

T.C.

**GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**XBP-1S (SPliced FORM OF X-BOX BINDING
PROTEIN-1) PROTEİNİNİN TSC (TUBEROUS
SCLEROSIS COMPLEX) EKSİKLİĞİNDE İNSÜLİN
HASSASİYETİNİN DÜZENLENMESİNDEKİ ROLÜ**

Murat DOĞRU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

GEBZE

2008

**T.C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**XBP-1S (SPliced FORM OF X-BOX BINDING
PROTEIN-1) PROTEİNİNİN TSC (TUBEROUS
SCLEROSIS COMPLEX) EKSİKLİĞİNDE İNSÜLİN
HASSASİYETİNİN DÜZENLENMESİNDEKİ ROLÜ**

**Murat DOĞRU
YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI
Yrd. Doç. Dr. Nil SAYDAN**

GEBZE

2008



**GEBZE YÜKSEK
TEKNOLOJİ
ENSTİTÜSÜ**

**MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
JÜRİ ONAY FORMU**

JÜRİ

ÜYE (DANIŞMAN) : Yrd.. Doç. Dr. Nil SAYDAN

ÜYE : Yrd.. Doç. Dr. Nagehan ERSOY

ÜYE : Yrd.. Doç. Dr. Can M. ERİŞTİ

Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 23/06/2008 tarih ve 2008/22 sayılı kararı ile yukarıdaki öğretim elemanlarından oluşmuş jüri tarafından düzenlenen 17/07/2008 tarihli Tez Savunma Tutanağı neticesinde Yüksek Lisans / ~~Doktora~~ öğrencisi Murat DOĞRU'nun çalışması GYTE Mühendislik ve Fen Bilimleri Yönetim Kurulu/...../..... tarih ve/..../..... sayılı kararıylaBiyoloji.....Anabilim Dalında Yüksek Lisans / ~~Doktora~~ tezi olarak onaylanmıştır.

İMZA/MÜHÜR

ÖZET

TEZ BAŞLIĞI: XBP-1s (spliced form of X-box binding protein-1) proteininin TSC (Tuberous sclerosis complex) eksikliğinde insülin hassasiyetinin düzenlenmesindeki rolü

YAZAR ADI : Murat DOĞRU

İnsülin hassasiyetinin azalması, yani insülin direnci, Türkiye’de ve dünyada insan sağlığını tehdit eden obezite ve tip 2 diyabet gibi birçok metabolik bozukluğun altında yatan en önemli nedenlerden biridir. Beyin, böbrek ve deri gibi çeşitli organlarda selim tümörlere neden olan, otozomal dominant kalıtmıli tuberoz sklerozis (TSC) hastalığında da birçok metabolik bozukluk ve insülin direnci görülür. Metabolik bozukluklar ile insülin direnci arasındaki moleküler köprü ER yoluyla kurulmuştur. ER, protein modifikasyonlarının ve lipit sentezinin gerçekleştiği önemli bir organeldir. Proteinlerin aşırı sentezi, mutant protein üretimi ve lipit metabolizmasındaki bozukluklar gibi nedenlerle ER’un işlevinin bozulması “ER stresi” ile sonuçlanır ve insülin direnci gelişimine neden olur. ER stresi, “katlanmamış protein cevabı (UPR-unfolded protein response)” olarak adlandırılan sinyal yolunu aktive eder. UPR aktivasyonu sonucunda, ER homeostazisinin düzenlenmesinde çok önemli rolü olan bir transkripsiyon faktörü XBP-1s sentezlenir. XBP-1s, ER’un katlama kapasitesini, lümen hacmini ve “ER ile ilişkili protein yıkımı (ERAD-ER associated degradation)”nı artırır ve böylece insülin hassasiyetinin artmasını sağlar. Tuberoz sklerozis genlerinin (*TSC1* veya *TSC2*) eksikliğinde, hücre büyümesini kontrol eden mTOR sinyal yolu aktive olur. mTOR’un kalıcı aktivasyonu aşırı protein sentezine neden olur. Bunun sonucunda ER stresi gelişir ve insülin direnci oluşur.

Tez çalışmasında, XBP-1s’nin aşırı ekspresyonunun, TSC2-/- MEF hücrelerinde gelişen insülin hassasiyetindeki azalmayı tersine çevirip çeviremeyeceği araştırıldı. Bu amaçla, insülin sinyal iletiminde rol oynayan IR, IRS1 ve IRS2 proteinlerinin tirozin fosforilasyonlarındaki değişimlere bakıldı. Yapılan deneyler sonucunda IRS1’in fosforilasyonunda anlamlı bir artış olduğu gösterildi. IR’nin fosforilasyonunda, IRS1’e oranla daha az bir artış gözlenirken, IRS2 fosforilasyonunda değişim olmadığı bulundu. XBP-1s’in etkisini mTOR’u baskılayarak gösterip göstermediğini görmek amacı ile aynı hücrelerde bir mTOR sinyal yolu proteini olan S6 proteininin fosforilasyonuna bakıldı. Yapılan deney sonucunda S6 fosforilasyonunda değişim olmadığı gösterildi.

SUMMARY

THESIS TITLE: The role of XBP-1s (spliced form of X-box binding protein) in regulation of insulin sensitivity in TSC (tuberous sclerosis complex) deficiency

AUTHOR : Murat DOĞRU

Decrease in insulin sensitivity, insulin resistance development, is the major cause of various metabolic disorders, such as obesity and type 2 diabetes, that severely threaten human health in Turkey and all over the world. Tuberous sclerosis, which is inherited in an autosomal dominant manner and characterized by benign tumors in various organs such as brain, kidney and skin, also manifests various metabolic complications and insulin resistance. The molecular link between metabolic disorders and insulin resistance is established by ER, which plays crucial roles in protein modifications and lipid biosynthesis. Perturbations of ER function by excess protein synthesis, increased mutant protein load and defects in lipid metabolism result in ER stress and insulin resistance development. ER stress activates a complex signaling pathway called “unfolded protein response-UPR”. UPR activation results in the synthesis of XBP-1s, a major protein in the regulation of ER homeostasis. XBP-1s increases ER protein folding capacity, lumen size and ER associated degradation (ERAD) and hence, increases insulin sensitivity. Loss of tuberous sclerosis genes (*TSC1* or *TSC2*) results in the activation of mTOR pathway, which regulates cellular growth. Constitutive activation of mTOR causes excess protein folding demand on ER and results in ER stress and insulin resistance development.

In this study, to examine whether overexpression of XBP-1s in *TSC2*^{-/-} MEF cells would correct decreased insulin sensitivity, tyrosine phosphorylation levels of insulin signaling pathway elements IR, IRS1 and IRS2 proteins were investigated. It was shown that overexpression of XBP-1s significantly increased IRS1 phosphorylation, slightly increased IR phosphorylation and had no effect on IRS2 phosphorylation levels. To examine whether XBP-1s shows its effect by inhibiting mTOR activation, the phosphorylation level of an mTOR pathway protein, S6, was investigated. It was shown that XBP-1s overexpression did not alter S6 phosphorylation level.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince bana danışmanlık yapan, destekleri ile sürekli yanımda olan Yrd. Doç. Dr. Nil Saydan'a, yaptığım deneylerde bana rehberlik eden ve desteklerini esirgemeyen Dr. Lale Özcan'a, Dr. Ayşe Seda Ergin'e, Dr. Ruijun Hahn'a teşekkürlerimi sunarım.

Başta ailem olmak üzere, manevi destekleri ile sürekli yanımda olduklarını hissettiğim Dr. Nezih Hekim'e, Prof. Dr. Füsün Gümüşel'e ve tüm arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunmaktan mutluluk duyarım.

Bu çalışma, Harvard Üniversitesi, Harvard Tıp Fakültesi, Boston Çocuk Hastanesi'nin Endokrinoloji Bölümü'nde, Dr. Umut Özcan'ın laboratuvarında yapılmıştır.

