Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü
GBM	: Glioblastoma Multiforme
IR	: İnsülin Reseptörü
IRS	: İnsülin Reseptörü Substratı
IGF	: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
IGFR	: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü Reseptörü
kDa	: Kilodalton
NLS	: Nükleer Lokalizasyon Sinyali
mM	: Milimolar
MSS	: Merkezi Sinir Sistemi
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
ng	: Nanogram
PAGE	: Poliakrilamid jel elektroforezi
PKC	: Fosfoinositide bağımlı kinaz-1
PH	: Plekstrin Homoloji
PTB	: Fosfotirozin Bağlama Bölgesi
PTEN	: Fosfataz tensin homoloğu
PVDF	: Poliviniliden diflorid
rpm	: Dakikadaki dönüş sayısı
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
SH2	: Src-homoloji 2
TBE	: Tris Borat EDTA
TEMED	: N,N,N,N-tetrametiletilediamin
°C	: Santigrat derece (Celsius)

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. İnsülinin hücredeki pleiotropik etkileri	2
Şekil 2. İnsülin reseptörü a) Dimerik insülin reseptör yapısı b) İnsan dimerik insülin reseptörünün moleküler modeli	4
Şekil 3. İnsülin sinyal yolağı	5
Şekil 4. IRS1 proteininin moleküler yapısı ve alt birimlerinin görevleri	10
Şekil 5. İnsülin Reseptör Substrat proteinlerinin moleküler yapısı	11
Şekil 6. Standart olmayan IRS sinyalinin şematik gösterimi	12
Şekil 7. EGFR sinyal yolağı	17
Şekil 8. GBM'lerde hiperaktif reseptör tirozin kinazlar	18
Şekil 9. U-87 MG hücre gruplarında insülin indüklü IRS1, ERK1/2 ve AKT1 proteinlerinin aktivasyon ve ekspresyonları ile Grb2 proteininin ekspresyon profili	34
Şekil 10. U-87 MG hücre gruplarında transfeksiyon sonrası ektopik IRS1 ekspresyon seviyeleri.....	35
Şekil 11. Ektopik IRS1 ekspresyonu yapan U-87 MG hücrelerinde insülin indüklü IRS1 tirozin fosforilasyonu	36
Şekil 12. Ektopik IRS1 ekspresyonu yapan U-87 MG hücrelerinde insülin indüklü Grb2 ekspresyonu	37
Şekil 13. Ektopik IRS1 ekspresyonu yapan U-87 MG hücrelerinde insülin indüklü ERK1/2 ekspresyonu ve aktivasyonu	38
Şekil 14. Ektopik IRS1 ekspresyonu yapan U-87 MG hücrelerinde insülin indüklü AKT1 ekspresyonu ve aktivasyonu	39
Şekil 15. Kontrol, boş vektör ve IRS1 transfekte edilmiş U-87 MG hücrelerinin 24, 48 ve 72 saat sonundaki sağkalım oranları.....	40

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1. İnsülin reseptör substrat-1 serin fosforilasyonuna neden olan etmenler	6
Tablo 2. İnsülin sinyalleşmesinde protein-protein etkileşimi ile ilgili alanların sınıflandırılması	9
Tablo 3. İnsan kanserlerinde IRS ekspresyonu	13
Tablo 4. Primer ve sekonder GBM başlangıç ve ilerlemede majör genetik değişiklikler	16
Tablo 5. Western blot jel hazırlama protokolü	30



1. GİRİŞ

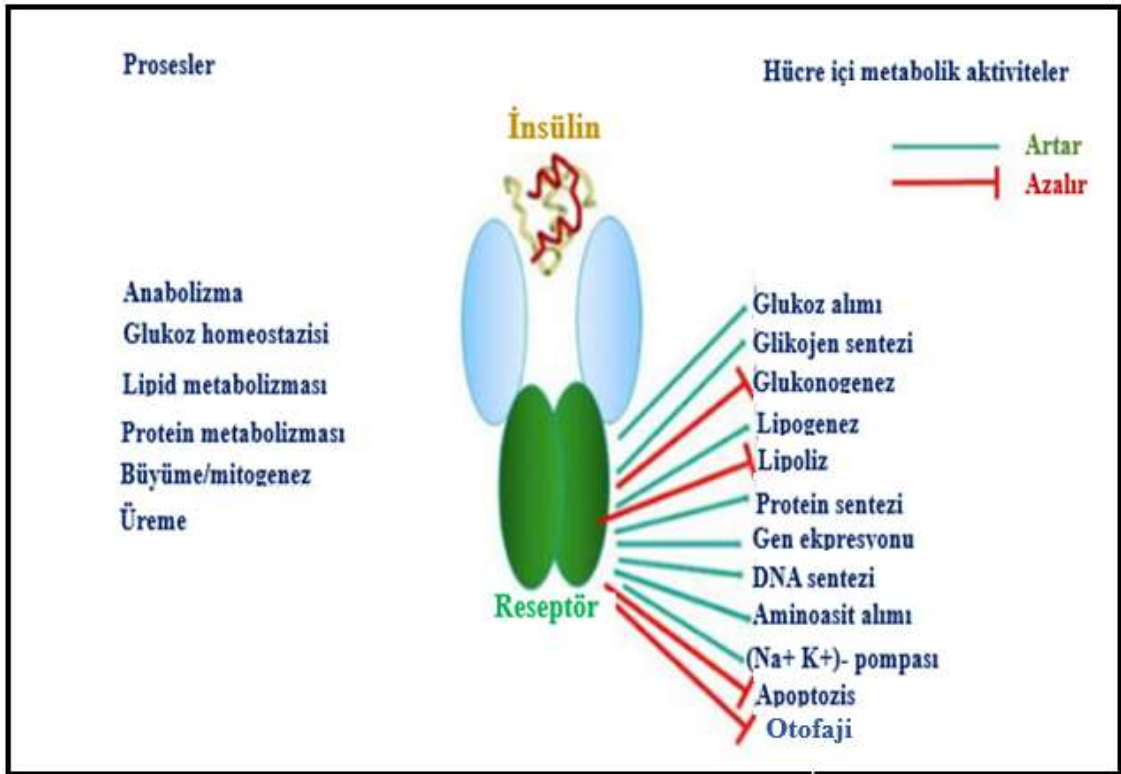
İnsülin Reseptör Substrat (IRS) proteinleri, çoğu kanserle ilişkili olan sitoplazmik adaptör proteinlerdir (Mardilovich ve ark., 2009). Bu proteinler, tümör hücresi metabolizmasını kontrol eden insülin reseptörü (IR) ve insülin benzeri büyüme faktörü 1 reseptörü (IGF-1R)'den gelen sinyallere aracılık etmede kilit rol oynarlar (Shaw, 2011).

IRS proteinlerinin, kanser gelişiminde önemli rol oynayan birçok yüzey reseptörü ile etkileşime girmesi ve kanser tipine bağlı olarak ekspresyon seviyesinde genellikle artışın gözlemlenmesi, kanserde IRS bağımlı sinyal yollarının belirlenmesinin önemini ortaya koymaktadır. İnsülin reseptör substrat protein ailesi, hücredeki birçok proliferatif ve metabolik sinyalleri koordine eden altı (IRS1-IRS6) üyeden oluşmaktadır (Dearth ve ark., 2007). Ailenin tanımlanan ilk üyesi IRS1'dir. Bu gen, insanda 2q34-37 kromozom bölgesinde lokalizedir ve tek ekzon tarafından kodlanmaktadır (Gorgisen ve ark., 2017). Literatürde, İnsülin Reseptör Substrat-1 (IRS-1) proteininin meme, karaciğer, yumurtalık, prostat, pankreas gibi birçok farklı kanser tipinde ekspresyon artışının olduğu gösterilmiştir. Ayrıca bu proteinin ekspresyon artışı, merkezi sinir sistemi (MSS) tümörlerinden biri olan medulloblastoma ile de ilişkilendirilmiştir. MSS'nin en agresif tümör grubunu ise Glioblastome Multiforme (GBM) oluşturmaktadır. Ancak IRS1-GBM ilişkisini gösteren çalışmalar oldukça sınırlıdır. GBM'in moleküler patogenezinin belirlenmesi hastalığın tanı, progresyonu ve tedavisi açısından oldukça önem taşımaktadır. Bu çalışmada, glukoz metabolizmasında önemli rol oynayan IRS1 proteinine bağlı gerçekleşen insülin sinyalinin in vitro ortamda GBM gelişimindeki rolünün açığa çıkarılması planlanmıştır. Bu kapsamda IRS1 ekspresyon artışının insülin sinyal yolağı aracılığıyla GBM hücrelerinin sağkalımını arttıracakları öngörülmüştür. Dolayısıyla çalışma kapsamında elde edilecek veriler, GBM hücrelerinde IRS1 ekspresyonunun uyardığı sinyal ağını moleküler düzeyde ortaya koyarak, GBM' in moleküler patogenezinine yönelik gerçekleştirilecek çalışmalara da öncül olabilecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İnsülin Hormonu

İnsülin, pankreasın beta hücreleri tarafından salınan, hücrel glukoz alımını kolaylaştırarak normal kan glukoz düzeyini koruyan, karbonhidrat, protein ve yağ metabolizmasını düzenleyen ve mitojenik etkileri yoluyla hücre bölünmesini ve büyümesini teşvik eden anabolik bir hormondur (Wilcox, 2005). Ayrıca insülin, insülin reseptörü (IR), insülin reseptörü substratı (IRS) proteinleri, fosfoinositol 3-kinaz (PI3K) ve birçok protein kinazı içeren hücre içi sinyal yolağının aktivasyonu aracılığıyla enerji ve lipid metabolizmasının düzenlenmesinde de rol oynayan önemli bir endokrin hormondur. (Cignarelli ve ark., 2019). İnsülin, her ne kadar bir glukoz homeostazı düzenleyici hormon olarak görülse de çok daha geniş pleiotropik rolü olduğu bilinmektedir (Meyts, 2000).



Şekil 1. İnsülinin hücredeki pleiotropik etkileri (Meyts, 2000).

Hücrel düzeyde insülin sinyali, plazma membranında lokalize olan IR'ye bağlanarak başlatılır (Pirola ve ark., 2004).

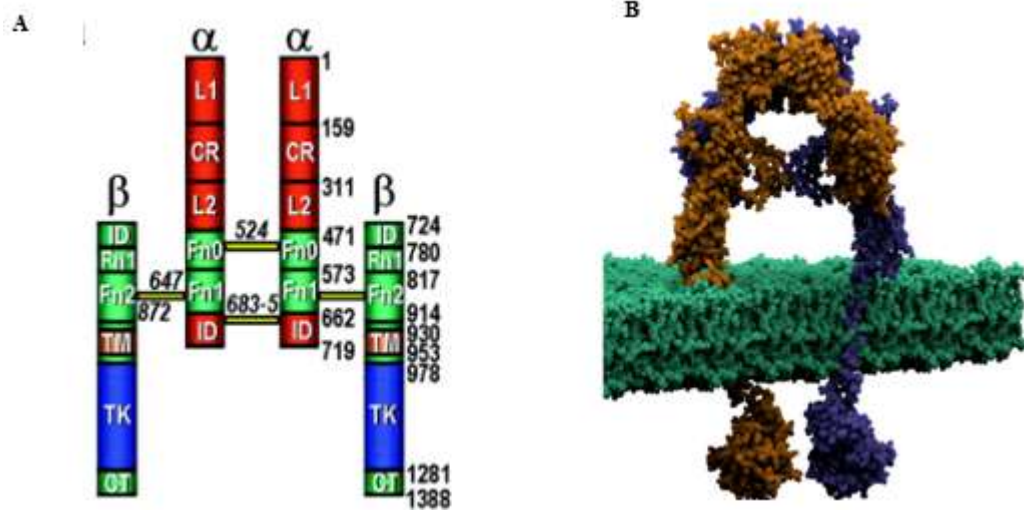
2.2. İnsülin Reseptörü

İnsülin, insülin reseptörü üzerinden çeşitli hücrelere etki eder (Elbina ve ark., 1985). IR, tirozin kinaz reseptör sınıfına ait transmembran proteindir. Temel olarak insülin ile aktive edilmesine rağmen, farklı insülin analogları ve insülinle ilişkili büyüme faktörleri IGF-I ve IGF-II (özellikle IGF-II) ile de aktive edilebilir (Ward ve Lawrence, 2009). IR'ye bağlandıktan sonra bu etkileşim bir dizi biyokimyasal olay zincirini başlatır (Kasuga ve ark., 1982).

IR, metabolik olarak glukoz homeostazının düzenlenmesinde anahtar rol oynar. Aynı zamanda IR hücre büyümesini de uyarabildiğinden, bu fonksiyonel işlem, belirli hiperinsülinemi koşulları altında, kanser ve kardiyovasküler hastalıklar dahil olmak üzere birçok patolojik bozukluğa neden olabilir (Vigneri ve ark., 2016). Dolayısıyla kanser hücrelerinde IR'nin aşırı ekspresyonu, hiperinsülinemiye karşı artan hassasiyetle açıklanabilir (Belfiore ve Malaguarnera, 2011).

2.2.1. İnsülin reseptörünün yapısı

IR, molekül ağırlığı yaklaşık 300 kDa olan bir glikoproteindir (Liu ve He, 2016). 19. kromozom üzerinde lokalize, 22 ekzon ve 21 intronlu bir gen tarafından kodlanmaktadır. (Meyts, 2000). IR, iki α ve iki β alt ünitelerinden oluşan heterodimerik bir proteindir (White ve Kahn, 1994). α -alt ünitesi, iki adet lösince zengin tekrar bölgesi (L1 ve L2), bir adet sisteince zengin bölge (CR) ve iki adet fibronektin III (FnIII-1 ve FnIII-2) bölgesinden oluşur (Li ve ark., 2014). IR ayrıca β -alt ünitesinde birer adet transmembran (TM), juxtamembran (JM) ve sitoplazmik tirozin kinaz (TK) alanlarını (Ye ve ark., 2017) ve son olarak da karboksi terminal (C) bölge içerir (Kidmose ve Andersan, 2016). IR'nin intrasitoplazmik bölgesinde tirozin otofosforilasyon bölgeleri tanımlanmıştır. Bu bölgeler juxtamembran bölgedeki Y972 ve karboksi terminaldeki Y1158, Y1162, Y1163 pozisyonları olup, insülin reseptörünün oto-fosforilasyonu, otoinhibisyonu ve sinyalin alt basamaklara iletimini sağlayan önemli alanlardır (Görgişen, 2015).



Şekil 2. İnsülin Reseptörü. A) Dimerik insülin reseptör yapısı (Lip ve Ottonsmeyer, 2003), B) İnsan dimerik insülin reseptörünün moleküler modeli (Kidmose ve Andersan, 2016).

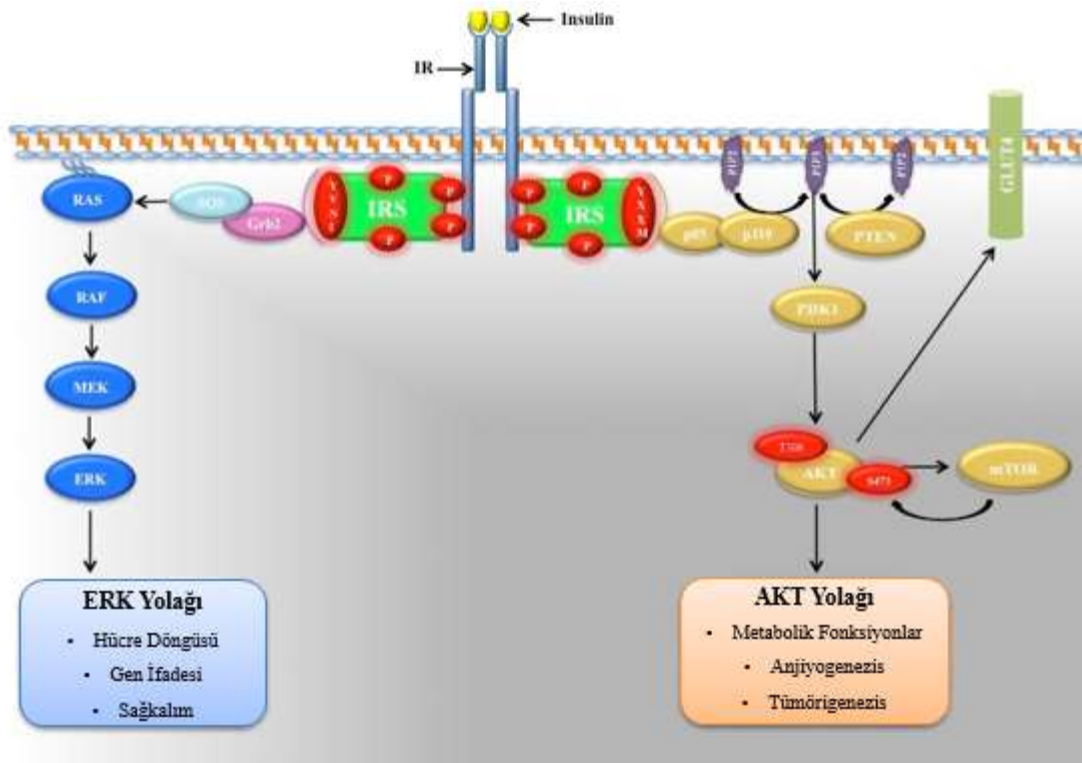
2.3. İnsülin Sinyal Yolağı

İnsülin sinyal yolağının ana medyatörü, hedef hücrelerin yüzeyinde bulunan insülin reseptörüdür (Kidmose ve Andersan, 2016). Ligand bağlanmasıyla aktive edildiğinde, insülin reseptörü yukarıda belirtilen tirozin bölgelerinden otofosforilasyonuna uğrar. Bu fosforlanmış tirozinler daha sonra hücrenin içinde hormonun pleiotropik etkilerinden sorumlu olan karmaşık bir biyokimyasal sinyal ağı oluşturan çeşitli hücre içi proteinlerle etkileşime girer (Ward ve Lawrence, 2009).

Genel olarak, insülin sinyal iletimi sürecinde ligant bağlayan IRS proteinleri bu fosfo-tirozinlere 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 p85 α bağlanır. p85 α aynı zamanda PI3K'in katalitik alt ünitesi p110 α 'ya da bağlanıp aktivasyonunu sağlar (Görgişen, 2017). Aktive edilmiş katalitik p110 α alt birimi, zardaki fosfatidilinositol-4,5-bisfosfatı (PIP2) fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfata (PIP3) dönüştürür (Hao ve ark., 2014).

