

**T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOFİZİK ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

Tez Yöneticisi
Doç. Dr. Tammam SİPAHİ

**TİP II DİYABETLİ HASTALARDA G PROTEİN β 3
C825T VE C1429T GEN POLİMORFİZMİNİN
DİYABETİK NEFROPATİ GELİŞMESİNDEKİ
ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI**

(Yüksek Lisans Tezi)

Canan KAHRİMAN

EDİRNE – 2015

**T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOFİZİK ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

Tez Yöneticisi
Doç. Dr. Tammam SİPAHİ

**TİP II DİYABETLİ HASTALARDA G PROTEİN β 3
C825T VE C1429T GEN POLİMORFİZMİNİN
DİYABETİK NEFROPATİ GELİŞMESİNDEKİ
ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI**

(Yüksek Lisans Tezi)

Canan KAHRİMAN

Referans no: 10030319

Tez No :

EDİRNE – 2015

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğü

ONAY

Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofizik Anabilim Dalı yüksek lisans programı çerçevesinde ve Doç. Dr. Tammam SİPAHİ danışmanlığında yüksek lisans öğrencisi Canan KAHRİMAN tarafından tez başlığı “**Tip II Diyabetli Hastalarda G Protein β 3 C825T ve C1429T Gen Polimorfizminin Diyabetik Nefropati Gelişmesindeki Rolünün Araştırılması**” olarak teslim edilen bu tezin tez savunma sınavı **06/02/2015** tarihinde yapılarak aşağıdaki jüri üyeleri tarafından “**Yüksek Lisans Tezi**” olarak kabul edilmiştir.

İmza

JÜRİ BAŞKANI(Danışman)

Doç.Dr. Tammam SİPAHİ

İmza

JÜRİ ÜYESİ

Doç. Dr. Tuzile GÜZYARAR

İmza

JÜRİ ÜYESİ

Doç. Dr. Özgür DOĞANCIAR

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Enstitü Müdürü

TEŐEKKÜR

Tezim süresince desteğini ve yardımlarını esirgemeyen Biyofizik Anabilim Dalı başkanı değerli danışman hocam Doç. Dr. Tammam SİPAHİ'ye, Biyofizik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Tefvik GÜLYAŞAR'a, Yüksek Lisans eğitimim boyunca birlikte olmaktan mutluluk duyduğum tüm değerli arkadaşlarıma, istatistiksel hesaplamaları yapan Prof.Dr. Necdet SÜT'e, hasta materyali sağlayarak çalışmama katkıda bulunan Doç. Dr. Sedat ÜSTÜNDAĞ ve Prof. Dr. Sibel GÜLDİKEN başta olmak üzere tüm Endokrinoloji ve Nefroloji birimi çalışanlarına teşekkürlerimi borç bilirim. Ayrıca; Yüksek lisans eğitimim boyunca hiçbir özveriden kaçınmayarak bana destek olan aileme,

Sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım...

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	3
DİYABETES MELLİTUS	3
DİYABETİK NEFROPATİ	7
DİYABETİK NEFROPATİ PATOGENEZİ	7
G PROTEİNLERİ (GTP/GDP BAĞLAYICI PROTEİNLER)	17
G PROTEİNLERİNİN YAPISI	19
G PROTEİNİ β3 ALT ÜNİTESİ C825T VE C1429T POLİMORFİZMLERİ	26
GEREÇ VE YÖNTEM	28
BULGULAR	36
TARTIŞMA	40
SONUÇLAR	44
ÖZET	46
SUMMARY	48
KAYNAKLAR	50
ŞEKİLLER LİSTESİ	59
ÖZGEÇMİŞ	61
EKLER	

SİMGE VE KISALTMALAR

AGE	: İleri glikasyon son ürünleri
bç	: Baz çifti
C825T	: 825. pozisyonda C→T polimorfizmi
C1429T	: 1429. pozisyonda C→T polimorfizmi
cAMP	: Siklik AMP
DM	: Diabetes Mellitus
DN	: Diyabetik nefropati
DNA	: Deoksiribonükleik asit
ECM	: Hücre dışı matris
GFR	: Glomerüler filtrasyon
GNβ3	: G proteini β3 alt ünitesi
GTP	: Guanozin trifosfat
GTPaz	: Adenozin Guanozin trifosfat
GDP	: Guanozin difosfat
α, β, γ	: Alfa, Beta, Gama
Gα	: G proteini alfa alt birimi
Gβ	: G proteini beta alt birimi
Gβγ	: G proteini beta gama alt birimi
HDL	: Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein
LDL	: Düşük yoğunluklu lipoprotein
MODY	: Maturity onset diabetes of young (Gençlerde, erişkin başlangıçlı diabet)

- RFLP** : Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi
PZR : Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RGS : G protein sinyalini düzenleyici proteinler
SOR : Serbest oksijen radikalleri
TGF- β : Dönüştürücü büyüme faktörü
UV : Ultraviyole
VKI : Vücut kitle indeksi

GİRİŞ VE AMAÇ

Diabetes Mellitus (DM), özellikle son yıllarda dünyada ve ülkemizde sıklığı hızla artan ve ciddi komplikasyonları nedeniyle yaşam kalitesini olumsuz yönde etkileyen kronik bir hastalıktır. Diabetes Mellitusun komplikasyonları mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonlar olarak ikiye ayrılır. Mikrovasküler komplikasyonları; nefropati, retinopati ve nöropatidir. Makrovasküler komplikasyonları ise koroner kalp hastalığı, periferik damar hastalığı ve serebrovasküler hastalıklardır (1-3). Diyabetik nefropati (DN); diyabetin sıklığı giderek artan bir şekilde görülen komplikasyonlarından biri olup son dönem böbrek yetmezliğine yol açan nedenlerin başında gelmektedir (4). Diyabetik nefropati, diyabetes mellitus tiplerinden olan hem Tip 1 hem de Tip 2 DM'de gelişebilir. Tip 2 diyabetle ilişkili olan diyabetik nefropati dünya çapında son dönem böbrek yetmezliğinin en çok görülen sebebidir (5). Komplikasyonların başlaması yaşam kalitesinde azalmaya neden olmaktadır. Erken tanı ve tedavi ile bu komplikasyonları önlemek, geciktirmek veya etkilerini azaltmak mümkündür. Diyabetin bu komplikasyonlarından korunma için birçok farklı çalışma yapılmaktadır.

DM'li hastalarda yapılan çalışmalarda, DN'nin başlama zamanı ve derecesi açısından çok fazla çeşitlilik olduğu gözlenmiştir. DM süresi ve glisemik kontrol gibi sadece bilinen risk faktörleriyle açıklanamayan DN'de genetik faktörlerin de etkili olabileceği belirtilmiştir. Genetik faktörler tip 1 DM'ye göre tip 2 DM'de daha fazla rol almaktadır (6). Kişilerin genetik yapılarındaki polimorfizmlerin aynı çevresel faktörler için, bireylerde farklı sonuçlar doğmasına yol açtığı gözlenmektedir. Bunlar fizyolojik fonksiyonlara etki ederek bireyler arasında hastalıklara karşı değişik yatkınlık düzeyleri oluşturmaktadır (7).

DM'ye yatkınlık ve komplikasyonları ile ilişkisi yönünden sinyal iletim yollarında oldukça kritik bir konuma sahip olmaları nedeniyle, G proteinlerinin yapı ve işlevlerindeki bozukluklar önemli hastalıklara neden olmaktadır. GNB3 geni 825T alleli, Na⁺/H⁺ değiştirici aktivitesinin artışı ile karakterize olan C825T polimorfizmi epitelyal yüzeylerde sodyum tutulmasına neden olur ve bu nedenle diyabetik nefropati ile ilişkisi olduğu düşünölmektedir. G protein β3 geni (GNB3) C825T polimorfizminin hem Tip 1 hem de Tip 2 diyabette diyabetik nefropatinin başlangıç tahmini için iyi bir belirteç olduğu hipotezine yol açan birtakım hususlar vardır (8). Bu nedenlerle, bu çalışmada Tip 2 Diyabetes Mellitus tanısı alan hastalarda GNB3 geni C825T ve C1429T polimorfizimlerinin diyabetik nefropati üzerindeki etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır.

GENEL BİLGİLER

DIYABETES MELLİTUS

Diyabetes mellitus (DM), insülin salınımı, insülin etkisi ya da her ikisindeki bozukluklardan kaynaklanan, özellikle hiperglisemi ile karakterize, karbonhidrat, lipid ve protein metabolizması bozuklukları ve hızlanmış aterosklerozla birlikte mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonlarla seyreden kronik bir metabolizma hastalığıdır (9). Bu komplikasyonlardan biri de hem Tip 1 hem de Tip 2 DM'da gelişebilen DN'dir. Diyabetin vasküler komplikasyonları bütün dünyada en önemli morbidite ve mortalite nedeni olmayı sürdürmektedir (10).

Diyabetes Mellitus'un Epidemiyolojisi

Dünya genelinde insanların yaşam sürelerinin giderek uzaması, fiziksel aktivitenin azalması ve obezitenin artması, diabetes mellitus insidans ve prevalansında hızlı bir artışa neden olmuştur (11). Dünya sağlık örgütünün öngörülerine göre 2000 yılında tüm dünyada 171 milyon olan diyabetli sayısı 2030 yılında 366 milyona ulaşacaktır. Yine dünya sağlık örgütüne göre 2004 yılında hiperglisemiye bağlı gelişen komplikasyonlar sonucu 3.4 milyon kişinin hayatını kaybettiği bilinirken, sağlık teknolojisindeki tüm gelişmelere ve diyabet konusunda toplumun daha da bilinçlenmesine rağmen bu sayı 2030 yılında ikiye katlanacaktır. Ülkemizde de İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi ve Sağlık Bakanlığı'nın saha işbirliği ile 2010 yılında gerçekleştirilen 'Türkiye Diyabet, Hipertansiyon, Obezite ve Endokrinolojik Hastalıklar Prevalans Çalışması-II (TURDEP-II Çalışması)'na göre 1998 de % 7 olan erişkin diyabet sıklığının % 13.7'ye ulaştığı görülmüştür. Bu oran tüm

öngörülerin çok üzerinde çıkmıştır. Bu sonuçlar Diabetes Mellitusun önümüzdeki yıllarda ülkemizde çok daha öncelikli bir sağlık sorunu olacağını ortaya koymaktadır. Diyabetin her iki tipi de Türkiye’de ve Dünya’da yukarıdaki belirtildiği şekilde artmasına rağmen özellikle tip 2 diyabet obezitenin artışına, fiziksel aktivenin azalmasına paralel olarak daha hızlı bir artış göstermektedir. (12).

Diyabetes Mellitus’un Sınıflandırılması

Diyabet ve glukoz metabolizmasının bozukluklarının tanı ve sınıflaması kolaylıkla yapılabilir. Ancak Diyabetes Mellitus sınırları net olarak çizilmiş basit bir hastalık olmayıp değişik patolojik süreçler sonucu ortaya çıkan ve çok farklı etiyolojik faktörler içeren kompleks bir hastalıktır. Bu yüzden hastalık süreç içerisinde farklı şekillerde sınıflandırılmış ve adlandırılmıştır. Tablo 1’de diyabetin etyolojik sınıflamasında dört klinik tip yer almaktadır. Bunlardan üçü (Tip 1 diyabet, Tip 2 diyabet ve Gestasyonel Diyabetes Mellitus) primer, diğeri (spesifik diyabet tipleri) ise sekonder diyabet formları olarak bilinmektedir (13). Konumuzla ilişkili olan Tip 2 Diyabetes Mellitus hakkında aşağıda genel bilgiler verilmiştir.

Tip 2 Diyabetes Mellitus: Tip 2 DM, değişik derecelerde insülin direnci, bozulmuş insülin salınımı ve glukoz üretiminde artma ile karakterize heterojen bir hastalıktır (14). Hastaların çoğu obezdir (%80) ve obeziteye bağlı periferik insülin direncinin beta hücre tüketimine yol açtığı düşünülmektedir. İnsülin direnci oluşmasında dokularda, bilhassa adale dokusunda insülin reseptör ve postreseptör bozukluğunun mevcudiyeti ile glukoz taşıyıcılarının bozukluğu söz konusudur (15).

Hastalıktan sorumlu genleri saptamaya yönelik çalışmalar, glukoz ve insülin sisteminin çeşitli basamaklarında saptanmış birçok mutasyon tespit etmiş olmasına rağmen bunların hiç biri bütün diyabetlilerde sabit olarak bulunmamaktadır ve tip 2 diyabet için karakteristik değildir. Sadece tip 2 diyabetin bir varyantı olan maturity onset diabetes of the young (gençlerde maturite ile başlayan diyabet) (MODY)’nin otozomal dominant geçiş gösteren bir genetik durum olduğu ispatlanmıştır (16).

Tablo 1. Diyabetes Mellitusun Etiyolojik Sınıflaması

1. Tip 1 Diyabet (Genellikle mutlak insülin noksanlığına sebep olan β hücre yıkımı vardır.)	
A. İmmün aracılıklı (% 90)	
B. İdyopatik (% 10)	
2. Tip 2 Diyabet (İnsülin direnci zemininde ilerleyici insülin sekresyon defekti ile karakterizedir.)	
3. Gestasyonel Diyabetes Mellitus (GDM)(Gebelik sırasında ortaya çıkan ve genellikle doğumla birlikte düzelen diyabet.)	
4. Diğer spesifik diyabet tipleri	
A. β-hücre fonksiyonlarının genetik defekti(Monogenik diyabet formları) <ul style="list-style-type: none">➤ 20. Kromozom, HNF-4α (MODY1)➤ 7. Kromozom, Glukokinaz (MODY2)➤ 12. Kromozom, HNF-1α(MODY3)➤ 13. Kromozom, IPF-1 (MODY4)➤ 17. Kromozom, HNF-1β (MODY5)➤ 2. Kromozom, NeuroD1(MODY6)➤ Mitokondriyal DNA ➤ Neonatal diyabet (Örn. Kir 6.2 mutasyona bağlı diyabet)➤ Diğerleri	E. İlaç veya kimyasal ajanlar <ul style="list-style-type: none">➤ Atipik anti-psikotikler➤ Anti-viral ilaçlar➤ B-adrenerjik agonistler➤ Diazoksid➤ Fenitoin➤ Glukokortikoidler➤ A-İnterferon➤ Nikotik asit➤ Pentamidin➤ Proteaz inhibitörleri➤ Tiyazid grubu diüretikler➤ Tiroid hormonu➤ Vacor➤ Diğerleri
B. İnsülin etkisindeki genetik defektler <ul style="list-style-type: none">➤ Leprechaunism➤ Lipoatrofik diyabet➤ Rabson-Medenhall sendr➤ Tip A insülin direnci➤ Diğerleri	G. İmmün aracılıklı nadir diyabet formları <ul style="list-style-type: none">➤ Anti-insülin reseptör antikorları➤ Stiff-man sendromu➤ Diğerleri
C. Pankreasın ekzokrin doku hastalıkları <ul style="list-style-type: none">➤ Fibrokalkülöz pankreopati➤ Hemokromatoz➤ Kistik fibrozis➤ Neoplazi➤ Pankreatit➤ Travma/pankreatektomi➤ Diğerleri	H. Diyabetle ilişkili genetik sendromlar (Monogenik diyabet formları) <ul style="list-style-type: none">➤ Alström sendromu➤ Down sendromu➤ Friedreich tipi ataksi➤ Huntington korea➤ Klinefelter sendromu➤ Laurence-Moon-Biedl sendromu➤ Miyotonik distrofi➤ Porfiriya➤ Prader-Willi sendromu➤ Turner sendromu➤ Wolfram(DIDMOAD) sendromu➤ Diğerleri
D. Endokrinopatiler <ul style="list-style-type: none">➤ Akromegali➤ Aldosteronoma➤ Cushing sendromu➤ Feokromositoma➤ Glukagonoma➤ Hipertiroidi➤ Somatostatinoma➤ Diğerleri	

Diyabetes Mellitusun Komplikasyonları

Diabetes mellitusun komplikasyonları akut ve kronik olarak aşağıda Tablo 2' de sınıflandırılmıştır.

Tablo 2. Diyabetes Mellitusun komplikasyonları

Akut Komplikasyonlar	Kronik Komplikasyonlar	
	Makrovasküler	Mikrovasküler
1-Diyabetik Ketoasidoz 2-Hiperosmolar Hiperglisemik Durum 3-Laktik Asidoz 4-Hipoglisemi	1-Kardiyovasküler Hastalıklar 2-Serebrovasküler Hastalıklar 3-Periferik damar Hastalığı	1-Diyabetik Nefropati 2-Diyabetik Retinopati 3-Diyabetik Nöropati

Diyabetin hem kendisi hem de oluşan uzun süreli komplikasyonları, hastanın yaşam kalitesini olumsuz yönde etkileyen ve erken ölümlerle sonuçlanabilen önemli sorunlardır (17). Biz burada konumuzla daha yakından ilgili olduğundan diyabetik nefropati üzerinde duracağız.

DİYABETİK NEFROPATİ

Tanım ve Epidemiyoloji

İlk olarak 1936'da Kimmelsteil ve Wilson tarafından tanımlanan diyabetik nefropati, diyabetin en önemli ve yaşam kalitesini bozan komplikasyonlarından birisidir. Artan sayıda hastanın son dönem böbrek yetmezliği (SDBY) geliştirmesinde en önemli neden diyabetik nefropatidir ve diyaliz uygulanan hastaların büyük bir bölümünü diyabetliler oluşturmaktadır (12,13). Ülkemizde'de Türk Nefroloji Derneği 2009 verilerine göre diyaliz hastaları arasında DM % 35 ile SDBY nedenleri arasında birinci sırada yer almaktadır (18). Amerika Birleşik Devletleri'nde 1995 rakamlarına göre, tip 2 diyabetli hastalarda nefropati prevalansının tanı sırasında %5-10, diyabetin 20. yılında olduğunda ise %25-60 olduğunu göstermektedir. Diyabetik nefropatili hastaların ise %50-60'ı Tip 2 diyabetes mellitusa sahiptir (17-19).

Risk Faktörleri

Diyabetik nefropatinin gelişiminde en önemlisi hastalığın süresi olmak üzere birçok risk faktörü tanımlanmıştır. DN gelişimi için risk faktörleri; hiperglisemi, hipertansiyon, dislipidemi, sigara, aile öyküsü ve renin anjiyotensin aldosteron aksını etkileyen gen polimorfizmi gibi genetik faktörlerdir (20).