Bu çalışma TÜBİTAK-BİDEB'in destekleri ile yapılmıştır.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	iv
SUMMARY	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
1.1. İnsülin Direnci (İnsülin Hassasiyetinin Azalması)	5
1.1.1. İnsülin Direnci, Obezite ve Tip 2 Diyabet	10
1.2. İnsülin Sinyal İletimi	11
1.2.1. IR ve IRS Aktivasyonu	12
1.2.2. PI3K Aktivasyonu	13
1.2.3. Akt/PKB Aktivasyonu	14
1.2.4. aPKC Aktivasyonu	16
1.2.5. Ras-MAPK Aktivasyonu	16
1.3. İnsülin Direncine Neden Olan Moleküler Mekanizmalar	17
1.3.1. İnsülin Sinyal Elemanlarının Knock-out Edilmesi Çalışmaları	17
1.3.2. İnsülin Sinyal Elemanlarının Negatif Düzenlenimi	20
1.4. Endoplazmik Retikulum (ER) Stresi ve UPR Sinyal Yolu	21
1.4.1. ER'da Protein Katlanması	23
1.4.2. UPR Sinyal İletimi	24

1.4.2.1. PERK Aktivasyonu	26
1.4.2.2. ATF-6 Aktivasyonu	26
1.4.2.3. IRE-1 Aktivasyonu	28
1.5. ER stresi ile İlişkili Patolojik Durumlar	29
1.5.1. Viral Enfeksiyonlar	29
1.5.2. Genetik Hastalıklar	30
1.5.2.1. İnsülin Direnci Sendromu	31
1.6. Tuberoz Sklerozis Kompleksi(TSC)	32
1.6.1. TSC Protein Kompleksinin Düzenlenmesi	33
1.7. TSC Tarafından Düzenlenen mTOR Protein Kompleksi	37
1.7.1. mTOR Sinyal Yolunun Düzenlenmesi	38
1.7.2. mTOR Sinyal Yolu	40
1.8. TSC Eksikliği, İnsülin Direnci ve ER Stresi: Konu ile İlgili Çalışmalar	44
2. MATERYAL ve YÖNTEM	51
2.1. Materyal	51
2.1.1. Kullanılan Biyokimyasal Maddeler	51
2.1.2. Kullanılan Kimyasal Solüsyonlar	51
2.1.3. Kullanılan Cihazlar ve Diğer Malzemeler	52
2.2. Yöntem	53
2.2.1. Hücre Kültürü	53
2.2.1.1. Alt Kültürleme	54
2.2.1.2. XBP-1s ve Kontrol Adenovirus Enfeksiyonu	55
2.2.1.3. İnsülin Uyarımı	55

2.2.2. Protein Ekstraksiyonu, İmmünopresipitasyon, Western Blotlama	56
2.2.2.1. Protein Ekstraksiyonu ve Miktar Tayini	56
2.2.2.2. İmmünopresipitasyon	56
2.2.2.3. Western Blotlama: SDS-PAGE	57
2.2.2.4. Western Blotlama: Membrana Transfer ve Sonuç Görüntüleme	58
2.2.2.5. Membran Arındırma	59
3. BULGULAR	60
3.1. TSC2 ^{-/-} MEF Hücrelerinin ve XBP-1s Aşırı Ekspresyonunun Kontrolü	60
3.2. TSC2 ^{-/-} MEF Hücrelerinde ER Stresi Kontrolü	61
3.3. IRS1 Tirozin Fosforilasyonu	61
3.4. IR Tirozin Fosforilasyonu	63
3.5. IRS2 Tirozin Fosforilasyonu	64
3.6. p70 S6 Fosforilasyonu	65
4. TARTIŞMA ve SONUÇ	66
5. KAYNAKLAR	70
ÖZGEÇMİŞ	76