PIP3, fosfoinositide bağımlı kinaz-1 (PDK1)'i fosforiller. Aktive edilmiş PDK1, AKT'yi Thr308'de fosforile ederek aktive eder (Görgişen ve ark., 2017). AKT'nin tam

aktivasyonu ise uyardığı mTOR tarafından S473 bölgesinden fosforillenmesi sonucunda gerçekleşir. Aktive edilmiş AKT glukoz alımı, hücre döngüsü ilerlemesi, hücre göçü, büyüme ve anjiyogenez kontrol eden birçok transkripsiyon faktörünün ve proteininin aktivasyonunu gerçekleştirir (Sarker ve ark., 2009). IR'nün hücre büyümesi ve farklılaşması gibi mitojenik etkileri ise ağırlıklı olarak RAS/RAF/MEK/ERK sinyal yolu ile sağlanmaktadır (Vigneri ve ark., 2016).



Şekil 3. İnsülin sinyal yolağı (Görgişen, 2017).

2.4. İnsülin Reseptör Substrat (IRS) Proteinleri

İnsülin reseptör substrat (IRS) proteinleri, insülin reseptör ailesi üyelerinden gelen sinyalleri koordine eden (Yenush ve ark., 1998), çoğu kanserle ilişkili hücre yüzey reseptörleriyle etkileşime geçerek sinyal iletimini sağlayan sitoplazmik adaptör proteinlerdir. IRS protein ailesi, intrinsik kinaz aktiviteleri olmadığı halde bağlandığı reseptörler ve alt sinyal elemanları tarafından fosforile edilerek sinyal yollarının aktivasyonunu ve regülasyonunu gerçekleştirirler (White, 2002).

IRS proteinleri, hormon, sitokin ve büyüme faktörü sinyalinin birleştiren ve koordine eden hücre içi moleküllerdir. Tüm IRS'ler, SH2 içeren proteinler için bağlanma bölgesi görevi gören çoklu tirozin fosforilasyon bölgeleri içerir. IRS proteinleri başta insülin reseptörünün substratı olarak tanımlanmış olsa da günümüzde, insülin benzeri büyüme faktörü reseptörü, büyüme hormonu, sitokin, integrin ve prolaktin gibi reseptörlerle de etkileşime girdiği bilinmektedir (Derth ve ark., 2006).

IRS proteinlerinin aktivasyonu tirozin fosforilasyonu aracılığıyla gerçekleşmektedir. Tirozin fosforilasyonunun aksine IRS'in Serin/Treonin fosforilasyonu, insülin sinyalizasyonunu hem pozitif hem de negatif olarak düzenlemektedir. IRS proteinlerinin serin fosforilasyonu, insülin sinyallemesini hafifletme nedeni olarak belirlenmiş (Qiao ve ark., 1999), bunların IR'den ayrışmasını, hücre içi lokalizasyonu ve nihayetinde degradasyonu etkileyen çeşitli hücrel mekanizmalarda rol oynadığını gösterilmiştir (Coops ve White, 2012).

Son çalışmalar, IRS proteinlerinin serin fosforilasyonunun, IRS proteinlerinin PI3-kinazı çekebilme yeteneğini de azaltabildiğini ve böylece aktivasyonunu baskılayarak; IRS-1 proteininin daha hızlı bir şekilde bozulmasına yol açabileceğini açıkça ortaya koymuştur. Bu serin fosforilasyonu alt efektörlere zarar vererek IRS-1'in tirozin fosforilasyonunu azaltır. IRS proteinlerinin serin fosforilasyonu, bir dizi hücre içi serin kinazına cevaben ortaya çıkabilir (Saini, 2010). IRS-1'in serin fosforilasyonlarının nedenleri Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1. İnsülin reseptör substratı-1 serin fosforilasyonuna neden olan etmenler (Saini, 2010) revize edilmiştir.

IRS1 Serin Fosforilasyonu Nedenleri	
mTOR	IKK
P70S6	TNF- α
Aminoasitler	Mitokondriyal fonksiyon bozukluğu
Hiperinsülinemi	PKC θ
JNK	Hiperglisemi
Stres	İnflamasyon
Hiperlipidemi	Diaçilgliserol

2.4.1. İnsülin reseptör substrat protein ailesi

IRS ailesinin üyeleri hücre sinyali komplekslerini organize etmek ve yönlendirmek için aracılık eden, IRS protein ailesinin üyeleridir (Boucher ve ark., 2014). İnsülin reseptör substrat protein ailesi, hücredeki birçok proliferatif ve metabolik sinyalleri koordine eden (Dearth ve ark., 2007), dört yakın ilişkili (IRS1 -IRS4) ve iki uzak akraba (IRS-5/DOK4 ve IRS-6/DOK5) üyeden oluşmaktadır (Iking ve ark., 2016). Kemirgenlerde ve insanlarda yaygın ekspresyon göstermeleri nedeniyle, IRS1 ve IRS2 üzerinde en çok çalışılmış aile elemanlarıdır (Chan ve Lee, 2008). IRS1 ve IRS2 çoğu hücre tipinde insüline bağlı mitojenik aktivitenin ve birincil glukoz metabolizmasının düzenlenmesinin ana araçlarıdır (Shaw, 2011).

IRS1, bu ailenin ilk tanımlanan ve yaygın ekspresyon göstermesi nedeniyle üzerinde en çok çalışılan elemanıdır (Görgişen, 2018). Aslında IRS1, IRS ailesinin prototipidir (Cai ve ark., 2003). *IRS1* geni, insanda 2q34-37 kromozom bölgesinde lokalizedir ve tek ekzon tarafından kodlanmaktadır (Gorgisen ve ark., 2017).

IRS1, insülin, insülin benzeri büyüme faktörü 1 reseptörü (IGFR-1), interlökin-4, interlökin-9, interlökin-13, interferon reseptörleri, büyüme hormonu ve tümör nekroz faktör alfa dahil çeşitli sitokin reseptörleri için hücre içi bir substrat olarak görev yapar (Tanaka ve ark., 1997).

IRS2 başlangıçta interlökin-4 sinyal yolunun bir bileşeni olarak tanımlanmış olsa da günümüzde tüm hücrelerde ve dokularda ifade edildiği bilinmektedir (Burks ve White, 2001). IRS2, IRS1'den yaklaşık olarak 10 kD daha büyüktür. *IRS2* geni, insan 13q341 kromozom bölgesindedir ve tek bir ekzon tarafından kodlanmaktadır (White, 1988).

IRS3 diğer IRS proteinlerinden çok daha küçüktür ve daha az fosforilasyon bölgesine sahiptir (Tsuruzue ve ark., 2001). IRS3, kemirgen dokularında eksprese edilir, insanlar fonksiyonel bir IRS3 genine sahip değildir (Brumer ve ark., 2010). İnsanlarda IRS3 geni bir psödogenidir (Bjornholm ve ark., 2002).

IRS4, IRS ailesinin tanımlanan diğer bir üyesidir. Başlangıçta insüline cevaben hızlı tirozin fosforilasyonu görülen 160 kDa'luk protein olarak insan embriyonik böbrek (HEK 293) hücrelerinde tespit edilmiştir (Fantin ve ark., 1998). IRS4, ağırlıklı olarak

beyin, böbrek ve iskelet kasında dokuya özgü bir şekilde ifade edilir (Dörpholz ve ark., 2017).

IRS5 ve IRS6, DOK4 ve DOK5 olarak da bilinir. IRS ailesinin yakın zamanda tanımlanmış iki üyesidir (Versteyhe ve ark., 2009). IRS5 ve IRS6, ailenin geri kalanından uzak akrabalar olarak kabul edilir ve diğer IRS proteinlerine göre birbirlerine daha benzerdir (Chan ve Lee, 2008). İnsan dokuları arasında DOK4 ve DOK5, kalp ve iskelet kaslarında yüksek oranda eksprese edilir. DOK4 ekspresyonu karaciğerde, ince bağırsakta ve akciğerde, DOK5 ekspresyonu beyinde ve böbreklerde tespit edilmiştir (Favre ve ark., 2003).

2.4.2. İnsülin reseptör substrat proteinlerinin yapısı

Tüm IRS proteinleri, amino terminallerinde bir plekstrin homoloji (PH) ve bir fosfotirozin bağlanma (PTB) bölgelerinden oluşur (Lavin ve ark., 2016). Bu bölgeler tirozin motiflerinden fosforile olduğunda, Src-homoloji 2 (SH2) alanı içeren hücre içi moleküller için bağlanma alanları oluşturmaktadır (Boucher ve ark., 2014).

PH alanı, IR-IRS etkileşimleri için kritik önem taşımaktadır. Plazma zarı fosfolipidleri, hücre iskeleti elementleri ve protein ligandları bu etkileşime aracılık eder (Boura-Halfon ve Zick, 2009). PH alanlarının işlevi belirsiz olsa da, araştırmalar protein-protein etkileşimlerine aracılık ettiklerini veya fosfolipidleri bağladıklarını göstermektedir (Myers ve ark., 1995).

Amino terminalindeki (N-terminali) ikinci bölge fosfotirozin bağlanma (PTB) alanıdır (Gorgisen ve ark., 2017). PTB alanları, NPXY motiflerindeki fosforile tirozin bölgelerine spesifik olarak bağlanır. PTB/NPYX etkileşimi, IRS moleküllerinin insülin reseptörlerine bağlanması için büyük önem taşımaktadır (Jacobs ve ark., 2001).

PTB alanları, büyüme faktörü reseptörleri tarafından sinyal iletiminde önemli bir rol oynar. Çalışmalar, PTB bölgesinin hem fosfotirozin içeren rezidularla hem de fosfolipidlerle etkileşime girebildiğini ve bu bağlama faaliyetlerinin her ikisinin de Shc fonksiyonu için gerekli olabileceğini göstermiştir (Margolis ve ark., 1998).

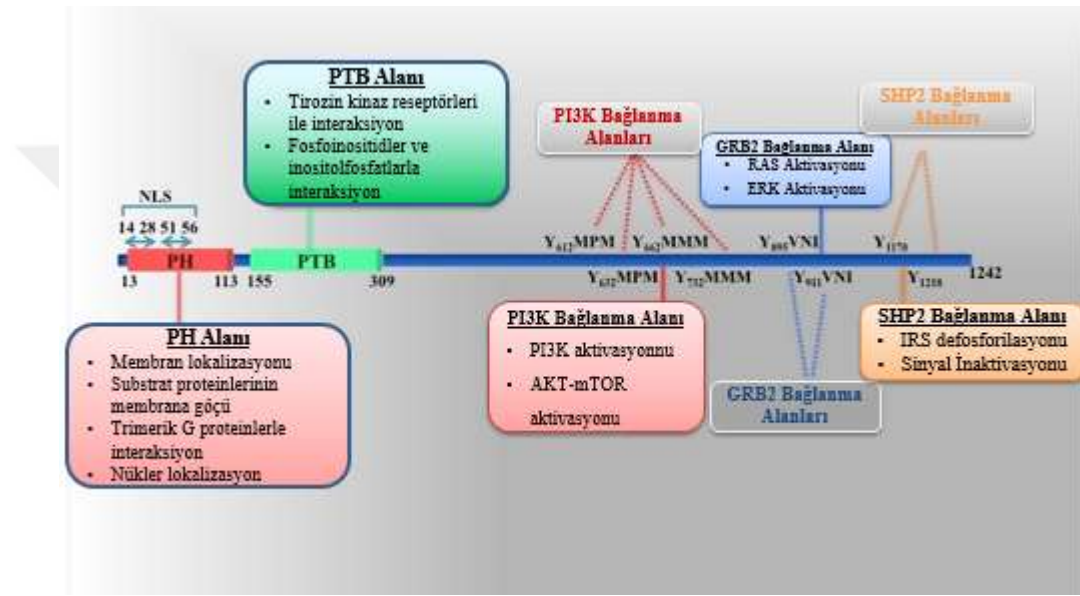
IRS proteinlerinin C-terminal bölgesi evrimsel açıdan en az korunmuş bölgedir (Paz ve ark.,1999). IRS proteinlerinin, N-terminal bölgesinden daha az benzerlik gösteren karboksi terminali (C-terminali), birçok sinyal yolağına ait proteinlerle etkileşime girebilen Tirozin ve Serin/Treonin fosforilasyon motifleri içermektedir. IRS proteinlerinin C-terminallerinde bulunan tirozin fosforilasyon motiflerindeki farklılıklar, bu proteinlerin farklı sinyal yollarıyla etkileşime girmesine izin verir (Al-Salam ve İrwin, 2017). C-terminalindeki her tirozin fosforilasyon bölgesi, enzimler (PI-3-kinaz; bir fosfotirozin fosfataz SHP2; ve Src-benzeri kinaz, fyn) ve adaptör proteinleri (Grb-2, nck, crk ve diğerleri) dahil olmak üzere spesifik efektör proteinleri bağlayan ve aktive eden benzersiz bir amino asit motifiyle çevrilidir (Withers ve White, 2000). Tablo 2’de insülin sinyalizasyonda önemli işleve sahip IRS proteinlerinin iyi karakterize edilmiş protein etkileşim alanlarından PH, PTB,SH2 ve SH3 alanları verilmiştir.

Tablo 2. İnsülin sinyalleşmesinde protein-protein etkileşimi ile ilgili alanların sınıflandırılması (Virkamäki ve ark., 1999)

Alan	Tanım motifleri veya yapısı	İnsülin sinyalindeki fonksiyonu
PH Alanı	Lipit ürünleri (PIP ₂ ,PIP ₃)	IRS proteininin insülin reseptörüne alımı
PTB Alanı	Spesifik fosfotirozin kalıntısı (NPXpY motifi)	İnsülin reseptörünün IRS proteini ile tanınması
SH2 Alanı	Üç aminoasit ile belirlenen spesifik fosfotirozin kalıntısı	IRS proteininin akış aşağı moleküllere sinyal iletimi
SH3 Alanı	COOH -terminal tirozin protein bakımından zengin –motif	SH2 proteinlerinden aşağı akış moleküllerine sinyal iletimi

IRS1, PH ve PTB alanlarına ve neredeyse tamamı C-terminalinde bulunan 20’den fazla tirozin fosforilasyon bölgesine sahiptir ve bunlar, PI3K’nın p85 alt ünitesinin SH2 alanları için tercih edilen bağlama bölgelerini temsil eden YXXM dizilerini içerir. IRS1’ in alt yolaklarından en belirginini ve en iyi karakterize edilen sinyal yolu PI3K’dır. PI3K,

AKT, atipik protein kinaz C (aPKC) enzimleri ve mTOR/S6K dahil olmak üzere çeşitli efektörleri uyarır. Bu efektörler çoğunlukla insülin ve IGF-1'in glukozu hücre içine alması, protein sentezi ve lipid metabolizması üzerindeki etkilerinden sorumludur. IRS-1'e bağlanan bir diğer efektör proteinlerden biri de GRB2'dir. GRB2, RAS/ERK yoluyla mitogenezi düzenler (Brummer ve ark., 2010). IRS1, aktive edilmiş reseptör ile Src homolojisi-2 (SH2) alanlarını taşıyan bu efektör proteinler arasında bir bağlantı görevi görür (Eck ve ark., 1996).



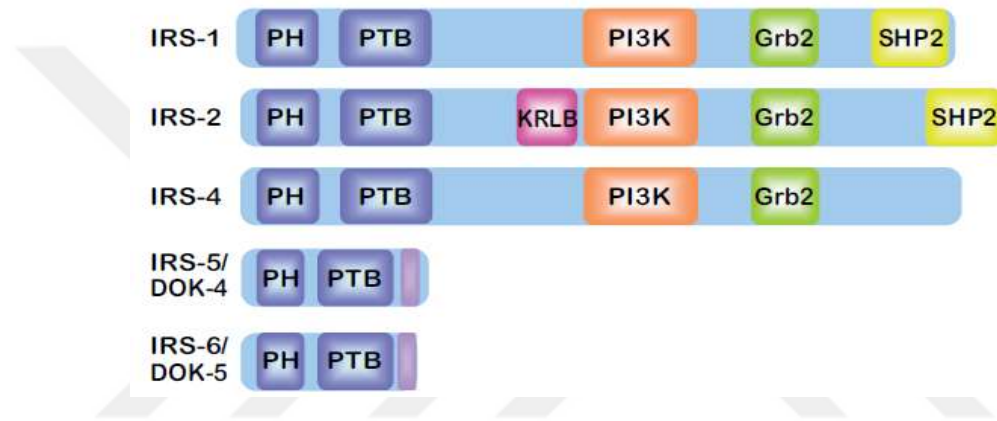
Şekil 4. IRS1 proteininin moleküler yapısı ve alt birimlerinin görevleri (Görgişen, 2017).

IRS2, IR'nin tirozin kinaz alanı ile etkileşime giren ve IRS2'nin tirozin fosforilasyonunu sınırlama işlevi görebilen KRLB denilen ilave bir alan içerir (Shaw, 2001). KRLB bölgesi, IRS2'deki tirozin fosforilasyon derecesini kontrol etmek için negatif düzenleyici eleman olarak görev yapar. Bu düzenleyici ögenin IRS2 işlevini IRS1'in işlevinden ayıran temel bir özellik olması muhtemeldir (Wu ve ark., 2008).

rIRS3, IRS1 ve IRS2'deki PH alanına oldukça homolog olan bir PH alanı içerir (sırasıyla sıçan IRS1 ve IRS-2 ile %50 ve %45 dizi benzerliği). IRS3'teki PTB alanı ise IRS-1 ve IRS-2' deki PTB alanı ile sırasıyla %48 ve %53 benzerlik gösterir. PH ve PTB alanları dışında, IRS3 ve IRS1 veya IRS2 arasında yüksek bir homoloji bölgesi yoktur. IRS3, PI3-kinaz, SHPTP2, Nck ve Shc'yi bağlar, ancak Grb2 ve fosfolipaz C'yi zayıf şekilde bağlar. IRS4, IRS1 ve IRS2 ile sırasıyla %27 ve %29 benzerlik göstermektedir.

IRS4'ün PH alanı, IRS1, IRS-2 ve IRS3'te sırasıyla %49, %50 ve %43 dizi benzerliğine karşılık gelen yüksek derecede bir homoloji sergiler. IRS4'ün PTB alanı ise IRS1, IRS2 ve IRS3'te sırasıyla %66, %62 ve %43 benzerlik gösterir (Giovannone ve ark., 2000)

IRS5 (Dok4) ve IRS6 (Dok5)'in PH alanları IRS1 ve IRS2 ile %22 oranında dizi benzerliği gösterirken, PTB alanları IRS proteinleri ile sırasıyla IRS5 (Dok4) ve IRS6 (Dok5)'te %20-%22 ve %21-%23 oranlarında dizi benzerliği göstermektedir (Cai ve ark., 2003). IRS5 (Dok4) ve IRS6 (Dok5) proteinlerinin C-terminalleri yoktur ve insüline cevap olarak nispeten zayıf fosforile edilmişlerdir (Brummer ve ark., 2010).