Hipergliseminin DN'nin gelişmesinde anahtar rolü oynadığı, Diabetes Control and Complications Trial çalışmasında kanıtlanmıştır (21). Gerek tip 1 gerekse tip 2 DN'nin bazı ailelerde daha çok görülmesi, genetik faktörlerin de belirli roller oynadığını düşündürmektedir (22,23). Tip 1 ve tip 2 diyabetiklerin diyabeti bulunmayan birinci derece yakınlarında kardiyovasküler olaylara toplumun geneline oranla daha sık rastlanmaktadır (24,25). SDBY gelişme riski etnik kökene göre de değişmektedir. Bir çalışmada primer nedeni diyabet olan SDBY hastaları arasında Afrika kökenli yerli Amerikalılar açısından belirgin bir risk artışı dikkati çekmektedir. Yerli Amerikalı popülasyonunda SDBY insidansı 600 olgu/milyon iken, beyaz popülasyonda 100 olgu/milyon olarak bulunmuştur (26,27). Bir başka çalışmada anjiyotensin dönüştürücü enzim geni intron 16'daki polimorfizm ile nefropati gelişme riski arasında ilişki bulunmuştur. Bu gendeki delesyon varyantları açısından homozigot olanlarda nefropatinin daha hızlı seyrettiği öne sürülmektedir (28,29). Sigaranın nefropatinin başlaması ve ilerlemesi üzerinde temel bir etkiye sahip olduğu uzun zamandır bilinmektedir. Böbrek yetmezliği olan ve sigara içen diyabetiklerdeki filtrasyon kaybı sigara içmeyen diyabetiklerdekinin iki katı olarak hesaplanmıştır (30). Nefropati başladıktan sonra tablonun ilerlemesine yol açan en önemli risk faktörü ise hipertansiyondur. Normal bireylerde glomerul mikrodolaşımı sistemik kan basıncındaki değişikliklere karşı glomerul öncesi yüksek direnç tarafından korunur. Diyabetik nefropatili hastalarda ise afferent arteriyollerde vazodilatasyon nedeni ile aort basıncının önemli bir bölümü glomerul yatağına aktarılır. Böylece glomerul kapiller basıncı normal kan basıncı değerlerinde bile yükselir ve bu artış sistemik hipertansiyon varlığında daha da belirgin hale gelir (31).

DİYABETİK NEFROPATİ PATOGENEZİ

Diyabetik nefropati patogenezinde, glukozun direk toksik etkileri, polyol yolu aktivasyonu, protein, lipid, lipoprotein, aminoasitlerin glikasyonu ve ileri glikasyon ürünlerinin oluşumu, oksidatif stres, çeşitli büyüme faktörlerinin artmış aktivitesi ve renin-anjiyotensin aldosteron sistemi rol oynamaktadır.

Genetik

Diyabetiklerin sadece bir kısmında nefropati gelişiyor olması, DN gelişiminde genetik yatkınlığın önemini ortaya koymaktadır (32). Tip 1 ve 2 DM'li ikizler ve ailelerle yapılan çalışmalar, DN gelişiminde genetik yatkınlığın önemli rolünü desteklemektedir (33,34). Her iki diyabet tipinde de DN'nin ailesel kümelenme gösterdiği ortaya konmuştur. Tip 1 diyabetik olan kardeşlerden birinde proteinüri varsa diğer kardeşte proteinüri gelişme riski yüksek bulunmuştur (35). Bazı genler çeşitli enzim, hormon, sitokin, büyüme faktörü, lipid ve yapısal komponentlerin üretim ve fonksiyonunu düzenlemektedir. DN gelişimine yatkınlık yaratabilecek aday genlerden bazıları anjiotensinojen, anjiotensin dönüştürücü enzim, Agt (anjiyotensin) II-tip 1 reseptör, nitrik oksit sentaz, endotelin-1, apolipoprotein E, AR, ileri glikasyon son ürün reseptörü, perlecan, nefrin ve TGF- β 1 genleridir (36). Bunun yanında GNB3 geni 825T alelinin hem Tip1 hem de Tip2 diyabette diyabetik nefropatinin başlangıç tahmini için iyi bir belirteç olduğu hipotezine yol açan birtakım hususlar vardır. Bu nedenlerle, bu çalışmada Tip II Diyabetes Mellitus tanısı alan hastalarda GNB3 geni C825T ve C1429T polimorfizimlerinin diyabetik nefropati üzerindeki etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Hiperglisemi

Kronik hiperglisemik bir tablo olan DM'ta, glukozun aracılık ettiği çok sayıda metabolik olay komplikasyonların gelişmesinde rol oynamaktadır. Böbrek hasarı gelişiminde, birbirinden bağımsız etkileri olduğu düşünülen bu metabolik olayların birbirleriyle etkileşim içinde olduğu son zamanlarda anlaşılmıştır. Hiperglisemi ile yapımı artan serbest oksijen radikalleri (SOR)'nin bu metabolik yolların aktivasyonu ve karşılıklı etkileşiminde anahtar faktör olduğu gösterilmiştir (37).

1. Glukozun direk toksik etkileri (glukotoksisite): Glukoz, hücrelere doğrudan toksik etkide bulunur. Hücre proliferasyonu, hücre dışı matriks (ECM) birikimine neden olan kollajen, fibronektin, laminin, TGF- β 1 sentez artışı ve mezangiyal hücrelerde azalmış heparan sülfat sentezine bağlı proteinüri, glukozun direk toksik etkileri arasında sayılabilir (38).

2. Polyol yolu aktivasyonu: Glukoz, nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) varlığında, AR enzimi tarafından sorbitole dönüştürülür. Hiperglisemide bu dönüşüm artar. NADPH, nitrik oksit (NO) sentezi ve serbest radikallerin uzaklaştırılmasında rol alan glutatyon yapımında kullanılır. Hiperglisemide NADPH tüketiminin artması ile NO yapımı

azalır, serbest radikallere bağı vasküler hasar gelişir. Hücre içinde artan sorbitol etkisiyle miyoinozitol ve Na⁺K⁺ adenozin trifospataz (ATPaz) aktivitesi azalır. Sodyum hücre içinde birikir, ozmoregülasyon bozulur, hücre ödemi ve fonksiyon bozukluğu ortaya çıkar. Sorbitol ayrıca, nikotinamid adenin dinükleotid (NAD) varlığında, sorbitol dehidrogenaz enzimiyle fruktoza dönüştürülür. Fruktozun non-enzimatik glikozillenmesi sonucu ileri glikasyon son ürünleri (AGE) oluşur ve doku hasarına neden olur (39).

3. Non enzimatik glikozillenme ve ileri glikasyon ürünleri: İleri glikasyon son ürünleri, bir enzim aracılık etmeksizin, aminoasit, lipid ve lipoproteinlerin kendiliğinden indirgenmesiyle oluşur (40). Maillard reaksiyonu adı verilen bu sürecin ilk basamağında oluşan Schiff bazlar, moleküler yeniden düzenlenme sonucu Amadori cisimlerine dönüşür. Son 2-3 aydaki glisemik kontrol hakkında fikir veren hemoglobin A1c, bir Amadori cisimidir. Bu ürünlerin oluşumundan sonraki aşama, geri dönüşümsüz AGE'nin ortaya çıkması ile sonuçlanır. Amadori cisimlerinin, sonraki basamağa ilerlemesi, hipergliseminin düzeyine bağlıdır (39). AGE düzeylerinin, tüm insanlarda yaşlanma ile serum ve cilt, lens gibi kollajen içeren dokularda arttığı gösterilmiştir (41). AGE üretimi, diyabetiklerde, diyabetik olmayanlara göre en az iki kat artmıştır. Diyabetik nefropatili olguların serum ve skleroze glomerüllerindeki AGE düzeylerinin artmış olduğu, glomerüldeki AGE varlığının diyabetik renal hastalığın başlatıcısı ve DN'nin klinik seyriyle ilişkili olduğu gösterilmiştir. Artmış AGE oluşumu, diyabetin mikrovasküler komplikasyonlarının patogeneğinde önemli rol oynamaktadır. Deneysel çalışmalarda, ileri glikozile albüminin diyabetik olmayan hayvanlara uzun süre verilmesinin, DN'dekine benzer şekilde, kollajen, laminin ve TGF-β 1 gen aktivasyonu ile ilişkili glomerüler değişikliklere ve proteinüriye yol açtığı gösterilmiştir (42). AGE'lerin DN'deki moleküler mekanizmaları tam aydınlatılamamış olmakla birlikte, yapılan çalışmalarla bazı etkileri ortaya konmuştur:

- Büyüme faktörleri, ECM proteinleri ve inflamatuvar sitokinlerin genetik indüksiyonu ile hücre proliferasyonunu artırır.
- AGE'ler kollajen ve diğer matris proteinlerine bağlanarak, vasküler geçirgenliği artırır ve bölgeye mononükleer hücre göçüne neden olur (43).
- NO yapımını azaltarak, endotel disfonksiyonuna yol açar ve ateroskleroz sürecinde rol alır.
- Endotel, mezangiyal, damar düz kas hücreleri ve makrofajlar üzerinde bulunan özel AGE reseptörüne bağlanarak lipid peroksidasyon artışına yol açar (42).

- Lipid peroksidasyon artışı, vasküler geçirgenliği artırarak, bölgeye mononükleer hücre göçüne yol açar.

- Lipid peroksidasyon artışıyla, oksidatif strese duyarlı nükleer faktör kapp B (NF-kB), TGF- β 1 gen aktivasyonuna neden olur. Sonuçta ECM üretimi artar, yıkımı azalır. Deneysel çalışmalarda, AGE üretimi aminoguanidin ile inhibe edildiğinde, diyabete bağlı mikrovasküler komplikasyonların ve plazma lipid bozukluklarının önemli ölçüde azaldığı ve AGE'lerin proteinlere bağlanmasını engelleyen phenacylthiazolium bromide ile DN'deki renal hasarın gerilediği, vasküler kompliyansın yeniden sağlandığı gösterilmiştir (44).

4. Protein kinaz C aktivasyonu: Hiperglisemide aktive olan protein kinaz C (PKC), böbrek hücrelerinde fibronektin, tip IV kollajen, TGF- β 1 sentezini artırır. Angiotensin II(Agt II) de, tip 1 reseptör aktivasyonu ile mezangiyal ve tübüler hücrelerde PKC'yi aktive eder. PKC aktivasyonu glomerüloskleroz ile sonuçlanır (45,46).

Oksidatif Stres

Hücrelerde yapısal ve fonksiyonel değişikliklere neden olan reaktif oksijen ürün oluşumunun arttığı, hem diyabetik hasta monosit ve granülositlerinde, hem de yüksek glukoz maruz bırakılan normal monosit ve granülositlerde gösterilmiştir (47). Glukozun otooksidasyonu, AGE'ler, prostoglandinler ve agt II reaktif oksijen ürünlerinin ana kaynaklarıdır. Diyabette gözlenen artmış SOR yapımına rağmen plazma ve hücre içi antioksidan enzim (glutatyon, E vitamini, askorbik asit, katalaz, süperoksid dismutaz) kapasitesi azalmıştır. Hücre hasarına yol açan reaktif oksijen ürünleri ve bu hasarı önlemekle görevli antioksidan savunma sistemi arasındaki dengenin bozulması tip 2 diyabetteki vasküler değişikliklerin esas sorumlusudur (40,48). Nefropati dahil, diyabetin tüm mikro ve makrovasküler komplikasyonları bu vasküler değişiklikler sonucu ortaya çıkmaktadır (49). Kornatowska ve arkadaşları, 21 proteinürik, 14 normoalbuminürik tip 2 diyabetik hasta ve 19 sağlıklı gönüllüde, lipid peroksidasyonu ve antioksidan enzim aktivitesi arasındaki farkları incelemiştir. Kontrol grubuna kıyasla, lipid peroksidasyonu tüm diyabetik hastalarda yüksek, antioksidan (süperoksid dismutaz ve katalaz) enzim aktivitesi tüm diyabetik hastalarda düşük bulunmuştur (50). Diyabetikler arasında yapılan karşılaştırmada, bu olumsuz sonuçların proteinürisi olanlarda daha belirgin olduğu görülmüştür. Araştırmacılar, diyabetle artan ve vasküler komplikasyonların ortaya çıkmasında önemli rol oynayan oksidatif stresin nefropati gelişmesiyle şiddetlendiği sonucuna varmışlardır (37).

Craven ve arkadaşları deneysel çalışmalarında, kontrol grubundaki sağlıklı farelere göre, diyabetik farelerde böbrek ağırlığı, glomerüler hacim, üriner albümin atılımı ve glomerüler TGF- β 1 üretiminin arttığını, bu olumsuz gelişmelerin C vitamini verilen grupta anlamlı olarak düşük bulunduğunu bildirmişlerdir (51). SOR'nin, nefropati gelişimi üzerindeki başlıca etkileri aşağıda sıralanmıştır:

- SOR'nin yol açtığı lipid peroksidasyonu sonucunda ortaya çıkan bazı prostoglandinler, şiddetli renal vazokonstriksiyona neden olmaktadır.

- SOR, glomerülde seçici geçirgenliği sağlayan hücrelerden biri olan podositlerde, vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) sentezini artırmaktadır. VEGF, podositlerin makromoleküllere olan geçirgenliğini artırarak proteinüriye yol açmaktadır (52).

- SOR ayrıca, membran lipidlerinin peroksidasyonu yoluyla vasküler geçirgenliği artırmaktadır (42).

- SOR, tip 2 DM'de sık görülen hiperlipidemi ile beraber olduğunda, düşük dansiteli lipoprotein (LDL) oksidasyonunu ve ateroskleroza hızlandırabilmektedir.

- SOR, NF-kB aracılığıyla büyüme faktörleri ve sitokin genlerinin uyarılmasına yol açmaktadır. TGF- β 1 geni bu uyarıya artmış ECM protein sentezi ile cevap vermektedir (37).

- Hiperglisemi varlığında SOR, PKC aktivasyonu ile başlayan yolakları uyarmaktadır (52,53).

Büyüme Faktörleri

Renal hasarın ilerleyici atrofiye neden olduğu pek çok nefropatiden farklı olarak DM'ta, proteinürinin geliştiği ve glomerüler filtrasyonun (GFR) azaldığı evrede bile, nefronda hipertrofi mevcuttur. DN, glomeruloskleroz ve mezangiyal matriks artışı ile karakterizedir. Büyüme faktörlerinin, DN gelişiminde oynadığı rol genel kabul görmüştür. TGF- β 1'in DN'de yapımı ilk ve en yüksek oranda artan büyüme faktörü olduğu saptanmıştır (54).

Hemodinamik Faktörler

Hiperfiltrasyon ve artmış intraglomerüler basınç gibi hemodinamik mekanizmalar renal hasarın ortaya çıkması ve ilerlemesiyle ilişkilidir. Efferent arterioller vazokonstriksiyona kıyasla rölatif afferent arterioller vazodilatasyon, sistemik basıncı glomerüler kapiller ağa yansıtarak, intraglomerüler basıncı artırır. Bu hemodinamik değişiklikler artmış proteinüri ve hızlanmış glomeruloskleroz ile birliktelik gösterir. Deneysel çalışmalarda intraglomerüler basıncın düşürülmesiyle renal hasarlanmanın önemli ölçüde yavaşladığı gösterilmiştir (55).

Renin Anjiotensin Aldosteron Sistemi (RAAS)

Diabetes Mellitus'ta dolaşımdaki RAAS genellikle baskılanmış veya normal olmasına karşın, böbrek dokusunda yer alan lokal RAAS uyarılmıştır. Renal interstisyumdaki Agt II düzeyleri plazmadakine göre bin kat yüksektir. Hiperglisemi, doku Agt II düzeylerini artırarak oksidatif stres ve endotelial disfonksiyonuna neden olur ki bu süreç vazokonstriksiyon, tromboz, inflamasyon, vasküler remodeling, TGF- β 1 aracılıklı ECM birikimi ile sonuçlanır. Çok sayıda deneysel çalışmada, ACE inhibisyonu veya Agt II-tip 1 reseptör blokajıyla renal histopatolojik değişikliklerin geri döndürülebildiği gösterilmiştir (56).

Morfolojik Değişiklikler

Morfolojik değişiklikler DN'de tüm renal kompartmanları etkileyerek ortaya çıkabilmektedir. Bu değişikliklerin bir kısmı diyabet için spesifik olmasına karşın bir kısmı da nonspesifiktir (53,57).

Diyabetik nefropatide görülebilen morfolojik değişiklikler:

- Glomerüller lezyonlar
 - Kapiller bazal membran kalınlaşmaları
 - Diffüz glomerüloskleroz
 - Nodüler glomerüloskleroz
- Renal vasküler lezyonlar
 - Renal ateroskleroz ve arteriyoskleroz
- Pyelonefrit
 - Akut ve kronik piyelonefrit
 - Nekrotizan papillit

Glomerüller lezyonlardan en önemlileri kapiller bazal membran kalınlaşmaları, diffüz glomerüloskleroz ve nodüler glomerülosklerozdur (Kimmelstiel-Wilson lezyonu). Glomerüller kapiller bazal membran kalınlaşmaları, tüm damar boyunca görülür ve diyabetin başlamasından sonra birkaç yıl içinde de elektron mikroskopik incelemede gözlenebilir. Bazen renal fonksiyonlarda herhangi değişim olmadan da izlenebilir. Diffüz glomerüloskleroz, mezangial hücre proliferasyonu ve beraberinde mezangial matrikste diffüz artış olarak tanımlanabilir ve her zaman membran kalınlaşması ile ilişkilidir. Nodüler glomerüloskleroz veya Kimmelstiel-Wilson lezyonu, lobulun mezangial merkezinde tabakalanmış matriksin top şeklindeki birikimleri ile karakterize bir glomerül lezyonudur. Glomerülün periferinde gelişmeye eğilimi

olan nodüller, mezangiumdan kaynaklandıkları için glomerüler kapiller kıvrımlarını daha da perifere iterler. Tübüller, glomerülün efferent arteriyolleri ile beslendiklerinden ileri glomerülosklerozda tübüllerde iskemi ve interstisyel fibrozis görülür (58).

Diyabetiklerdeki sistemik damar lezyonlarının önemli bölümünü renal ateroskleroz ve arteriyoskleroz oluşturmaktadır. Bu hiyalen arteriyoskleroz sadece afferent arteriyolleri değil, aynı zamanda efferent arteriyolleri de etkiler ki efferent arteriyoskleroz diyabetli olmayan kişilerde nadiren gözlenen bir lezyondur (57-59).

Piyelonefritin hem akut hemde kronik tipi diyabetiklerde normal popülasyona göre daha sık olarak ortaya çıkar. Özellikle akut piyelonefritin özel ve şiddetli bir tipi olan nekrotizan papillit diyabetiklerde normal popülasyona göre çok daha sık olarak görülmektedir. Bunun nedeni mikroanjiyopatiden kaynaklanan iskemi ve bakteriyel enfeksiyona olan eğilimdir (58).

Klinik Evreleri

Diyabetin başlangıcından SDBY gelişimine kadar ki süre yaklaşık 15–30 yıldır (60). Böbrek yetmezliği gelişen Tip 1 ve Tip 2 DM'lu hastalarda böbrek hastalığının doğal seyri oldukça iyi belirlenmiştir.

Diyabetik nefropati fizyopatolojik olarak 5 evreden geçer:

1. Glomerüler hiperfiltrasyon
2. Normoalbuminüri
3. Yerleşmekte olan albuminüri
4. Aşık nefropati
5. Son dönem böbrek yetersizliği

Evre 1: Glomerüler Hiperfiltrasyon(Hemodinamik Değişiklikler): Bu evrede GFR artmıştır. Tip 1 diyabetiklerde renal vazodilatasyon ve hiperfiltrasyon erkenden ortaya çıkar. Tip 2 diyabetikler de ise bu değişiklikler başlangıçta sıklıkla olmayabilir.