KISALTMALAR DİZİNİ

-A-

ACC: Acetyl coenzyme-A carboxylase

AMPK: Adenosine mono phosphate induced kinase

aPKC: atypical protein kinase C

AS160: 160 kDa protein of Akt substrat

ATF-6: Activating transcription factor-6

ATP: Adenozin tri phosphate

-B-

BAT: Brown adipose tissue

-C-

Ca²⁺: Calcium ion

CFTR: cystic fibrosis transmembrane conductance regulator

CLIP-170: Cytoplasmic linker protein-170

-D-

DNA: Deoxiribonucleic acid

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

-E-

EDTA: Ethylene diamine tetraacetic acid

EGTA: Ethylene glycole tetraacetic acid

ER: Endoplasmic reticulum

ERAD: Endoplasmic reticulum associated degredation

ERSE: Endoplasmic reticulum stress element

4E-BP1: eIF4E (eukaryotic initiation factor 4E)-binding protein 1

eEF2: eukaryotic Elongation Factor-2

-F-

FAS: Fatty acid synthase

FFA: Free fatty acid

FIRKO: Fat specific insulin receptor knock-out

FKBP12: FK506 binding protein of 12 kDa

FOXO: Forkhead transcription factor O

FRAP: FKBP12-rapamycin associated protein

-G-

Gab-1: Grb2 associated binder-1

GADD34: Growth arrest and DNA damage induced gene 34 protein

GAP: GTPase Activating Protein

GEF: Guanine Nucleotide Exchange Factor

GLUT-4: Glucose transporter-4

GSK3: Glycogen synthase kinase 3

GTP: Guanosine triphosphate

G6P: Glucose-6-phosphatase

G β L: G protein beta subunit-like protein

-H-

HFD: High Fat Diet

HIF-1 α : Hypoxia inducible factor-1 alpha

HRP: Horse Radish Peroxidase

-I-

IFN- γ : Interferon-gamma

IGF-1: Insulin like growth factor

IGF-1R: Insulin like growth factor receptor

IKK: Inhibitor of κ (kappa) B kinase

IR: Insulin receptor

IRE-1: Inositol requiring enzyme-1

IRS: Insulin receptor substrate

-J-

JNK: c-Jun N-terminal kinase

-K-

K⁺: Potassium ion

-L-

LIRKO: Liver specific insulin receptor knock-out

-M-

MAPK/ERK: Mytogen activated protein kinase

MEF: Mouse embryonic fibroblast

MIRKO: Muscle specific insulin receptor knock-out

mAVO: mammalian protein Adheres voraciously to TOR2

mLST8: mammalian protein Lethal with sec-thirteen 8

mSIN: mammalian Sty 1 interactor

mTOR: mammalian Target of rapamycin

mTORC: mammalian Target of rapamycin complex

-N-

NAFL: Non-alcoholic fatty liver disease

NFκB: Nuclear factor kappa B

-P-

PDK: Phosphoinositid dependent kinase

PEPCK: Phosphoenol pyruvate carboxykinase

PERK: PKR (RNA-dependent protein kinase)-related ER kinase

PH: Plecstrin homology domain

PIKK: Phosphatidylinositol kinase-related kinase

PIP₃: Phospho inositol (3, 4, 5) phosphate

PI3K: Phosphoinositol 3 kinase

PKB: Protein kinase B

PKC: Protein kinase C

PMSF: Phenylmethylsulphonyl fluoride

p(N): (N) kDa protein

PPAR: Peroxisome proliferator activated receptor

PTB: Phospho tyrosin binding domain

PTEN: Phosphatase and tensin homologue

PTP1B: Phospho tyrosin phosphatase 1B

-R-

RAFT: Rapamycin and FKBP12 target

RAPT: Rapamycin target

REDD-1: DNA damage inducible transcript 4 protein

RSK: p90 ribosomal S6 kinase

-S-

SDS: Sodium dodecyl sulfate

SH: Src homology domain

Shc: SH containing protein

SHIP-2: SH2 containing inositol 5'-phosphatase 2

siRNA: small interference Ribonucleic acid

SOCS: Suppressor of cytokine signalling

SREBP: Sterol regulated binding protein

STAT3: Signal Transducer and Activator of Transcription 3

S6K: 70 kDa ribosomal protein S6 kinase

-T-

TBS: Tris buffered saline

TBS-T: Tris buffered saline-tween 20

TNF: Tumor necrosis factor

TOR: Target of rapamycin

TRAF2: TNF-alpha receptor associated factor

5' TOP: 5' Tract of pyrimidines

TSC: Tuberous sclerosis complex

-U-

UPR: Unfolded protein response

UPRE: Unfolded protein response element

-V-

VLDL: Very low density lipoprotein

-W-

WAT: White adipose tissue

-X-

XBP-1: X-box binding protein-1

XBP-1s: spliced form of X-box binding protein

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. İnsülinin metabolik etkileri	6
1.2. Doku spesifik insülin reseptör knock-out çalışmaları sonucunda gözlenen fenotipler	9
1.3. İnsülin sinyal iletimi	12
1.4. İnsülin sinyal yolu elemanlarının knock-out çalışmaları	19
1.5. ER stresi ve katlanmamış protein cevabı UPR	23
1.6. UPR sinyal iletimi	25
1.7. IRE-1, PERK ve ATF-6'nın primer yapıları	27
1.8. TSC1 ve TSC2 tümör baskılayıcıların primer yapıları	34
1.9. TSC1/2'yi kontrol altında tutan mekanizmalar	35
1.10. mTOR'un primer yapısı	37
1.11. mTORC1 sinyal yolu	41
1.12. TSC1 ^{-/-} ve TSC2 ^{-/-} MEF hücrelerinde PERK fosforilasyonu	46
1.13. TSC2 ^{+/-} farelerde gelişen hemanjiyom ve böbrek adenomlarında ER stresi	47
1.14. TSC1 ^{-/-} ve TSC2 ^{-/-} MEF hücrelerinde insülin direnci gelişiminde UPR'nin rolü	48
1.15. XBP-1 ^{+/-} farelerde ER stresi ve insülin sinyal iletimi.	49
2.1. Deney düzeni ve uygulanan yöntemler	53
3.1. TSC2 ve XBP-1s blotları	60
3.2. TSC2 ^{-/-} MEF hücrelerinde PERK fosforilasyonu	61
3.3. TSC2 ^{-/-} MEF hücrelerinde IRS1 tirozin fosforilasyonu	61
3.4. TSC2 ^{-/-} MEF hücrelerinde IRS1 tirozin fosforilasyonu	62
3.5. TSC2 ^{-/-} MEF hücrelerinde IR tirozin fosforilasyonu	63
3.6. TSC2 ^{-/-} MEF hücrelerinde IRS2 tirozin fosforilasyonu	64
3.7. TSC2 ^{-/-} MEF hücrelerinde ribozomal protein S6 ^{Ser235/236} fosforilasyonu	65
4.1. TSC eksikliği, ER stresi ve insülin direnci	68

1. GİRİŞ

İnsülin sinyal iletimi, birçok farklı organizmada besin metabolizmasını büyüme, gelişme ve üreme fonksiyonlarına entegre eden, evrimsel olarak korunmuş bir mekanizma olarak görev yapar. Hücresel düzeyde, insülin sinyal iletimi, karbohidrat ve lipit metabolizmasını, gen transkripsiyonunu, DNA sentezini, anti-apoptotik yolları ve hücre proliferasyonunu düzenler [1].

Hedef hücrelerin kan dolaşımındaki normal insülin seviyelerine cevap verememeleri, yani insüline karşı duyarsızlaşmaları durumuna “insülin direnci” denilir. İnsülin direnci gelişimi, insülinin normal glukoz ve lipit homeostazisini sağlayamaması ile sonuçlanır. İnsülin hassasiyetinde azalmalar normal yaşam süresi içinde puberte, hamilelik ve yaşlılık gibi bazı evrelerde de görülmektedir. Bu evrelerde düzenli fiziksel aktivite ve karbohidrat alımı insülin hassasiyetinin artmasını sağlar. İnsülin direncine eşlik eden obezite, dislipidemi, glukoz intolerans, hipertansiyon gibi metabolik bozukluklar tip 2 diyabet, kardiyovaskular hastalıklar, kanser, polikistik over hastalığı, nörodejeneratif hastalıklar ve alkolik olmayan yağlı karaciğer hastalıklarının (NAFL) gelişimine neden olur [1-4].

Türkiye’de ve dünyada insülin direnci ile ilişkili hastalıklar, insan sağlığını ciddi şekilde tehdit etmektedirler. Bu nedenle, hedef hücrelerin neden insüline karşı hassasiyetleri azalmakta ve insülin direnci gelişmekte sorusuna yanıt verebilmek büyük bir önem taşımaktadır. Bilindiği gibi, insülin direncinin görüldüğü en önemli hastalıklardan biri obezitedir. Diyabet öncesi insülin direnci gelişimi aşırı kilo alımı ile ilişkilendirilmiştir ve tip 2 diyabetli hastaların %80’i obezdir [5, 6].

Obezite hastalarında, aşırı yağ birikimi sonucu bozulan adiposit metabolizması nedeni ile kana salınan serbest yağ asitleri (FFA) ve adipokinler, örneğin TNF- α , perifer dokularda ve adipoz dokuda insülin direncine neden olur. Pankreatik β -hücrelerinde insülin direnci gelişimi ve kandaki glukoz dengesini düzenleyen kas ve karaciğer’de gelişen insülin direnci, tip 2 diyabetin en önemli nedenidir [1, 3, 4].

İnsülin varlığında, hedef hücrelerin yüzeyinde sergilenen, reseptör tirozin kinaz protein ailesinin bir alt grubunun üyesi olan, tetramer yapıdaki insülin/insülin benzeri büyüme faktörü reseptörü (IR/IGF-1R) oligomerize olur. Oligomerizasyon sonucu, reseptörün sitoplazmik tirozin kinaz alt birimi tirozin bakiyelerinden otofosforile olarak aktive olur. İnsülin reseptör substratları (IRS1, IRS2, IRS3, IRS4, IRS5/DOK4, IRS6/DOK5), reseptörün fosforile olan tirozin bakiyelerinde toplanırlar ve tirozin bakiyelerinden fosforile olarak hücre içine insülin sinyalini iletirler. Bu fosforilasyonlar, aşağı [downstream] sinyal elemanlarını aktive ederek hücrenin insülin uyarımına uygun cevap oluşturmasını sağlar. Aşağı sinyal yolları birkaç kola ayrılır. Bunlardan biri ve insülinin metabolik uyarılarının en önemli ileticisi PI3K-Akt/PKB sinyal yolu, diğeri hücre büyümesi, proliferasyonu ve farklılaşmasından sorumlu ve PI3K yolu ile birlikte çalışan genlerin ekspresyonunu düzenleyen Ras-MAPK sinyal yoludur. İnsülin direnci, sinyal yollarının tamamını inaktif eden IRS serin/treonin fosforilasyonları veya IRS protein miktarının azalması (downregulation) veya sinyal yollarını kısmen inaktif eden diğer sinyal elemanlarının inhibisyonu yolu ile oluşur [1-4, 8].

İnsülin direnci gelişiminin altında yatan moleküler mekanizmaların aydınlatılmasında çok yol kat edilmiştir. Adipoz dokudan salgılanan FFA'ların ve TNF- α gibi inflamatuvar sitokinlerin, hedef hücrelerde inflamatuvar stres sinyal yollarını, örneğin JNK'1, aktive ettiği ve aktive olan sinyal yollarının insülin sinyal iletimini engelleyerek hücrenin insüline cevap vermesini engelledikleri yapılan birçok çalışmada gösterilmiştir. Fakat bu çalışmalar, metabolik stres durumunda JNK'in nasıl aktive olduğunu açıklamamıştır [6, 7].

Son yıllarda yapılan bir çalışma obeziteyi JNK aktivasyonuna bağlayan köprünün ER olduğunu göstermiştir [9]. ER, yeni sentezlenen proteinlerin katlanmasının, modifikasyonlarının ve lipid metabolizmasının yürütüldüğü özelleşmiş bir çevre oluşturan membranla çevrili, ağısı bir hücre içi organeldir. ER üzerinde artan metabolik talep, organelin işlevini yerine getirememesine neden olur. İnfeksiyon, hipoksi, kimyasal toksinlere maruz kalma, aşırı lipid birikimi ve besin yetmezliği ve çeşitli genetik bozukluklar gibi biyolojik koşullar ER homeostazisini bozabilir ve katlanmamış yada yanlış katlanmış proteinlerin ER lümeninde birikmesine, dolayısı ile ER stresine neden olabilir. ER stresini azaltmak için katlanmamış protein cevabı (unfolded protein

response-UPR) denilen, protein sentezini yavaşlatan ve protein yıkımını artıran bir sinyal yolu aktive edilir [6, 9].