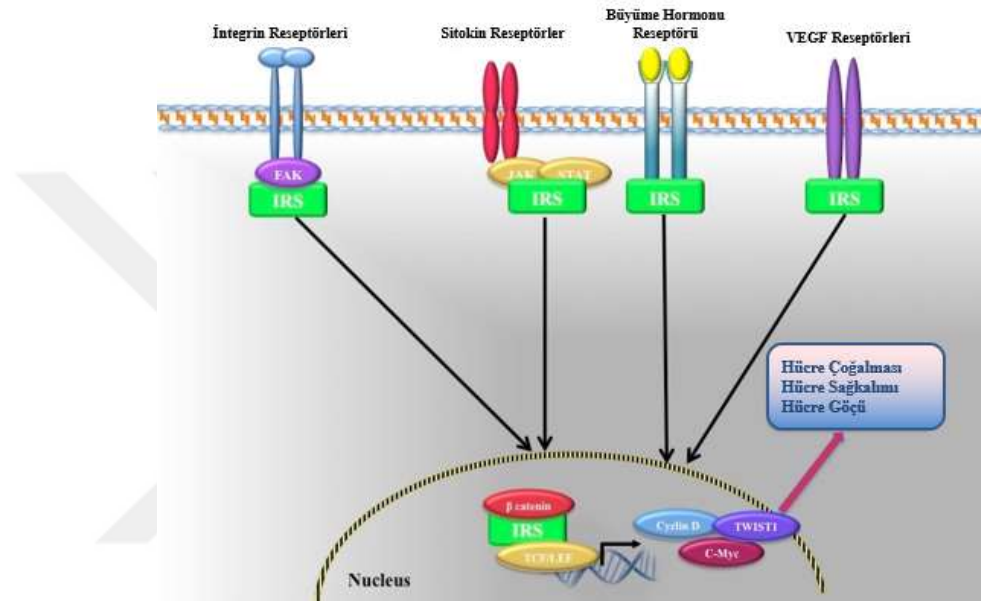
Şekil 5. İnsülin Reseptör Substrat proteinlerinin moleküler yapısı (Mardilovich ve ark., 2009).

2.5. IRS Proteinleri ve Kansere

IRS proteinleri, çoğu kanserle ilişkili olan adaptör proteinlerdir. Bu proteinlerin gerek kanserin başlangıç evresinde gerekse de kanserin metastatik ilerlemesine kadar birçok aşamasında etkili oldukları çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir. IRS proteinlerinin IR ve insülin benzeri büyüme faktörü reseptörü (IGFR) dışında farklı reseptörlerle etkileşime geçmesi, farklı kanser tiplerinde ekspresyon artışı gözlenmesi, hedef proteinleri aracılığıyla kanserle ilişkili uyardığı yollar ve IRS geni susturulmuş fare modellerinin fenotipleri gibi nedenler bu proteinlerin kanserle yakından ilişkili olduğunu gösteren bilimsel kanıtlardır (Mardilovich ve ark., 2009).

IRS proteinlerinin IR ve IGF-IR gibi tirozin aktivitesine sahip reseptörlere bağlanmayla sınırlı olmadığı gösterilmiştir (Dearth ve ark., 2007). IRS proteinleri ligand

bağlı reseptörler, vasküler endotelial büyüme faktör reseptörü (VEGFR), büyüme hormon reseptörü (GH), leptin, prolaktin, integrin, sitokinler gibi birçok reseptörle de etkileşime girebilir. Aktive edilmiş IRS proteinleri bazı durumlarda çekirdeğe göç edebilir. Çekirdekte lokalize olan IRS proteinleri bazı aracı moleküllerle transkripsiyon faktörü gibi davranarak hücrede, c-myc, Twist1 ve Siklin D1 ekspresyon artışlarına neden olabilir (Görgişen ve ark., 2017).



Şekil 6. Standart olmayan IRS sinyalinin şematik gösterimi (Görgişen ve ark., 2017).

Transgenik ve knock-out fare tümör modellerinde IRS fonksiyonunun incelenmesi, kanserde ve tümör hücresi metabolizmasının düzenlenmesinde IRS fonksiyonu ile ilgili önemli ipuçları sağlamıştır. Fare meme bezinde IRS1'in aşırı ekspresyonu, meme bezinde ve tümörde büyümeye neden olmuştur (Shaw, 2011). Ayrıca fare hepatositlerinde IRS1'in aşırı ekspresyonu, DNA sentezinin artmasına ve karaciğer kütlesinin %25 oranında büyümesine neden olmuştur (Tanaka ve ark., 1997).

IRS knock-out fare modelleri üzerinde yapılan araştırmalar, bu proteinlerin biyolojik rollerinin ortaya konmasında oldukça önem taşımıştır. IRS1 knock-out fareler, normal farelerden %30 daha küçük doğmaktadır ve yaşamları boyunca kısa boylu kalırlar. Bu fareler insüline karşı direnç geliştirirler ancak normal pankreatik beta hücre sayılarını korurlar (Gorgisen ve ark., 2017).

IRS protein ailesi üzerinde yapılan çalışmalar genel olarak IRS1 ve IRS2 ekspresyonlarına yönelik yapılmıştır. Hem IRS1 hem de IRS2 ekspresyonunun karaciğer, pankreas ve prostat kanseri, malign plevral mezotelyomada arttığı rapor edilmiştir. Meme, yumurtalık ve medulloblastoma dahil diğer kanserlerde yalnızca IRS1 ekspresyonu değerlendirilmiş ve bunlarda da ekspresyon artışı gösterilmiştir (Mardilovich ve ark., 2009). Ancak kanserler içerisinde üzerinde en çok çalışılan kanser türü olan meme kanserinde, IRS1'in tümör progresyonu ile negatif bir ilişki olduğu gösterilmiştir. IRS1'in ekspresyonundaki düşüş ayrıca küçük hücreli olmayan akciğer kanserlerinde (NSCLC) de görülür ve bu ekspresyon düşüşü daha sık olarak skuamöz hücre karsinomlarında meydana gelir (Han ve ark., 2006).

Cantarini ve ark. (2006) karaciğer kanserinde IRS ailesinin üç üyesi IRS1, IRS2 ve IRS4'ün ekspresyon artışını gözlemlemişler, IRS4'ün ise yalnızca karaciğer kanserinde artış gösterdiğini tespit etmişlerdir. Son olarak, hem IRS2 hem de IRS5, berrak hücreli renal hücreli karsinomda gen ekspresyonu düzeyinde düzenlenir (Mardilovich ve ark., 2009).

Tablo 3. İnsan kanserinde IRS ekspresyonu (Mardilovich ve ark., 2009) revize edilmiştir.

Kanser Tipi	IRS Ekspresyonu	Özellikleri
Meme*	IRS1 ↑ IRS1 ↑ IRS1 ↓	<ul style="list-style-type: none"> • İyi diferansiye primer tümör • İyi prognoz – Nuklear IRS1 • Kötü diferansiye, ileri derece tümör
Hepatoselüler	IRS1 ↑ IRS2 ↑ IRS4 ↑	<ul style="list-style-type: none"> • mRNA/protein miktarı artışı • mRNA/protein miktarı artışı • mRNA miktarı artışı
Akciğer	IRS1 ↓	<ul style="list-style-type: none"> • Skuamöz hücreli karsinom
Medullablastom	IRS1 ↑	<ul style="list-style-type: none"> • Polyoma JCV-T antijeni ile nukleus lokalizasyonu
Mezotelyoma	IRS1 ↑ IRS2 ↑	<ul style="list-style-type: none"> • Malign plöral mezotelyomada mRNA artışı • Malign plöral mezotelyomada mRNA artışı
Over	IRS1 ↑	<ul style="list-style-type: none"> • Malign epitelial tümörlerde protein artışı
Pankreas	IRS1 ↑ IRS2 ↑	<ul style="list-style-type: none"> • mRNA artışı • Duktal benzeri kanser hücrelerinde mRNA/protein artışı
Prostat	IRS1 ↑ IRS2 ↑	<ul style="list-style-type: none"> • Tümörde ve metastatik odaklarda protein artışı • Myc ekspresyon artışıyla ilişkili protein artışı
Renal	IRS2 ↑	<ul style="list-style-type: none"> • Berrak hücreli karsinomda mRNA artışı

2.6. Glioblastoma Multiforme

İnsan glioması beyin veya omurilikte bulunur ve en sık görülen malign santral sinir sistemi tümörünü temsil eder (Huang ve ark., 2016). Glioma, birincil beyin tümörlerini tanımlamak için kullanılan genel bir terimdir ve köken aldıkları hücelere göre sınıflandırılır. Bu hücreler, astrositik tümörleri (astrozitom, anaplastik astrozitom ve glioblastom), oligodendrogliomalar, ependimomlar ve karışık gliomaları içerir. Bunlar, beyindeki tüm malign primer tümörlerin neredeyse %80'i ni oluşturan merkezi sinir sisteminin en sık görülen tümörleridir (Hanif ve ark., 2017).

Birincil beyin tümörleri, yetişkinlerdeki tüm kanserlerin %2'sinden daha azını (Sathornsumetee ve Rich, 2008), tüm primer beyin tümörlerinin %30'unu oluşturmaktadır (Sander ve ark., 2017). Gliomaların en malign formu olan Glioblastoma Multiforme (GBM) (Li ve ark., 2018), yetişkinlerde en sık görülen birincil beyin tümörüdür (Görgişen ve ark., 2019). Her yaşta görülebilmekle beraber olgular sıklıkla 45-75 yaş arasındadır. Ortalama tanı yaşı ise 46 ile 61 arasında değişmektedir. Çocukluk yaşlarında nadir görülmektedir. Erkeklerde kadınlara oranla daha fazla gözlenmektedir (Kalkan ve Atlı, 2015).

GBM, Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından evre IV astrozitom olarak sınıflandırılmaktadır (Louis ve ark., 2016). Her ne kadar GBM, 100.000 kişide 10'dan az insidansa sahip nadir bir tümör olsa da (Hanif ve ark., 2017), GBM hastalarının ortalama sağkalım süresi 14.6 aydır (Kraakstad ve Chekenya, 2010). Hemen hemen tüm hastalarda ölümle sonuçlanan tedavi edilemeyen bir hastalıktır (Wainwright ve ark., 2012). Sağkalım olasılığı tanıdan sonraki ilk yılda %57'dir ve yedi yıl içerisinde hastaların %99'unda nüks rapor edilmiştir. Bu nedenle GBM'nin şimdiye dek tedavi edilemez olarak kabul edilmesinin nedeni budur (Kristoffersen ve ark., 2014). Rezeksiyon, kemoterapi ve radyoterapi GBM için tedavi yöntemleridir (Huang ve ark., 2017). GBM tanısından sonra cerrahi rezeksiyonu takiben uygulanan adjuvan radyoterapi ve kemoterapi ile ortalama yaşam süresi 18-24 aya kadar uzatılabilmektedir (Alagoz, 2018).

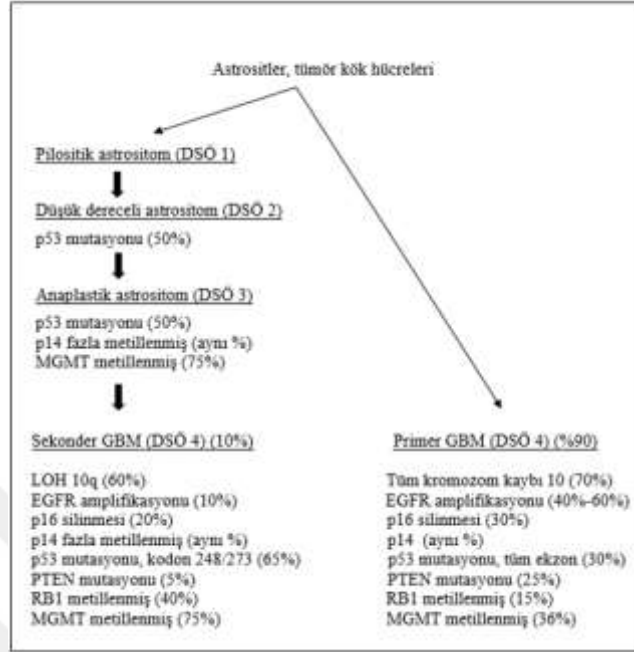
2.6.1. Primer ve Sekonder GBM'ler

Glioblastomlar, günümüzde moleküler temelde primer ve sekonder olarak iki gruba ayrılmaktadır (Durmaz ve Vural, 2007). Tanısı konmuş GBM vakalarının %90'ndan fazlası primer gliomlardır. Geri kalan %10'luk kısım ise düşük dereceli tümörlerden kaynaklanan sekonder gliomlardır (Urbańska ve ark., 2014). Primer GBM genellikle yaşlı kişilerde (60 yaş) gözlenir ve ortalama sağ kalım süresi 4-7 ay olarak bildirilmiştir (Kalkan ve Atlı, 2014). Sekonder glioma çoğunlukla ortalama yaşı 39 olan, daha yavaş gelişen ve daha iyi prognozlu kişilerde görülür (Urbańska ve ark., 2014).

Primer glioblastomların genetik yapısı, sekonder glioblastomlardan farklıdır. Primer glioblastomlarda sıklıkla epidermal büyüme faktörü reseptörü (*EGFR*) ve fosfataz ve tensin homoloğu (*PTEN*) genlerinde ve ekspresyonlarında değişiklikler bulunurken, sekonder glioblastomlarda *TP53* genlerinde mutasyon görülür (Ohgaki ve Kleiuhes, 2007). Primer glioblastomlar, *EGFR* amplifikasyonu ve aşırı ekspresyonu, *PTEN* mutasyonu, *p16* delesyonu, *MDM2* amplifikasyonu ve aşırı ekspresyonu ve kromozom 10 üzerindeki heterozigosite kaybı (LOH) ile karakterize edilir (Kleiuhes ve ark., 2002).

p16, *pRB1* genlerinde mutasyonlar, siklin bağımlı kinaz 4/6 (CDK) ve (*MDM2*) genlerinin amplifikasyonu, kromozom 10 delesyonları sekonder GBM'de saptanmış genetik değişikliklerdir. *TP53* yolağı sekonder glioblastomanın gelişiminde kritik bir rol oynamaktadır. *TP53* geni 17p31.1'de lokalize ve hücre siklusu, DNA hasarına hücrel yanıt, hücre ölümü ve hücre farklılaşmasını içeren birçok hücrel süreçte önemli rolü olan bir protein kodlamaktadır (Kalkan ve Atlı, 2014). Tablo 4'te primer ve sekonder glioblastomaların başlangıç ve ilerlemesindeki bazı genetik değişiklikler verilmiştir.

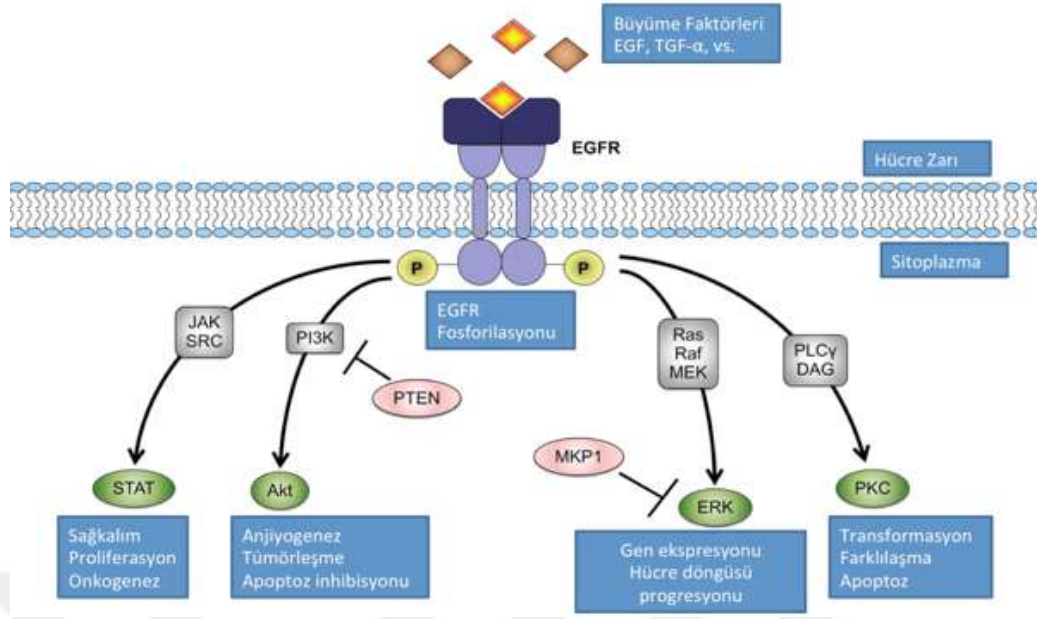
Tablo 4. Primer ve sekonder GBM başlangıç ve ilerlemede majör genetik değişiklikler (Kanu ve ark., 2019).



2.6.2. GBM'lerde moleküler mekanizma

EGFR' ler ve trombosit kaynaklı büyüme hormonu reseptörü (PDGFR), GBM' lerde eksprese edilen intrinsik tirozin kinaz aktivitesine sahip en yaygın reseptör tirozin kinazlardır (RTK) (Kraakstad ve Chekenya, 2010). *EGFR* geni, 7p12.1'de lokalizedir. Primer glioblastomda aşırı eksprese edilir, çoğaltılır ve çok nadiren mutasyona uğrar. Moleküler taramalar, *EGFR* gen amplifikasyonlarının glioblastomlarda yaklaşık %35-70 oranında gözlemlendiğini ortaya çıkarmıştır (Lopez-Gines ve ark., 2010).

EGFR, RAS, mitojenle aktiveleştirilen protein kinaz (MAPK) ve fosfatidilinozid-3-kinaz (PI3K) / AKT yollarının aktivitesini artırır (Sathornsumetee ve Rich, 2008). EGFR gen amplifikasyonu ve aşırı ekspresyonu, primer glioblastomada sık görülen genetik değişikliklerin başında gelir. EGFR ve EGFR-ilişkili hücre yolaklarında meydana gelen değişimler, tümör büyümesini, migrasyonu ve anjiyogenezi artırıcı etki gösterir (Erbayraktar ve ark., 2015).