Erken görülen işlevsel değişikliklerden biridir. İnsanlarda hiperfiltrasyon ve böbrek boyutlarında büyüme hem hiperfiltrasyon hem de metabolik bozukluğun ağırlığı ile ilişkilidir. Hastalarda ağır asidoz ve dehidratasyon varsa glomerüler filtrasyon hızı (GFR) düşmektedir. Tanı konduğu anda GFR > 150 ml/dk ise nefropati riski yüksektir.

Evre 2: Normoalbuminürik evre(Erken Renal Değişiklikler): Bu evrede, hasta diyabet yaşı ve metabolik kontrolü ne olursa olsun normoalbuminüriktir. Bazı diyabetiklerin

kötü metabolik kontrole karşın böbrek yetersizliğinden korunması genetik faktörlerle ilgili olmalıdır. Kan basıncı ise çoğu kez normaldir. Sıkı kan şekeri regülasyonu ile çoğu kez bu dönem 5–15 yıl sürer.

Evre 3: Yerleşmekte olan diyabetik nefropati evresi(Nefropatinin Başlangıç Dönemi (Mikroalbuminüri)): Glomerüler filtrasyon hızı normal veya yüksek olabilir. 20–70 µg/dk mikroalbuminüri ile GFR daha yüksektir. Yani albuminüri artıp nefropati ilerledikçe GFR azalmaktadır. Bu yüzden mikroalbuminüri nefropatinin ilerlemesini anlamak için önemli bir göstergedir.

Mikroalbuminüri Tip 1 diyabetiklerde diyabetin başlangıcından yaklaşık olarak 5–15 yıl sonra çıkar. Tip 2 diyabetiklerde, mikroalbuminüri diyabetin klinik bulguları ortaya çıkmadan da önce bulunabilir. Tip 2 diyabetiklerde, Tip 1 diyabetiklere göre daha fazla görülmektedir.

Evre 4:Aşık proteinüri evresi(İlerlemiş Nefropati): Bu evrede proteinüri >300 mg/gün'dür. Bu düzey eser proteinüri olarak belirtilir. 0.5 g/gün'den fazla olmaya başlayınca mikroalbuminüri veya proteinüri denir. Proteinüri döneminde GFR ve kreatinin normal bulunabileceğinden hipertansiyon, retinopati gibi diğer anjiyopatik komplikasyonlar da birlikte değerlendirilmelidir. Tip 2 diyabeti olan proteinürili hastaların prognozu kötüdür, bu durum sadece böbrek hastalığına ve son dönem böbrek yetersizliğine bağlı değil ayrıca kardiyovasküler mortalite riskindeki artışa da bağlıdır (61).

Bu evrenin histolojik özelliği glomerulosklerozdur. Başlangıçta GFR'in devamı için glomerüler hipertrofi ile bu kompanse edilmektedir. Diyabetik nefropatinin ilerlemesi ile glomerüler skleroz gelişir ve glomerüler kompensasyon mekanizması yetersiz kalır. Bu evrenin karakteristik özelliği GFR'nin progresif azalması, proteinüri ve hipertansiyonun yerleşmesi, azoteminin eklenmesidir. Tip1 DM'lilere göre Tip 2 diyabetiklerde göreceli olarak 5 yıl daha erken görülür.

Diyabetik nefropatide, diğer progresif glomerülopatilerde olduğu gibi proteinüri renal fonksiyondaki azalmanın güçlü ve bağımsız bir göstergesidir. Aşırı protein tubulointerstisyel hasarı artırır ve hastalığın progresyonuna neden olur. Özellikle proteinin tübüllerden aşırı reabsorpsiyonu ve tübüler epitel hücrelerde birikimi, vazoaaktif ve inflamatuvar sitokinlerin (endotelin-1, osteopontin, monosit kemoatraktan protein-1 (MCP-1) gibi) salınmasına neden olur. Bu faktörler proinflamatuvar ve fibrotik sitokinlerin aşırı ekspresyonuna, mononükleer hücrelerin infiltrasyonuna, tübülointerstisyumun hasarına ve renal skarlaşma ile yetersizliğe

neden olurlar. Renal hemodinamik değişikliklere neden olan bu kaskad hem primer olarak hem de nefron kaybına sekonder olarak proteinürinin artmasına neden olur.

Bu durum da interstisyel skarlaşmayı artırır ve daha fazla nefron kaybına neden olur (62).

Evre 5: Son dönem böbrek yetersizliği evresi: Üremi ile seyreder. Bu dönemde tedavi diyaliz ve transplantasyondur. Olguların tamamına yakını hipertansiftir. Aşık proteinüri döneminden SDBY'ne gidiş hızları Tip 1 ve Tip 2 diyabetiklerde benzer bulunmuştur.

Diyabetik nefropatinin en erken belirtisi > 30 mg/gün veya 20 μ g/dk albuminürinin olmasıdır. Üç aylık periyod içinde yapılan 3 tetkikin iki veya daha fazlasında persistan albuminüri > 300 mg/24 saat veya >200 μ g/dak ile karakterize klinik sendrom diyabetik nefropati olarak tanımlanmaktadır (61).

Tip 1 diyabetik hastaların %80'inden fazlasında sürekli mikroalbuminüri yılda %10–20 artarak 10–15 yıllık süreç içinde aşık nefropati şeklinde ilerleme gösterir. Nefropatinin bu şekilde ilerlemesi hem hipertansiyon gelişimini hızlandırır hem de GFR giderek azalmaya başlar. Aşık nefropatili olan Tip 1 diyabetiklerin %50'sinde 10 yıl içinde, %75'den fazlasında ise 20 yıl içinde son dönem böbrek yetersizliği gelişir. Mikroalbuminürisi olan Tip 2 diyabetiklerde klinik olarak %20–40 oranında aşık nefropatiye gidiş gözlenir. Ancak 20 yıllık süre içinde son dönem böbrek yetersizliği bunların %20'sinde gelişir (62).

Sinyal İletimi

Sinyal transdüksiyon yolları olarak da bilinen çeşitli sinyal iletim mekanizmalarında sinyal terimi reseptör aktivasyonunu, transdüksiyon ise bir uyarının yanıt dönüşmesindeki süreci anlatmaktadır (59). Sinyal oluşumunda reseptör adı verilen özgül proteinlere ihtiyaç vardır. Reseptörler sinyal molekülünü geri dönüşümlü olarak bağlar ve hedef hücrede bir yanıt oluştururlar. Pek çok durumda bu reseptörler hedef hücre yüzeyinde bulunan transmembran proteinleridir. Ligand yani ekstrasellüler sinyal molekülü bağlandığında aktive olurlar. Hücrenin karakterine göre intrasellüler sinyal kaskadını başlatırlar. Bazı durumlarda ise reseptörler hücrenin içindedir ve sinyal molekülü reseptörü aktive etmek için hücre içine girer. Bu sinyal molekülleri küçük ve hidrofobik yapıda olduklarından plazma membranından difüze olabilirler. Sinyal transdüksiyon sistemlerinin ortak özellikleri özgüllük, amplifikasyon, desensitizasyon ve integrasyondur. Reseptör ligandı yüksek derecede özgüllük ve duyarlılıkla bağlamaktadır. Reseptör etki mekanizmalarında çoğunlukla enzim aktivasyonu

olmaktadır. Özellikle protein kinaz aktivasyonu ile ilerleyen mekanizmalarda sinyal amplifikasyonu olmakta ve bu şekilde hücrenin liganda duyarlılığı artmaktadır. Eğer uyarıcı molekül dolaşımında uzun süre yüksek düzeyde kalırsa hücre reseptörlerini inaktifleştirerek, sayılarını azaltarak veya hücre yüzeyinden uzaklaştırarak ligand etkisine yanıtız kalmaktadır. Sinyal transdüksiyon mekanizmaları arasında haberleşme ve etkileşim bulunmaktadır. Bu sayede hücre uyarıları bütünleştirerek yanıtını oluşturmaktadır (63).

Sinyalizasyonda genel olarak beş temel mekanizma bulunur (64):

1) Lipidde çözünebilen ligand membranı geçip intrasellüler reseptöre bağlanarak etki gösterir.

2) Transmembran reseptör proteininin ekstrasellüler bölgesine ligand bağlandığında intrasellüler bölgede enzimatik aktivite olur. Reseptörün kendisi enzim gibi davranır. Reseptörde intrinsek enzim aktivitesi vardır.

3) Ligand yine transmembran reseptörünün ekstrasellüler kısmına bağlanır ve bağımsız bir protein tirozin kinazı aktive eder. Örneğin Jak kinaz. Burada reseptörün intrinsek kinaz aktivitesi yoktur.

4) Ligand veya iyon bağımlı transmembran kanalı ligandın bağlanması ile açılıp kapanabilir.

5) Transmembran reseptör proteinine ligand bağlandığında G-protein stimule olur ve intrasellüler ikincil haberciler yolu ile sinyal oluşur.

Reseptör aracılı sinyal iletimi aşağıdaki şekilde sınıflandırılabilir (63-67):

A) Hücre içi reseptörler (Gen transkripsiyonunu regüle eden nükleer reseptörler)

B) Hücre yüzey reseptörleri:

a) İyon kanalı bağı reseptörler (iyonotropik reseptör)

- Voltaj bağımlı

- Ligand bağı

b) Enzim bağı (kinaz bağı) reseptörler

- Reseptör guanilil siklaz

- Reseptör tirozin kinaz

- Tirozin kinazla ilişkili reseptörler (reseptör dışı protein tirozin kinaz)

- Reseptör tirozin fosfataz

- Reseptör serin / threonin kinaz

- Reseptör serin / threonin fosfataz

c) G-protein bağı reseptörler (metabotropik reseptör) ve ikincil haberciler

- c AMP yolu
- Fosfolipaz C ve inozitol fosfat yolu
- Ca⁺⁺- Kalmodulin yolu
- c GMP yolu
- İyon kanalı düzenlenmesi
- Fosfolipaz A2 yolu

G PROTEİNLERİ (GTP/GDP BAĞLAYICI PROTEİNLER)

1957 yılında Sutherland ve ark. (68,69) adenilat siklazın epinefrin, glukagon ve NaF ile uyarıldığını ve ürününün cAMP olduğunu saptamışlardı, ancak G proteinleri ve hormon reseptörlerinin varlığı bilinmiyordu. Bundan 10 yıl sonra hormona duyarlı adenilat siklazın düzenleyici alt birimindeki özgün bir bölge ile hormon ligandının allosterik etkileşiminin, katalitik birimin aktivitesini düzenlediği ortaya çıkarıldı. 1960'ların sonunda Birnbaumer ve ark. (70) yağ hücresi adenilat siklazında yaptıkları çalışmalarda, adenilat siklaz enziminin çeşitli hormon reseptörleri tarafından uyarıldığı ve bu reseptörlerin katalizörlerinden farklı oldukları sonucuna varmışlardır. Birkaç yıl sonra Orly ve ark. (71) reseptör ve adenilat siklazın birbirlerinden bağımsız olduğunu göstermişlerdir. 1981'de Shorr ve arkadaşları (72) β adrenerjik reseptörünü saflaştırmışlar ve hücre zarını yedi kez kat eden ilk G protein reseptörünü karakterize etmişlerdir. Kısa bir süre sonra Rodbell ve ark. (73) GTP'nin adenilat siklaz enziminin hormonal uyarısındaki rolünü tanımlamışlardır. Pfeufer ve ark. (74) adenilat siklaz kompleksinden GTP bağlayan bir proteini ayırmışlar, 1977'de Ross ve ark. (75) ise hormona duyarsız adenilat siklaz sistemine 40 kDa'luk GTP bağlayan bir proteini, GTP varlığında ekleyerek uyarının yeniden oluştuğunu bildirmişlerdir. O zaman Ns olarak adlandırılan ve şimdi Gas olarak bilinen bu protein yine Gilman ve ark. tarafından saflaştırılarak karakterize edilmiştir. 1994 yılında Gilman ve Rodbell (76) o zamana kadar G proteinleri ile ilgili çalışmalarından dolayı Tıp ve Fizyoloji alanında Nobel ödülünü kazanmışlardır.

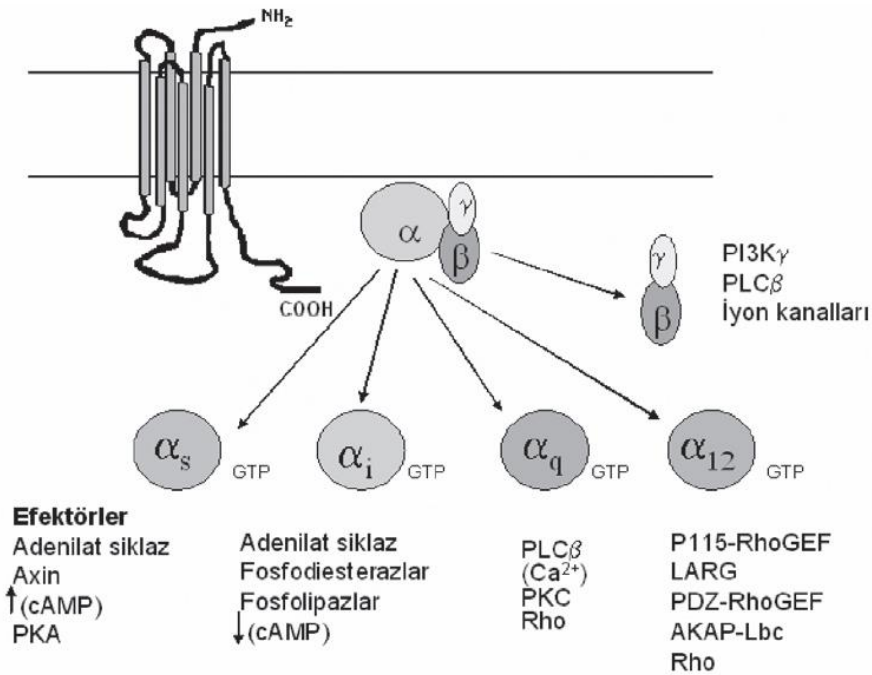
G proteinleri olarak bilinen heterotrimerik G proteinleri, bakterilerden memelilere kadar korunmuş büyük GTPaz ailesinin üyelerindedir. GTP/GDP bağlayıcı ve düzenleyici proteinler olan G proteinleri hücre yüzey reseptörlerinden gelen eksternal sinyallerin hücre içi moleküllere iletiminde rol alırlar (Şekil 1). G proteinleri guanozin difosfat (GDP) ve guanozin trifosfat (GTP) ile çalıştıkları için bu ad verilmiştir. Hormonlar, nörotransmitterler büyüme faktörleri ve otokoidler biyolojik etkilerini bu reseptörlerle etkileşerek gösterirler. G-

proteinlerinin biyolojik etkileri arasında, koku ve tat alma, görme, nörotransmitter işlevi, endokrin ve ekzokrin bez işlevleri, kemotaksis, ekzositoz, kan basıncının kontrolü, embriyogenez, hücre büyüme ve farklılaşması, onkogenz ve infeksiyonlar sayılabilmektedir (77).

Pek çok ekstraselüller ligand, cAMP, Ca⁺⁺ iyonu ve fosfoinozitollerin intraselüller konsantrasyonlarını arttırarak etki gösterir. Bu işi ise genellikle üç farklı komponentten oluşan bir transmembran sinyal iletimi aracılığı ile saniyeler içinde yaparlar. Sinyal iletimi sırasıyla şu şekilde gerçekleşir:

- Ekstraselüller ligand hücre yüzey reseptörü tarafından algılanır.
- Reseptör plazma membranının sitoplazmik yüzeyinde yerleşik olan G proteininin (GDP/GTP bağlayıcı regülatör proteinler) aktivasyonunu tetikler.
- Aktive olan G-proteini ise genellikle bir enzim veya iyon kanalı olan efektör elemanın aktivitesini değiştirir. Bu efektör eleman ise intraselüler ikincil habercinin konsantrasyonunu değiştirir. Böylece;

- Adenilil siklaz/cAMP sisteminin uyarılması
- Fosfolipaz C/inozitol fosfat sisteminin uyarılması
- Guanilil siklaz/cGMP sisteminin uyarılması
- Ca⁺⁺ kalmodulin yolunun aktive olması ya da
- İyon kanallarının düzenlenmesi gerçekleşir (78).



Şekil 1. G proteinlerinin özgülüğünü tanımlayan α alt birimleri (79)

G-protein ve ikincil haberci yolunu kullanan endojen ligandlar ve bunlara ait ikincil habercilere örnek olarak şunlar verilebilir (63):

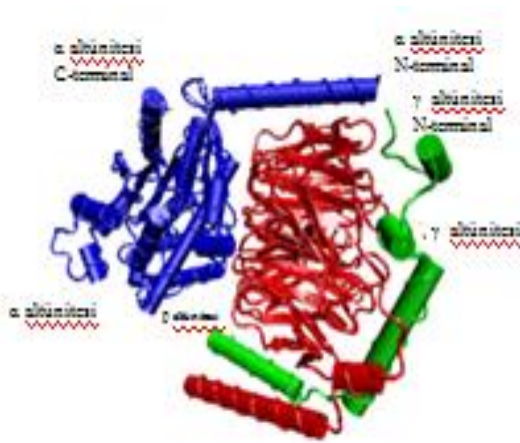
- İkincil habercisi cAMP olanlar; adrenokortikotropik hormon, katekolaminler (beta), koryonikgonadotropin, FSH, LH, Glukagon, histamin, MSH, PTH, prostoglandin E2, prostasiklin, serotonin (5-HT4), tirotropin, vasopressindir (V2).

- İkinci haberci olarak Ca⁺⁺ fosfoinozitoleri kullanan ligandlar ise; Asetilkolin (muskarinik), anjiotensin, katekolamin (α 1), PDGF, serotonin (5-HT1c ve 2), TRH, vasopressindir (V1).

- cGMP'yi kullananlara örnek olarak ise atriyal natriüretik faktör (ANF), nitrik oksit (NO) verilebilir.