Aktive olan UPR, ER membran proteinleri PERK, IRE-1 ve ATF-6 yolu ile stres cevabı oluşturur. ER stresinin birincil cevabı, PERK aktivasyonu yolu ile 4E-BP1 proteinini fosforilleyerek global protein translasyon inhibisyonudur. IRE-1, JNK'ı aktive ederek hücrenin insülin ile uyarılmasını, IRS'ını serin/treonin bakiyelerinden fosforile ederek bloke eder. Nükleusa transloke olan ATF-6 transkripsiyon faktörü, XBP-1s transkripsiyon faktörünün ekspresyonunu sağlar. XBP-1s, ERSE (endoplasmic reticulum stress element) ve UPRE (unfolded protein response element) DNA bölgelerini içeren genlere bağlanarak ER genişlemesinde, katlama kapasitesinin artmasında ve ER ilişkili yıkım yolunun aktivasyonunda rol alan genlerin transkripsiyonunu uyarır ve ER'un üzerine binen talep yükünün karşılanmasını sağlar. Böylece ER üzerine binen yük azalır ve ER homeostazisi korunmuş olur [10-13]. ER stresinin azalması, insülin direnci gelişimini engeller ve insülin hassasiyetini artırır. Bunun sonucunda, obezite ve tip 2 diyabet hastaları metabolik iyileşme gösterirler. Yapılan çalışmalar, XBP-1s'nin ER stresi azaltmada çok önemli bir rol üstlendiğini göstermiştir. Karaciğer kültür hücrelerinde XBP-1s'nin aşırı ekspresyonu JNK aktivasyonunu ve dolayısı ile insülin direncini azaltmıştır. Ayrıca diyet-teşvikli diyabet gelişimine dirençli XBP-1 heterozigot fareler, karaciğer dokusunda artan JNK aktivasyonu ve insülin direnci göstermişlerdir [9].

ER stresine neden olan durumlar arasında mutant protein üretimine veya aşırı protein sentezine neden olan genetik bozukluklar önemli bir yer tutar. Örneğin, otozomal resesif geçişli genetik bir hastalık kistik fibroz, CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) genindeki bir mutasyon nedeni ile yanlış katlanması sonucunda ER stresi görülür ve mutant protein ERAD yoluyla yıkıma gider. Otozomal dominant geçişli Huntington hastalığı, huntingtin proteinindeki poliglutamin tekrarlarındaki mutasyon sonucu, ERAD yoluyla yıkılamaz ve ER stresi uyarılır ve hücreler apoptoz yolu ile ölür [10, 12].

Tuberoz sklerozis, otozomal dominant geçişli, beyin ve böbrek gibi çeşitli organlarda selim tümörlerle karakterize, genetik bir hastalıktır. Hastalık, tümör baskılayıcı olan tuberoz sklerozis kompleksi genlerinin (TSC1 ve TSC2) herhangi birinin kaybı ile görülür [15-18]. TSC

hastalarında birçok metabolik bozukluk görülür. Görülen metabolik bozuklukların nedeni, TSC hastalarında gelişen insülin direncidir [15]. Obezite ve tip 2 diyabet hastalarında olduğu gibi, TSC hastalarında görülen insülin direnci, ER stresi ile ilişkilidir [18].

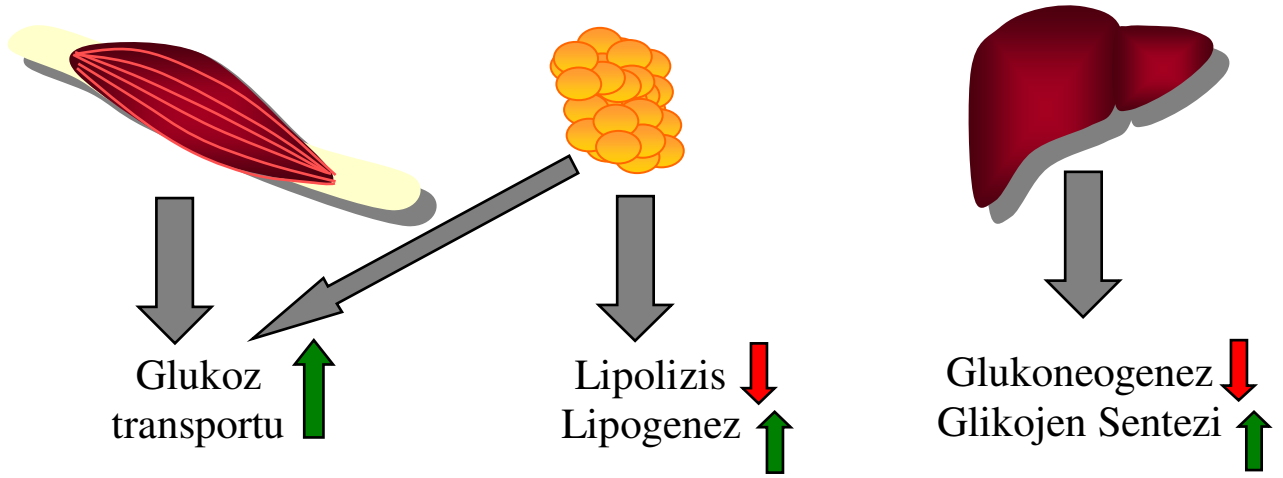
ER stresi, aşırı protein sentezi ve protein katlanma talebinin artması nedeni ile oluşur ve bunun sonucunda UPR sinyal yolu aktive olur. TSC1 ve TSC2 bir protein kompleksi halinde birlikte hareket ederek, hücre büyümesi, proliferasyonu ve farklılaşmasının düzenleyicisi olan, dış oramdaki besin miktarına bağlı sinyallere cevap olarak protein sentezini, ribozom biyogenezini, hücre iskeletini ve otofajiyi kontrol eden mTOR protein kompleksinin aktivasyonunu kontrol altında tutar. TSC genlerinin herhangi birinin kaybı, mTOR'un kalıcı aktivasyonu ile sonuçlanır ve hücrede aşırı protein sentezi başlar. Aşırı protein sentezi ile birlikte ER'a binen aşırı yük, ER stresini ve UPR'yi aktive ederek insülin hassasiyetinde azalmaya neden olur [15-18].

1.1. İnsülin Direnci (İnsülin Hassasiyetinin Azalması)

İnsülin, besinlerin sindirimi ve emilimi sonrasında yükselen kan glukoz seviyesine cevap olarak, pankreastan salınan bir anabolik ve lipojenik hormondur. Belirli amino asitler, özellikle arjinin ve lözin, FFA'lar ve steroid hormonlar da insülin salınımında etkilidir. Pankreatik β -hücrelerinden insülin salınımı şu sıra ile gerçekleşir:

Besin alımı \rightarrow Kanda glukoz yükselmesi \rightarrow β -hücrelerine glukoz alımı \rightarrow Glukoz oksidasyonu \rightarrow sitozolik ATP artışı \rightarrow ATP-kapılı K^+ kanallarının kapanması \rightarrow Hücre depolarizasyonu \rightarrow Voltaj kapılı Ca^{2+} kanallarının açılması \rightarrow Hücre içi Ca^{2+} konsantrasyonunun artması \rightarrow İnsülin veziküllerinin ekzositozu [19].

İnsülin glukozun depo edilmesini uyarır. Karaciğerde glikoliz'i ve glikojenez'i uyarır iken glukoz yapımı yolu glukoneojenezi ve kana glukoz salınımını engeller. Lipogenez yolunu aktive eder ve oluşan trigliseritleri VLDL kompleksler halinde kana salar ve adipoz dokunun glukozu yağ olarak depolamasını uyarır ve adipositlerde lipolizisi baskılar. İnsülin, kas hücrelerinde GLUT-4 glukoz transport proteininin hücre yüzeyinde artmasını uyararak kas hücrelerinin kandaki glukozu hücre içine almalarını sağlar (Şekil 1.1) [1-4, 19, 23].



Şekil 1.1. İnsülinin karaciğer, adipoz ve kas dokularındaki metabolik etkileri. İnsülin Karaciğerde glukoz üretimini baskılar, glikojen sentezini artırır ve kana glukoz salınımını azaltır. Adipoz dokuda glukoz alımını artırır, lipit kullanımını baskılayarak glukoz kullanımını tetikler. Glukozun lipitlere dönüşümünü, lipogenezi aktive eder. Kaslarda hücre içine glukoz transportunu artırır.

Hedef hücrelerin kan dolaşımındaki normal insülin seviyelerine cevap verememeleri, yani insüline karşı duyarsızlaşmaları durumuna “insülin direnci” denilir. İnsülin direnci gelişimi, insülinin normal glukoz ve lipit homeostazisini sağlayamaması ile sonuçlanır. İnsülin hassasiyetinde azalmalar normal yaşam süresi içinde puberte, hamilelik ve yaşlılık gibi bazı evrelerde de görülmektedir. Bu evrelerde düzenli fiziksel aktivite ve karbohidrat alımı insülin hassasiyetinin artmasını sağlar. İnsülin direncine eşlik eden obezite, dislipidemi, glukoz intolerans, hipertansiyon gibi metabolik bozukluklar tip 2 diyabet, kardiyovaskular hastalıklar, kanser, polikistik over hastalığı, nörodejeneratif hastalıklar, alkolik olmayan yağlı karaciğer hastalıklarının (NAFL) gelişimine neden olur [1-4].