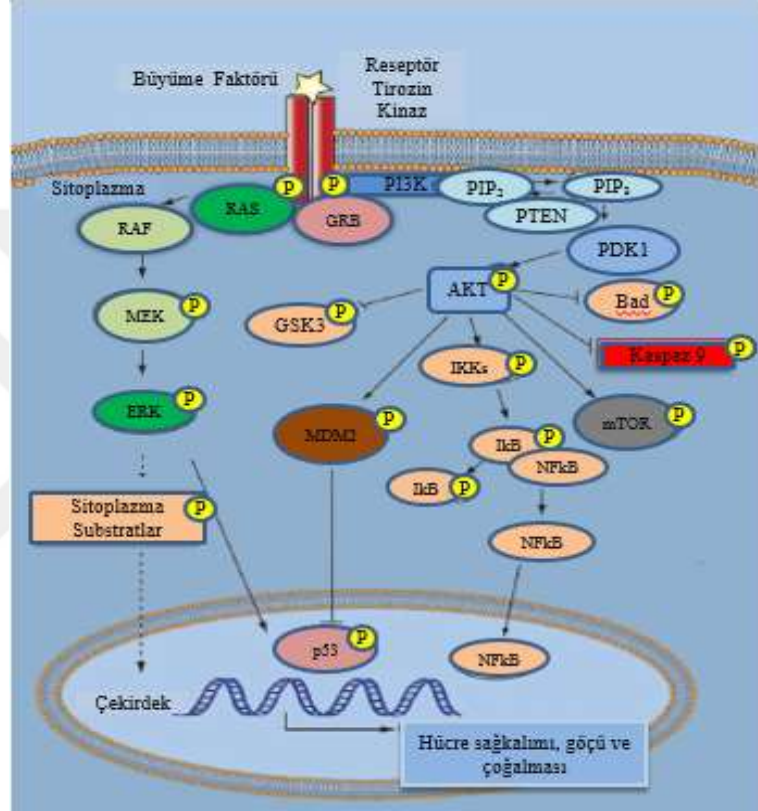


Şekil 7. EGFR sinyal yolağı (Gülaçar, 2017).

EGFR veya PDGFR kaynaklı Ras aktivasyonu, GBM'lerin ortak bir özelliğidir. EGF veya PDGF'nin bu reseptörlere bağlanması, hücre içi tirozin rezidülerinin otofosforilasyonuna ve Ras'ın adaptör proteinleri ile etkileşimi yoluyla aktivasyonuna yol açar. Ras aktivasyonu, Raf'ı hücre zarı için alır ve ardından sırasıyla Src kinazları veya PKC ile tirozin veya serin / treonin rezidülerinin fosforilasyonunu sağlar. Bu, daha sonra MAPK'lar ve ERK1 ve 2 kinazlar aracılığıyla aşağı akış sinyallerini başlatır (Krakstad ve Chekenya, 2010). Bu da şekil 7'de gösterildiği gibi gen ekspresyonu, hücre döngüsü, farklılaşma, apoptoz gibi hücresel süreçleri aktive eder.

GBM hücrelerindeki diğer önemli yolak fosfatidilinositol 3 kinaz (PI3K) yolağıdır. PI3K, RTK'ler üzerindeki fosfotirozin rezidülerine bağlanarak plazma zarına transloke edilir. Aktive PI3K, fosfatidilinositol-3,4 difosfattan (PIP2) fosfatidilinositol-3,4,5 trifosfat (PIP3) üretir. PIP3 birikimi, fosfoinositide bağımlı kinaz 1 (PDK1) ve AKT'yi plazma membranına alır. AKT, iki önemli düzenleyici bölgede, Thr308 (PDK1 ile) ve Ser473'te (mTOR kompleksi 2 ile) fosforilasyon yoluyla aktive edilir. Aktive edilmiş AKT daha sonra nükleer faktör κ B'nin (NF κ B) nükleer translokasyonunu kolaylaştırarak sağkalımı artırır, bu da daha sonra transkripsiyonel olarak hücrenin hayatta kalmasına aracılık eden ve proliferasyonu tetikleyen eden genleri aktive eder (Krakstad ve Chekenya, 2010).

10q23.3'te bulunan *PTEN* geni, protein fosfataz ve 3-fosfoinositol fosfataz aktivitelerinin fonksiyonunda önemli olan protein tirozin fosfatazın katalitik bölgesine homoloji olan merkezi bir alanı kodlar (Ohgaki ve Kleihues, 2007). *PTEN*, PIP₃'ü PIP₂'ye fosforile ederek PI3K sinyalini sonlandırır. PI3K aktivitesini negatif olarak düzenleyen bir tümör baskılayıcı olarak işlev görür. *PTEN* geninin GBM'lerdeki mutasyonları, PIP₃ seviyelerinin artmasına neden olur (Krakstad ve Chekenya, 2010).



Şekil 8. GBM'lerde hiperaktif reseptör tirozin kinazlar (Krakstad ve Chekenya, 2010).

GBM'de AKT, PI3K, mTOR ve RAS yollarının ortak noktasına baktığımızda IRS1 proteini karşımızda çıkmaktadır. Ayrıca beynin tüm metabolik ve elektriksel fonksiyonlarında glukozu temel enerji kaynağı olarak kullanması IRS1 proteininin GBM gelişiminde önemli rol oynayabileceği düşüncesini akla getirmektedir. Bu noktalardan yola çıkıldığında, IRS1-GBM ilişkisini ortaya koyan çalışmalar oldukça sınırlıdır. GBM hastalarında, IRS1 mutasyonlarının etkili olabileceği Gülaçar ve arkadaşları tarafından ileri sürülmüştür (Gülaçar, 2017). Dolayısıyla IRS1 sinyal iletim ağının GBM gelişimindeki etkisinin ortaya çıkarılması oldukça önem taşımaktadır.

Tüm bu bilgiler ışığında, çalışmamız kapsamında IRS1 ekspresyon artışının, IRS1 sinyal yolağı elemanları aracılığıyla GBM hücrelerinin sağkalımını arttırdığını düşünerek, in vitro ortamda GBM hücrelerinde IRS1 bağımlı sinyal yolağının rolünü aydınlatmayı amaçladık.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kompetan Hücre 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 çözdürülüp otoklavlandı.

2. 50 mM CaCl₂ (Merck) /10 mM Tris (pH:7.4)

3. %100 Gliserol (Merck)

Uygulama

- 2 adet 50 ml'lik falkon tüplere 15'er ml LB sıvı besiyeri kondu.
- Bu tüplerden birine 20 µl DH5α E. coli suşu ilave edildi. Diğer tüp ise negatif kontrol olarak kullanıldı.
- Örnekler 37 °C'de çalkalamalı etüvde gece boyunca inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon sonunda bakterilerin ürediği tüp etüvden çıkarılarak buzda 30 dk bekletildi ve sonrasında 4000 rpm' de 5 dk boyunca santrifüj edildi.
- Süpernatant uzaklaştırıldı ve pelet üzerine daha önce soğutulmuş 50 mM CaCl₂ (Merck) /10 mM Tris (pH:7.4)'den 25 ml ilave edilerek homojenize hale getirildi.
- Karışım 15 dakika buz üzerinde bekletildi. 4000 rpm'de 5 dk boyunca santrifüj edildi.
- Pelet üzerine 9 ml 50 mM CaCl₂ (Merck) /10 mM Tris (pH:7.4) çözeltisi ve 1 ml %100 gliserol içeren yeni bir çözelti hazırlandı ve buza kondu.
- Bu işlemten sonra, buzda bekletilen ve kompetan hücreleri içeren tüpler tekrar 2000 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj edildi.
- Hazırlanan örnek, buzda soğutulmuş 1.5 ml'lik ependorf tüplere 200'er µl olacak şekilde bölündü.
- Ardından örnekler -80 °C'de depolandı.

3.2. E. coli DH5 α Suşuna Plazmid Transformasyonu

- -80 °C'den çıkarılan kompetan hücreler buzda eritildi.
- Önceden soğutulmuş yeni ependorfta 75 μ l kompetan hücreden ve 8 μ l vektörden (pcDNA3.1 Flag tagged insan IRS1 ekspresyon vektörü) alınarak karıştırıldı.
- Örnek, buz üzerinde 30 dk bekletildi.
- Süre sonunda örnek 42 °C'de 1 dk boyunca ısı bloğunda bekletildi ve sonrasında tekrar buza alınarak 1 dk bekletildi.
- Örnek üzerine önceden 37 °C'ye getirilmiş 500 μ l amfisilinsiz LB besiyeri eklendi ve karışım 37 °C'de çalkalamalı etüvde 1 saat inkübe edildi.
- İnkübasyon sonunda karışım, içerisinde 10 ml LB sıvı besiyeri ve 50 mg/ml amfisilin içeren 2 adet 15 ml'lik falkona eşit miktarda bölündü ve gece boyu 37° C'de çalkalamalı etüve bırakıldı.

3.3. E. coli Hücrelerinden Plazmid İzolasyonu

Kullanılan Solüsyonlar:

1. Resüspaniyon Solüsyonu
2. Lizis Solüsyonu
3. Nötralizasyon Solüsyonu
4. Yıkama solüsyonu (35 ml %96'lık etanol eklendi)
5. Elüsyon Solüsyonu (10 mM Tris-HCl, pH 8.5)

Plazmid izolasyonu, Thermo Scientific GeneJET Plazmid Miniprep Kit ile aşağıdaki protokole göre yapıldı;

- 50 mg/ml amfisilin içeren 10 ml besiyerinde gece boyu üretilen transforme bakterilerin bulunduğu falkon tüpler 4500 rpm'de 10 dk santrifüj edildi.
- Süpernatant kısımları atıldı.
- Her tüpe 500 μ l resüspaniyon solüsyonu eklendi.

- Vortekslenerek homojenize edildi.
- Dört adet 1.5 ml'lik ependorf tüpe falkonlardaki bakterilerden 250'şer µl eklendi.
- Her bir ependorf tüpe 250'şer µl lizis solüsyonu eklendi ve solüsyon viskoz ve kısmi olarak şeffaf hale gelene kadar 4-6 kez alt üst edildi.
- Bunun üzerine 350 µl nötralizasyon solüsyonu eklendi ve karışım hemen 4-6 kez iyice alt üst edildi.
- Ardından 12000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi.
- Süre sonunda üst faz spin kolonlara aktarıldı.
- 12000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi ve spin kolonun altındaki sıvı uzaklaştırıldı.
- Ardından 500 µl yıkama solüsyonu eklenerek DNA dışındaki bağlı maddeler silika membrandan uzaklaştırıldı.
- 12000 rpm'de 30-45 sn santrifüj edildi ve kolonun altındaki sıvı boşaltıldı.
- Tekrar 500 µl yıkama solüsyonu eklenerek 12000 rpm'de 45 sn santrifüj edildi.
- Spin kolonun alt bölümü içindeki sıvı ile beraber atıldı ve plazmid DNA'nın bulunduğu spin kolon yeni ependorf tüplere alındı.
- Plazmid DNA'ları spin kolondan sökmek için uzaklaştırmak için 50 µl elüsyon tamponur spin kolon üzerine eklendi.
- 12000 rpm'de 1-2 dk santrifüj edilerek plazmid DNA'nın silika membrandan ayrılarak ependorf tüplere geçmesi sağlandı.
- Spin kolon atıldı ve plazmid DNA'nın bulunduğu tüpün ağzı parafilmlelenerek -20 °C'de saklandı.
- DNA miktar ve kalitesi nanodrop aracılığıyla belirlendi.

3.4. Hücre Kültürü

Çalışmamızda, stoklarımızda mevcut olan Glioblastoma Multiforme'ye ait U-87 MG hücre hattı kullanıldı. Hücrelerin tamamı %1 L-glutamin, esansiyel olmayan amino asitler, sodyum piruvat, %10 Fetal Bovin serum (FBS-biowest Cat. no: S1810-100) ve %1 PSA (Penisilin/Streptomisin/Amfoterisin) (BI-03 033 1B) eklenmiş DMEM (Dulbecco's modified eagle medium-biowest Cat. no: L0064-500) içinde; %5 CO₂'lik atmosfer, %95 nem ve 37 °C'lik inkübatörde (Mettler) monolayer kültür olarak çoğaltıldı.

3.4.1. U-87 MG hücrelerinin çözündürülmesi

Çözdüreceğimiz U-87 MG hücreleri için taze besiyeri oda sıcaklığında 30 dk bekletilerek hazır bulunduruldu.

- Süre sonunda güvenlik kabini (MetiSafe) içinde steril bir 15 ml'lik falkon tüpe 5 ml besiyeri bırakıldı.
- Azot tankından U-87 MG hücrelerinin bulunduğu kriyo tüp çıkarıldı. Alkollenerek kabine alındı.
- Elle bir miktar ovuşturuldu ve ardından 15 ml'lik falkondan bir miktar besiyeri alınarak hücrelerin bulunduğu tüpe eklendi.
- Tüp içerisinde donmuş halde tabana yapışmış olarak bulunan hücreler, tabandan ayrılıncaya kadar pipetaj yapıldı.
- Tabandan ayrılan hücreler 15 ml'lik falkonun içinde bulunan besiyeri üzerine eklendi ve 3-4 kez alt üst edilerek hücrelerin iyice erimesi sağlandı.
- Hücreler 2000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi.
- Steril 100 mm'lik bir petriye 10 ml besiyeri kondu.
- Falkondaki süpernatant kısım atıldı ve petriden bir miktar besiyeri alınarak pelet üzerine eklendi.
- Hücreler iyice pipetaj yapıldıktan sonra falkon tüpten alınarak petrideki besiyerine eklendi ve %5 CO₂'li inkübatöre kaldırıldı.

3.4.2. U-87 MG hücrelerinin beslenmesi

Hücreler, %10 FBS ve %1 PSA içeren DMEM besiyeri ile invert mikroskopta morfolojik olarak incelendikten sonra hücrenin durumuna göre iki gün aralıklarla beslendi. Bunun için;

- İnkübatörde bulunan hücreler çıkarılarak güvenlik kabinine alındı.
- Petride bulunan besiyerleri pipetörle dikkatli bir şekilde çekilerek ortamdan uzaklaştırıldı.
- Bunun üzerine 5 ml kadar 1XPBS (Phosphate Buffer Saline) eklendi ve petrinin her tarafına yayılması sağlandıktan sonra ortamdan uzaklaştırıldı.
- Petriye 10 ml yeni besiyeri eklenerek etüve kaldırıldı.

3.4.3. U-87 MG hücrelerin dondurulması

%10 DMSO (Dimetil Sülfoksit): Dondurma solüsyonu 9:1 FBS ve DMSO olacak şekilde hazırlandı.

Uygulma

- Petrideki besiyeri pipetör ile dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldı.
- Bunun üzerine 5 ml 1XPBS eklenerek yıkandı.
- Ardından pipetör ile PBS uzaklaştırılarak üzerine 400 µl tripsin eklendi.
- Petri, 37 °C’de inkübasyona alındı ve burada 2-3 dk bekletildi.
- Etüvden çıkarılan hücreler, tripsinle homojenize edildi.
- 15’lik bir falkon içerisine 5 ml besiyeri eklendi ve tripsin ile petriden ayrılan hücreler bu falkona eklendi.
- 2000 rpm’de 5 dk santrifüj edildi.
- Süpernatant uzaklaştırıldı. İçerisine pipetör ile daha önce hazırlanan %10’luk DMSO-FBS karışımı olan dondurma solüsyonundan 4 ml eklendi ve iyice pipetaj yapıldı.
- Dört adet kriyo tüp hazırlandı ve her birine bu solüsyondan 1’er ml konuldu.
- Tüpler, kriyo tüp dondurma kutusuna alındı.
- Hücreler ertesi gün azot tankına transfer edildi.

3.4.4 U-87 MG hücrelerinin pasajlanması

İnvert mikroskopta incelenen hücrelerin yoğunluğu ortalama %70-80’e ulaştığında hücreler pasajlandı. Bunun için;

- Petride bulunan besiyeri pipetör ile dikkatlice uzaklaştırıldı.
- Üzerine pipetör ile 5 ml yıkama solüsyonu (1XPBS) eklendi.
- PBS tekrar pipetör ile uzaklaştırıldı.
- Üzerine 500 µl tripsin eklendi ve tripsinin her tarafa homojen olarak dağılması sağlandı.
- Tripsinin etkisini daha iyi gösterebilmesi için 3-4 dk etüvde bekletildi.

- Tabana yapışmış olan hücrelerin ayrılması için petride bulunan tripsin ile pipetaj yapıldı.
- Yeni bir petriye 10 ml kadar besiyeri eklendi.
- Yüzeyden ayrılan hücrelerden 200 µl alınarak yeni petriye alındı ve inkübe edildi.

3.4.5. U-87 MG hücrelerine plazmid transfeksiyonu

- U-87 MG hücreleri transfeksiyon işleminden bir gün önce, Tripsin-EDTA (biowest Cat no. L0932-100) ile %70-%80 yoğunluk oranına sahip olmak amacıyla pasajlandı.
- Transfeksiyon işlemi için transfeksiyon solüsyonu hazırlandı. Bunun için 1.5 ml'lik bir ependorf tüpe 20 µl plazmid DNA, 780 µl serumsuz besiyeri ve 15 µl transfeksiyon reagent (Thermo Scientific TurboFect) eklenerek iyice pipetaj edilmek suretiyle karıştırıldı.
- Bu karışım laminar kabinde 20 dk bekletildi.
- Süre sonunda etüvdeki kontrol hücrelerinin bulunduğu petri kabı çıkarıldı. Bunun üzerine ependorf tüpte bulunan solüsyonun tümü 1000' lik pipetle alınarak 10-15 cm yükseklikten hücrelerinin üzerine damlatıldı ve ardından gece boyu inkübasyona bırakıldı.

3.5. U-87 MG Hücrelerinin Sayımı

Hücre sayımı için hematositometre metodu kullanıldı. Bunun için;

- Besiyeri uzaklaştırılan hücreler 1XPBS ile yıkandı ve üzerine 500 µl tripsin ilave edilerek hücrelerin petri tabanından ayrılması sağlandı.
- Petri tabanından ayrılan bu hücreler içerisinde 5 ml besiyeri bulunan 15 ml'lik bir falkon tüpe aktarılarak karıştırıldı.
- Stoktan alınan hücreler 1/10 oranında besiyeriyle dilüe edildi.
- Buradan 100 µl alınarak thoma lamı üzerine bırakıldı. Lamel, thoma lamının tam ortasına gelecek şekilde yerleştirildi.

- Merkez alana düşen hücreler sayılarak toplam hücre sayısı aşağıdaki formülle belirlendi.

- Hücre Sayımı (ml) =
$$\frac{A \times SF \times 10^4}{\text{Lam üzerinde sayılan alan}}$$

A : Bir karede sayılan hücre adedi

SF : Seyreltme faktörü

10⁴ :Standart sonuç elde etmek için kullanılan bir değişmez.

- Bu formüle göre 96 kuyucuklu bir plakaya her kuyucuğa 5000 hücre düşecek şekilde hücre ekimi yapıldı.
- Hücrelerin plaka tabanına yapışması ve büyümesi için bir gün boyunca etüvde bırakıldı.

3.6. MTT (Hücre Canlılık) Testi

MTT (5 mg/ml) Metiltiazol difenil tetrazolium (MTT, AppliChem, A2231): Steril ortamda 0,05 g MTT, 10 ml 1XPBS içerisinde çözüldü.

Uygulama

- Çok kanallı pipet aracılığıyla her kuyuya 20 µl MTT solüsyonu eklendi
- Hücreler etüvde 4 saat inkübe edildi.
- Süre sonunda besiyeri uzaklaştırıldı.
- Çok kanallı pipet aracılığıyla her kuyuya 100 µl DMSO eklendi.
- 96 kuyulu petri, 5 dk boyunca karıştırıldıktan sonra renk değişimi spektrofotometre cihazında 540-690 nm dalga boyunda okutuldu.