G PROTEİNLERİNİN YAPISI

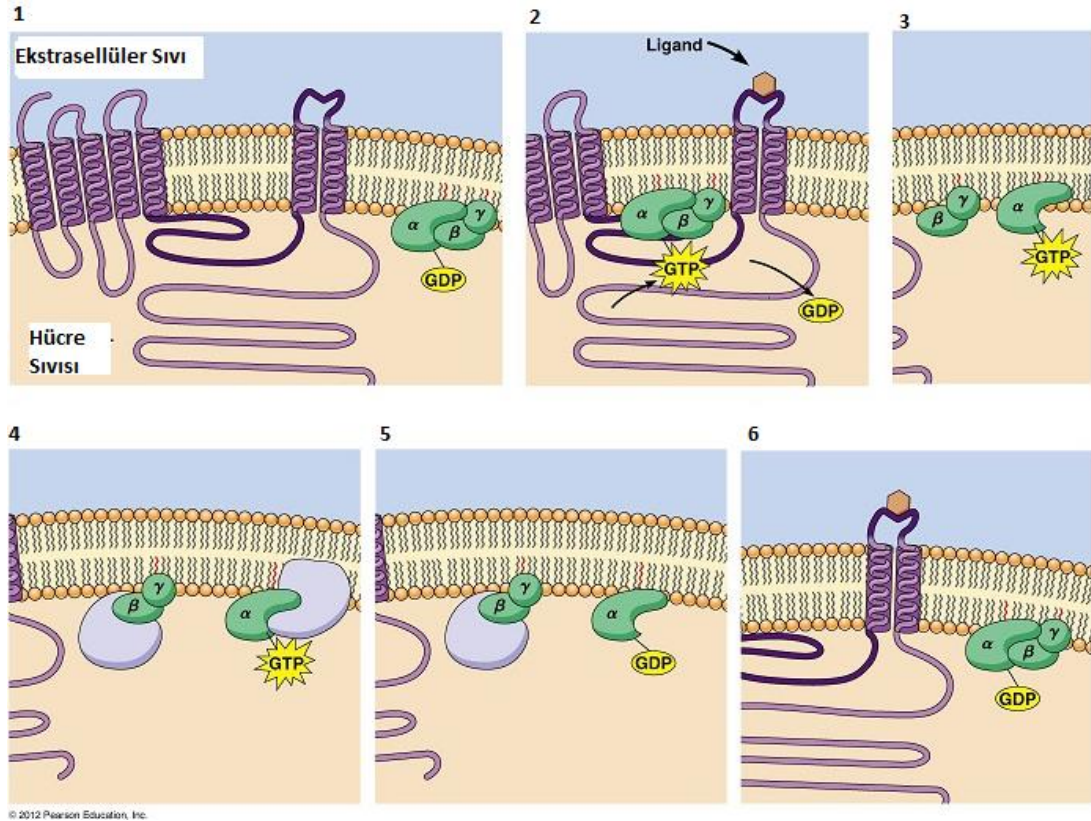
G-protein-aracılı sinyal sistemlerinin çeşitliliğinin temelinde, G proteinlerinin modüler yapısı ve birçok alt tiplerin varlığı yatar. G-proteinleri α , β , ve γ olmak üzere üç farklı alt birimden oluşmaktadır ve bu nedenle heterotrimerik G proteini olarak isimlendirilmektedir (Şekil 2). β ve γ alt birimleri $\beta\gamma$ dimeri halinde birbirlerine bağlı halde kalırlar. Her üç alt birim de fenilasyon adı verilen bir mekanizma aracılığı ile üzerlerindeki bir aminoasit yan zincirine bağlanmış bir yağ asiti ile membrana tutunurlar. G proteinlerinin membran iç yüzeyinde serbest bir şekilde difüze olduğu sanılmaktadır. Bu da bir hücre içinde bulunan bir G protein popülasyonunun birden fazla reseptör ve efektör ile fazla seçici olamayan bir ilişkiye girebileceğini öneren anahtar özelliğinde bir durumdur (80). Heterotrimerik guanin nükleotid bağlayan proteinler sinyal iletiminde hücre içi ve hücre dışı sistemler arasında kilit konumundadır (81).



Şekil 2. Heterotrimerik G proteinlerinin genel yapısı (82)

G proteinleri, hücre zarını 7 kez kat eden G-Proteini-Kenetli-Reseptörler (G-Protein-Coupled-Receptor) (GPCR) ile kenetli olarak çalışır. GPCR'nin karboksil grubu (C terminal bölgesi) hücre içinde kalır ve fosforillenme bu bölgede olur. Hücre dışındaki amino ucu ise (N terminal bölgesi) ligand bağlanma bölgesini oluşturur (83). Hücre zarını kat eden her birim (TM) yaklaşık 20-27 aminoasit içerir. N terminal bölgesi 7-595 aminoasit, C terminal bölgesi 12-359 aminoasit, hücre içindeki ve hücre zarı dışındaki halkalar da 5-230 amino asit içerir (84).

G proteini-kenetli reseptöre ligandın bağlanması reseptörün hücre zarı kısmında biçimsel değişime ve onun G proteinine bağlanmasına neden olur (85). Bu etkileşim G proteinini aktive eder. G protein ayrılarak sinyali hücre içi bileşene efektörler aracılığıyla iletir (82). Ligand bağlanması reseptörde biçim değişikliğine neden olur, reseptörün hücre içindeki bölümü G proteinle etkileşerek GDP'nin serbest kalmasını ve GTP bağlanmasını sağlar. GTP bağlı alfa birimi beta ve gama dimerinden ayrılır; ayrılan her iki birim hücre içi hedeflere yönelir ve onları etkinleştirir. Alfa alt biriminin aktivitesi GTP'den fosfatın ayrılması ile son bulur. Böylece G proteini tekrar inaktif duruma geçer (Şekil 3) (86,87).



Şekil 3. G protein etki mekanizması (88)

G Proteinlerin Alfa Alt Birimi

G α -alt birimleri molekül ağırlıkları 39-52 kDa arasında değişmektedir. Gproteinlerinin α alt birimi 16 gen ile kodlanmaktadır Bilinen 16 memeli alfa alt birimi aminoasit dizilerinin karşılaştırılması ile 4 alt aileye ayrılmaktadır (89).

G α alt birimi yapısal olarak iki bölümden oluşur. Bunlardan birincisi GDP/GTP'nin bağlanma ve GTP hidrolizinde rol alan GTPaz yani katalitik kısımdır. Bu bölüm yapısal olarak küçük G-proteinleri ve elongasyon etkenlerini kapsayan süperaileye identiktir. Bu kısımda guanin nükleotid bağlayıcı bir cep, Mg⁺⁺ bağlayıcı bölüm, guanin halkası bağlayıcı motif ve GTP hidrolizi için gereken treonin ve glutamin birimleri yer alır. G α alt birimindeki Mg⁺⁺ varlığı bu ünitenin GTP bağlayabilmesi için zorunludur. İkincisi olarak ise, helikal bölge GTPaz bölgesine esnek bir şekilde bağlıdır. GTPaz bölgesi üzerinde guanin nükleotid, efektör ve reseptör bağlanma bölgeleri bulunur (84). α alt biriminin aminoasit dizileri arasında % 45-80 benzerlik vardır ve α alt birimleri, dizisel benzerliklerine göre 4 sınıfa ayrılmaktadır: Gs, Gi/o, Gq, G12. Her aileye ait G proteinlerinin dokulardaki dağılımı ve etkileştiği efektörü farklıdır. (Tablo 3) (90).

GTPaz işlevsel bölgesi, GTPaz süperailesinin tüm proteinlerinde (protein sentez faktörleri, ras proteinleri gibi) çok iyi korunmuş bir üçüncül yapıya sahiptir. α alt birimi birçok proteinde korunmuş bölge olarak yer alır. Bu bölgeler GTP bağlanmanın ve GTP hidrolizinin temel yapısını düzenler (87).

G α alt biriminde üç adet anahtar (switch) bölge vardır. Bunlar GTP/GDP bağlanması sırasında konformasyonel değişikliğe uğramaktadırlar. G-protein ve GTP'nin γ fosfatı arasındaki yeni hidrojen bağları oluşumu ile konformasyonel değişiklik meydana gelmektedir. Bu bölgeler efektör bağlamada önemlidir. Anahtar I ve II bölgesi β alt birimi ile ilişki halindedir (Tablo 3) (89).

Tablo 3. G-protein alfa alt birimlerini kodlayan genler ve insan vücundundaki dağılımı (89)

İsim	Doku	Efektör
α-Altbirimleri		
$G\alpha$ ailesi		
$G\alpha_s$	Her yerde	AC (tüm tipleri) \uparrow
$G\alpha_{\text{oxl}}$	Nöroendokrin	AC \uparrow
$G\alpha_{\text{olf}}$	Koku epitelyumu, beyin	AC \uparrow
$G\alpha_{10}$ ailesi		
$G\alpha_{11}$	Oldukça yaygın	AC (tip I,III,V,VI,VIII,IV) \downarrow (Direkt düzenlenme)
$G\alpha_{12}$	Her yerde	$G\beta\gamma$ aracılığı ile diğer bazı efektörler düzenlenir.
$G\alpha_{13}$	Oldukça yaygın	Uyarılmış $G\alpha_{11,3}$ 'den serbestlenir.
$G\alpha_o$	Nöronal, nöroendokrin	VDCC \downarrow , GIRK \uparrow ($\beta\gamma$ aracılığı ile)
$G\alpha_z$	Nöronal, trombositler	AC (e.g., V,VI) \downarrow (direkt düzenlenir); Rap1GAP
$G\alpha_{\text{hmt}}$	Tat hücreleri, saç hücreleri	PDE \uparrow ? ; ($G\beta\gamma$ aracılığı ile diğer efektörler ?)
$G\alpha_{\text{tr}}$	Retinal çubuklar, tat hücreleri	PDE 6 (γ altbirim çubuk) \uparrow
$G\alpha_{\text{tc}}$	Retinal koniler	PDE 6 (γ altbirim çubuk) \uparrow
$G\alpha_{\psi 11}$ ailesi		
$G\alpha_q$	Her yerde	PLC- β 1-4 \uparrow
$G\alpha_{11}$	Hemen hemen her yerde	PLC- β 1-4 \uparrow
$G\alpha_{14}$	Böbrek, karaciğer,	PLC- β 1-4 \uparrow
$G\alpha_{15/16}$	Hematopoietik hücreler	PLC- β 1-4 \uparrow
$G\alpha_{12/13}$ ailesi		
$G\alpha_{12}$	Her yerde	PDZ-RhoGEF/LARG, Btk, Gap1m, cadherin
$G\alpha_{13}$	Her yerde	p115RhoGEF, PDZ-RhoGEF/LARG, radixin

G-Proteinlerinin Beta-Gama Alt Birimi:

Beta (β) ve gamma (γ) alt birimleri birbirine sıkıca bağlı bir dimer komplekstir ve denatürasyon dışında birbirlerinden ayrılmazlar. Beta (β) alt biriminin boyutu 36 kDa kadardır. β alt birimi 7 kanatlı pervaneye benzeyen bir yapıya sahiptir. Her bir pervane 40 adet WD (triptofan-aspartat) tekrarı içermektedir. Ayrıca β alt birimi 20 aminoasitlik bir heliks de içermektedir. WD tekrarı pek çok farklı hücrel süreçte rol alan proteinlerde rastlanan bir motiftir.

γ alt birimi her biri 6-9 kDa ağırlığında olan daha küçük proteinlerden oluşan bir gruptur. Gamma alt birimi betaya göre daha heterojen bir yapıdadır. Bu proteinlerin tümü translasyon sonrası değişimlere uğramakta ve böylelikle γ alt birimi ailesine daha fazla çeşitlilik katmaktadır. Farklı $\beta\gamma$ alt birimlerindeki işlevsel farklılığın γ alt birimleri tarafından belirlendiği düşünülmektedir (89,90).

β alt birimi 5, γ alt birimi ise 12 gen ile kodlanır (Tablo 4) (89). Beta alt birimini kodlayan genler 11 ekzondan meydana gelmiştir. β alt biriminin toplam 5 adet alt tipi vardır

ve bunlar aminoasit homolojisine göre $\beta 1$ – $\beta 4$ ve $\beta 5$ şeklinde iki alt aileye ayrılmaktadır. γ alt birimini kodlayan genler, dört ekzondan oluşan $\gamma 5$ dışında, üç ekzondan oluşmaktadır. B1 $\gamma 1$ dimerinin kristal yapısı gama alt biriminin β alt birimi ile N terminal halka ve γ alt biriminin birçok aminoasidi üzerinden etkileştiğini göstermiştir (91). $\beta 1$ - $\beta 4$ büyük ölçüde homolog olmasına karşın $\beta 5$ görece daha az homologdur. Bu da $\beta 5$ 'in farklı bir işlevinin olabileceğini düşündürmektedir. Diğerlerinin aksine farklı γ alt birimleri ile etkileşebilen $\beta 5$ aynı zamanda γ alt birimine benzeyen domen içeren G protein sinyal düzenleyici (RGS) ailesinin üyeleriyle de etkileşime girebilmektedir (92).

$\beta\gamma$ kompleksi, α alt biriminin reseptöre ilginliğinin (afinite) artırılmasında ve doğrudan ya da G protein α alt birimi ile birlikte çeşitli efektörlerin düzenlenmesinde görev yapar (93). $\beta\gamma$ dimeri, $G\alpha$ -GDP'deki hidrofobik cebe bağlanır. GTP, $G\alpha$ 'ya bağlanarak hidrofobik cebi ortadan kaldırır ve $G\alpha$ 'nın $G\beta\gamma$ kompleksine olan ilginliğini azaltır (94). $\beta\gamma$ kompleksinin ayrıca G protein kenetli reseptör kinazların hücre zarına alınmasına yol açtığı düşünülmektedir.

Tablo 4. G-protein beta ve gama alt birimlerini kodlayan genler ve insan vücudundaki dağılımı (89)

<u>β Altbirimleri</u>		
β_1	Retinal çubuklar	}
β_2	Oldukça yaygın	
β_3	Retinal koniler	
β_4	Oldukça yaygın	
β_5	Esas olarak beyin	
<u>γ Altbirimleri</u>		
γ_1, γ_{rod}	Retinal çubuklar, beyin	}
$\gamma_{14}, \gamma_{conn}$	Retinal koniler, beyin	
γ_2, γ_6	Yaygın	
γ_3	Beyin, kan	
γ_4	Beyin ve diğer dokular	
γ_5	Yaygın	
γ_7	Yaygın	
γ_8, γ_9	Koku/vomer nazal epitelyum	
γ_{10}	Yaygın	
γ_{11}	Yaygın	
γ_{12}	Yaygın	
γ_{13}	Beyin, tat tomurcukları	

AC tip 1 ↓	AC tip II,IV,VII ↑	PLC- β
($\beta 3 > \beta 2 > \beta 1$) ↑	GIRK1-4 (Kir3.1-3.4) ↑	
kinazlar (GIRK 2 ve 3) ↑	PI-3-K, β , γ ↑	T tip
VDCC (Ca _v 3.2) ↓	(G $\beta_1\gamma_2$) N-,P/Q-,R-tip VDCC	
(Ca _v 2.1-2.3) ↓		

AC, adenilat siklaz; PDE fosfodiesteraz; PLC, fosfolipaz C; GIRK, G proteini ile düzenlenen dışarı düzeltilmiş potasyum kanalı; VDCC, voltaj-bağımlı Ca²⁺ kanalı; PI-3-K, fofoinositol 3-kinaz; GRK, G proteini ile düzenlenen kinaz; RhoGEF, Rho guanin nükleotid değiş-tokuş faktörü

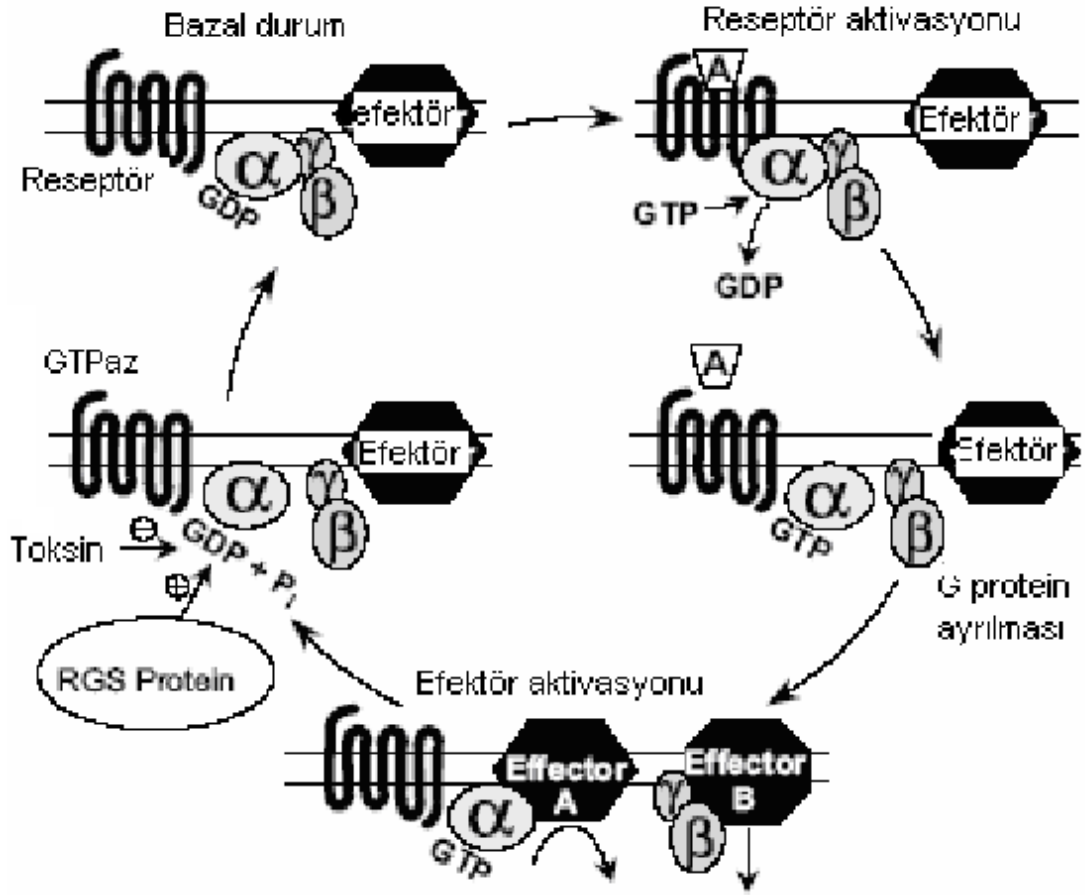
G-protein Aracılı Sinyal Yolunun Düzenlenmesi

G proteinleri inaktif (sessiz) durumdayken α alt birimi, $\beta\gamma$ kompleksi ve GDP birbirine bağlıdır (Şekil 4) (95). GDP bağlı dinlenim durumunda heterotrimerik yapıda bulunan G

proteini hücre dışı reseptörle ya da hücre içi efektör sistemleri ile etkileşim halinde değildir. Bir sinyal molekülünün G protein kenetli reseptöre bağlanmasıyla reseptör uyarılır. Uyarılan reseptör, α alt biriminin guanin nükleotit bağlama bölgesinden GDP'nin serbestlenmesine ve yerine GTP'nin bağlanmasına yol açar. GTP'nin bağlanması, G proteininde yapısal değişikliğe neden olur ve GTP bağlı α alt birimi, uyarılmış reseptörden ve $\beta\gamma$ dimerinden ayrılır. Sonra, hem α alt birimi hem de $\beta\gamma$ kompleksi iyon kanalları ya da enzimler gibi efektörlerin aktivitesini düzenlerler.

G protein α alt birimi GTPaz aktivitesine sahiptir ve α alt birimine bağlı GTP'yi GDP ve inorganik fosfata (Pi) hidrolizler. Oldukça yavaş seyreden GTP hidrolizi, efektör α alt birim kompleksinin ayrılmasına neden olur ve düzenleyici sinyal sonlanır. GDP bağlı α alt birimi ile $\beta\gamma$ alt birimleri bir araya gelerek inaktif G proteinini oluştururlar ve uyarılmış reseptör varlığında yeni bir döngüye girebilirler. G proteinlerinin uyarılmasında hız belirleyici aşama, nükleotit bağlama cebinden GDP'nin serbestlenmesidir. GDP, heterotrimerik G proteininden $G\alpha$ alt birimi tipine göre değişen bir hızda kendiliğinden salıverilir. $G\alpha$ alt birimlerinin uyarılmamış hali ise $G\beta\gamma$ kompleksinin bağlanması ile kontrol edilir. G proteinin reseptör ile uyarılması sonucu, GDP'nin salıverilmesi büyük ölçüde kolaylaşır (96).