Türkiye’de ve dünyada insülin direnci ile ilişkili hastalıklar, insan sağlığını ciddi şekilde tehdit etmektedirler. Bu nedenle, hedef hücrelerin neden insüline karşı hassasiyetleri azalmakta ve insülin direnci gelişmekte sorusuna yanıt verebilmek büyük bir önem taşımaktadır. Bilindiği gibi, insülin direncinin görüldüğü en önemli hastalıklardan biri obezitedir. Diyabet öncesi insülin direnci gelişimi aşırı kilo alımı ile ilişkilendirilmiştir ve tip 2 diyabetli hastaların %80’i obezdir [5,

6]. İnsülin direnci ile birlikte görülen hiperglisemi, hiperinsülinemi, dislipidemi, glukoz intolerans, hipertansiyon, obezite ve bu metabolik bozukluklar nedeni ile gelişen tip 2 diyabet, kardiyovaskular hastalıklar, kanser, polikistik over hastalığı gibi hastalıklar kümesi “insülin direnci sendromu (metabolik sendrom, sendrom X)” olarak adlandırılmaktadır [2, 3].

İnsülin direnci sonucunda ortaya çıkan fenotip, etkilenen doku tipine bağlı olarak değişir. İnsülin direncine eşlik eden hiperinsülinemi, her organda farklı sonuçlar doğurur. İnsülinin hedefi olan her organ insüline dirençli olmayabilir. Bu durumda, örneğin karaciğer insüline direnç gösterirken glukoz sentezine ve kana glukoz salımına devam edeceği için hiperglisemi, glukoz intolerans gözlenecek, böbrekler insülin direnci göstermedikleri için aşırı sodyum geri emilimi ve hipertansiyona neden olacaktır [2].

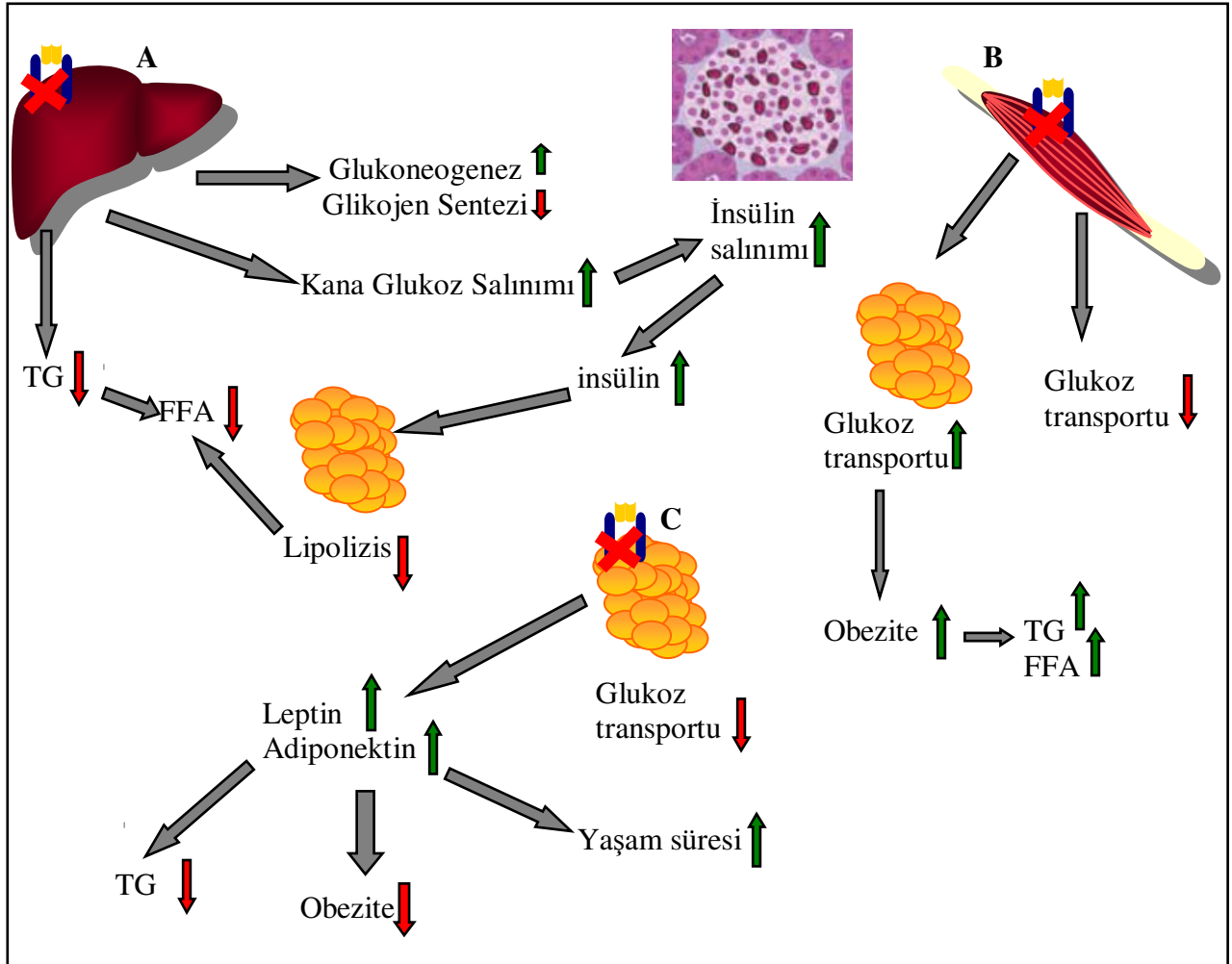
Son yıllarda yapılan doku spesifik insülin reseptör knock-out çalışmaları, bazı organlarda insülin sinyali normal akışına devam ederken, diğerlerinde edemediği için insülin direnci sendromlu hastalarda görülen farklı fenotiplerin açıklanmasına yardımcı olmuşlardır [1-4].

Karaciğer spesifik insülin reseptör knock-out (LIRKO) fare modeli çalışmada, diğer organlar normal insülin seviyelerine normal cevap oluştururken, karaciğer insüline karşı direnç göstermektedir. LIRKO farelerde açlık kan şekeri seviyesi yüksek seyretmektedir. İnsülinin karaciğerden glukoz salınımını inhibe edememesinden kaynaklanan bu duruma, glukoneogenez için gerekli iki ana enzimin, fosfoenolpiruvat karboksikinaz (PEPCK) ve glukoz-6-fosfataz (G6P) enzimlerinin sentezindeki artış eşlik etmektedir. Hepatik insülin direnci, bir süre sonra perifer dokularda da insülin direncine neden olmaktadır. İnsülinin etkisi ile perifer dokularda lipolizisin baskılanması ve karaciğerde trigliserid (TG) üretimini ve salınımını uyaramaması sonucunda kanda TG ve FFA seviyesi azalmaktadır (Şekil 1.2 A) [2, 21, 22, 23].

Kas dokusu, oral yolla alınan glukozun %70-80'inin kandan emiliminde rol oynar. Kas hücrelerinde görülen insülin direnci tip 2 diyabet gelişimindeki erken defektlerden biridir. Kas hücrelerine spesifik insülin reseptör knock-out (MIRKO) fare modelleri ile farelerde kas insülin direnci oluşturulmuştur. Kas dokusunda insülin direnci görülmesine rağmen, MIRKO farelerin kan glukoz seviyeleri ve glukoz tolerans test sonuçları normaldir. İlginç olarak, MIRKO farelerin

adipositlerinde *in vivo* 3 katına çıkan glukoz alımı, *in vitro* ortamda kontrol farelerin adipositlerine göre fark göstermemektedir. Bu durum, MIRKO farelerin kaslarından salınan bilinmeyen bir faktörün, adipositlerin kandan glukoz alımını artırdığını düşündürmüştür. MIRKO farelerde serum TG ve FFA seviyelerinin yükseldiği, adipoz dokunun arttığı ve obezite geliştiği gözlenmiştir (Şekil 1.2 B) [2, 24, 25].