3.7. U-87 MG Hücrelerinin İnsülin ile Muamele Edilmesi

- U87-MG hücrelerinin bulunduğu besiyeri uzaklaştırıldı.
- Hücreler 1XPBS ile yıkandı.
- Tripsin ile petriden ayrılan hücreler, 6 kuyulu plakalara eklendi.

- Gece boyu etüvde bekletildi.
- Süre sonunda 6 kuyulu plakalardaki besiyeri uzaklaştırılarak 1XPBS ile yıkandı.
- Hücrelere serum içermeyen besiyeri verildi.
- Hücreler etüvde 14 saat boyunca serumsuz ortamda bekletildi.
- Süre sonunda ilgili gruplar, 15 dk ve 30 dk aralıklarla 100 ng/ml konsantrasyonunda insülin ile muamele edildi.
- İnsülin ile muamele sonunda hücreler tekrar 1XPBS ile yıkandı.
- Hücreler üzerine lizis tamponu eklendi.
- Hücre kazıyıcısı ile hücreler kaldırılarak ependorf tüplere alındı.
- Hazırlanan lizatlar -80 °C'ye kaldırıldı.

3.8. Protein Lizatlarının Hazırlanması

Triton-X Lizis Tamponu: 100mM 4.199 g Sodyum Florür (NaF-Sigma), 50mM 13,015 g Hepes (Sigma), 150mM 8.766 g Sodyum Klorür (NaCl-Sigma), 1mM 0.09521 g Magnezyum Klorid (MgCl₂-Sigma), 1mM 0.3804 g EGTA (Sigma), 1mM 0.1742 g PMSF (Sigma), 1mM 0.1839 g Sodyumortovanadat (Sigma), 10 mM 4.461 g Sodyum-pirofosfat (Sigma), tartılıp 500 ml bidistile su içinde çözüldü. 10 mg/ml'lik stoktan 1 ml Leupeptin (Sigma), 10mg/ml'lik stoktan 1 ml Aprotinin (Sigma), 10 mg/ml stoktan 100 µl Pepstatin A (Sigma), %10'luk gliserol'den 100 ml ve 12 ml Triton-X-100 (Sigma) eklendikten sonra son hacim 1 litre olacak şekilde bidistile su ile tamamlandı. 50 ml'lik falkonlara bölünerek -20 °C'de saklandı.

Uygulama

- Lizis tamponu -20°C'den çıkarılarak buz üzerinde erimeye bırakıldı.
- İnsülin ile muamele edilmeyen hücrelerin besiyeri uzaklaştırıldı.
- Hücreler 1'er ml 1XPBS ile yıkandı.
- Daha sonra her kuyuya 250 µl lizis tamponu eklendi.
- Hücre kazıyıcısı ile tabana yapışmış olan hücreler kaldırıldı ve iyice pipetaj yapıldıktan sonra ependorf tüpe aktarıldı.
- Aynı işlemler insülin ile 15 dk ve 30 dk muamele edilmiş olan hücreler için de uygulandı.

- Lizatların bulunduğu ependorf tüpler parafilmlenerek Bradford analizi yapılmak üzere -80 °C’de saklandı.

3.9. Protein Miktar Tayini (Bradford Analizi)

Stok BSA (BioShop CAS. 9048-46-8) (10 mg/ml): 50 mg BSA, 5 ml steril suda iyice çözüldü ve stok -20 °C’de saklandı.

Bradford Reaktifi (BioRad 500-0006): Bradford reaktifi steril su ile 1:5 oranında sulandırıldı.

Uygulama

- U-87 MG hücre lizatları -80 °C’den çıkarılarak buzda erimeye bırakıldı.
- Eridikten sonra iyice vortekslenerek soğutmalı santrifüjde 10 bin rpm’de 1 dk. santrifüj edildi.
- Santrifüj sonucunda süpernatant yeni bir ependorf tüpe aktarıldı.
- 10 mg/ml stok BSA solüsyonundan 1 mg/ml olacak şekilde sulandırıldı.
- 1 mg/ml BSA 0.2, 0.5, 1, 3, 5, 7, 9, 11 µl miktarlarında üç tekrarlı olacak şekilde 96 kuyulu petriye dağıtıldı.
- Aynı şekilde protein lizatları da vortekslendikten sonra 1’er µl alınarak üçerli tekrar olacak şekilde kuyucuklara eklendi.
- Standart ve örnek üzerine 100 µl Bradford Reaktifi eklendi.
- Ardından örnekler florometre cihazında 595 nm dalga boyunda okutuldu ve konsantrasyonlar excel aracılığıyla belirlendi.

3.10. Western Blot

Kullanılan Solüsyonlar:

Resolving (Ayrıştırma) Tamponu: 1,5M TrisBase pH: 8.8. 1 lt’si için 181,64 gr TrisBase olacak şekilde 500 ml hazırlandı. 90,82 g TrisBase tartıldı. 300 ml distile H₂O’da çözüldü ve hacim 500 ml’ye tamamlandı. Solüsyonun pH’ sı 8.8’e ayarlandı.

Stacking (Yükleme) Tamponu: 0,5M TrisBase pH:6,8. 1 lt' si için 60,5 g TrisBase olacak şekilde 500 ml hazırlandı. 30,25 g TrisBase tartıldı. 200 ml distile H₂O'da çözüldü ve hacim 500 ml'ye tamamlandı. Solüsyonun pH'sı 6.8'e ayarlandı.

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

Running Buffer (Yürütme) (1X): 100 ml 10X Running Buffer üzerine 900 ml distile su eklendi ve karıştırıldı.

10XPBS (pH 7.4): 80 g NaCl, 2 g KCl, 14,4 gr Na₂HPO₄, 2,4 g KH₂PO₄ tartıldı. 800 ml distile su içerisinde çözüldü. Çözelti pH' sı 7.4' e ayarlanarak son hacim 1000 ml' ye tamamlandı.

1XPBST (1 lt için): 10X PBS' ten 100 ml ve distile sudan 900 ml alınarak karıştırıldı. Bu çözelti üzerine 1ml Tween 20 (Merck 8.22184.1000) ilave edildi.

SDS Yüklemeye Tamponu: 1 ml gliserol, 3 ml % 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-merkaptotanol (Sigma M3148) ilave edildi.

%10 Amonyum persülfat (APS): 0,1 g APS (Sigma A3678) 1.5 ml'lik bir ependorf tüp içerisine alındı. Üzerine 1ml distile su eklendi. İyice vorteksenerek çözülmesi sağlandı ve 4 °C'de saklandı.

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

Akrilamid/Bisakrilamid (100 ml için 29/0.8): Solüsyon 500 ml hazırlandı. Bunun için 145 g Akrilamid (Merck 8.00830.1000) ve 4 g Bisakrilamid (Merck 2610) tartıldı. Üzerine 200 ml distile su eklenerek karıştırıcıda iyice çözünmesi sağlandı. Hacim 500 ml'ye tamamlandı.

3.10.1. Jelin hazırlanması

Aşağıdaki tabloda %10'luk jel hazırlama protokolü uygulandı.

Tablo 5. Western Blot jel hazırlama protokolü

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
%APS	0.3ml	0.3ml	0.3ml	0.3ml	%APS	50µl	100µl
Temed	30µl	30µl	30µl	30µl	Temed	5µl	10µl
Toplam	30ml	30ml	30ml	30ml	Toplam	5ml	10ml

3.10.2. Protein lizatlarının hazırlanması

Stacking Jel donmaya bırakıldığı sırada protein lizatları hazırlanmaya başlandı. -20 °C'de muhafaza edilen ve daha önce miktar tayini yapılmış proteinler -20 °C'den çıkarıldıktan sonra buz üzerinde erimeye bırakıldı. Bu arada ısıtıcı 95 °C'ye ayarlandı. Buzda eriyen örnekler vortekslendi. İlgili tüplere daha önce Bradford Assay ile belirlenen miktarlarda örnek ve öncesinde bu miktarların yarısı kadar β-merkaptoetanol içeren SDS yükleme tamponu konularak tekrar vortekslendi. Örneklerin bulunduğu tüpler daha önce 95 °C'ye ayarlanmış ısıtıcıya alındı ve burada 5 dk bekletildi. Isıtıcıda bulunan bu örnekler bu süre zarfında 1-2 kez vortekslenerek tekrar ısıtıcıya alındı. Süre sonunda ısıtıcıdan alınan örneklere mikrosantrifüj cihazında kısa süreli bir spin yapıldı.

3.10.3. Örneklerin jele yüklenmesi ve jelde yürütülmesi

Örneklerin poliakrilamid jele yüklenmesi için öncelikle jele yerleştirilmiş olan taraklar dikkatli bir şekilde çıkarıldı. Oluşan kuyucuklarda var olan kabarcıklar, bu kuyucuklara distile su eklenip hızlı bir şekilde silkelemek suretiyle uzaklaştırıldı. Jel, yürütme tankına alınarak üzerine yürütme solüsyonu eklendi. Yükleme pipet uçları aracılığıyla ilk kuyucuğa 6 µl marker, sonraki kuyucuklara ise Bradford Assay ile

belirlenen miktarlarda örnek yüklendi. Jele yüklenen örnekler stacking jeli geçene kadar 60 voltta, resolving jelde ise 80 voltta yürütüldü (Biorad güç kaynağı). Yürütme işlemi sonrası proteinlerin PVDF membrana transfer aşamasına geçildi.

3.10.4. Proteinlerin jelden PVDF membrana transferi

Örnekler yürütüldükten sonra transfer aşaması için transfer solüsyonu hazırlandı. Bu solüsyon içerisine transfer için kullanılacak olan sünger, whatman kağıdı, PVDF membran konularak ıslatıldı. Yürütme işlemi sonucu örneklerin bulunduğu camlar yürütme tankından çıkarıldı. Bir miktar musluk suyuyla muamele edildi. Ardından cam, düz bir zemin üzerine alınarak bir ayırıcı yardımıyla kalın ve ince camlar birbirinden ayrıldı. Bu camlar arasında bulunan jelin stacking kısmı kesilerek atıldı. Transfer aparatının siyah kısmına sırasıyla transfer tamponunda ıslatılmış bir sünger, whatman kağıdı (Sigma Z691011), örneklerin yürütüldüğü jel, saf metanolde ıslatılmış PVDF membran (Millipore IPVH00010) yerleştirildi. Bunun üzerine tekrar bir whatman kağıdı ve bir sünger yerleştirildi. Bu işlemler esnasında her seferinde oluşan hava kabarcıkları silindir bir çubuk yardımı ile uzaklaştırıldı. Ardından bu kaset transfer cihazına yerleştirildi. Üzerine transfer solüsyonu eklendi. Transfer cihazı, içerisine buz eklenmiş bir kutuya konularak gece boyu 40 voltta transfer işlemi gerçekleştirildi.

3.10.5. PVDF membranın işaretlenmesi

Gece boyu transferde bekletilen örneklerin bulunduğu kaset, sonraki gün transfer cihazından çıkarıldı. Blotlama işlemi için membran jelden ayrıldı. Metanol içerisine konuldu. Metanolden çıkarılan ve örneklerin bulunduğu membranın ön yüzü işaretlendi. Sonrasında PBST-BSA (1X PBS, %0.1 Tween-20, %1 BSA) solüsyonunda 1.5 saat bloklandı. Ardından bu solüsyon atıldı ve membran üzerindeki markır referans alınarak protein büyüklüğüne göre kesildi. Bunun ardından, PBST-BSA içinde hazırlanan primer antikorunun 1/1000 dilüsyonu ile gece boyu +4 °C'de çalkalayıcı de karıştırıldı. Ertesi gün primer antikor uzaklaştırıldı ve blot, PBST (1X PBS, %0.1 Tween-20) ile 15'er dakika aralıklarla 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 1,5 saat oda sıcaklığında yapıldı. Sekonder antikorun uzaklaştırılmasının ardından blot PBST ile 15'er dk aralıklarla iki kez yıkandı.

3.10.6. PVDF membranın görüntülenmesi

Kullanılan solüsyonlar

1. Western ECL Reaktifi (BIO-RAD)

- Peroksid solüsyonu (Cont no. 102030888)
- Luminol/enhancer solution (Cont no. 102030889)

1 ml peroksid solüsyonu ve 1 ml de luminol enhancer solüsyonu alınarak 15'lik bir falkon tüpe konuldu. İyice vortekslendi.

2. Developer Röntgen Banyo Solüsyonu (Naturel)

- **Solüsyon A (pH. 10-13):** Hidrokinon 112 g/Lt, Potasyum Hidroksit 205 g/Lt, Sodyum Metabisülfid
- **Solüsyon B (pH. 2-5):** Fenidon 24 g/Lt, Dietilen glikol 800 g/Lt, Benzotriazol 8 g/Lt, Asetik Asid 84 g/Lt
- **Solüsyon C (pH. 4-7):** Glutaraldehid 156 g/Lt, Sodyum Metabisülfid 153 g/Lt

1 lt olarak hazırlandı. 700 ml musluk suyuna 250 ml Solüsyon A eklendi. İyice karıştırıldıktan sonra 25 ml Solüsyon B ve 25 ml de Solüsyon C eklenerek karıştırıldı.

3. Fixer Röntgen Banyo Solüsyonu (Natürel)

- **Solüsyon A (pH. 5-7):** Ammoniumtniosulphate 720 g/Lt, Sodyum Metabisülfid 40 g/Lt, Asetic Acid 55 gr/Lt
- **Solüsyon B (pH. 0-2):** Asetik Asid 30 g/Lt, Aliminyum Sülfat 350 g/Lt

1 lt olarak hazırlandı. 700 ml musluk suyu üzerine 250 ml Solüsyon A eklendi. İyice karıştırıldı. Bunun üzerine 250 ml Solüsyon B eklenerek karıştırıldı.

Uygulama

Sekonder antikorun yıkama işleminden sonra görüntüleme işlemine geçildi. Bunun için ECL reaktifi (Biorad) kullanıldı. 1 ml peroksid solüsyonu ve 1 ml de luminol enhancer solüsyonu alınarak 15 ml'lik bir falkon tüpe konuldu. İyice vortekslendi. Membran düz bir zemin üzerine alındı. Membranın üzerini tamamen kaplayacak şekilde bu solüsyon ilave edildi ve 5 dk bekletildikten sonra membran üzerindeki solüsyon

uzaklaştırılarak bir kaset içerisine konuldu. Karanlık odada kemilüminasa duyarlı film (Kodak Medical X-ray Film), membranın üzerine konarak 1-2 dk. bekletildi. Bu süre sonunda film, önce developer solüsyonuna konarak bantlar gözükene kadar bekletildi. Bantlar gözükmeye başladıktan sonra bu solüsyondan çıkarılıp suya, ardından fikser solüsyonuna alınarak burada da 1-2 dk bekletildi. Bu süre sonunda film çıkarılarak tekrar suya konulmak suretiyle görüntüleme gerçekleştirildi.

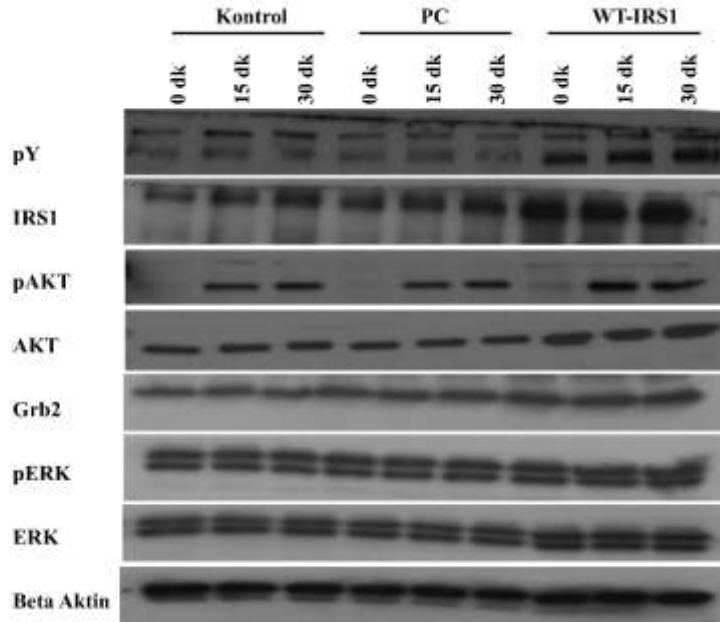


4. BULGULAR

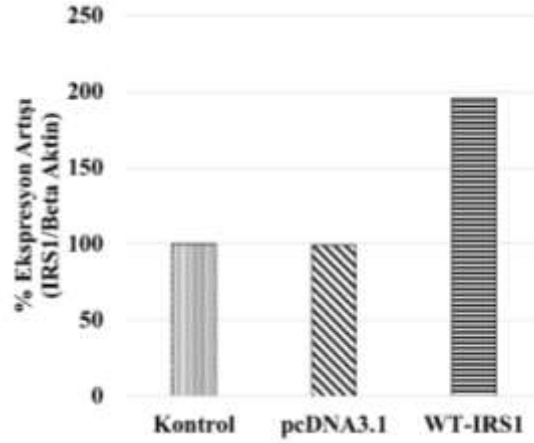
4.1. Yabancı Tip IRS1 Proteininin U-87 MG Hücrelerinde Ektopik Ekspresyonunun Gösterilmesi

U-87 MG hücrelerinde ekzojen olarak IRS1 ekspresyon artışının sağlanması amacıyla pcDNA3.1-flag tagged-insan IRS1 genini (WT-IRS1) içeren memeli ekspresyon vektörü lipofektamin aracılığıyla U-87 MG hücrelerine transfekte edilmiştir. IRS1 ekspresyonunun, boş memeli ekspresyon vektörü omurgası ve transfeksiyon işlemi kaynaklı bir değişime uğrayıp uğramadığının gösterilmesi için ise ayrı bir grup U-87 MG hücrelerine boş vektör (pcDNA3.1) benzer yöntemle transfekte edilmiştir. Transfeksiyon gerçekleştirilmemiş grup ise kontrol olarak kullanılmıştır.

Şekil 9 ve Şekil 10'da görüldüğü gibi pcDNA3.1-flag tagged-insan IRS1 vektörü transfekte edilen grupta (WT-IRS1) ektopik IRS1 ekspresyonu, kontrol ve pcDNA3.1 gruplarına göre yaklaşık 2 kat artmıştır. Kontrol ve pcDNA3.1 grupları arasında ise IRS1 ekspresyonu açısından herhangi bir değişiklik gözlemlenmemiştir.



Şekil 9. U-87 MG hücre gruplarında insülin indüklü IRS1, ERK1/2 ve AKT1 proteinlerinin aktivasyon ve ekspresyonları ile Grb2 proteininin ekspresyon profili.