G protein α alt biriminin GTPaz aktivitesini düzenleyen proteinlere RGS (Regulators of G protein signaling proteins; G protein sinyalini düzenleyici proteinler) adı verilmektedir. RGS ailesinin 30'dan fazla üyesi olduğu ve hepsinde ortak olan RGS bölgesinin bulunduğu bilinmektedir. Bu bölge α alt birimine bağlanır ve GTPaz'ı uyararak GTP hidroliz hızını düzenler. Normal olarak yavaş olan içsel GTP hidrolizi, bir RGS proteinin bağlanması ile artar ve RGS'ler böylece etkin G protein sinyal süresini azaltarak negatif sinyal düzenleyicileri olarak görev yaparlar. RGS protein ekspresyonunda ve işlevinde herhangi bir bozulma, sinyal süresinin artmasına neden olur (97,98). RGS'lerin G protein aracılı sinyal kinetiğini düzenlemenin yanısıra sinyal iletiminin özgünlüğünü etkiledikleri ve bazı durumlarda efektör işlevini üstlenebildikleri düşünülmektedir.



Şekil 4. G protein aracılı sinyal yolunun düzenlenmesi (89)

G Proteinlerinin Hastalıklarla İlişkisi

Sinyal iletim yollarında oldukça kritik bir konuma sahip olmaları nedeniyle, G proteinlerinin yapı ve işlevlerindeki bozukluklar önemli hastalıklara neden olmaktadır (95,96). Gen haritalanmasının temel amaçlarından birisi de hastalığa neden olan gen lokuslarının belirlenmesidir.

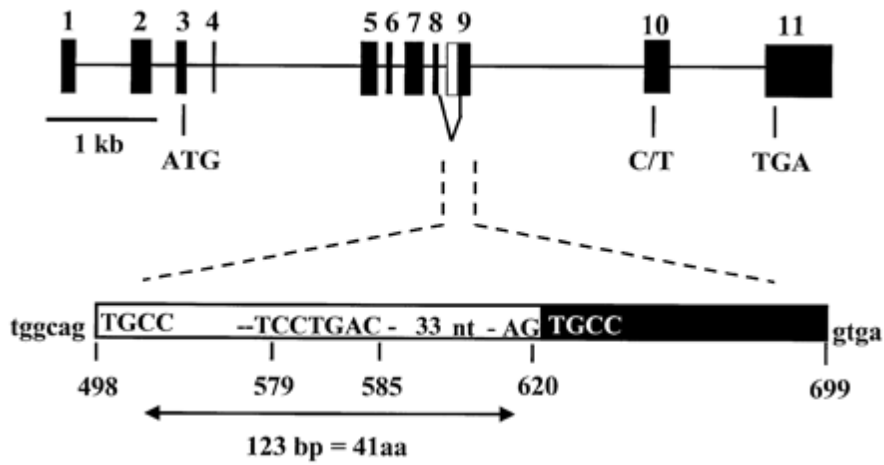
Bozuk G-protein aracılı sinyal iletimi, G-protein bağlı reseptörler ve G proteinlerindeki ekspresyon düzeyinde oluşan farklılıklar veya translasyon sonrası modifikasyonlar nedeniyle gelişen, nicelik ve/veya niteliksel değişikliklere bağlı olarak ortaya çıkmaktadır (90).

G proteini, efektör ve reseptör, hücre dışı sinyallerle tetiklenen bir dizi açma-kapama düğmesi olarak düşünülebilir. α alt biriminin GTPaz etkinliği ve duyarsızlaşma işlemi bu açma kapama düğmelerinin çalışma sürelerini ayarlar. Sinyal yolunun herhangi bir bileşenindeki değişimin düğmenin açılmasını önlemesi sonucu hedef organda sinyale karşı direnç oluşur. Benzer şekilde, düğmenin gerekmediği halde açılmasına veya uzun süre açık

kalmasına neden olan değişiklikler birincil haberciden bağımsız olarak aşırı işleme neden olur. (97). GTP bağlayıcı proteinler (G proteinleri) birçok agonistin işlevsel yanıtına aracılık eder (98).

G Proteini $\beta 3$ geni

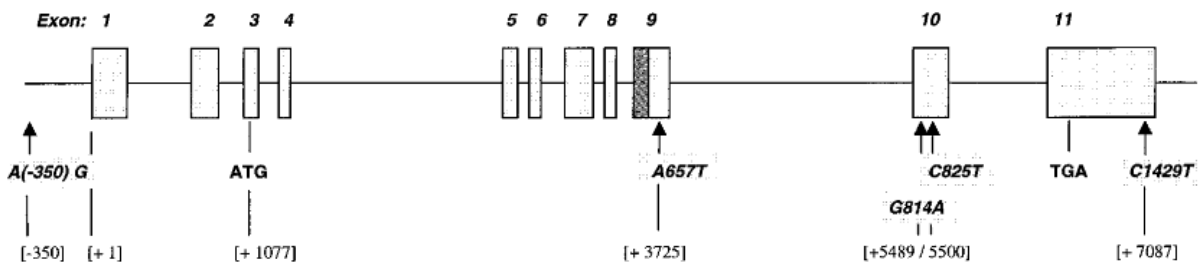
GN $\beta 3$ geni kromozomun 12p13 (12. kromozomun kısa kolunun, 1. segment ve 3. bandında) bölgesinde lokalize olmuştur. Gen 11 ekzondan oluşur. Üçüncü ekzondaki ATG kodonu ile başlar ve onbirinci ekzondaki TGA kodonu ile sonlanır (Şekil 5) (8).



Şekil 5. GNB3 geni (101)

G PROTEİNİ $\beta 3$ ALT ÜNİTESİ C825T VE C1429T POLİMORFİZMLERİ

G $\beta 3$ 'ü kodlayan gen GNB3'dür (Şekil 6). Bu gene ait çeşitli polimorfizmler üzerinde çalışılmıştır. Bunlar G814A, A657T, C1429T, A(-350)G ve C825T gibidir. C825T polimorfizmi esansiyel hipertansiyon, diyabetik nefropati, obezite gibi çeşitli hastalıklarla ilişkilendirilmektedir (99).



Şekil 6. G proteini $\beta 3$ altünitesini kodlayan gen bölgesi (99)

GNB3 gen polimorfizmi ilk olarak Siffert W. ve arkadaşları tarafından açıklanmış bir polimorfizmdir ve öncelikle hipertansiyon ile ilişkilendirilmiştir (101). Bu polimorfizm, T allel taşıyıcılarında G β 3s şeklinde izlenen varyant, ekzon 9'da 498-620. nükleotidde 123 baz çiftlik delesyon, translasyon sonrası 41 aminoasit kayıp ve bir WD tekrar domaini kaybı ile karakterizedir (101,102). Ekzon 10'da meydana gelen polimorfizm ve oluşan T alleli ekzon 9'daki kriptik splicing bölgesinin tanınabilmesini sağlamaktadır (100).

GNB3'ün 10. ekzonunda C825T şeklinde bir dimorfizm tanımlanmıştır (100,101). Ekzon 10'da 825. nükleotidde C-T şeklinde tek baz değişikliği saptanmıştır. Bu durum nedeniyle T alleli G β 3s şeklinde kodlanan bir splice varyant (β s) oluşumu ile ilişkilidir. Ekzon 9'daki alternatif RNA kaymasına (splicing) bağlı olarak, 498– 620. nükleotidlerde 123 baz çiftlik bir delesyon meydana gelmektedir. Bu durum wild type (CC) genotipe göre 41 aminoasitlik bir kayıpla sonuçlanmaktadır. Bu çerçevede içi (in-frame) delesyon nedeniyle normalde yedi adet olan WD tekrar kalıtında bir adet kayıp olmakta ve pervane benzeri (propeller) parça sayısı altıya inmektedir.

Heterotrimerik G-proteinlerinin β 3 alt birimini kodlayan GNB3 geninde, ekzon 10'daki C825T polimorfizmi sonucu doğal (wild) tip allel (C) Timin kalıtı (T) ile yer değiştirir. Sonuçta CT (heterozigot) ve TT (homozigot) genotipler meydana gelir (101).

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada, GNB3 geninin C825T ve C1429T gen bölgelerindeki polimorfizimlerin diyabetik nefropati ile ilişkisinin araştırılması amacıyla “Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu” izni alındı. İlgili belge Ek’de sunulmuştur. Tip 2 Diyabetes Mellitus tanısı konulmuş ve Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Nefroloji ve Endokrinoloji Bilim dalları izleminde olan hastaların gizli, açık diyabetik nefropatisi veya diyabetik nefropati nedeni ile diyalize girmekte durumu olan toplam 99 hasta (Nefropati grubu) ile diyabetik nefropatisi olmayan 99 Tip 2 diyabet hastası (Nefropati olmayan grup) birey alınarak çalışma grubuna dahil edilmiştir. Hasta grubunun yaş ortalaması ve standart sapması $61,99 \pm 9,355$ olup, yaş aralığı 38-87’dir. Kontrol grubunda ise yaş ortalaması ve standart sapması $60,84 \pm 9,802$ olup, yaş aralığı 38-81’dir.

Polikliniklerde yapılan görüşme ve muayene sonucu hastaların yaş, cinsiyet, kilo, boy, sigara ve alkol kullanımı, diyabet ve aile öyküsü sorgulandı ve çalışmaya alınma kriterlerini karşılayan bireyler çalışmaya davet edilmişler ve kan örneği vermeleri istenmiştir. Bilgilendirilmiş onay işlemi ardından gönüllü bireylerden, EDTA’lı tüplere 2 ml kan örnekleri alınmıştır. DNA izolasyonu kandan, DNA izolasyon kiti ile yapılmıştır. Elde edilen DNA’lar analiz edilinceye kadar $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ’de saklanmıştır. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) kullanılarak izole edilen DNA’ların GNB3 geninin C825T ve C1429T bölgeleri çoğaltıldı. PZR sonucu oluşan ürünler etidyum bromür ile hazırlanmış %2’lik agaroz jele yüklenerek UV ışık altında ürünün oluşup oluşmadığına bakıldı. GNB3 geninin C825T ve C1429T bölgelerinin C ya da T allellerinden hangisine sahip olduğu Restriksiyon Fragment Uzunluğu Polimorfizimi (RFLP) yöntemi ile tespit edildi. RFLP yönteminde, PZR ürünleri GNB3

geninin C825T polimorfizmi için *BseDI* ve C1429T polimorfizmi için *BshNI* restriksiyon enzimleriyle 1 saat boyunca 37° C'de kesime bırakıldı. Bu kesim ürünleri %2'lik agaroz jelde yürütülerek polimorfizimleri belirlendi ve elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

KULLANILAN ARAÇ VE GEREÇLER

Çalışmada Kullanılan Kimyasal Malzemeler

- Agaroz (BioMax)
- Borik Asit (Sigma)
- EDTA (Sigma)
- Tris (Bio Basic)
- Etidyum Bromür (EtBr) (Sigma)
- 100 bç DNA marker (Fermantas)
- dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Fermantas)
- Primerler (Fermantas)
- Taq DNA polimeraz Seti (Fermantas)
- *BseDI* Restriksiyon Enzimi (Fermantas)
- *BshNI* Restriksiyon Enzimi (Fermantas)

Çalışmada Kullanılan Cihazlar

- Agaroz Elektroforez Tankı (Bio-Metra)
- Güç Kaynağı (Bio-Metra)
- Derin Dondurucu (Arçelik)
- Manyetik Karıştırıcı (Wisestir)
- Otoklav (Nüve)
- Otomatik Mikro Pipetler (Dragon, Thermo Scientific)
- Santrifüj (Beckman Coulter)
- Terazî (AND)
- Thermal Cyclers (Techne)
- Vortex (VELP)
- ETÜV (Heraeus)

- Termo-Shaker (Boeco)

ÇÖZELTİLER

Polimeraz Zincir Reaksiyonunda (PZR) Kullanılan Çözeltiler

PZR 10X Tampon, pH: 8.3

750 mM Tris-HCl (25°C'de pH=8.8)

200 mM(NH₄)₂SO₄

% 0.1 Tween 20

Agaroz Jel Elektroforezinde Kullanılan Çözeltiler

10X(TBE)

108 gr Tris

7.44 gr EDTA

55 gr Borik Asit

1lt distile su içerisinde çözündürüldü.

%2'lik Agaroz Jel

0.6 gr Agaroz, 30ml 0.5XTBE çözeltisi içinde kaynatıldı ve kaynayıp biraz beklendikten sonra EtBr eklendi.

YÖNTEMLER

DNA İzolasyonu

DNA izolasyon yöntemi aşağıdaki adımlar uygulanarak gerçekleştirildi.

- 200 µl tam kan 2 ml'lik ependorfların içerisine konuldu. Üzerine 20 µl proteinaz K çözeltisi ve 400 µl Liziz çözeltisi eklendi. Çözeltiler ilave edildikten sonra homojen bir karışım elde etmek için kısa bir süre vorteks edildi.
- Hücre zarlarını tamamen parçalanana kadar karışımlar 56 C'de 10 dk inkübe edildi.
- 200 µl etanol (% 96-100) eklendi ve kısa bir süre vorteks edildi.

- Kolona, hazırlanmış olan karışım ilave edildikten sonra 1 dk 6000xg'de santrifüj edildi. Atığı içeren toplama tüpü atıldı ve yeni toplama tüpün içerisine kolon yerleştirdi.
- 500 µl Wash Buffer I (etanol ilave edilmiş) eklendi ve 1 dk 8000xg'de santrifüj edildi.
- Toplama tüpün içerisindeki atık atıldı ve kolon içerisine tekrar yerleştirildi.
- 500 µl Wash Buffer II (etanol ilave edilmiş) eklendi ve 3 dk 12000xg'de santrifüj edildikten sonra kolon 2 ml'lik ependorf içerisine yerleştirildi.
- 100 µl Elution Buffer ilave edildi ve oda sıcaklığında 2 dk beklendi daha sonra 1 dk 8000xg'de santrifüj edildi.
- Son olarak DNA elüsyon tamponunun yardımı ile 2 ml'lik kapaklı DNA saklama tüplerine geçtiği için filtre tüpleri uzaklaştırılır ve DNA eldesi tamamlanmış olur.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

C825T için PZR Uygulaması

PCR' da kullanılan Primer Dizileri

G proteini β3 alt ünitesini kodlayan genlerin amplifikasyonu, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR, Polymerase Chain Reaction) yöntemiyle özgün primerler kullanılarak çoğaltılmaya başlanmıştır.

PZR'de kullanılan Primer Dizileri:

C825T için:

C825T Forward: 5'-TGA CCC ACT TGC CAC CCG TGC-3'

C825T Reverse: 5'-GCA GCA GCC AGG GCT GGC-3'

C1429T için:

C1429T Forward: 5'-CAG CCT CTC CCT TAA TGA GC-3'

C1429T Reverse: 5'-ACT ACT CTG CTC AGA ACT CC-3'

C825T için PZR Koşulu

C825T için PZR karışımı, aşağıdaki ürünler kullanılarak 200 µl'lik PZR tüpleri içerisinde hazırlandı.

3.5 µl MgCl₂ (25mM)

1.5 µl PCR Tampon (10XTaq Buffer ile(NH)₂SO₄)

0.5 µl dNTP (5mM)

0.5 µl T174M Primer F (10pmol/µl)

0.5 µl T174M Primer R (10pmol/µl)

0,25 µl Taq Polimeraz enzimi (5u/µl)

16.25 µl dH₂O

2 µl DNA

Toplam hacim: 25 µl

C825T için PZR Döngüsü

C825T' nin bir döngüsü 94°C'de 1dk denatürleme, 69 °C'de 1dk tutunma, 72°C'de 1dk uzamadan oluşan toplam 35 döngülük bir PZR programı uygulandı.

Başlangıç: 94°C, 5 dakika

94°C, 1 dakika

69°C, 45 saniye

72°C, 1dakika

} 35 döngü

Sonlanma: 72°C, 5 dakika

C1429T için PZR Koşulu

C1429T için PZR karışımı, aşağıdaki ürünler kullanılarak 200 µl'lik PZR tüpleri içerisinde hazırlandı.

3.5 µl MgCl₂ (25mM)

1.5 µl PCR Tampon (10XTaq Buffer ile(NH)₂SO₄)

0.5 µl dNTP (5mM)

0.5 µl T174M Primer F (10pmol/µl)

0.5 µl T174M Primer R (10pmol/µl)

0,25 µl Taq Polimeraz enzimi (5u/µl)

16.25 µl dH₂O

2 µl DNA

Toplam hacim: 25 µl

C1429T için PZR Döngüsü

C1429T' nin bir döngüsü 94°C'de 1dk denatürleme, 65 °C'de 1dk tutunma, 72°C'de 1dk uzamadan oluşan toplam 35 döngülük bir PZR programı uygulandı.

Başlangıç: 94°C, 5 dakika

94°C, 1 dakika

65°C, 1 dakika

72°C, 1dakika

} 35 döngü

Sonlanma: 72°C, 7dakika

Restriksiyon Enzim Kesim Yöntemi (RFLP)

C825T için RFLP

C825T için RFLP aşağıdaki ürünler kullanılarak 200 µl'lik kesim tüpleri içerisinde hazırlandı.

1 µl 10XTampon

0.5 µl *BseDI* enzim

2.5 µl dH₂O

5 µl PZR ürünü

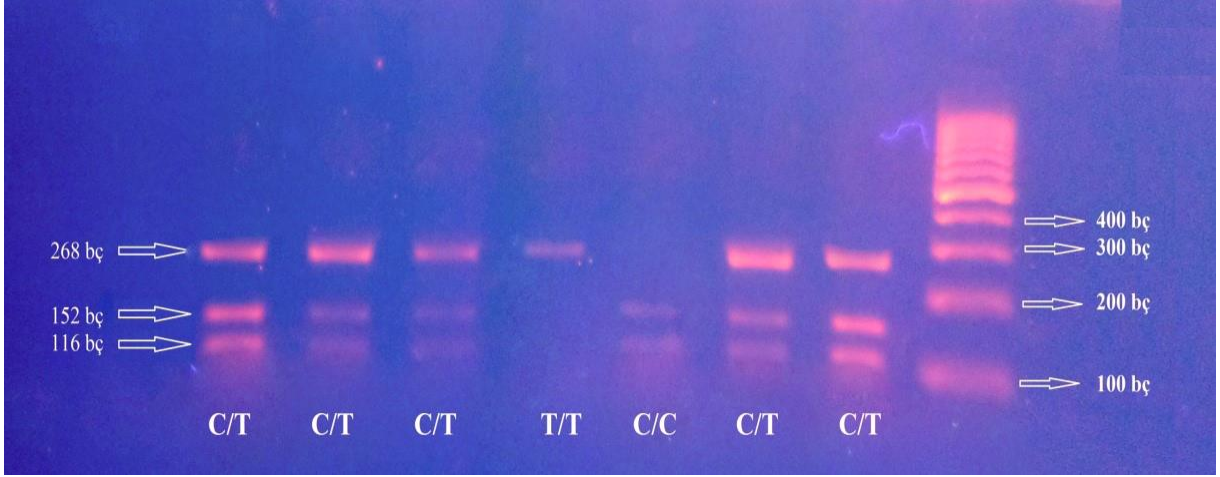
Toplam Hacim: 9 µl

Yukarıdaki karışım hazırlandıktan sonra 55°C'de 1 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresinin sonunda ürünler EtBr ile hazırlanan %2'lik agaroz jelde yürütülerek UV ışık altında oluşan bantlar gözlemlendi (Şekil 2).