Adipoz dokunun insülin direncinde oluşturacağı fenotipi araştırmak için kurulan yağ dokusu insülin reseptör knock-out (FIRKO) fare modelinde ilginç olarak insülin hassasiyetinde, glukoz ve lipit metabolizmasında iyileşme gösterilmiştir. *In vivo* iyileşmelere rağmen, FIRKO farelerden izole edilen adipositlerde insülin direnci, glukoz ve lipit metabolizmasında bozukluklar gösterilmiştir. Normal farelerin adipositleri homojen dağılım gösterirken FIRKO farelerde adipositler biri küçük, diğeri büyük olmak üzere iki hücre grubu olarak heterojenik dağılım göstermiştir. Her iki hücre grubunda insülin direncine bağlı metabolik bozukluklar gözlenmiştir. Fakat her iki hücre grubunda da, inflamasyonun ve insülin direnci oluşumunun önemli araçları IFN- γ ve TNF- α salınımı azalmış, aksine insülin hassasiyetini artıran en önemli iki aracı leptin ve adiponektin salınımı artmıştır. Kontrol fareleriyle aynı miktarda besin almalarına rağmen FIRKO farelerin beyaz ve kahverengi adipoz dokularında (sırasıyla WAT ve BAT) %50 azalma ve %25 kilo kaybı gözlenmiştir (Şekil 1.2 C) [2, 26, 27].



Şekil 1.2. Doku spesifik insülin reseptör knock-out çalışmaları sonucunda gözlenen fenotipler. A) LIRKO farelerde glukoneogenez ve kana glukoz salınımı artar, glikojen sentezi ve kana TG salınımı azalır. Hepatik glukoz salınımının artması pankreas β hücrelerinden insülin salınımını artırır ve hiperinsülinemi oluşur. İnsülin adipoz dokuda lipolizisi baskılar ve kana FFA salınımı azalır. B) MIRKO farelerde kas hücrelerinde glukoz transportu azalır fakat adipositlerde glukoz transportu yaklaşık üç katına çıkar. adipoz doku genişler ve obezite oluşur. Bunun sonucunda adipositlerden TG ve FFA salınımı artar. C) FIRKO farelerde adipositlerde glukoz transportu azalır fakat insülin hassasiyetinde iyileşme görülür. İnsülin hassasiyetini artıran adipokinlerin, leptin ve adiponektin salınımında artış gözlenir, TG salınımında azalma olur ve adipoz doku %50 oranında azalır, yaşam süresi uzar.

1.1.1. İnsülin Direnci, Obezite ve Tip 2 Diyabet

İnsülin direnci ile ilişkili obezite, tip 2 diyabet gibi metabolik sendromun içinde olan hastalıklar ülkemizde ve dünyada ciddi sağlık problemleri arasında üst sıradadır [5]. Doku spesifik insülin direnci çalışmaları, obezite ve tip 2 diyabetin nedenlerini açıklamaya yetmemiştir. Ayrıca, bu çalışmalarda kullanılan IR knock-out modellerle oluşturulan insülin reseptöründeki genetik hasarlar, insülin direnci sendromlu bireylerde çok nadir olarak görülür [2].

Metabolik hastalıkların önemli etmenlerinden biri obezitedir. Adipoz doku FFA'lar, gliseroller, leptin ve adiponektin gibi insülin hassasiyetinde ve besin alımının kontrolünde önemli olan çeşitli adipokinler ve proinflamatuvar sitokinler sentezleyip salar. Adipoz kütesinin artması ile birçok adipoz kaynaklı bileşik sentezi de artar. Bu bileşiklerin çoğu insülin direnci gelişiminde rol oynar. Örneğin TNF- α , hedef hücrelerde stres sinyal yollarını aktive ederek JNK yoluyla insülin direncine neden olur. Bunun dışında, obezite ve tip 2 diyabet hastalarında serum FFA seviyeleri yükselir. FFA, her iki hastalıkta da görülen insülin direnci ile ilişkilendirilmiştir. Kan FFA seviyesindeki ani artış sonucu akut insülin direnci oluşur [1, 4, 7].

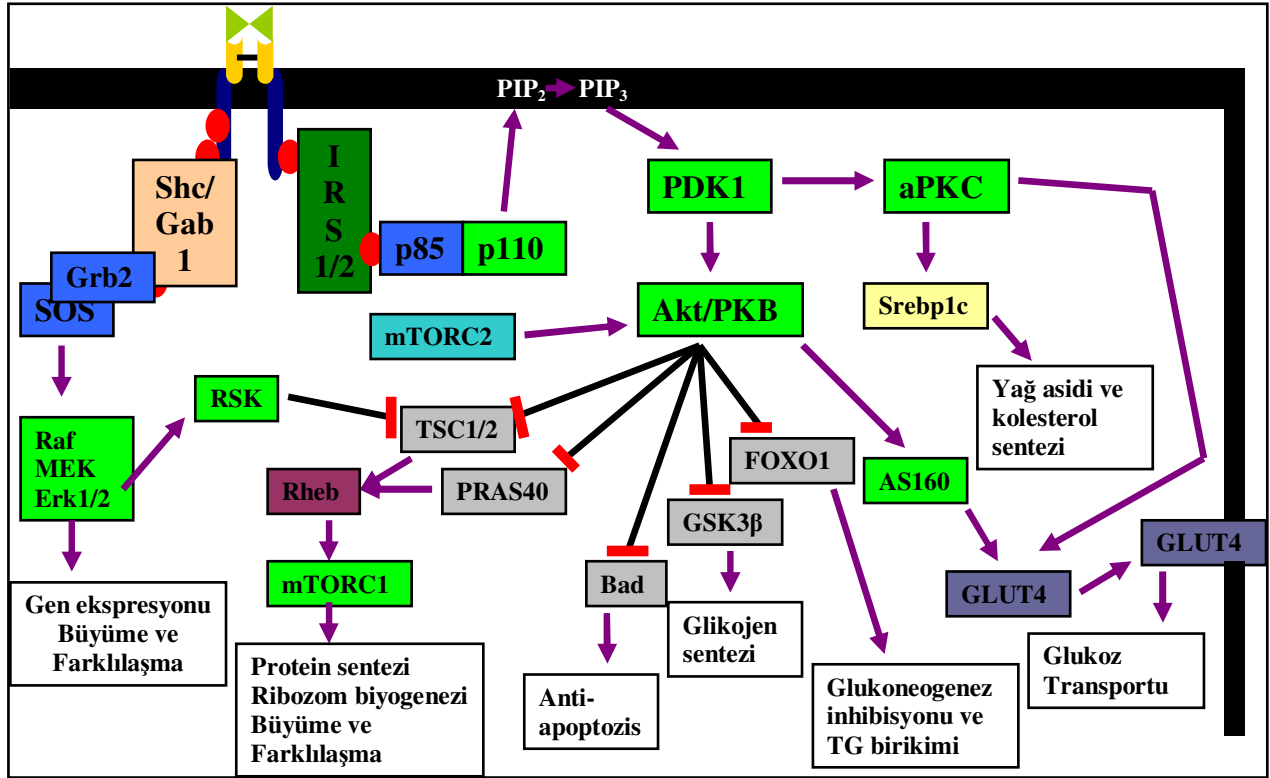
Obezitenin ve insülin direncinin tip 2 diyabet ile ilişkilendirilebilmesi için pankreatik β hücrelerinin insülin salgılamada arızalar olması gerekir. Obez ve insülin dirençli bireylerin çoğunda hiperglisemi gelişmemektedir. Normal koşullarda, pankreatik β hücreleri insülinin azalmış etkisinin üstesinden gelebilmek için insülin salgılamasını artırır ve böylece normal glukoz toleransını korurlar. Fakat obez bireylerin genelinde gözlenen artan FFA seviyesi, insülin direnci gelişimine neden olmakla birlikte β hücrelerinin fonksiyonunu bozar [1, 4, 28, 29].

Serbest yağ asitlerinin, FFA'ların adipositlerden kana salınmalarının altında yatan en önemli neden, adipositlerde görülen insülin direncidir. Adipositlerin insüline duyarsızlaşması sonucu, insülinin etkisi ile baskılanması gereken lipolizis aktive olur ve oluşan FFA'lar kana salınır [3].

1.2. İnsülin Sinyal İletimi

Metabolik bozuklukların altında yatan en önemli etmen olarak görülen insülin direncinin oluşmasındaki moleküler mekanizmaların nasıl işlediğinin anlaşılabilmesi için insülin sinyalinin hücre içine nasıl iletildiğinin anlaşılması gerekir.