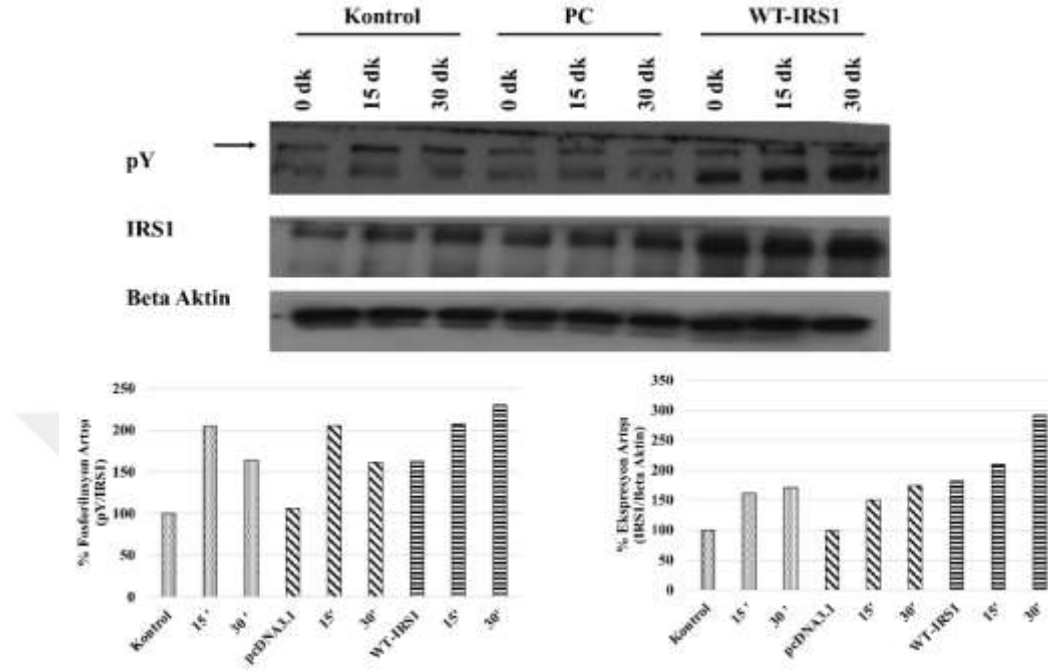
Şekil 10. U-87 MG hücre gruplarında transfeksiyon sonrası ektopik IRS1 ekspresyon seviyeleri

4.2. Ektopik IRS1 Ekspresyonu Yapan U-87 MG Hücrelerinde İnsülinin IRS1 Tirozin Fosforilasyonu Üzerine Etkisi

İnsülin sinyali oldukça hızlı bir iletimin söz konusu olduğu hücresel bir yoldur. Zamana bağlı insülin indüklü IRS1 aktivasyonu önceki çalışmalarda gösterilmiştir. (Görgişen, 2015). Görgişen ve arkadaşları 293T hücrelerinde insülin bağımlı IRS1 aktivasyonunun 5. dakikadan başlayarak, 15 ve 30. dk'larda da artışa devam ettiğini görmüştür. Dolayısıyla bu çalışmamızda IRS1 aktivasyonu için 15 ve 30 dk'lık inkübasyon süreleri optimum süre olarak belirlenmiştir.

Elde ettiğimiz western blot analizlerine göre insülin indüklü IRS1 aktivasyonunda tüm zaman dilimleri göz önüne alındığında kontrol ve pcDNA3.1 grupları arasında herhangi bir farklılık gözlemlenmemiştir. U-87 MG hücrelerinde insülin indüklü IRS1 aktivasyonu 15. dk'da insülin muamele edilmeyen eşdeğerlerine göre 2 kat, 30 dk. da ise her iki grupta da yaklaşık %55 oranında artış göstermiştir. IRS1 transfekte edilen hücrelerin insülin muamele edilmeyen grubunda IRS1 aktivasyonunun kontrol ve pcDNA3.1 gruplarına göre yaklaşık %55 arttığı saptanmıştır. 15 dakika muamele sonucunda IRS1 aktivasyonu açısından gruplar arasında farklılık gözlemlenmezken, 30 dk insülin muamele edilen gruplar karşılaştırıldığında WT-IRS1 grubunda diğer gruplara göre %60 artışın söz konusu olduğu görülmektedir. Ektopik IRS1 ekspresyonu yapan grup kendi içerisinde karşılaştırıldığında; kontrol grubuna göre IRS1 tirozin

fosforilasyonunda 15 dk'lık insülin muamelesi sonucunda yaklaşık %40, 30 dk'da ise %60 artış olduğu saptanmıştır.



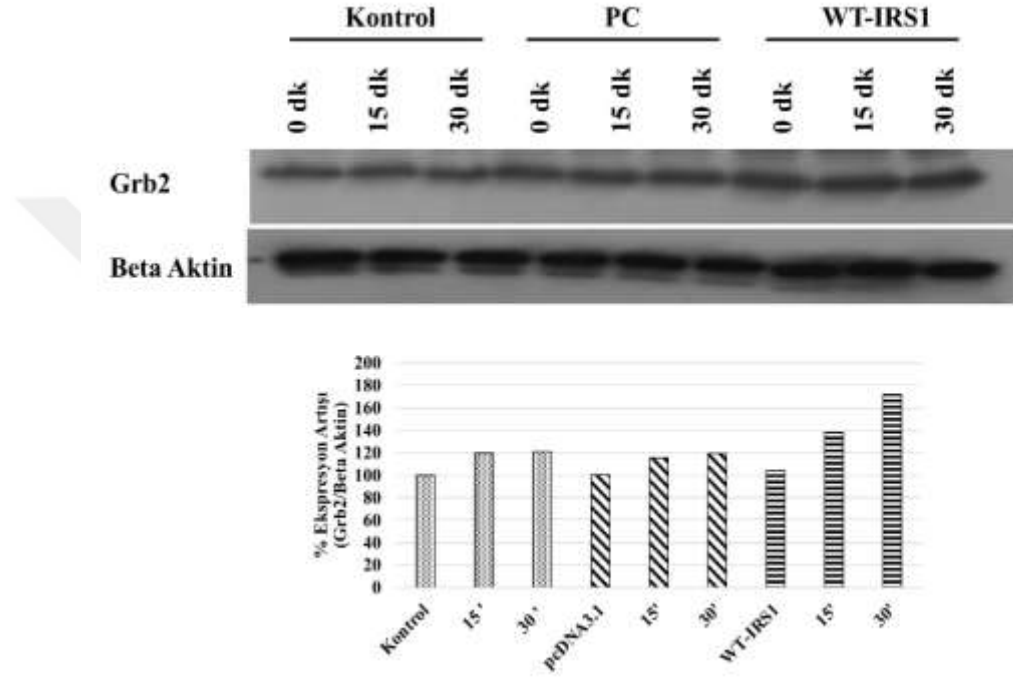
Şekil 11. Ektopik IRS1 ekspresyonu yapan U-87 MG hücrelerinde insülin indüklü IRS1 tirozin fosforilasyonu

4.3. Ektopik IRS1 Ekspresyonu Yapan U-87 MG Hücrelerinde İnsülinin Grb2 Ekspresyonu Üzerine Etkisi

İnsülin indüklü Grb2 ekspresyonu kontrol ve pcDNA3.1 gruplarında 15. dk'da insülin verilmeyen gruba göre %20 oranında artış göstermektedir. Bu artış ektopik IRS1 ekspresyon artışı gösteren grupta ise insülin verilmeyen gruba göre %38 oranındadır. 15 dk insülin muamele gruplar kendi içerisinde karşılaştırıldığında ise Grb2 ekspresyonu WT-IRS1 grubunda, pcDNA3.1 ve kontrol gruplarına göre %18 daha yüksektir.

30 dk insülin muamelesi sonucunda ise kontrol ve boş vektör aktarılan grupların Grb2 ekspresyonlarında 15 dk insülin muamele edilen gruplara göre değişiklik gözlemlenmezken, insülin muamele edilmeyen gruplarına göre yaklaşık %20 artış olduğu belirlenmiştir. Bu durumda 15 dk ve 30 dk insülin inkübasyonlarında Grb2 ekspresyonunun sabit kaldığı söylenebilir.

Ektopik IRS1 ekspresyonu yapan hücrelerde 30 dk insülin muamelesi Grb2 ekspresyonunun, insülin muamele edilmeyen gruba göre %72, 15 dk muamele edilen gruba göre ise %34 oranında artışına neden olmuştur. Bu durumda IRS1 ekspresyon artışının insülin indüklü Grb2 ekspresyonunu zamana bağlı olarak arttırdığı söylenebilir. WT-IRS1 grubu 30 dk insülinle muamele edildiğinde Grb2 ekspresyonu, pcDNA 3.1 ve kontrol gruplarına göre %52 oranında artış göstermiştir.

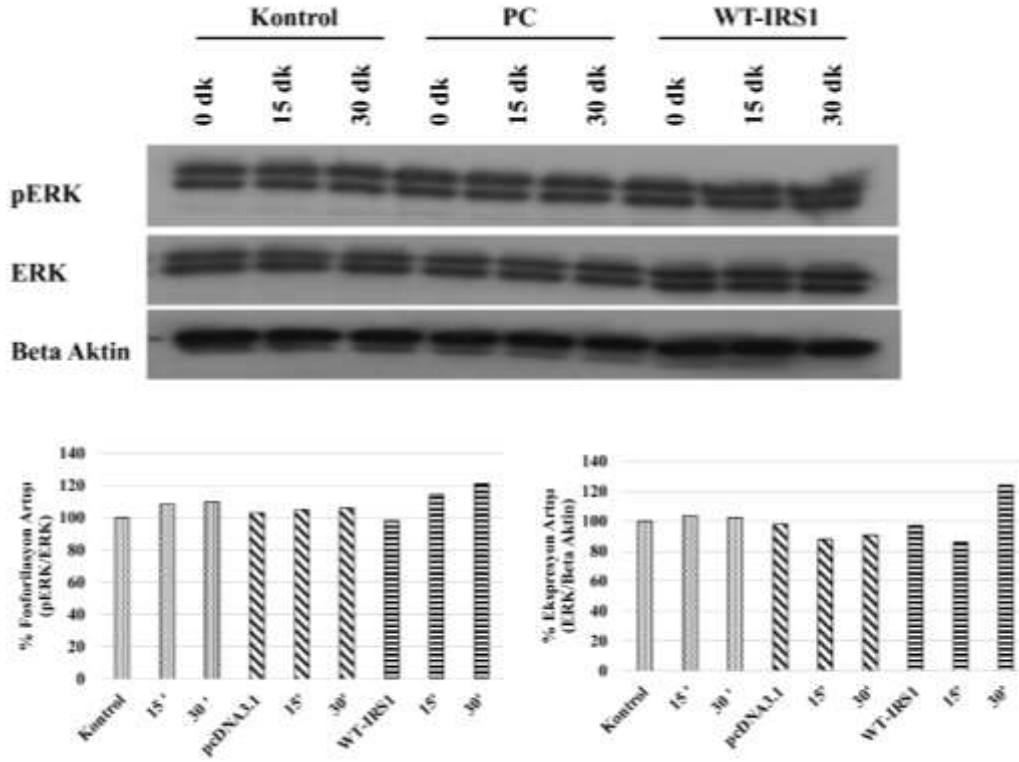


Şekil 12. Ektopik IRS1 ekspresyonu yapan U-87 MG hücrelerinde insülin indüklü Grb2 ekspresyonu

4.4. Ektopik IRS1 Ekspresyonu Yapan U-87 MG Hücrelerinde İnsülinin ERK1/2 Ekspresyonu ve Fosforilasyonu Üzerine Etkisi

İnsülin sinyal yolağında, insülin indüklü ERK1/2 aktivasyonunun optimum sürelerinin 15. ve 30. dk'lar arasında gerçekleştiği önceki yayınlarda gösterilmiştir (Guo ve ark., 2005). Kontrol ve pcDNA3.1 grupları 15 dk insülin ile muamele edildiğinde ERK1/2 fosforilasyonlarında, insülin muamele edilmeyen kontrollerine göre yaklaşık %10 oranında artış olduğu saptanmıştır. İnsülin muamelesinin 30 dk olduğu gruplarda ise, ERK1/2 fosforilasyonlarında 15 dk'lık gruplara göre belirgin bir değişim saptanmamıştır.

Ektopik IRS1 ekspresyonu gösteren grupta ise 15 dk insülin muamelesinin ERK1/2 fosforilasyonunu %15, 30 dk'lık insülin muamelesinin ise %21 oranında arttırdığı saptanmıştır. 15 dk insülin muamele edilen WT-IRS1 grubundaki ERK1/2 aktivasyonunun pcDNA 3.1 ve kontrol grubundaki eşleniklerine göre %10, 30 dk'lık insülin muamele edilen grupta ise %15 oranında arttığı belirlenmiştir.

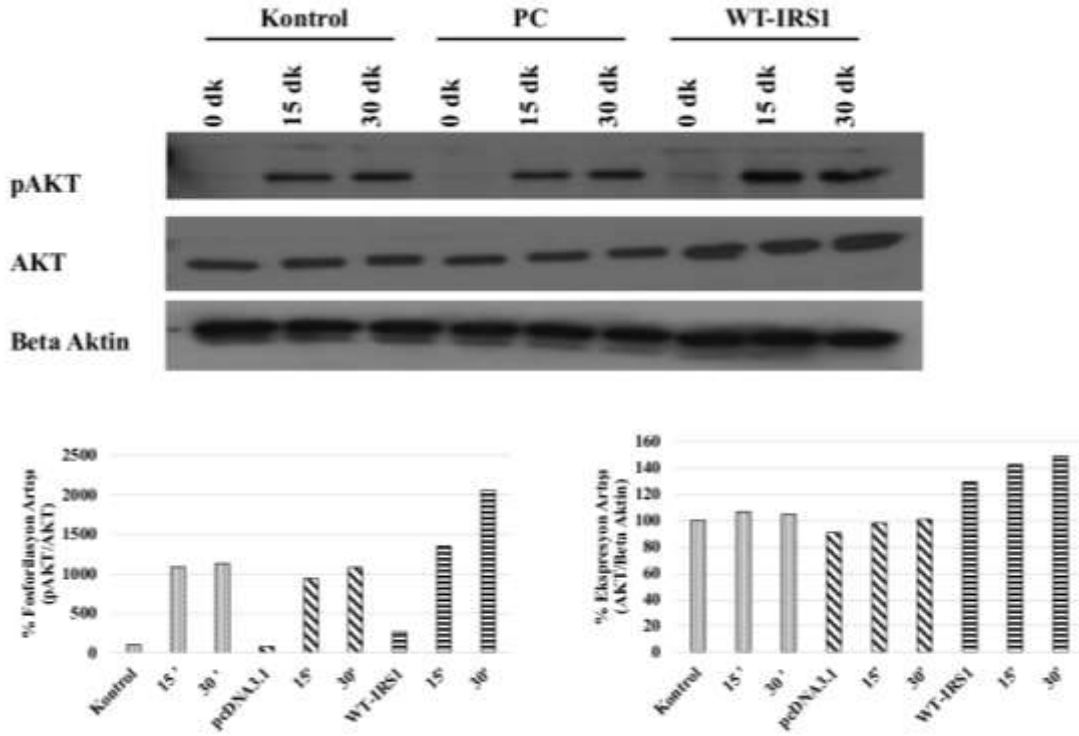


Şekil 13. Ektopik IRS1 ekspresyonu yapan U-87 MG hücrelerinde insülin indüklü ERK1/2 ekspresyonu ve aktivasyonu

4.5. Ektopik IRS1 Ekspresyonu Yapan U-87 MG Hücrelerinde İnsülinin AKT1 Ekspresyonu ve Fosforilasyonu Üzerine Etkisi

Literatürde, insülin indüklü AKT aktivasyonunun 15. dk'dan sonra maksimum seviyeye ulaştığı bilinmektedir (Guo ve ark., 2005). Western blot analiz sonuçlarına göre, kontrol ve pcDNA3.1'lerin 15 dk insülin muamele edilen grupları karşılaştırıldığında pAKT seviyelerinde belirgin bir farklılık gözlemlenmezken, WT-IRS1'in 15 dk muamelesinde yaklaşık %50 artışın olduğu saptanmıştır. 30 dk insülin muamele edilen gruplarda ise bu artış WT-IRS1 grubunda %100 olarak belirlenmiştir. Hücrelerin insülin

muamele edilmeyen grupları kendi içerisinde karşılaştırıldığında IRS1 ektopik ekspresyonu gerçekleştiren grubun AKT aktivasyonunun diğer gruplara göre 2,5 kat arttığı saptanmıştır.



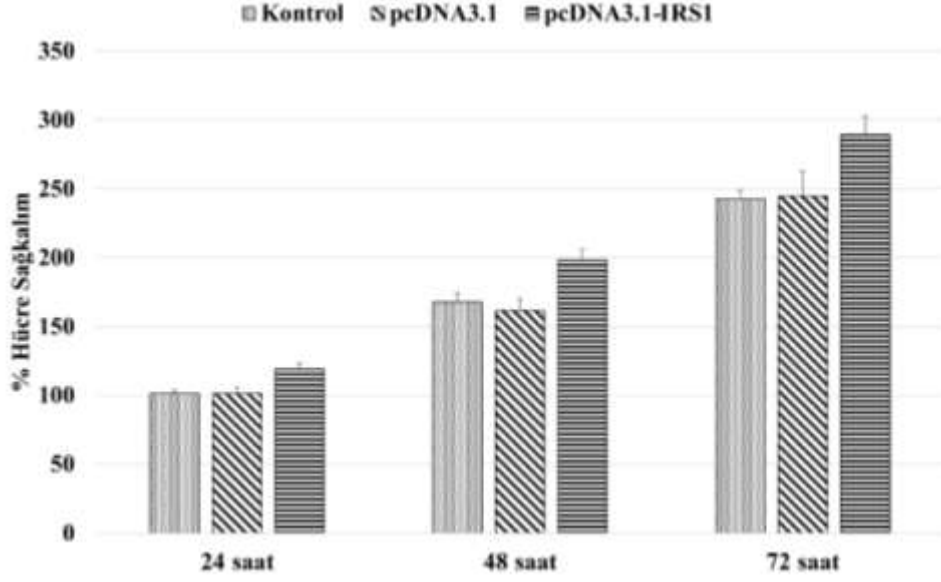
Şekil 14. Ektopik IRS1 ekspresyonu yapan U-87 MG hücrelerinde insülin indüklü AKT1 ekspresyonu ve aktivasyonu

4.6. Ektopik IRS1 ekspresyonu yapan U-87 MG Hücrelerinde Sağkalım Oranlarının Belirlenmesi

IRS1 ekspresyon artışı sonucunda insülin indüksiyonuna bağlı olarak sinyal yolağında gerçekleşen moleküler değişiklikleri saptadıktan sonra bu değişimlerin hücre sağkalımı üzerindeki fonksiyonel etkisini belirlemek amacıyla MTT analizi gerçekleştirildi.