BseDI kesim enziminin çalışma mekanizması aşağıdaki gibidir:

5'...C↓C N N G G...3'

3'...G G N N C↑C...5'



Şekil 7. Hasta ve kontrol PZR ürünlerinin GNB3 geninin C825T bölgesini içeren RFLP sonucunun %2'lik jelde yürütülmesi ve UV ışık altında incelenmesi

C1429T için RFLP

C1429T için RFLP aşağıdaki ürünler kullanılarak 200 µl'lik kesim tüpleri içerisinde hazırlandı.

1 µl 10XTampon

0.5 µl *BshNI* enzim

2.5 µl dH₂O

5 µl PZR ürünü

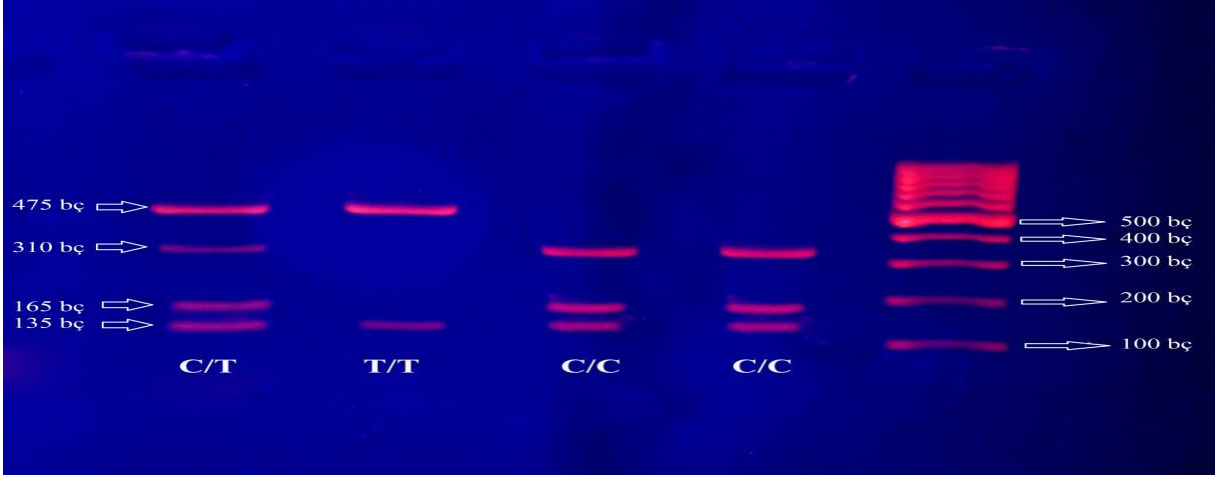
Toplam Hacim: 9 µl

Yukarıdaki karışım hazırlandıktan sonra 37°C'de 1 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresinin sonunda ürünler EtBr ile hazırlanan %2'lik agaroz jelde yürütülerek UV ışık altında oluşan bantlar gözlemlendi.

BshNI için çalışma mekanizması aşağıdaki gibidir:

5'...G↓G Y R C C...3'

3'... C C R Y G ↑G...5'



Şekil 8. Hasta ve kontrol PZR ürünlerinin GNB3 geninin C1429T bölgesini içeren RFLP sonucunun %2'lik jelde yürütülmesi ve UV ışık altında incelenmesi

İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Sonuçlar sayı (yüzde) veya ortalama \pm std. sapma olarak ifade edildiler. Yaş ve vücut kitle indeksi (VKİ) değişkenlerinin gruplar arasında karşılaştırmalarında Student t testi kullanıldı. GNB3 geninin genotipleri, cinsiyet, alkol, sigara ve aile öyküsünün gruplar arası karşılaştırmalarında pearson ki-kare testi kullanıldı. $P < 0,05$ değeri istatistiksel anlamlılık sınırı olarak kabul edildi. HDL-C, LDL-C ve Hba1c değerlerinin karşılaştırmalarında Mann Whitney U testi kullanıldı. Analizler, SPSS 20.0 (Statistics Package of Social Science) (Lisans No: 10240642) istatistik paket programı kullanılarak gerçekleştirildi.

BULGULAR

Çalışmaya, GNB3 geninin C825T ve C1429T gen bölgeleri için; diyabetik nefropati tanısı almış Tip II diyabetli (DN) 99 hasta (51 erkek, 48 kadın) ve diyabetik nefropati tanısı almamış Tip II diyabetli (NDN) 99 kontrol (33 erkek, 66 kadın) olmak üzere toplam 178 kişi dahil edildi. Diyabetik nefropatili grubun yaş ortalaması 61.99 ± 9.355 ve kontrol grubunun yaş ortalaması 60.84 ± 9.802 olarak hesaplandı. Çalışmaya katılan gruplara ilişkin demografik ve klinik bulgular incelendi. Gruplar istatistiksel açıdan karşılaştırılırken, kategorik değişkenler için Pearson ki-kare testi, sayısal değişkenler için ise Student t-testi kullanıldı ve normal dağılım göstermeyen verilerin karşılaştırılmasında, gruplar arası farkı bulmak için Mann-Whitney U testi uygulanmıştır. Tüm testler için anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak kabul edilmiştir. Normal dağılım göstermeyen veriler ortanca (minimum–maksimum / aralık) olarak verildi. Bulgular Tablo 1’de verilmiştir. Elde edilen bulgular çerçevesinde cinsiyet, sigara içme durumu ve HDL-C sonucu diyabetik nefropati ile ilişkili bulundu. Bulgular Tablo 5 ve Tablo 6’de özetlenmiştir.

Tablo 5. Diyabetik nefropatili hasta ve kontrol gruplarındaki cinsiyet, aile öyküsü, alkol, sigara kullanımı ve risk oranları

		Hasta	Kontrol	p değeri
		n(%)	n(%)	
Cinsiyet	Kadın			0,010
	Gruplar arası	51(60,7%)	33(39,3%)	
	Grup içi	51(51,5%)	33(33,3%)	
	Erkek			
Gruplar arası	48(42,1%)	66(57,9%)		
Grup içi	48(48,5%)	66(66,7%)		
Alkol	Var			0,121
	Gruplar arası	91(48,7%)	96(51,3%)	
	Grup içi	91(91,9%)	96(97,0%)	
	Yok			
Gruplar arası	8(72,7%)	3(27,3%)		
Grup içi	8(8,1%)	3(3,0%)		
Sigara	Var			0,07
	Gruplar arası	79(46,2%)	92(53,8%)	
	Grup içi	79(79,8%)	92(92,9%)	
	Yok			
Gruplar arası	20(74,1%)	7(25,9%)		
Grup içi	20(20,2%)	7(7,1%)		
Aile Öyküsü	Var			0,83
	Gruplar arası	35(42,7%)	47(57,3%)	
	Grup içi	35(35,4%)	47(47,5%)	
	Yok			
Gruplar arası	64(55,2%)	52(44,8%)		
Grup içi	64(64,6%)	52(52,5%)		

p-değerleri Pearson ki-kare testi sonucunda elde edilmiştir.

Tablo 6. Diyabetik nefropatili hasta ve kontrol gruplarındaki yaş, VKİ, HDL, LDL, Hba1c ve risk oranları

	Hasta	Kontrol	p değeri
	(n=99)	(n=99)	
Yaş	61,99 ± 9,355	60,84 ± 9,802	0,399*
VKİ	31,841 ± 5,9064	31,161 ± 6,0046	0,422*
HDL-C	46,20 ± 13,280	51,99 ± 16,460	0,043†
LDL-C	112,72 ± 37,435	113,39 ± 34,226	0,980†
Hba1c	7,2273 ± 1,33215	8,4769 ± 8,88663	0,614†

VKİ: Vücut kitle indeksi; **HDL-C:** HDL kolesterol; **LDL-C:** LDL kolesterol; **Hba1c:** Hemoglobin A1c.

*p-değerleri Student-t testi sonucunda elde edilmiştir. †p-değerleri Mann-Whitney U testi sonucunda elde edilmiştir.

DN (hasta) ve NDN (kontrol) grubundaki hastaların kategorik değişkenlerinin, GNB3 genindeki polimorfizminin anlamlılık açısından karşılaştırılmasında pearson ki kare testi kullanılmıştır. Tüm testler için anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak kabul edilmiştir.

Kontrol ve hasta gruplarına ait C825T ve C1429T gen bölgelerindeki genotip dağılımları Tablo 7 ve Tablo 8’de özetlenmiştir. C825T gen polimorfizminin genotip dağılımına bakıldığında, diyabetik nefropatili hasta grubu için CC=%8,1, CT=%65,7 ve TT=%26,3 ve kontrol grubu için CC=%26,3, CT=%63,6 ve TT=%10,1 olarak bulundu. Hasta grubunun TT genotipleri kontrole göre daha yüksek bulunmuşken, CC genotipleri daha düşük bulunmuştur. İstatistiksel olarak değerlendirildiğinde Tip 2 DM’lilerde diyabetik nefropati ile C825T genotipleri arasında anlamlı bir fark bulunmuştur (Tablo 7).

Tablo 7. C825T gen polimorfizminin hasta ve kontrol gruplarına göre genotip dağılımı

		GRUP		TOPLAM	p DEĞERİ	
		HASTA	KONTROL			
C825T	CC	SAYI	8	26	34	p=0,001
		% Gruplar arası	23,5%	76,5%	100,0%	
		%Gruplar içi	8,1%	26,3%	17,2%	
	CT	SAYI	65	63	128	
		% Gruplar arası	50,8%	49,2%	100,0%	
		%Gruplar içi	65,7%	63,6%	64,6%	
	TT	SAYI	26	10	36	
		% Gruplar arası	72,2%	27,8%	100,0%	
		%Gruplar içi	26,3%	10,1%	18,2%	
TOPLAM		SAYI	99	99	198	
	% Gruplar arası	50,0%	50,0%	100,0%		
	%Gruplar içi	100,0%	100,0%	100,0%		

p-değerleri Pearson ki-kare testi sonucunda elde edilmiştir.

C1429T gen polimorfizminin genotip dağılımına bakıldığında, diyabetik nefropatili hasta grubu için CC=%32,3, CT=%57,6 ve TT=%10,1 ve kontrol grubu için CC=%43,4, CT=%45,5 ve TT=%11,1 olarak bulundu. İstatistiksel olarak değerlendirildiğinde Tip 2 DM’lilerde diyabetik nefropati ile C1429T genotipleri arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır (Tablo 8).

Tablo 8. C1429T gen polimorfizminin hasta ve kontrol gruplarına göre genotip dağılımı

		GRUP		TOPLAM	P DEĞERİ
		HASTA	KONTROL		
C1429T	CC	SAYI	32	43	75
		% Gruplar arası	42,7%	57,3%	100,0%
		%Gruplar içi	32,3%	43,4%	37,9%
	CT	SAYI	57	45	102
		% Gruplar arası	55,9%	44,1%	100,0%
		%Gruplar içi	57,6%	45,5%	51,5%
	TT	SAYI	10	11	21
		% Gruplar arası	47,6%	52,4%	100,0%
		%Gruplar içi	10,1%	11,1%	10,6%
TOPLAM		SAYI	99	99	198
		% Gruplar arası	50,0%	50,0%	100,0%
		%Gruplar içi	100,0%	100,0%	100,0%

p-değerleri Pearson ki-kare testi sonucunda elde edilmiştir.

C825T ve C1429T gen polimorfizmleri için 198 kişinin (hasta+kontrol) istatistiksel sonuçlarına göre Tip 2 DM’li diyabetik nefropatili hasta ve Tip 2 DM’li kontrol grubu arasında C825T arasında anlamlı bir fark bulunurken; C1429T arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır.

TARTIŞMA

GN β 3 geni kromozomun 12p13 bölgesinde lokalize olmuştur. Bu gene ait çeşitli polimorfizmler üzerinde çalışılmıştır. Bunlar G814A, A657T, C1429T, A(-350)G ve C825T gibidir. Onbir ekzondan oluşan GN β 3 geninin onuncu ekzonunda sıklıkla C825T polimorfizmi ortaya çıkmaktadır (8,102-104). 825T aleli dokuzuncu ekzonda 498 ile 620' nci nükleotidler arasında 123 bazın silindiği G β 3-s ek varyantı ile ilişkilidir. Bu 41 aminoasidin delesyonu heterotrimerik G proteinlerinin 3 boyutlu yapısında konformasyonel değişime neden olur (103). Bu polimorfizm hücre membranını yedi kez kateden yüzey reseptörleri ile ilişkili olan ve hücrel yanıtın oluşmasına aracılık eden G proteinlerine aktivasyon artışı sağlar. G protein sinyalizasyonundaki anormallikler pek çok bozukluğa neden olmaktadır. G protein alt birimlerini kodlayan gene ait işlevsel olarak önemli genetik polimorfizmler, çeşitli hastalıklara neden olabilmekte veya hastalıkları tetikleyebilmektedir (105). C825T ve C1429T polimorfizminin çeşitli hastalıklar ile ilişkisini araştıran birçok çalışma yapılmıştır. GNB3 genindeki splice varyant üzerinde yapılan çeşitli çalışmalarda T allel taşıyıcılarının hipertansiyon, ateroskleroz, inme (stroke), obezite, immün yanıtta artış gibi çeşitli durumlarla ilişkili olduğu gözlenmiştir (8,106-109).

Siffert W. ve arkadaşları tarafından 1998 yılında 426 hipertansif ve 427 normotensif hasta grubu ile yapılan bir çalışmada esansiyel hipertansiyon ile 825T aleli arasında önemli bir ilişki bulunduğu rapor edilmiştir (100). Gülyaşar T. ve arkadaşları 825T varyantına sahip bireylerde hipertansiyon görülme sıklığının CC genotipine sahip bireylere göre anlamlı bir şekilde yüksek olduğunu rapor etmişlerdir (110). Cabadak H. ve arkadaşları esansiyel hipertansiyon ve C825T ve C1429T polimorfizmleri arasında ilişki bulurken, Türk toplumu

için risk oluşturabileceğinden söz etmişlerdir (111). Y. Suwazono ve arkadaşları tarafından 1997 ile 2002 yılları arasında 936 erkek ve 662 kadın hiperkolesterolemisi olan hasta çalışmaya alınmış GNB3 geni C1429T polimorfizminin Japon toplumunda bağımsız risk faktörü olduğunu ve erkek populasyonunda bu polimorfizmin araştırılmasının hiperkolesterolemiyi önlemede yararlı olabileceğini rapor etmişlerdir (112). İnsülin direnci de bu polimorfizm ile ilişkilendirilmiş bir başka konudur. CT ve TT genotipleri taşıyan, yaşlı hipertansif hastalarda insülin direnci daha sık izlenmektedir (113). Turner ve arkadaşları da yaptıkları çalışmada yine CT ve TT genotipindeki hipertansif hastalarda, hidroklorotiyazid kullanımı ile kan basıncının daha fazla düştüğünü gözlemlemişlerdir (114). Yamamoto ve arkadaşları ise sistolik kan basıncı artışının T alleli ile ilişkisinden söz etmişlerdir. Diastolik kan basıncı ile bu ilişkiyi gözlememişlerdir. T allel taşıyıcıları ayrıca obezite, hipertrigliseridemi, diabetes mellitus açısından da CC genotipine göre daha fazla riske sahiptir (115).

GNB3 825T alleli Na⁺/H⁺ değiştirici(NHE) aktiviteyi artırması ile karakterize edilen C825T polimorfizmi epitelyal yüzeylerden sodyum tutulmasına neden olur (8) ve bu nedenle diyabetik nefropati ile ilişkisinden söz etmektedir (8,112). Na⁺/H⁺ değişimi hücre içi pH'ı, hücre hacmini düzenlemektedir ve aktivitesindeki artış böbrek Na⁺ retansiyonu, insülin direnci, vasküler ve ventriküler hipertrofi ile de ilişkilendirilmiştir (100,113).

Siffert W. ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, GNB3 geninin C825T polimorfizminin hipertansiyon, obezite ve diyabetik nefropati için genetik bir belirteç olup olmadığını araştırılmış, G-proteinlerinin adipogenezde önemli rol oynamaları nedeniyle, T allelinin obezite ile ilişkili olduğu gösterilmiştir ve son dönem böbrek yetmezliği evresindeki hastalarda bu gen frekansında bir artış gözlemlenmiş ve diyabetik nefropati içinde genetik bir belirteç olabileceğini rapor etmiştir (8).

Fogarty ve arkadaşları yaptıkları çalışmada Tip I diyabetli hastalarda, diyabetik nefropati oluşumundaki C825T polimorfizminin rolünü araştırdılar ve T allelinin frekansını 0,32 olarak saptamış diyabetik nefropati ile ilişki olmadığını rapor etmişlerdir (116).

Natalia S. ve arkadaşlarının rus toplumunda yaptıkları 515 kişinin katıldığı çalışmada insilün bağımlı diyabet hastalarında GNB3 geninin C825T polimorfizminin diyabetin komplikasyonları ile ilişkisini araştırmış; diyabetik nefropatili hastalarda T allel frekansını 0,31 olarak saptanmışlardır ve bu komplikasyonlardan nefropati, nöropati ve retinopati ile T alleli arasında bir ilişki olmadığını rapor etmişlerdir (117).

Beige ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, 1008 hasta ve 1940 sağlıklı kontrol çalışmaya alınmış; diyabetes mellituslu hastalarda GNB3 geninin C825T polimorfizminin hem Tip 1 hemde Tip 2 diyabette nefropati riskini arttırmadığı sonucunu rapor etmişlerdir (118).

G proteinlerinin $\beta 3$ alt birimini kodlayan GNB3 genindeki polimorfizmler belirgin hücrel ve metabolik etkilerle ilişkilidir (3). Tip 2 diyabetli hastalarda, diyabetik nefropati sinyal yollarında çok önemli rolleri olan ve Na^+/H^+ değiştirici aktivasyonu ile karakterize olan heterotrimerik G proteinleriyle bağlantılı GNB3 geni C825T ve C1429T polimorfizmleri arasındaki olası ilişkiyi araştırdığımız çalışmamızda ilk önce hasta ve kontrol gruplarının yaş, cinsiyet, vücut kitle indeksi, aile öyküsü, sigara ve alkol kullanımı özellikleri sorgulandı. Hastaların yaşlarının ortalama 38–87 arasında olması nedeniyle kontrol grubu oluşturulurken bireylerin özellikle benzer yaş grubu aralığında olmasına dikkat edilmiştir. Kontrol grubu yaşları 38 ile 81 arasında değişen 99 kişiden oluşmaktadır. Yaş aralığı benzer olmakla birlikte çalışmamızda hasta ve kontrol grubunda yaş ortalaması açısından istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamaktadır. Hasta grubu yaş ortalaması 61,99 iken kontrol grubunda 60,84 olarak bulunmuştur.