İnsülin sinyal iletimi, glukoz ve lipit metabolizması, protein sentezi, hücre proliferasyonu gibi birçok hücreyel olayı kontrol eden kompleks heterolog sinyal ağı ile yürür. İnsülin varlığında, hedef hücrelerin yüzeyinde sergilenen, reseptör tirozin kinaz protein ailesinin bir alt grubunun üyesi olan, tetramer yapıdaki insülin/insülin benzeri büyüme faktörü reseptörü (IR/IGF-1R) oligomerize olur. Oligomerizasyon sonucu, reseptörün sitoplazmik tirozin kinaz alt birimi tirozin bakiyelerinden otoposforile olarak aktive olur. Otoposforile olan tirozin kinaz altbiriminde birçok substrat protein toplanır. İnsülin reseptör substratları (IRS1, IRS2, IRS3, IRS4, IRS5/DOK4, IRS6/DOK5), reseptörün fosforile olan tirozin bakiyelerinde toplanırlar ve tirozin bakiyelerinden fosforile olarak hücre içine insülin sinyalini iletirler. Bu fosforilasyonlar, aşağı (downstream) sinyal elemanlarını aktive ederek hücrenin insülin uyarımına uygun cevap oluşturmasını sağlar. Aşağı sinyal yolları birçok kola ayrılır. Bunlardan biri ve insülinin metabolik uyarılarının en önemli ileticisi PI3K-Akt/PKB sinyal yolu, bir diğeri hücre büyümesi, proliferasyonu ve farklılaşmasından sorumlu ve PI3K yolu ile birlikte çalışan genlerin ekspresyonunu düzenleyen Ras-MAPK sinyal yoludur. Üçüncü sinyal yolu PI3K/aPKC üzerinden lipit metabolizmasını düzenler (Şekil 1.3). İnsülin direnci, sinyal yollarının tamamını inaktif eden IRS serin/treonin fosforilasyonları veya IRS protein miktarının azalması (downregulation) veya sinyal yollarını kısmen inaktif eden diğere sinyal elemanlarının inhibisyonu yolu ile oluşur [1-4, 8, 30].



Şekil 1.3. İnsülin sinyal iletimi. PI3K/Akt sinyal iletim kolu glukoz metabolizmasını, TSC1/2 üzerinden protein sentezini ve BAD üzerinden sağkalımı, PI3K/aPKC kolu lipid metabolizmasını, Ras/MAPK kolu hücresel büyümeyi ve farklılaşmayı düzenler.

1.2.1. IR ve IRS Aktivasyonu

İnsülin sinyal iletiminde önemli düğümlerin birincisi IR ve IRS düğümüdür. IR, reseptör tirozin kinaz alt ailesi üyesidir. IR, insülini bağlayabilen iki α alt ünitesi ve molekül içi tirozin kinaz aktivitesi barındıran iki β alt ünitesinden oluşan tetramerik bir proteindir. İnsülin olmadığı zamanlarda α alt üniteleri, β alt ünitelerinin içinde barındırdıkları tirozin aktivitesini bloke eder. α alt üniteleri arasında disülfid bağı vardır. α alt ünitesi iki farklı izoform oluşturan mRNA splicing'i geçirir. İzoformların birinde IR geninin 12 amino asit kodlayan 11. ekzonu eksiktir ve oluşan protein insülin reseptörünün A formudur (IR_A). İkinci izoform, B izoformu, 11. ekzonu içerir (IR_B). İzoformların her birinin ligand hassasiyeti farklıdır. α alt ünitelerine insülinin bağlanması, β alt ünitesinin tirozin kinaz alt ünitesini serbest bırakır ve reseptör otofosforilasyona

gider. Bu aktivasyonu takiben, tirozin kinaz alt ünitesindeki konformasyonel değişim, reseptörün daha çok fosforillenmesini sağlar [2, 8].

IR, efektör proteinlerine doğrudan bağlanmaz. IR'e bağlanan, örneğın Gab-1, Cbl ve çeşitli Shc substrat proteinleri, insülinin etkisini efektör proteinlere iletirler. İnsülin reseptörüne bağlanan substrat proteinlerinin bir sınıfı IRS ailesidir. IRS ailesi proteinleri 6 tanedir (IRS1, IRS2, IRS3, IRS4, IRS5/DOK4, IRS6/DOK5). IRS proteinlerinin moleküler ağırlıkları 60 kDa ile 180 kDa arasında değişmektedir. IRS proteinlerinin doku dağılımları ve hücre içi lokalizasyonları farklılık gösterir. IRS1 ve IRS2 geniş bir dağılım gösterirken, IRS3 adipositlerle ve beyin ile sınırlıdır. IRS4 öncelikli olarak embriyonik dokularda veya hücre hatlarında eksprese edilir. IRS5 ve IRS6 çok sınırlı bir dağılım gösterirler ve insülin sinyal iletimindeki rolleri sınırlıdır. IRS proteinlerinin hepsi N-terminale yakın kısımlarında plekstrin homoloji bölgesi (PH) ve fosfotirozin bağlama bölgesi (PTB) içerirler. IRS proteinlerinin orta bölgesinde ve C-terminalinde, IR tarafından fosforile edildikten sonra SH2 alt birimi içeren proteinleri bağlayarak aktive edebilen yaklaşık 20 potansiyel tirozin fosforilasyon bölgesi içerirler. IRS proteinine SH2 alt birimleri aracılığı ile bağlanabilen en iyi çalışılmış adaptör proteinler PI3K'nın düzenleyici alt birimi ve Grb2 proteinleridir [2, 8].

1.2.2. PI3K Aktivasyonu

İnsülin sinyal ağı araçlarının önemli elemanlarından biri sınıf Ia fosfoinozitol 3-kinaz (PI3K)'dır. Aktif PI3K, iki alt birimden oluşur. Düzenleyici alt birim 3 gen grubu tarafından sentezlenir ve sekiz izoformu mevcuttur. Pik3r1 geni, hücrelerdeki düzenleyici alt birimlerin büyük bir kısmını oluşturan p85 α , p55 α ve p50 α izoformlarının sentezinden sorumludur. Pik3r2 geni p85 β 'nın, Pik3r3 ise p55PIK'in sentezinden sorumludur. Katalitik alt birimin, üç farklı gen tarafından sentezlenen p110 α , p110 β ve p110 δ olmak üzere üç farklı izoformu vardır. Düzenleyici alt birimlerin en çok bulunan ve hücre tiplerinde en geniş dağılımı göstereni p85 α 'dır. p85 α içinde, başka proteinlerle ilişkiye girebileceği birçok bölge barındırır. Bu bölgeler bir SH3 bölgesi, iki tarafı proline-zengin bölge ile çevrili bir bcr bölgesi ve katalitik alt birim p110'u bağlayan bölgeyi çevreleyen iki SH2 bölgeleridir. Katalitik alt ünitenin aktivasyonu, düzenleyici

alt ünitenin, IRS proteinlerinde bulunan pYMXM ve pYXXM amino asit motifleri ile ilişkiye girmesine bağlıdır.

PI3K, insülin sinyalini hücre içi ikincil mesajcı PIP₃'ü oluşturarak aşağı sinyal elemanlarına iletir. Oluşan PIP₃, PH bölgesi olan proteinleri membranda toplayarak aktive edebilir. Bir serin/treonin kinaz ailesi olan AGC kinazlar, guanin nükleotit değişim faktörü Rho ailesi ve TEC ailesi proteinleri PH bölgesi olan protein grubundadırlar. PIP₃'e bağlanıp aktive olan en önemli AGC kinaz ailesi proteini 3-fosfoinozidit bağımlı protein kinaz 1 (PDK1)'dir. PDK1, Akt/PKB'yi ve atipik PKC'yi (aPKC; PKC ζ ve PKC λ) aktive eder. PDK1 Akt'ı 308. pozisyondaki treonin bakiyesinden (T308), aPKC'yi T410'dan fosforile eder [2, 8]. Fakat Akt'ın tam aktivasyonu için 473. pozisyondaki serin bakiyesinden (S473) ikinci bir fosforilasyona ihtiyacı vardır. Önceleri PDK2 denilen, şimdilerde mTORC2 olduğu anlaşılan protein Akt'yi S473'ten fosforilleyerek Akt'ın tam aktif olmasını sağlar [8, 31, 32].