MTT analizi sonuçlarına göre 24, 48 ve 72 saat inkübasyonlarda kontrol ve pcDNA3.1 gruplarının sağkalımları arasında belirgin bir değişiklik gözlemlenmedi. Ancak WT-IRS1 ekspresyonu gerçekleştiren hücrelerin sağkalımlarında diğer gruplara

kıyasla 24 saat inkübasyon sonucunda %18, 48 saat inkübasyon sonucunda %36 ve 72 saat inkübasyon sonucunda %47 oranında artış olduğu gözlemlendi.



Şekil 15. Kontrol, boş vektör ve IRS1 transfekte edilmiş U-87 MG hücrelerinin 24, 48 ve 72 saat sonundaki sağkalım oranları.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

İnsülin, pankreasın Langerhans adacıklarındaki beta hücrelerinden salınan ve vücuttaki karbonhidrat metabolizmasının düzenlenmesinde glukagon ile birlikte rol alan bir hormondur. İnsülin, glikozun hücrelere kolaylaştırılmış difüzyonunu hızlandırarak kan glikoz düzeyini azaltmaya yönelik bir etki oluşturmaktadır. Bir başka ifadeyle insülin kan şeker düzeyinin düzenlenmesinde primer rol oynamaktadır (Ünal ve ark., 2012). Ayrıca insülin, hücre çoğalması, hücre sağkalımı, farklılaşma, göç ve metabolizma gibi çok hücreli organizmalarda çeşitli hücre fonksiyonlarını düzenler (Meyts, 2000). İnsülin sinyali, plazma membranında lokalize olan IR'ye bağlanarak başlatılır (Pirola ve ark., 2004). İnsülin, IR'ye bağlandıktan sonra IR, birtakım konformasyonel değişikliklere uğrayarak sinyal iletiminin başlamasına neden olur (Boucher ve ark., 2014).

IRS1, insülin ve insülin benzeri büyüme faktörü sinyalleşmesindeki ana adaptör moleküldür (Görgişen ve ark., 2019). İnsülin sinyalinin IR'ye bağlanmasıyla IR, oto-fosforilasyonla tirozinlerinden fosforile olur. Bu durum IRS1'in sahip olduğu SH2 alanıyla IR'ye bağlanmasını sağlar. IR'ne bağlanan IRS1 karboksi terminalinden fosforilasyona uğrayarak PI3K, GRB2, SHP2 gibi efektör proteinlerin aktivasyonunu sağlar. IRS1 PI3K /AKT yolağını kullanarak metabolik, GRB2/RAS /ERK yolağını kullanarak mitojenik aktiviteleri sağlamaktadır (Brummer ve ark., 2010).

Bugüne kadar yapılan çalışmalar IRS proteinlerinin birçok kanser türünde etkili olduğunu ortaya çıkarmıştır. Çalışmalar insanda yaygın ekspresyon göstermesi nedeniyle IRS1 ve IRS2 proteinleri üzerine yoğunlaşmıştır. Karaciğer, pankreas, prostat kanseri gibi hastalıklarda hem IRS1 hem de IRS2'nin arttığı rapor edilmiştir. Meme, yumurtalık, medulloblastom gibi kanser türlerinde yalnızca IRS1 ekspresyonu değerlendirilmiş ve ekspresyon artışı gösterilmiştir (Mardilovich ve ark., 2009).

GBM, birincil beyin tümörünün en sık görülen ve malign şeklidir (Xie ve ark., 2015). Oldukça kötü huylu olan bu tümör, tüm primer merkezi sinir sistemi gliomalarının %50' sinden fazlasını temsil etmektedir (Kanu ve ark., 2009).

GBM, DSÖ tarafından 4. evre astrositom olarak değerlendirilmektedir. Görülme insidansı düşük bir tümördür. Cerrahi rezeksiyon, kemoterapi, radyoterapi gibi tedavi

yöntemleri olmasına karşın hastaların ortalama sağkalım süresi yaklaşık 15 ay olan ölümcül bir hastalıktır (Stupp ve ark., 2005).

Memeli beyninin temel enerji kaynağı glukozdur. Beyin, glukozdan elde edilen enerjinin yaklaşık %20'sini kullanmaktadır. (Mergenthaler ve ark., 2014). Dolayısıyla beyin fizyolojik rolünü yerine getirmesi, glukoz metabolizmasının sıkı bir şekilde kontrolü ile sağlanmaktadır. Glukoz metabolizmasında meydana gelen bozukluklar GBM gelişiminde ve ilerlemesinde oldukça önem taşımaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalar, Tip 2 diyabet gibi metabolik bozukluklara sahip GBM hastalarının daha kötü prognoza sahip olduklarını ortaya koymuştur (Chambless ve ark., 2012). Ayrıca, GBM hastalarında tedavi amaçlı kullanılan glukokortikoidlerin, bireylerde oluşturduğu insülin direncini aşmaya yönelik kullanılan insülin ve insülin analoglarının mitojenik etkileri hala endişelere neden olmaktadır (Wen ve ark., 2006). İnsülinin merkezi sinir sisteminde ve nörodejeneratif hastalıkların gelişiminde önemli rol oynaması, GBM tümör dokularında insülin ve insülin büyüme benzeri faktör reseptörlerinin ekspresyonunda artışın gözlemlenmesi bu sinyal yolağının GBM'deki önemini ortaya koymaktadır (Craft ve Watson, 2004).

IR ve IGFR sinyal yolları göz önüne alındığında IRS1 proteinin ortak bir kavşak noktaı ifade etmesi bizleri IRS1'in GBM gelişiminde etkin olabileceğini düşünmeye sevk etmiştir. Bu düşüncemiz IRS1'in diğer kanser türlerinin gelişimindeki moleküler etkileri ile kuvvetlenmiştir.

Çalışmamız kapsamında, ektopik IRS1 ekspresyonu yapan U-87 MG hücrelerinde IRS1 tirozin fosforilasyon seviyesinin insülinden bağımsız olarak kontrollere göre %62 oranında arttığını saptadık. Bu durum, IRS1'in GBM hücrelerinde ekspresyonu arttığı durumlarda diğer RTK' ler tarafından tirozin fosforilasyonuna uğrayabileceğinin bir göstergesi olabilir. Buna en önemli örnek, EGFR'dir. EGFR, GBM tedavisinde önem taşıyan ve GBM dokularında ekspresyonunda ve gen kopya sayısında belirgin artışın olduğu en önemli reseptör kinazlardan bir tanesidir. Meme kanseri hücre hattında yapılan çalışmada IRS1'in EGFR ile etkileşime geçerek tirozin fosforilasyonuna uğradığı, hücre proliferasyonunu arttırdığı ve Gefitinib tedavisine yanıtta etkin rol oynadığı gösterilmiştir (Knowlden ve ark., 2008). GBM hücrelerinde gözlemlediğimiz bu durum GBM'deki EGFR aktivitesinin yüksek olmasından ve IRS1

tirozine fosforilasyonunu insülden bağımsız olarak indüklenmesinden kaynaklı olabilir. Ektopik IRS1 ekspresyonu yapan U-87 MG hücrelerinde insülin indüklü IRS1 tirozine fosforilasyon seviyesine baktığımızda; kontrollere göre zamana bağlı olarak bir artışın söz konusu olduğu, kontrol ve boş vektör aktarılan gruplarda ise IRS1'in tirozine fosforilasyonunun 30. dk'da azalışa geçtiği görülmektedir. Bu durumda IRS1 ekspresyon artışının U-87 MG hücrelerinde insülin indüklü IRS1 tirozine fosforilasyonunun stabil ve uzun süreli olmasını sağladığı söylenebilir. Uzun süreli IRS1 aktivasyonu, insülin sinyalinin fonksiyonel etkilerinin çoğalmasının yanı sıra hedef proteinlerin de aktivasyon sürelerinde artışlara da neden olabilmektedir. Böylece GBM hücreleri üzerinde mitojenik etki göstererek hücrelerin sağkalım oranlarını arttırabilir.

Artış gösteren IRS1 tirozine fosforilasyonunun insülin sinyalinde IRS1'in hedef proteinlerinin aktivasyonlarını ve ekspresyonlarını etkilemesi beklenmektedir. Bu nedenle çalışmamız kapsamında ilk olarak Grb2 ekspresyon seviyesi belirlenmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlara göre ektopik IRS1 ekspresyonu yapan U-87 MG hücrelerinde insülin indüklü Grb2 ekspresyonunda zamana bağlı artış söz konusudur. İnsülin sinyal akışında Grb2, IRS1'in karboksi terminalinde bulunan YVNI motiflerindeki fosforile tirozine aminoasitine bağlanarak RAS proteininin aktivasyonunu sağlamaktadır. Aktive olan RAS ise, RAF-MEK-ERK yolağının ve PI3K üzerinden AKT yolağının aktivasyonunu gerçekleştirir (Castellano ve Downward, 2011). Bu nedenle, IRS1 tirozine fosforilasyonuna bağlı artan Grb2 ekspresyonunun etkisini gözlemlemek için çalışmamızda ERK1/2 ve AKT proteinlerinin fosforilasyon düzeylerini belirledik. ERK1/2 proteinlerinin fosforilasyon düzeyleri, grupların kendi insülinle muamele edilmeyen eşdeğerleriyle karşılaştırıldığında artış göstermektedir. Elde edilen bu veriler literatürle uyumlu olup, insülin bağımlı ERK1/2 aktivasyonunun gerçekleştirildiğini göstermektedir. Ancak, gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında GBM hücrelerinde, ektopik IRS1 ekspresyon artışının insülin indüklü ERK1/2 aktivasyonu üzerinde herhangi bir etkisi gözlemlenmemiştir. Gong ve arkadaşları tarafından 2016 yılında primer GBM doku kültürü çalışmasında fizyolojik seviyedeki insülin uyarımının ERK1/2 aktivasyonundan ziyade AKT aktivasyonunu tercih ederek GBM hücrelerinin büyümelerini indükleyebileceği ileri sürülmüş, bazı tümör dokularında ERK1/2 aktivasyonu gözlemlenmezken AKT aktivasyonunda artış olduğu saptanmıştır (Gong ve ark., 2016).

Çalışmamızda, U-87 MG hücrelerinde ektopik IRS1 ekspresyon artışının insülin indüklü ERK1/2 aktivasyonu üzerinde herhangi bir etkisini görmememiz nedeniyle IRS1' in bir diğer önemli hedef proteini olan AKT aktivasyon seviyesini belirledik. Elde ettiğimiz sonuçlara göre ektopik IRS1 ekspresyon artışının, insülinden bağımsız olarak AKT1 fosforilasyonunu 3 kat arttırdığını saptadık. Ayrıca, hücreler insülinle muamele edildiğinde bu artışın zamana bağlı olarak kendi eşdeğerlerine göre 15 dk sonunda 1,5 kat 30 dk'da ise yaklaşık 2 kat arttığını belirledik. Dolayısıyla bu veriler, GBM hücrelerinde ektopik IRS1 artışının insülinden bağımsız IRS1 aktivasyonunu gerçekleştirdiğini ve insülin indüklü AKT1 aktivasyonunu arttırdığını göstermektedir. Bu noktada GBM hücrelerinde saptadığımız Grb2 ekspresyonundaki artışın da PI3K aracılığıyla AKT1 yolağını indüksiyonuna katkıda bulunabileceğini söyleyebiliriz. Elde ettiğimiz tüm bu veriler, Gong ve arkadaşları tarafından GBM hücrelerinde insülin indüksiyonunun AKT1 yolağını tercih etmesini gösteren çalışmayla uyumlu olmasının yanı sıra, GBM hücrelerinde insülinden bağımsız IRS1 tirozin fosforilasyonunun da tercihi olarak AKT1 yolağını aktive ettiğini göstermektedir. Bu verimizle uyumlu olarak hepatoselüler karsinom gelişiminde IRS1' in rolünü açıklamaya yönelik gerçekleştirilen çalışmada farelerde IRS1 susturulmasının AKT aktivasyonu azalatarak dietilnitrozamin indüklü tümör gelişimini durdurduğu gösterilmiştir (Sakurai ve ark., 2017).

Ektopik IRS1 ekspresyonu yapan U-87 MG hücrelerinde IRS1 ekspresyon artışına bağlı AKT1 aktivasyonunun hücrelerin sağkalımı üzerindeki fonksiyonel etkisini belirlediğimiz MTT analizi sonuçlarımız elde ettiğimiz moleküler verileri doğrular nitelikte, ektopik IRS1 ekspresyon artışının GBM hücrelerinde zamana bağlı olarak sağkalımlarını arttırdığını göstermektedir. Literatürde IRS1 ekspresyon artışının, küçük hücreli olmayan akciğer tümörü dışında birçok tümörün gelişiminde etkin rol oynadığı gösterilmektedir. IRS1'in GBM gelişimindeki rolü bugüne kadar aydınlatılmamış olmasına rağmen, çocuklarda yaygın olarak görülen merkezi sinir sistemi tümörlerinden olan medullablastom tümör örneklerinde IRS1 ekspresyon artışı gösterilmiştir (Valle ve ark., 2002). Başka bir çalışmada ise meme tümörlerinde IRS1 ekspresyon artışı primer olarak hücre proliferasyonunda sorumlu tutulmuştur (Dearth ve ark., 2006).

Sonuç olarak, çalışmamız kapsamında IRS1 proteininin in vitro ortamda GBM gelişimindeki moleküler ve fonksiyonel etkileri ortaya konmuştur. Elde ettiğimiz veriler,

IRS1 ekspresyon artışıının U-87 MG hücrelerinde insülininden bağımsız AKT1 aktivasyonu aracılığıyla hücre sağkalımını arttırdığını göstermektedir. Ayrıca ektopik IRS1 ekspresyonunun GBM hücrelerinde insülin cevabını artırarak AKT1 fosforilasyonunda artışa neden olduğu da gösterilmiştir.



KAYNAKLAR

- Alagoz M. Glioblastoma multiforme tedavisinde kanser kök hücrelerinin temozolomide karşı oluşturdukları direnç. *Sakarya Tıp Dergisi*. 2018;8(2):379-87.
- Al-Salam A, Irwin DM. Evolution of the vertebrate insulin receptor substrate (Irs) gene family. *BMC Evol Biol*. 2017;17(1):148.
- Belfiore A, Malaguarnera R. Insulin receptor and cancer. *Endocr Rev*. 2014; 18(4):125-47.
- Bijörholm M, He AR, Attersand A, Lake S, Liu SC, Lienhard GE ve ark. Absence of functional insulin receptor substrate-3 (IRS-3) gene in humans. *Diabetologia*. 2002; 45(12):1697–702.
- Boucher J, Kleinridders A, Kahn CR. Insulin Receptor Signaling in Normal and Insulin-Resistant States. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2014; 6(1): a009191–a009191.
- Boura-Halfon S, Zick Y. Phosphorylation of IRS proteins, insulin action, and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009;296(4): 581–91.
- Brummer T, Schmitz-Peiffer C, Daly RJ. Docking proteins. *FEBS J*. 2010; 277(21):4356–69.
- Burks DJ, White MF. IRS proteins and beta-cell function. *Diabetes*. 2001; 50 Suppl 1: S140-5.
- 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(28): 25323–30.
- Cantarini MC, de la Monte SM, Pang M, Tong M, D'Errico A, Trevisani F ve ark. Aspartyl-asparagyl β hydroxylase over-expression in human hepatoma is linked to activation of insulin-like growth factor and notch signaling mechanisms. *Hepatology*. 2006; 44(2): 446–57.
- Castellano E, Downward J. RAS Interaction with PI3K: More Than Just Another Effector Pathway. *Genes & Cancer*. 2011; 2(3): 261–74.
- Chambless LB, Parker SL, Hassam-Malani L, McGirt MJ, Thompson RC. Type 2 diabetes mellitus and obesity are independent risk factors for poor outcome in patients with high-grade glioma. *J Neurooncol*. 2012; 106(2): 383–9.
- Chan BT, Lee, AV. Insulin receptor substrates (IRSs) and breast tumorigenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2008; 13(4): 415–22.
- Cignarelli A, Genchi V, Perrini S, Natalicchio A, Laviola L, Giorgino F. Insulin and Insulin Receptors in Adipose Tissue Development. *Int J Mol Sci*. 2019; 20(3); 759.
- Cops KD, White MF. Regulation of insulin sensitivity by serine or threonine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins IRS1 and IRS2. *Diabetologia*. 2014; 55(10): 2565–82.
- Craft S, Watson GS. Insulin and neurodegenerative disease: shared and specific mechanisms. *Lancet Neurol*. 2004; 3(3): 169–78.
- Dearth RK, Cui X, Kim HJ, Kuitatse I, Lawrence NA, Zhang X ve ark. Mammary

- Tumorigenesis and Metastasis Caused by Overexpression of Insulin Receptor Substrate 1 (IRS1) or IRS2. *Mol Cell Biol.* 2006; 26(24): 9302–14.
- Dearth RK, Cui X, Kim HJ, Kuitse I, Lawrence NA, Zhang X ve ark. Mammary tumorigenesis and metastasis caused by overexpression of insulin receptor substrate 1 (IRS1) or IRS2. *Mol Cell Biol.* 2006; 26: 9302–1.
- Dearth RK, Cui X, Kim HJ, Hadsell DL, Lee AV. Oncogenic transformation by the signaling adaptor proteins insulin receptor substrate IRS1 and IRS2. *Cell Cycle.* 2007; 6(6): 705–13.
- Dörpholz G, Murgai A, Jatzlau J, Horbelt D, Belverdi MP, Heroven C ve ark. IRS4, a novel modulator of BMP/Smad and Akt signalling during early muscle differentiation. *Sci Rep.* 2017; 7(1): 8778.
- Durmaz V, Vural M. Primer ve sekonder glioblastoma multiforme genetiği. *Türk Nöroşirürji Derneği.* 2007; 17(2): 80–90.
- Eck MJ, Dhe-Paganon S, Trüb T, Nolle RT, Shoelson SE. Structure of the IRS-1 PTB domain bound to the juxtamembrane region of the insulin receptor. *Cell.* 1996; 85(5): 695–705.
- Ebina Y, Ellis L, Jarnagin K, Edery M, Graf L, Clauser E ve ark. The human insulin receptor cDNA: the structural basis for hormone-activated transmembrane signalling. *Cell.* 1985; 40(4): 747–58.
- Erbayraktar Z, Erbayraktar S, Erkan EP. Targeted treatment for glioblastoma: Revisiting conventional strategies and novel targets. *J Nervous Sys Surgery.* 2015; 5(3-4): 59-68.
- 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(17): 10726–32.
- Favre C, Gérard A, Clauzier E, Pontarotti P, Olive D, Nunès JA. DOK4 and DOK5: new dok-related genes expressed in human T cells. *Genes Immun.* 2003; 4(1): 40–45.
- Giovannone B, Scaldaferrri ML, Federici M, Porzio O, Lauro D, Fusco A ve ark. Insulin receptor substrate (IRS) transduction system: distinct and overlapping signaling potential. *Diabetes Metab Res Rev.* 2000; 16(6): 434–41.
- Glaser T, Han I, Wu L, Zeng X. Targeted Nanotechnology in Glioblastoma Multiforme. *Front Pharmacol.* 2017; 8: 166.
- Gong Y, Ma Y, Sinyuk M, Loganathan S, Thompson RC, Sarkaria JN ve ark. Insulin-mediated signaling promotes proliferation and survival of glioblastoma through Akt activation. *Neuro Oncol.* 2016; 18(1): 48–57.
- Gorgisen G, Gulacar IM, Ozes ON. The role of insulin receptor substrate (IRS) proteins in oncogenic transformation. *Cell and Mol Biol.* 2017; 63(1): 1
- Gorgisen G, Çakır T, Ateş C, Gulacar IM, Yaren Z. Overexpression of Insulin Receptor Substrate 1 (IRS1) Promotes Radioresistance in A172 Glioblastoma Cell Line. *East J Med.* 2019; 24(2): 204–09.