Vücut kitle indeksleri, alkol kullanımı, aile öyküsü, LDL-C ve Hba1c sonuçları bakımından hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı bir farklılık bulunamamıştır. Cinsiyet, sigara kullanımı ve HDL-C risk faktörleri açısından hasta ve kontrol grubu arasında fark bulunmuştur. HDL-C ortalama seviyesinin kontrol grubunda hasta grubuna göre daha fazla olduğu gözlemlenmiştir.

C825T gen polimorfizminin genotip frekansı dağılımına bakıldığında, diyabetik nefropatili hasta grubu için CC=%8,1, CT=%65,7 ve TT=%26,3 ve kontrol grubu için CC=%26,3, CT=%63,6 ve TT=%10,1 olarak bulundu. Hasta grubunun TT genotipleri kontrole göre daha yüksek bulunmuşken, CC genotipleri daha düşük bulunmuştur. İstatistiksel olarak değerlendirildiğinde Tip 2 DM'lilerde diyabetik nefropati sıklığı ile C825T genotipleri arasında anlamlı bir fark bulunmuştur (0,001).

C1429T gen polimorfizminin genotip dağılımına bakıldığında, diyabetik nefropatili hasta grubu için CC=%32,3, CT=%57,6 ve TT=%10,1 ve kontrol grubu için CC=%43,4, CT=%45,5 ve TT=%11,1 olarak bulundu. İstatistiksel olarak değerlendirildiğinde Tip 2 DM'lilerde diyabetik nefropati sıklığı ile C1429T genotipleri arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır (0,215).

Sonuç olarak; gerçekleştirdiğimiz çalışmada cinsiyet ($P=0,010$), sigara kullanımı ($P=0,007$) ve düşük HDL seviyesi (Hasta = $46,20 \pm 13,280$; Kontrol = $51,99 \pm 16,460$), ($P=0,043$) DN ile ilişkili risk faktörleri olarak bulundu. ($P<0,05$). Ayrıca, GNB3 geninin C825T gen bölgesindeki TT polimorfizminin de DN gelişiminde etkili bir faktör olabileceğini düşünmekteyiz.

SONUÇLAR

Çalışmamızda, DN'da rolü olduğu bilinen yaş, cinsiyet, diyabet, sigara içme durumu, alkol kullanımı, aile öyküsü, HDL, LDL ve Hba1c gibi risk faktörleri belirlendikten sonra, bu risk faktörleri göz önünde bulundurularak DN tansısı almış kişilerden oluşan bir hasta grubu ve DN tanısı almamış Tip 2 DM'li kişilerden oluşan bir kontrol grubu belirlenerek çalışmaya başlandı.

Bizim çalışmamızda Tip 2 DM tanısı almış Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Nefroloji Ana Bilim Dalına başvuran ve yapılan tetkikler sonucunda DN oldukları saptanan 99 hasta ile Tip 2 DM şikayeti ile Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Endokrinoloji Ana Bilim Dalına başvuran ve yapılan tetkikler sonucu Tip 2 DM oldukları saptanan 99 kontrol olmak üzere toplam 198 kişi çalışmaya alındı. T.Ü. Tıp Fak. Biyofizik Anabilim Dalında, DNA izolasyonu, PZR, RFLP ve agaroz jel elektroforezi teknikleri kullanılarak, DN ile C825T ve C1429T gen polimorfizmleri arasındaki incelendi. Ayrıca, DN ile ilişkili risk faktörleri belirlenmeye çalışıldı.

C825T gen polimorfizminin genotip frekansı dağılımına bakıldığında, diyabetik nefropatili hasta grubu için CC=%8,1, CT=%65,7 ve TT=%26,3 ve kontrol grubu için CC=%26,3, CT=%63,6 ve TT=%10,1 olarak bulundu. Hasta grubunun TT genotipleri kontrole göre daha yüksek bulunmuşken, CC genotipleri daha düşük bulunmuştur. Ki-kare testi değerlerine bakıldığında Tip 2 DM'lilerde diyabetik nefropati ile C825T genotipleri arasında anlamlı bir fark bulunmuştur (0,001).

C1429T gen polimorfizminin genotip dağılımına bakıldığında, diyabetik nefropatili hasta grubu için CC=%32,3, CT=%57,6 ve TT=%10,1 ve kontrol grubu için CC=%43,4,

CT=%45,5 ve TT=%11,1 olarak bulundu. Ki-kare testi değerlendirine bakıldığında Tip 2 DM'lilerde diyabetik nefropati ile C1429T genotipleri arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır (0,215).

Sonuç olarak; gerçekleştirdiğimiz çalışmada cinsiyet, sigara kullanımı ve dūřuk HDL seviyesi DN ile ilişkili risk faktörleri olarak bulundu. Ayrıca, GNB3 geninin C825T gen bölgesindeki TT polimorfizminin de DN ile ilişkili olabileceği sonucuna varıldı.

ÖZET

Heterotrimerik G proteinleri transmembran reseptörlerinin bir kısmının önemli bir bileşenidir ve hücre içi sinyal iletiminin düzenlenmesinde rol alırlar. Heterotrimerik G proteinleri α , β , ve γ olmak üzere üç alt birimden meydana gelmektedir. GNB3 geni G protein β 3 alt birimini kodlayan gendir. Bu gene ait çeşitli polimorfizmler arasında ise en önemlisi ve çeşitli hastalıklarla ilişkilendirilmiş olanı C825T polimorfizmidir. Bu çalışmada, DN tanısı alan hastalarda GNB3 geninin C825T ve C1429T gen bölgelerindeki polimorfizimlerin DN ile ilişkisinin araştırılması ve DN'ye yol açtığı düşünülen olası risk faktörlerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Spesifik primerler ve *BseDI* ve *BshNI* restriksiyon enzimleri ile Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ve Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) yöntemleri kullanılarak jel elektroforezinde gözlemlendi. Ki-kare testi kullanılarak gen polimorfizimleri ile DN arasındaki ilişki araştırıldı.

Çalışmaya, tip 2 diabetes mellitus tanısı ile takip edilen toplam 198 hasta alınmıştır. Bu hastalardan 99'i diyabetik nefropatisi bulunan (DN), 99'u ise kontrol grubu olarak diyabetik nefropatisi bulunmayan (NDN) hastalardan seçilmiştir. C825T için genotip dağılımları arasında

TT polimorfizmi, hastalarda kontrollere göre anlamlı derecede yüksek bulundu. Ayrıca CC polimorfizmi, kontrollerde hastalara göre anlamlı derecede yüksek bulundu. C1429T için ise genotip dağılımları arasında anlamlı bir farklılık gözlenmedi ($p>0,05$). Düşük HDL seviyesi (Patient = $46,20 \pm 13,280$; Control = $51,99 \pm 16,460$, $p<0,05$), ve sigara kullanımı ($p<0,05$) DN ile ilişkili risk faktörleri olarak bulundu.

Bu sonuca göre, GNB3'un C825T gen bölgesindeki TT polimorfizmi DN gelişiminde etkili bir faktör olabilir. Daha fazla sayıda vakanın katılımıyla oluşturulacak gruplarda çalışmanın genişletilmesi uygun bir yaklaşım olacaktır.

Anahtar Kelimeler: Tip II diyabet, diyabetik nefropati, G protein, GNB3, C825T, C1429T, polimorfizm

THE ROLE OF G PROTEIN $\beta 3$ C825T AND C1429T GENE POLYMORPHISMS IN THE DEVELOPMENT OF DIABETIC NEPHROPATHY IN PATIENTS WITH TYPE II DIABETES MELLITUS

SUMMARY

Heterotrimeric G proteins are important components of a multitude of transmembran receptors and are involved in the regulation of intracellular signaling pathways. Heterotrimeric G proteins consist of three subunits as α , β , and γ . GNB3 is the gene that encodes the G protein $\beta 3$ subunit. There are numerous polymorphisms of this gene but C825T polymorphism is the most important one which is related with several diseases. In this work, we aimed to study the association between GNB3 C825T/C1429T gene polymorphisms and DN. Moreover, we intend to determine the possible risk factors that cause DN.

The Btechnique will use a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) with *BseDI/BshNI* as restriction enzyme and specific primers, followed by gel electrophoresis.

Study subjects comprised of 198 Type 2 diabetes patients. 99 were with diabetic nephropathy (DN), 99 without nephropathy (NDN) as control subjects. For C825T, TT polymorphisms were significantly higher in patients compared to controls. Besides CC polymorphisms were significantly higher in controls compared to patients. However, there is no significant difference between cases and controls for C1429T gene polymorphisms ($p > 0,05$). Low HDL level (Patient = $46,20 \pm 13,280$; Control = $51,99 \pm 16,460$, $p < 0,05$) and cigarette consumption ($p < 0,05$) were found to be associated with DN.

According to this result, TT polymorphism in the GNB3 C825T can be an influential factor in the development of DN. However further studies with larger scaled groups should be performed in order to investigate the role of C825T single nucleotide polymorphisms of G-protein beta 3 gene (GNB3) in type 2 diabetes patients with diabetic nephropathy.

Keywords: Type II diabetes, diabetic nefropati, G protein, GNB3, C825T, C1429T, Polymorphism

KAYNAKLAR

1. Michael B, Lloyd PA, Eli F, Aaron IV, Richard WN, Andrew JMB. Complications of Diabetes Mellitus. In: Larsen PR, Kronenberg HM, Melmed S, Polonsky K (ed)s. Williams Textbook of Endocrinology. 10th ed. Philadelphia: WB Saunders, 2003: 1509-40.
2. Tucker BJ, Collins RC, Ziegler MG, Blandz RC. Disassociation between glomerular hyperfiltration and extracellular volume in diabetic rats. *Kidney Int* 1991;39:1176-83.
3. Hirose K, Qsterby R, Nozawa M, Jorgen H, Gundersen G. Development of glomerular lesions in experimentallong-term diabetes in the rat. *Kidney Int* 1982;21:689-95.
4. Parving HH. Diabetic nephropathy: prevention and treatment. *Kidney Int* 2001;60:2041-55.
5. Keane WF, Zhang Z, Lyle PA, Cooper ME, Zeeuw D, Grunfeld JP and et al. Risk scores for predicting outcomes in patients with type 2 diabetes and nephropathy: The Renal Study. *Clin J Am Soc Nephrol* 2006;(1):761-7.
6. Huang E-J. Homocysteine and other biochemical parameters in type 2 diabetes with different diabetic duration or diabetic retinopathy. *Clinica Chimica Acta* 2006;366:293-8.
7. Afshin Farzaneh-Far, John D. Davies, Levienja A. Braam, Henri M. Spronk, Diane Proudfoot, Shiu-Wan Chan, et al. A Polymorphism of the Human Matrix γ -Carboxyglutamic Acid Protein Promoter Alters Binding of an Activating Protein-1 Complex and Is Associated with Altered Transcription and Serum Levels. *The Journal Of Biological Chemistry* 2001;276(35):32466-73.
8. Winfried Siffert. G protein β 3 subunit 825T allele, hypertension, obesity and diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 2000;15:1298-306.
9. Yenigün M. Her Yönüyle Diabetes Mellitus. 2. Baskı. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevi 2001;51-61, 63-7, 69-81, 215-17, 237-43.

10. Forsblom CM, Groop PH, Ekstrand A, Totterman KJ, Sane T, Saloranta C, et al. Predictors of progression from normoalbuminuria to microalbuminuria in NIDDM. *Diabetes Care* 1998;21:1932-8.
11. Eschwege E, Simon D, Balkau B. The growing burden of diabetes in the world population. *International diabetes federation Bulletin* 1997;42:14-9.
12. Prof. Dr. İlhan Satman (Çalışma grubu adına) Türkiye Diyabet, Hipertansiyon, Obezite ve Endokrinolojik Hastalıklar Prevalans Çalışması-II (TURDEP-II Çalışması). 13 Ekim 2010
13. Diyabetes Mellitus Ve Komplikasyonlarının Tanı, Tedavi ve İzlem Klavuzu, Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği -2009
14. Powers AC. Diabetes Mellitus. Braunwald E(Ed), Fauci AS(Ed), Kasper DL(Ed), Hauser SL(Ed), Longo DL(Ed), Jameson JL(Ed). *Harrison İç Hastalıkları Prensipleri*. (M. Araz, Çev.). Nobel Tıp Kitabevi, 2004, İstanbul, 15.baskı. s.2109-13.
15. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2005;28:37-42.
16. Froguel, P, Zouali, H, Vionnet, N. Familial hyperglycemia due to mutations in glucokinase: Definition of a subtype of diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1993; 328:697.
17. Arık N. Diyabetik Nefropati. Arık N (editor). *Nefroloji*. 1. Baskı. İstanbul: Deniz Matbaası, 2001; 103-7.
18. Türkiye’de Nefroloji-Diyaliz ve Transplantasyon, 2009.
19. Orhan Y. Diabetes Mellitus. Sencer E (editor). *Endokrinoloji, Metabolizma ve Beslenme Hastalıkları*. İstanbul: Nobel Yayınevi, 2001; 246-86.
20. Fauci, Braunwald, Kasper, Hauser, Longo, Jameson, Loscalzo (editors-in chief). *Harrison’s Principles of Internal Medicine*. 17th Edition. Mc Graw Hall, 2008.
21. Diabetes Control and Complications Trial Research Groups. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long term complications in insulin dependent diabetes mellitus. *NEng J Med* 1993;329:977-86.
22. Berger M, Monks D, Wanner C, Linder TH. Diabetic nephropathy: an inherited disease or just a diabetic complication? *Kidney BloodPres Res* 2003;26:143-54.
23. Pettitt DJ, Saad MF, Benneth PH, Nelson RG, Knowler WC. Familial predisposition to renal disease in two generations of Pima Indians with type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia* 1990;33:438-43.
24. Earle K, Walker J, Hill QViberti GC. Familial clustering of cardiovascular disease in patients with insulin dependent diabetes and nephropathy. *N Eng J Med* 1992;326:673-7.
25. Keller C, Bergis KH, Fliser D, Ritz E. Renal findings in patients with short term type 2 diabetes. *J Am Soc Nephrol* 1996;7:2627-35.

26. Marso SP. Diabetic nephropathy. In: Marso SP, ed. *The Handbook of Diabetes Mellitus and Cardiovascular Disease*. 1st ed. London: Remedica Group; 2003. p. 113-27.
27. Feehally J. Ethnicity and renal disease: questions and challenges. *Clin Med* 2003;3:578-82.
28. Wolf G. New insights into the pathophysiology of diabetic nephropathy: from haemodynamics to molecular pathology. *Eur J Clin Invest* 2004;34:785-96.
29. Marre M, Mode B, Bernadet P, Gallois Y, Savanger F, Tham-Tam G, Hallab M. Relationships between angiotensin I converting enzyme gene polymorphism, plasma levels, and diabetic renal complications. *Diabetes* 1994;43:384-8.
30. Gross JL, de Azevedo MJ, Silveiro SP, Canani LH, Caramon ML, Zelmanovitz T. Diabetic nephropathy: diagnosis, prevention, and treatment. *Diabetes Care* 2005;28:164-76.
31. Arima S, Ito S. The mechanisms underlying altered vascular resistance of glomerular afferent and efferent arterioles in diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 2003;18:1966-9.
32. Marshall SM. Recent advances in diabetic nephropathy. *Postgrad Med J* 2004;80:624-33.
33. Cooper ME. Pathogenesis, prevention and treatment of diabetic nephropathy. *Lancet* 1998;352:213-9.
34. Pickup J, Williams G. Pathogenesis of diabetic nephropathy. In: Pickup J, Williams G (Eds.). *Textbook of diabetes*. 2nd ed. Edinburgh: Blackwell Science, 1997;1-21.
35. Parving HH, Tarnow L, Rossing P. Genetics of diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 1996;7:2509-17.
36. Araz M, Yılmaz N, Güngör K, Okan V, Kepekçi Y, Aynacıoğlu A. Angiotensin-converting gene polymorphism and microvascular complications in Turkish type 2 diabetic patients. *Diabetes Research and Clinical Practice* 2001;54:95-104.
37. Vasavada N, Agarwal R. Role of oxidative stress in diabetic nephropathy. *Adv Chronic Kidney Dis* 2005;12:146-54.
38. Lee HB, Yu MR, Yang Y, Ziang Z, Ha H. Reactive oxygen species-regulated signaling pathways in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2003;14:241-5.
39. Brownlee M, Cerami A, Vlassara H. Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. *N Engl J Med* 1988;318:1315-21.
40. Suzuki D, Miyata T, Saotome N, Horie K, Inagi R, Yasuda Y, et al. Immunohistochemical evidence for an increased oxidative stress and carbonyl modification of proteins in diabetic glomerular lesions. *J Am Soc Nephrol* 1999;10:822-32.
41. Dyer DG, Dunn JA, Thorpe SR, Bailie KE, Lyons TJ, McCance DR, et al. Accumulation of Maillard reaction products in skin collagen in diabetes and aging. *J Clin Invest* 1993;91:2463-9.

42. Salahudeen AK, Kanji V, Reckelhoff JF, Schmidt AM. Pathogenesis of diabetic nephropathy: a radical approach. *Nephrol Dial Transplant* 1997;12:664-8.
43. Brownlee M. Glycation products and the pathogenesis of diabetic complications. *Diabetes Care* 1992;15:1835.
44. Wautier JL, Chappey O, Wautier MP, Hori O, Stern D, Schmidt AM. Receptor mediated endothelial dysfunction in diabetic vasculopathy: SRAGE blocks hyperpermeability. *J Clin Invest* 1996;97:238.
45. Isshiki K, Haeda M, Koya D, Maeda S, Sugimoto T, Kikkawa R. Thiazolidinedione compounds ameliorate glomerular dysfunction independent of their insulin-sensitizing action in diabetic rats. *Diabetes* 2000;49:1022-32.
46. Ha H, Kim KH. Pathogenesis of diabetic nephropathy: the role of oxidative stress and protein kinase C. *Diabetes Res Clin Pract* 1999;45:147-51.
47. Ceriello A, Morocutti A, Mercuri F, Quagliaro L, Moro M, Damante G et al. Defective intracellular antioxidant enzyme production in type 1 diabetic patients with nephropathy. *Diabetes* 2000;49:2170-7.
48. Son SM. Role of vascular reactive oxygen species in development of vascular abnormalities in diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 2007;77:65-70.
49. Chaudhry J, Ghosh NN, Roy K, Chandra R. Antihyperglycemic effect of a new thiazolidinedione analogue and its role in ameliorating oxidative stress in alloxan-induced diabetic rats. *Life Sci* 2007;70:1135-42.
50. Kedziora-Kornatowska KZ, Luciak M, Blaszczyk J, Pawlak W. Lipid peroxidation and activities of antioxidant enzymes in erythrocytes of patients with non-insulin dependent diabetes with or without diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 1998;13:2829-32.
51. Craven PA, Derubertis FR, Kagan VE, Mehlem M, Studer RK. Effects of supplementation with vitamin C or E on albuminuria, glomerular TGF beta, and glomerular size in diabetes. *J Am Soc Nephrol* 1997;8:1405-14.
52. Lee EY, Chung CH, Kim JH, Hong SY. Antioxidants ameliorate the expression of vascular endothelial growth factor mediated by protein kinase C in diabetic podocytes. *Nephrol Dial Transplant* 2006;21:1496-503.
53. Panchapakesan U, Chen XM, Pollock CA. Drug insight: thiazolidinediones and diabetic nephropathy relevance to renoprotection. *Nat Clin Pract Nephrol* 2005;1:33-43.
54. Catherwood MA, Powell LA, Anderson P, McMaster D, Sharpe PC, Trimble ER. Glucose-induced oxidative stress in mesangial cells. *Kidney Int* 2002;61:599-608.
55. Price DA, Porter LE, Gordon M, Fisher ND, De'Oliveira JM, Laffel LM et al. The paradox of the low-renin state in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 1999;10:2382-91.

56. Tomohiro T, Kumai T, Sato T, Takeba Y, Kobayashi S, Kimura K. Hypertension aggravates glomerular dysfunction with oxidative stress in a rat model of diabetic nephropathy. *Life Sci* 2007;80:1364-72.
57. Wolf G. New insights into the pathophysiology of diabetic nephropathy: from haemodynamics to molecular pathology. *Eur J Clin Invest* 2004;34:785-96.
58. Clare-Salzler MJ, Crawford JM, Kumar V. Pankreas. Diabetes mellitusü morfolojisi ve geç komplikasyonları. *Robbins Temel Patoloji*. 7. Baskı. (Çvr ed. Çevikbaş U). İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri Ltd. Sti; 2003. p. 650-651.
59. Van Dijk C, Berl T. Pathogenesis of diabetic nephropathy. *Rev EndocrMetab Disord* 2004; 5: 237-248.
60. Herman WH, Teutsch SM. Diabetes and renal mortality in the United States. *Am J Public Health* 1985;75:1325-6.
61. Molitch ME, DeFronzo RA, Franz MJ, Keane WF, Mogensen CE, Parving HH. American Diabetes Association. Diabetic nephropathy. *Diabetes Care* 2003; 26: 94-98.
62. Mogensen CE, Keane WF, Benneth PH, Jerums G, Parving HH, Passa P, et al. Prevention of diabetic renal disease with special reference to microalbuminuria. *Lancet* 1995; 346: 1080-1084.
63. Granner DK. Hormon Etkisi. In: Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell V Eds. *Harper'in biyokimyası*. 24. Baskı. İstanbul: Barış Kitapevi, 1998: 536-550.
64. Katzung BG. *Basic & Clinical Pharmacology*. 7th Ed., Stanford: USA Appleton& Lange Publishing, 1998:17-27.
65. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. *Molecular Biology of The Cell*. 3rd. Ed., New York: USA Garland Publishing, Inc. 1994:721-85.
66. Foreman JC. Introduction to signal transduction. In: Foreman JC, Johansen T. Eds. *Textbook of receptor pharmacology*. 1st Ed. USA: CRC Press, Inc. 1996:153-8.
67. Waller DG, Renwick AG, Hillier K. *Medical Pharmacology and Therapeutics*. 1st. Ed. Spain: W.B. Saunders. 2001:3-16.
68. Berthet J, Rall TW, Sutherland EW. (1957) The relationship of epinephrine and glucagon to liver phosphorylase. IV. Effect of epinephrine and glucagon on the reactivation of phosphorylase in liver homogenates. *J Biol Chem* 224(1):463-75.
69. Sutherland EW, Rall TW. Fractionation and characterization of cyclic adenine ribonucleotide formed by tissue particles. *J Biol Chem* 1958;232(2):1077-91.
70. Birnbaumer L, Rodbell M. Adenylyl cyclase in fat cells. II. Hormone receptors. *J Biol Chem* 1969;244(13):3477-82.
71. Orly J, Schramm M. Coupling of catecholamine receptor from one cell with adenylate cyclase from another cell by cell fusion. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1976;73(12):4410-4.

72. Shorr RGL, Lefkowitz RJ, Caron MG. Purification of the β -adrenergic receptor. Identification of the hormone-binding subunit. *J Biol Chem*. 1981;256(11):5820-6.
73. Rodbell M, Birnbaumer L, Pohl SL, Krans HMJ. The glucagon- sensitive adenylyl cyclase system in plasma membranes of rat liver. V.An obligatory role of guanyl nucleotides in glucagon action. *J Biol Chem*. 1971;246(6):1877-82.
74. Pfeuffer T, Helmreich EJM. Activation of pigeon erythrocyte membrane adenylyl cyclase by guanyl nucleotide analogues and separation of nucleotide-binding protein. *J Biol Chem* 1975;250(3):867-76.
75. Ross EM, Gilman AG. Resolution of some components of adenylyl cyclase necessary for catalytic activity. *J Biol Chem* 1977;252(20):6966-9.
76. Vaughan M. Signaling by heterotrimeric G proteins minireview Series. *J Biol Chem* 1998;273(2):667-8.
77. Gutkind JS. The pathways connecting G-protein coupled receptors to the nucleus through divergent mitogen-activated protein kinase cascades. *The journal of biological chemistry*. 1998;273(4):1839-42.
78. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Gardner P. *Pharmacology*. 4th Ed, Philadelphia: USA Churchill, Livingstone Company. 2001:19-49.
79. Dorsam RT, Gutkind JS. G-protein coupled receptors and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(2):79- 94.
80. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P, Wilson J, Hunt T. *Molecular Biology of the Cell*. In: Mechanism of the cell communication. Garland Publishing, New York, 2008, 5ed, p.879-964.
81. Oldham WM, Hamm HE. Structural basis of function in heterotrimeric G proteins. *Quarterly Reviews of Biophysics* 2006;50:15-38.
82. 1GOT to fix the new conformation (Fig. 2)8. from Protein Data Bank
83. Noel J, Hamm HE, Sigler PA. The 2.2Å crystal structure of transducin- α complexed with GTP γ S. *Nature* 1993;366:654-63.
84. Ji HT, Grossmann SM, Ji I. G protein-coupled receptor. *The journal of biological chemistry*, 1998;273(28):17299-302.
85. Bourne HR, Sanders DA, McCormick F. The GTPase superfamily: Conserved structure and molecular mechanism. *Nature* 1991;348:117-27.
86. Rens-Domiano S, Hamm HE. Structural and functional relationships of heterotrimeric G-proteins. *FASEB Journal* 1995;9:1059-66.
87. Kaziro Y, Itoh H, Kozasa T, Nakafuku M, Satoh T. Structure and function of signal-transducing GTP-binding proteins. *Annual Review of Biochemistry* 1991;60:349-400.

88. Jeff Hardin, Gregory Berfoni, Lewis J. Kleinsmith; Word of the cell. 18th edition, Pearson Education Inc. 2012
89. Offermanns S. G-proteins as transducers in transmembrane signalling. *Prog Biophys Mol Biol.*2003;83(2):101-30.
90. Gautam N., Baetscher M., Aebersold R., Simon M.I. A G protein gamma subunit shares homology with ras proteins. *Science* 1989;244:971-974.
91. Sondek J, Bohm A, Lambright DG, Hamm HE, Sigler PB. Crystal structure of a G-protein beta gamma dimer at 2.1A resolution. *Nature* 1996;379:369–374.
92. Milligan G, Kostenis E. Heterotrimeric G-proteins: A short history. *British Journal of Pharmacology* 2006;147:46-55.
93. Lambright DG, Sondek J, Bohm A, Skiba NP, Hamm HE, Sigler PB. The 2.0° A crystal structure of a heterotrimeric G protein. *Nature* 1996;379(6563):311-9.
94. Lambright DG, Noel JP, Hamm HE, Sigler PB. Structural determinants for activation of the α subunit of heterotrimeric G protein. *Nature* 1994;369(6482):621-8.
95. Theresa M, Vera C, Vanhauwe J, Thomas TO, Medkova M, Preininger A, Mazzoni MR, Hamm HE. Insights into G protein structure, function, and regulation. *Endocr Rev.* 2003;24(6):765-81.
96. Stryer L. Cyclic GMP cascade of vision. *Annu Rev Neurosci* 1986;9:87-119.
97. Koelle MR. A new family of G protein regulators-the RGS proteins. *Curr Opin Cell Biol* 1997;9(2):143-7.
98. Hollinger S, Hepler JR. Cellular regulation of RGS proteins: modulators and integrators of G protein signaling. *Pharmacol Rev* 2002;54(3):527-59.
99. Roskopf D, Busch S, Manthey I, Siffert W. G protein $\beta 3$ gene, structure, promoter, and additional polymorphisms. *Hypertension*, 2000;36(1):33-41.
100. Siffert W, Roskopf D, Siffert G, Busch S, Moritz A, Erbel R, Sharma AM, Ritz E, Wichmann HE, Jakobs KH, Horsthemke B. Association of a human G-protein beta 3 subunit variant with hypertension. *Nat Genet* 1998;18(1):45-8.
101. Siffert W. A single nucleotide polymorphism in G protein-a powerful pointer to several diseases. *Qiagen news.* 2000;2:6-8.
102. Yanbin Dong, Haidong Zhu, Giuseppe A. Sagnella, Nicholas D. Carter, Derek G. Cook, Francesco P. Cappuccio. Association Between the C825T Polymorphism of the G Protein $\beta 3$ -Subunit Gene and Hypertension in Balck. *Hypertension* 1999;34:1193-6.
103. Rudolf P. Wütrich, Snjezana Cicvara, Christa Booy, Urs Widmer and Ulrich Binswanger. The 825C/T Polymorphism of the G protein Subunit $\beta 3$ does not influence blood pressure and renal function in kidney transplant recipients. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15: 1663-1666.

104. A. Meirhaeghe, C. Bauters, N. Helbecque, M. Hamon, E. McFadden, J. M. Lablanche, M. Bertrand and P. Amouyel. The human G-protein $\beta 3$ subunit C825T polymorphism is associated with coronary artery vasoconstriction. *European Heart Journal* 2001;22:845-8.
105. Siffert W. G protein polymorphisms in hypertension, atherosclerosis, and diabetes. *Annu Rev Med* 2005;56:17-28.
106. Morrison AC, Doris PA, Folsom AR, Nieto FJ, Boerwinkle E. G-protein $\beta 3$ subunit and α -adducin polymorphisms and risk of subclinical and clinical stroke. *Stroke* 2001;32(4):822-9.
107. Virchow S, Ansorge N, Rübber H, Siffert G, Siffert W. Enhanced f MLP-stimulated chemotaxis in human neutrophils from individuals carrying the G protein $\beta 3$ subunit 825 T allele. *FEBS letters*. 1998;436:155-8.
108. Lindemann M, Virchow S, Ramann F, Barsegian V. The G protein $\beta 3$ subunit 825 T allele is a genetic marker for enhanced T cell response. *FEBS letters*. 2001;495:82-6.
109. Von Beckerath N, Schusterschitz Y, Koch W, Griebner K. G protein beta 3 subunit 825T allele carriage and risk of coronary artery disease. *Atherosclerosis*. 2003;167:135-9.
110. Özkeçeci, E., T. Gülyaşar, S. Şener, "The association of hypertension and C825T polymorphism of the gene encoding the G-protein beta-3 subunit (GNB3) in a group of Turkish hypertensive patients", *Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi (ISI), Cilt 25(2)*, 100-104 pp., 2008.
111. Hülya Cabadak, Oya Orun, Cevdet Nacar, Yüksel Doğan, Özlem Güneysel, Ali Serdar Fak, Beki Kan. The Role of G Protein $\beta 3$ Subunit Polymorphisms C825T, C1429T, and G5177A in Turkish Subjects with Essential Hypertension. 2011 Informa Healthcare USA, Inc
112. Suwazono Y, Kobayashi E, Uetani M, Miura K, Morikawa Y, Ishizaki M, Kido T, Nakagawa H, Nogawa K. G-protein beta 3 subunit polymorphism C1429T and low-density lipoprotein receptor-related protein 5 polymorphism A1330V are risk factors for hypercholesterolemia in Japanese males a prospective study over 5 years. *Metabolism* 2006;55(6):751-7.
113. Poch E, González D, Gómez-Angelats E, Enjuto M, Paré JC, Rivera F, de La Sierra A. GProtein beta(3) subunit gene variant and left ventricular hypertrophy in essential hypertension. *Hypertension* 2000;35(1):214-8.
114. Turner ST, Schwartz GL, Chapman AB, Boerwinkle E. C825T polymorphism of the G protein beta (3)-subunit and antihypertensive response to a thiazide diuretic. *Hypertension* 2001;37(2):739-43.
115. Yamamoto M, Abe M, Jin JJ, Wu Z, Tabara Y, Mogi M, Kohara K, Miki T, Nakura J. Association of GNB3 gene with pulse pressure and clustering of risk factors for cardiovascular disease in Japanese. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;316(3):744-8.

116. Fogarty DG, Zychma MJ, Scott LJ, Warram JH, Krolewski AS. The C825T polymorphism in the human G-protein beta3 subunit gene is not associated with diabetic nephropathy in Type I diabetes mellitus. *Diabetologia* 1998;41:1304-8.
117. Natalia S. Shcherbak · Eugene I. Schwartz, The C825T polymorphism in the G-protein β 3 subunit gene and diabetic complications in IDDM patients. *J Hum Genet* 2001;46:188–91.
118. Joachim Beige, Jens Bergel, Armin Distler, Arya M. Sharma. G-protein β 3 subunit C825T genotype and nephropathy in diabetes mellitus. *Nephrol Dial Transplant* 2000;15:1314-87.

ŞEKİLLER LİSTESİ

ŞEKİLLER

Şekil 1. G proteinlerinin özgünlüğünü tanımlayan α alt birimleri	18
Şekil 2. Heteromerik G proteinlerinin genel yapısı.....	19
Şekil 3. G protein etki mekanizması	20
Şekil 4. G protein aracılı sinyal yolunun düzenlenmesi.....	25
Şekil 5. GNB3 geni	26
Şekil 6. GNB3 altünitesini kodlayan gen bölgesi	26
Şekil 7. Hasta ve kontrol PZR ürünlerinin GNB3 geninin C825T polimorfizmini içeren RFLP sonucunun %2'lik jelde yürütülmesi ve UV ışık altında incelenmesi	34
Şekil 8. Hasta ve kontrol PZR ürünlerinin GNB3 geninin C1429T polimorfizmini içeren RFLP sonucunun %2'lik jelde yürütülmesi ve UV ışık altında incelenmesi	35

TABLolar

Tablo 1. Diyabetes Mellitusun etiyolojik sınıflaması	5
Tablo 2. Diyabetes Mellitusun komplikasyonları.....	6
Tablo 3. G protein alfa alt birimlerini kodlayan genler ve insan vücudundaki dağılımı	22
Tablo 4. G protein beta ve gama alt birimlerini kodlayan genler ve insan vücudundaki dağılımı.....	23
Tablo 5. Diyabetik nefropatili hasta ve kontrol gruplarındaki cinsiyet, aile öyküsü, alkol, sigara kullanımı ve risk oranları	37
Tablo 6. Diyabetik nefropatili hasta ve kontrol gruplarındaki yaş, VKİ, HDL, LDL, Hba1c ve risk oranları	37

Tablo 7. C825T gen polimorfizminin hasta ve kontrol gruplarına göre genotip dağılımı.... 38

Tablo 8. C1429T gen polimorfizminin hasta ve kontrol gruplarına göre genotip dağılımı.. 39

ÖZGEÇMİŞ

Canan KAHRİMAN

Doğum Tarihi: 16.05.1988

EĞİTİM:

1994-1999 Düzce, Uzunmustafa İlköğretim Okulu

1999-2002 Düzce, Uzunmustafa Ortaokulu

2002-2006 Düzce, Düzce Lisesi(Y.D.A)

2007-2012 Van, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Eğitim Fakültesi Fizik Bölümü

2012- Edirne, Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofizik Yüksek Lisansı

EKLER

Ek 1

T.C. TRAKYA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU Edirne, Türkiye

ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAY BAŞVURU BİLGİLERİ	PROTOKOL KODU	TÜTF-GOKAEK 201/23	
	PROTOKOL ADI	Tip II Diyabetli Hastalarda G Protein β3 C825T ve C1429T Gen Polimorfizminin Diyabetik Nefropati Gelişmesindeki Rolünün Araştırılması*	
	SORUMLU ARAŞTIRICI ÜN VAN I / ADI	Doç. Dr. Tammam SİPAHİ	
	ARAŞTIRMA MERKEZİ		
	DESTEKLEYİCİ		
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	Tek Merkez Ulusal	Çok Merkez Uluslararası
KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 03/13		Tarih: 05.02.2014
	Üniversitemiz Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Tammam SİPAHİ'nin sorumluluğunda yapılması planlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen Yüksek Lisans Öğrencisi Canan KAHRİMAN'ın tez çalışmasının araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, araştırmaya ilişkin giderlerin gönüllüye ve/veya bağlı bulunduğu sosyal güvenlik kurumuna ödetilmediği koşullarda gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel standartlar açısından sakınca bulunmadığına mevcudun oy birliği ile karar verilmiştir.		
ETİK KURUL BİLGİLERİ			
ÇALIŞMA ESASI	Helsinki Bildirgesi, İyi Klinik Uygulamalar Kılavuzu, TÜTF-GOKAEK Yönergesi		

ÜYELER

Ünvan/Ad/ Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki(*)	Katılım (**)	İmza
Prof. Dr. Ülfit VATANSEVER ÖZBEK Başkan	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	T.Ü.T.F Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları A.D.	K	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Esin KARLIKAYA Başkan Yardımcısı	Tıp Tarihi ve Etik	T.Ü.T.F. Tıp Tarihi ve Etik A.D.	K	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Ç. Hakan KARADAĞ Üye	Tıbbi Farmakoloji.	T.Ü.T.F. Tıbbi Farmakoloji A.D.	E	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. F. Nesrin TURAN Üye	Biyoistatistik	T.Ü.T.F. Biyoistatistik A.D.	K	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Hilmi TOZKIR Üye	Tıbbi Genetik	T.Ü.T.F. Tıbbi Genetik A.D.	E	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Hasan ÜMIT Üye	İç Hastalıkları	T.Ü.T.F. İç Hastalıkları A.D.	E	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Selma Arzu VARDAR Üye	Fizyoloji	T.Ü.T.F. Fizyoloji A.D.	K	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Sedat ÜSTÜNDAĞ Üye	İç Hastalıkları	T.Ü.T.F. İç Hastalıkları A.D.	E	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Burcu TOKUÇ Üye	Halk Sağlığı	T.Ü.T.F. Halk Sağlığı A.D.	K	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Koray ELTER Üye	Kadın Hastalıkları ve Doğum	T.Ü.T.F. Kadın Hastalıkları ve Doğum A.D.	E	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Rugül KOSE ÇINAR Üye	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	T.Ü.T.F. Ruh Sağ. ve Has. A.D.	K	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Recep YAĞIZ Üye	Kulak, Burun ve Boğaz Hastalıkları	T.Ü.T.F. K.B.B. Hast. A.D.	E	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Atakan SEZER Üye	Genel Cerrahi	T.Ü.T.F. Genel Cerrahi A.D.	E	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Berkan DEMİRAL Üye		T.Ü. İktisadi ve İdari Bilimler Fakültesi	E	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Avukat Baki KURNAZ Üye		T.Ü. Rektörlüğü	E	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	

*Araştırma ile ilişki
**Toplantıda Bulunma

Prof. Dr. Recep YAĞIZ
Dekan a.
Dekan Yardımcısı