- Görgißen G. İnsülin sinyal iletiminde P38 kinazın rolünün araştırılması [Doktora tezi]. Antalya: Akdeniz Üniversitesi; 2015.
- Görgißen G. İnsülin direncinde İnsülin Reseptör Substrat 1 (IRS1) proteininin rolü. *Bozok Tıp Derg.* 2018; 8(3): 114-21.
- Guo TB, Lu J, Li T, Lu Z, Xu G, Xu M ve ark. Insulin-activated, K⁺-channel-sensitive Akt pathway is primary mediator of ML-1 cell proliferation. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2005; 289(2): 257–63.
- Gülaçar IM. Glioblastoma multiforme dokularında İnsülin Reseptör Substrat-1'in (IRS1) mutasyonel analizi ve ekspresyon/aktivasyon profilinin değerlendirilmesi [Yüksek lisans tezi]. Van: Van Yüzüncüyıl Üniversitesi; 2017.
- Han CH, Cho JY, Moon JT, Kim HJ, Kim SK, Shin DH ve ark. Clinical significance of insulin receptor substrate-I down-regulation in non-small cell lung cancer. *Oncol Rep.* 2006; 16(6): 1205–10.
- Hanif F, Muzaffar K, Perveen K, Malhi SM, Simjee SU. Glioblastoma Multiforme: A Review of its Epidemiology and Pathogenesis through Clinical Presentation and Treatment. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2017; 18(1): 3–9.
- Hao Y, Zhao S, Wang Z. Targeting the Protein–Protein Interaction between IRS1 and Mutant p110 α for Cancer Therapy. *Toxicol Pathol.* 2014; 42(1): 140–47.
- Huang J, Chen H, Wei Q, Zhang Z, Zhong Z, Xu Y. Downregulation of LKB1 promotes tumor progression and predicts unfavorable prognosis in patients with glioma. *Onco Lett.* 2017; 13(3): 1688–94.
- Ikink GJ, Boer M, Bakker ERM, Hilkens J. IRS4 induces mammary tumorigenesis and confers resistance to HER2-targeted therapy through constitutive PI3K/AKT-pathway hyperactivation. *Nat Commun.* 2016; 7(1): 13567.
- Jacobs AR, Le Roith D, Taylor SI. Insulin Receptor Substrate-1 Pleckstrin Homology and Phosphotyrosine-binding Domains Are Both Involved in Plasma Membrane Targeting. *J Biol Chem.* 2001; 276(44): 40795–802.
- Kalkan R, Atlı Eİ. Geçmişten günümüze glioblastoma genetiği. *Türk Noroşir Derg* 2014; 24(3): 239-49.
- Kanu O, Hughes B, Di C, Lin N, Fu J, Bigner DD ve ark. Glioblastoma Multiforme Oncogenomics and Signaling Pathways. *Clin Med Oncol.* 2009; 3: 39–52.
- Kasuga M, Karlsson FA, Kahn CR. Insulin stimulates the phosphorylation of the 95,000-dalton subunit of its own receptor. *Science.* 1982; 215(4529): 185–7.
- Kidmose RT, Andersen, GR. Interacting with the Human Insulin Receptor Structure. 2016; 24(3): 351–2.
- Kleihues P, Louis DN, Scheithauer BW, Rorke LB, Reifenberger G., Burger PC ve ark. The WHO classification of tumors of the nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2002; 61(3): 215–25; discussion 226-9.
- Knowlden JM, Jones HE, Barrow D, Gee JM, Nicholson RI, Hutcheson IR. Insulin receptor substrate-1 involvement in epidermal growth factor receptor and insulin-like growth factor receptor signalling: implication for Gefitinib ('Iressa') response and resistance. *Breast Cancer Res Treat.* 2008; 111(1): 79–91.

- Krakstad C, Chekenya M. Survival signalling and apoptosis resistance in glioblastomas: opportunities for targeted therapeutics. *Mol Cancer*. 2010; 9: 135.
- Kristoffersen K, Nedergaard MK, Villingshøj M., Borup R, Broholm H., Kjær ve ark. Inhibition of Notch signaling alters the phenotype of orthotopic tumors formed from glioblastoma multiforme neurosphere cells but does not hamper intracranial tumor growth regardless of endogene Notch pathway signature. *Cancer Biol Ther*. 2014; 15(7): 862–77.
- Lavin DP, White MF, Brazil DP. IRS proteins and diabetic complications. *Diabetologia*. 2016; 59(11): 2280–91.
- Li Q, Wong YL, Kang C. Solution structure of the transmembrane domain of the insulin receptor in detergent micelles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*. 2014; 1838(5): 1313–21.
- Li Y, Dong X, Cai J, Yin S, Sun Y, Yang D ve ark. SERPINA3 induced by astroglia/microglia co-culture facilitates glioblastoma stem-like cell invasion. *Oncol Lett*. 2018; 15(1): 285–91.
- Liu Y, He Q. The Route of Nanomaterials Entering Brain. *Neuro Nano Nano*. 2016; 33–57.
- Lopez-Gines C, Gil-Benso R, Ferrer-Luna R, Benito R, Serna E, Gonzalez-Darder J ve ark. New pattern of EGFR amplification in glioblastoma and the relationship of gene copy number with gene expression profile. *Mod Pathol*. 2010; 23(6): 856–65.
- Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK ve ark. World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol*. 2016; 131(6): 803–20.
- Mardilovich K, Pankratz SL, Shaw LM. Expression and function of the insulin receptor substrate proteins in cancer. *Cell Commun and Signal*. 2009; 7: 1–15.
- Margolis B, Borg JP, Straight S, Meyer D. The function of PTB domain proteins. *Kidney Int*. 1999; 56(4): 1230–7.
- Mergenthaler P, Lindauer U, Dienel GA, Meisel A. Sugar for the brain: the role of glucose in physiological and pathological brain function. *Trends Neurosci*. 2013; 36(10): 587–97.
- Meyts PD. *The Insulin Receptor and Its Signal Transduction Network*. Endotext. 2000.
- Myers MG, Grammer TC, Brooks J, Glasheen EM, Wang LM, Sun X ve ark. The Pleckstrin Homology Domain in Insulin Receptor Substrate-1 Sensitizes Insulin Signaling. *J Biol Chem*. 1995; 270(20): 11715-18.
- Ohgaki H, Dessen P, Jourde B, Horstmann S, Nishikawa T, Di Patre PL ve ark. Genetic Pathways to Glioblastoma. *Cancer Res*. 2004; 64(19): 6892–9.
- Paz K, Liu YF, Shorer H, Hemi R, LeRoith D, Quan M ve ark. Phosphorylation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1) by protein kinase B positively regulates IRS-1 function. *J Biol Chem*. 1999; 274(40): 28816–22.
- Pirola L, Johnston AM, Van Obberghen E. Modulation of insulin action. *Diabetologia*. 2004; 47(2): 170–84.
- Qiao LY, Goldberg JL, Russell JC, Sun XJ. Identification of enhanced serine kinase

- activity in insulin resistance. *J Biol Chem.* 1999; 274(15): 10625–32.
- Saini V. Molecular mechanisms of insulin resistance in type 2 diabetes mellitus. *World J Diabetes.* 2010; 1(3): 68.
- Sakurai Y, Kubota N, Takamoto I, Obata, A, Iwamoto M, Hayashi T ve ark. Role of insulin receptor substrates in the progression of hepatocellular carcinoma. *Scientific Reports.* 2017; 7(1): 5387.
- Sander P, Mostafa H, Soboh A, Schneider JM, Pala A, Baron, AK ve ark. Vacquinol-1 inducible cell death in glioblastoma multiforme is counter regulated by TRPM7 activity induced by exogenous ATP. *Oncotarget.* 2017; 8(21): 35124-37.
- Sarker D, Reid AHM, Yap TA, de Bono JS. Targeting the PI3K/AKT pathway for the treatment of prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 2009; 15(15): 4799–805.
- Sathornsumetee S, Rich JN. Designer therapies for glioblastoma multiforme. *Ann N Y Acad Sci.* 2008; 1142: 108–32.
- Shaw LM. The insulin receptor substrate (IRS) proteins: At the intersection of metabolism and cancer. *Cell Cycle.* 2011; 10(11): 1750–6.
- Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005; 352: 987–96.
- Tanaka S, Mohr L, Schmidt EV, Sugimachi K, Wands JR. Biological effects of human insulin receptor substrate-1 overexpression in hepatocytes. *Hepatology.* 1997; 26(3): 598–604.
- Tsuruzoe K, Emkey R, Kriauciunas KM, Ueki K, Kahn CR. Insulin receptor substrate 3 (IRS-3) and IRS-4 impair IRS-1- and IRS-2-mediated signaling. *Mol Cell Biol.* 2001; 21(1): 26–38.
- Urbańska K, Sokołowska J, Szmidi M, Sysa P. Review Glioblastoma multiforme – an overview. *Contemp Oncol (Pozn).* 2014; 5: 307–12.
- Ullrich A, Bell JR, Chen EY, Herrera R, Petruzzelli LM., Dull TJ ve ark. Human insulin receptor and its relationship to the tyrosine kinase family of oncogenes. *Nature.* 1985; 313(6005): 756–61.
- Ünal D. Insulin hormone: Mechanism and effects on the body and relationship with central nervous system. *Dicle Medical Journal / Dicle Tip Dergisi.* 2012; 39(2): 310–5.
- Valle LD, Enam S, Lassak A, Wang JY, Craul S, Khalili K ve ark. Insulin-like Growth Factor I Receptor Activity in Human Medulloblastomas. *Clin Cancer Res.* 2002; 8:1822-30.
- Versteyhe S, Blanquart C, Hampe C, Mahmood S, Christeff N, Meyts PD. Insulin receptor substrates-5 and -6 are poor substrates for the insulin receptor. *Mol Med Rep.* 2009; 3(1).
- Vigneri R, Goldfine ID, Frittitta L. Insulin, insulin receptors, and cancer. *J Endocrinol Invest.* 2016; 39(12): 1365–76.
- Virkamäki A, Ueki K, Kahn CR. Protein–protein interaction in insulin signaling and the

molecular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest*. 1999; 103(7): 931–43.

Wainwright DA, Nigam P, Thaci B, Dey M, Lesniak MS. Recent developments on immunotherapy for brain cancer. *Expert Opin Emerg Drugs*. 2012; 17(2): 181–202.

Ward CW, Lawrence MC. Ligand-induced activation of the insulin receptor: a multi-step process involving structural changes in both the ligand and the receptor. *BioEssays*. 2009; 31(4): 422–34.

Wen PY, Schiff D, Kesari S, Drappatz J, Gigas DC, Doherty L. Medical management of patients with brain tumors. *J Neurooncol*. 2006; 80(3): 313–32.

White MF, Kahn CR. The insulin signaling system. *J Biol Chem*. 1994; 269(1): 1–4.

White MF. The IRS-signalling system: a network of docking proteins that mediate insulin action. *Molecular and cellular biochemistry*. 1998; 182(1–2): 3–11.

White MF. IRS proteins and the common path to diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2002; 283(3): 413–22.

Wilcox G. Insulin and insulin resistance. *The Clin Biochem Rev*. 2005; 26(2): 19–39.

Withers DJ, White M. Perspective: The Insulin Signaling System-A Common Link in the Pathogenesis of Type 2 Diabetes. *Endocrinology*. 2000; 141(6): 1917–21.

Wu J, Tseng YD, Xu CF, Neubert TA, White MF, Hubbard SR. Structural and biochemical characterization of the KRLB region in insulin receptor substrate-2. *Nat Struct Mol Biol*. 2008; 15(3): 251–8.

Xie Y, Bergström T, Jiang Y, Johansson P, Marinescu VD, Lindberg N *et al*. The Human Glioblastoma Cell Culture Resource: Validated Cell Models Representing All Molecular Subtypes. *EBioMedicine*. 2015; 2(10): 1351–63.

Ye L, Maji S, Sanghera N, Gopalasingam P, Gorbunov E, Tarasov S *et al*. Structure and dynamics of the insulin receptor: implications for receptor activation and drug discovery. *Drug Discov Today*. 2017; 22(7): 1092–102.

Yenush L, Zanella C, Uchida T, Bernal D, White MF. The pleckstrin homology and phosphotyrosine binding domains of insulin receptor substrate 1 mediate inhibition of apoptosis by insulin. *Mol Cell Biol*. 1998; 18(11): 6784–94.

ÖZGEÇMİŞ

02.04.1988 tarihinde Van'da doğan Zafer YAREN, ilk öğrenimini 1994-2002 yılları arasında Van Mehmetçik Selen İlköğretim okulunda okuyarak mezun olmuştur. Lise öğrenimini 2002-2006 yılları arasında Van Mehmet Akif Ersoy Lisesi'nde tamamlamıştır. Lisans Öğrenimini ise 2008-2012 yılları arası Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Biyoloji tamamlamıştır.

2016 yılında Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans öğrenimine başlamıştır. 2017 yılında Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Teknokent bünyesinde bulunan Genovan Genetik ve Biyoteknoloji Laboratuvarında Ar-Ge personeli olarak çalışmaya başlamıştır.

EKLER

EK 1. Etik Kurul Belgesi



T.C.
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GİRİŞİMSSEL OLMAYAN
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
KARAR FORMU



KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 05	Tarih: 25.04.2018
	Dr.Öğrt.Üyesi Gökhan GÖRĞİŞEN sorumluluğunda yapılması tasarlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen "In Vitro Ortamda İnsülin Reseptör Substrat 1 (IRS1) Bağımlı Sinyal İletim Ağıının Glioblastoma Multiforme Gelişimindeki Rolünün Belirlenmesi" isimli bilimsel araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiştir. Araştırmacıların Yüzüncü Yıl Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulunun Çalışma Esasları Hakkında Yönergesinde belirtilen hususları yerine getirdikleri belirlenmiş olup, çalışmalarını ile ilgili tüm sorumluluk araştırmacılara ait olmak üzere, söz konusu çalışmanın gerçekleştirilmesinde sakınca bulunmadığına, toplantıya katılan Etik Kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu/oy birliği ile karar verilmiştir.	
GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU		
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu	
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Prof.Dr. Öğuz TUNCER	


Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilgili		Katılım *		İmza
Prof.Dr. Öğuz TUNCER	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Dr. Öğr. Üyesi Şakir SEVİMİ	Tıp Tarihi ve Etik	Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Prof.Dr. Süddik KESKİN	İstatistik Uzmanı	Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Prof.Dr. Hüseyin GÜDÜCÜOĞLU	Tıbbi Mikrobiyoloji	Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Prof.Dr.A.Faruk KIROĞLU	KHB	Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Dr. Öğr. Üyesi Abhas ARAS	Genel Cerrahi	Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Dr. Öğr. Üyesi Celaleddin SOYALP	Anesteziyoloji ve Reanimasyon	Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Dr. Öğr. Üyesi Numan ÇİM	Kadın Hastalıkları ve Doğum	Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	
Dr. Öğr. Üyesi Ramazan ÜSTÜN	Fizyoloji	Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Dr. Öğr. Üyesi Oruç ALLAHVERDİYEV	Tıbbi Farmakoloji	Yüzüncü Yıl Üniversitesi Eczacılık Fakültesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Lütfi POLAT	Eczacı	Van Petat Eczanesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Nazlı AKTAŞ	Avukat	Yüzüncü Yıl Üniversitesi Hukuk Müşavirliği	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Özge Barak DEĞER	Sağlık Mesleği Mensubu Olmayan Üye	Van Sanayici ve İş Kadınları Derneği	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Adnan SELÇUK	Sağlık Mesleği Mensubu Olmayan Üye	Van İş Geliştirme Merkezi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

Sayfa 2

Adres : Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Merkez Kampüsü Van
Tel : 432- 2150470
Faks : 432-2168352
e-posta: etikkurull@gmail.com

EK 2. Tez Orjinallik Raporu

	<p style="text-align: center;">T.C. VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ Sağlık Bilimleri Enstitüsü</p>	
LİSANSÜSTÜ TEZ ORJİNALLİK RAPORU		

Tarih: 17/06/2019
<p>Tez Başlığı / Konusu: İN VİTRO ORTAMDA İNSÜLİN RESEPTÖR SUBSTRAT 1 (IRS 1) BAĞIMLI SİNYAL İLETİM AĞININ GLİOBLASTOMA MULTİFORME GELİŞİMİNDEKİ RÖLÜNÜN BELİRLENMESİ</p> <p>Yukarıda başlığı belirlenen tez çalışmamın Kapak sayfası, Giriş, Ana bölümler ve Sonuç bölümlerinden oluşan toplam 68 sayfalık kısmına ilişkin, 17/06/2019 tarihinde tez danışmanım tarafından Turnitin intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtreleme uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı %4 (yüzde dört) dir.</p> <p><u>Uygulanan filtreler aşağıda verilmiştir:</u></p> <ul style="list-style-type: none">- Kabul ve onay sayfası hariç,- Teşekkür hariç,- İçindekiler hariç,- Simge ve kısaltmalar hariç,- Gereç ve yöntemler hariç,- Kaynakça hariç,- Alıntılar hariç,- Tezden çıkan yayınlar hariç,- 7 kelimeden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç (Limit match size to 7 words) <p>Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Lisansüstü Tez Orjinallik Raporu Alınması ve Kullanılmasına İlişkin Yönergeyi inceledim ve bu yönergede belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.</p> <p>Gereğini bilgilerinize arz ederim.</p> <p style="text-align: right;"> ZAFER YAREN Öğrencinin Adı Soyadı İmza</p>

Öğrencinin Adı Soyadı	Zafer Yaren
Anabilim Dalı	: Tıbbi Biyoloji
Öğrenci No	169302020
Programı	: <input checked="" type="checkbox"/> Yüksek Lisans <input type="checkbox"/> Doktora
DANIŞMAN ONAYI UYGUNDUR (Unvan, Ad Soyad, İmza) Dr. Öğr. Üyesi Gökhan Görgülen	ENSTİTÜ ONAYI UYGUNDUR (Unvan, Ad Soyad, İmza)