1.2.3. Akt/PKB Aktivasyonu

Akt/PKB, serin/treonin kinaz aktivitesi ile insülinin PI3K aracılı metabolik etkilerini hücre içindeki hedeflere iletir. Akt çeşitli kinazları, transkripsiyon faktörlerini ve sinyal proteinlerini fosforilleyerek metabolik yolları, protein sentezini ve hücre hayatta kalımı ve proliferasyonu ile ilgili mekanizmaları düzenler [2, 8].

Akt'ın genleri farklı üç izoformu mevcuttur. Akt1/PKB α , Akt2/PKB β ve Akt3/PKB γ olarak tanımlanan izoformların hepsi N-terminalde PH bölgesi ve C-terminalde katalitik bölge olmak üzere ortak yapısal özelliklere sahiptir. Son zamanlarda yapılan knock-out çalışmalar, Akt izoformlarının hücrede farklı fonksiyonları düzenlediğini göstermiştir. Hücrelerden Akt1'in silinmesi, büyümede yavaşlama, gerileme ve yaşam süresinde azalma ile sonuçlanırken metabolik anormalliklere neden olmamaktadır. Akt2'nin yetersizliği, fare modellerinde insülin direncine ve diyabet gelişimine neden olmaktadır. Akt2'nin kinaz bölgesindeki bir mutasyon, insanlarda da şiddetli insülin direnci ve diyabete neden olmaktadır. Akt3'ün glukoz metabolizmasında bir rolüne rastlanmamış fakat nöronal gelişimde önemli olduğu bulunmuştur [8].

Akt'ın tam olarak aktivasyonu için T308 bölgesinin PDK1 tarafından fosforile edilmesi, sonrasında S473'ün mTORC2 protein kompleksi tarafından fosforile edilmesi gerekmektedir. Aktive olan Akt'ın bulunan ilk substratı GSK3'tür. Akt, GSK3'ü fosforile ederek inaktive olmasını sağlar. GSK3 aktif iken glikojen sentazı fosforilleyerek inhibe eder. Akt tarafından fosforillenen GSK3 bu işlevini gerçekleştiremez. Böylece glikojen sentaz aktive durumda kalır ve glikojen sentezi artar [2, 8, 33].

Akt aktivasyonu, glukoz transportunda da etkilidir. Akt, Rab-GTPaz aktive edici protein olan AS160'ı fosforilleyerek inaktive eder. Bu fosforilasyon, hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesinden sorumlu olan Rab-GTP'nin aktif formunun korunması ile sonuçlanır ve böylece GLUT4'ün membrana translokasyonu için gerekli olan hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesini aktive etmiş olur [2, 8, 34].

Akt, glukoneojenik ve lipojenik enzim genlerinin ekspresyonunu da kontrol eder. Akt, glukoneojenik yollarda görev yapan enzim genlerinin transkripsiyonunu uyaran bir transkripsiyon faktörü FOXO1'i fosforilleyerek, proteinin nükleusa translokasyonunu önler. Böylece, glukoneogenezde görev yapan enzimlerin, örneğin PEPCK'nın sentezini engellemiş olur [2, 8, 35].

Akt sadece metabolik yolları değil, hücre büyümesi ve proliferasyonu ile ilgili yolları da düzenler. Hücre büyümesi ve proliferasyonu için gerekli en önemli olay protein sentezinin kontrolüdür. Akt, bu tez çalışmasının konusu olan TSC1/TSC2 protein kompleksini fosforile ederek inhibe eder. TSC1/2 kompleksi aktive durumda iken, protein sentezi ve ribozom biyogenezi gibi hücre büyümesi ve proliferasyonu ile ilgili sinyal yollarını kontrol eden mTOR proteininin aktivasyonunu baskılar. TSC1/2'nin Akt tarafından fosforillenmesi ile mTOR üzerindeki baskı kalkar ve mTOR aktive olur [8, 15-18, 31, 32, 36].

1.2.4. aPKC Aktivasyonu

aPKC'ler, adipositlerde ve kas hücrelerinde glukoz transportunda ve lipid metabolizmasında rol oynar. aPKC'nin aşırı ekspresyonu GLUT4 glukoz kanallarının membrana translokasyonunu artırmıştır [2, 8].

aPKC, bir transkripsiyon faktörü SREBP-1c'nin karaciğerde sentezini artırarak lipid metabolizmasında da önemli rol oynar. İnsülin seviyesinin azalmasına neden olan açlık durumunda, karaciğer hücrelerinde SREBP-1c seviyesi azalır. Besin alımında insülin seviyesinin yükselmesi ile birlikte, SREBP-1c protein miktarı da artar [2, 38].

SREBP proteinleri, hücrelerde iki gen tarafından kodlanan üç izoform halinde bulunurlar (SREBP-1a, SREBP-1c ve SREBP-2). SREBP-1c, karaciğer ve yağ dokusunda bulunan dominant izoform, yağ asidi sentezi için gerekli yağ asidi sentaz (FAS) ve asetil koenzim A karboksilaz (ACC) gibi genlerin ekspresyonunu kontrol eder [2, 38, 39].

1.2.5. Ras-MAPK Aktivasyonu

Ras-MAPK sinyal yolu, adaptör protein Grb2'nin ve guanil nükleotit değiştirici protein (GEF) SOS'un insülin reseptör substratı Gab-1 ve Shc'nin fosfotirozin bakiyelerine bağlanması ile aktive olur. Grb2'nin SH2 bölgesi ile Gab-1 ve Shc'ye bağlanması SOS'u membranın sitoplazmik yüzüne çeker ve sinyali küçük G protein Ras'a iletmesini sağlar. Aktive olan Ras, Raf, MAPKK (veya MEK) ve MAPK'nin sırasal serin/treonin fosforilasyonlarını ve aktivasyonlarını uyarır. MAP kinaz olan ERK1 ve ERK2 sitoplazmik substratlarını veya nükleusa transloke olarak transkripsiyon faktörlerini fosforile ederek aktive ederler [2, 8]. MAPK'ların birçok substratı vardır. Örneğin nükleusa transloke olup Elk-1 transkripsiyon faktörünü fosforile ederek proliferasyonla ilgili genlerin transkripsiyonunu düzenlerler [8]. Bundan başka, ERK, sitoplazmada p90 ribozomal S6 kinaz'ı fosforilleyerek aktive eder. Aktive olan RSK tez çalışmasının konusu olan TSC1/2 kompleksini fosforile ederek inhibe eder ve mTOR aktivasyonuna neden olarak protein sentezini düzenler [15, 32, 40].

1.3. İnsülin Direncine Neden Olan Moleküler Mekanizmalar

Hücrelerin insüline karşı duyarsızlaşmaları birçok genetik ve çevresel nedenlere bağlıdır. Besin alımının artışı ve azalmış fiziksel aktivite, insülin direnci gelişiminin çevresel nedenlerinin başında gelir. Çevresel etmenlerin yanında, insülin sinyal yollarında görev yapan proteinleri kodlayan genlerdeki defektler yada genlerin ekspresyonunu uyaran mekanizmalardaki arızalar, bu arızalardan etkilenen sinyal elemanına ve dokulara göre değişen şiddetlerde, kısmen yada tam, akut veya kronik insülin direncine neden olur [1-9, 15, 18-29].

İnsülin sinyal akışı çok karmaşık bir ağdır. İnsülin reseptörü her hücrede iki izoform halinde sentezlenir ve bu hücreler insülin tarafından aktive edilebilen IGF-1 reseptörü de sergilerler. Bu reseptörlerin hepsi en az altı adet IRS ailesine ait proteini (IRS1-6) fosforilleme yeteneğine sahiptir. Teorik olarak, PI3K, sekiz adet düzenleyici alt birim ve üç adet katalitik alt birimden herhangi ikisi ile oluşabilir, yani hücrelerde 24 adet potansiyel PI3K izoformu mevcuttur. Aktif PI3K'nın aşağı sinyal elemanı olan Akt'nin insülin sinyalinin iletiminde rol oynayan üç izoformu vardır. Toplamda, düşünüldüğünde, en az 1000 değişik kombinasyon ile insülin sinyali iletilebilir. Bu sinyal yollarının ya da sinyal yollarındaki elemanlar arasındaki kombinasyonların birinde meydana gelecek bir arıza, etkileri çok farklı ve kendine ait moleküler etkileri olan insülin dirençlerine neden olabilir [2, 3].

1.3.1. İnsülin Sinyal Elemanlarının Knock-out Edilmesi Çalışmaları

İnsülin sinyal elemanlarının insülin direncinin oluşumundaki rollerini anlamak için birçok knock-out çalışma yapılmıştır (Şekil 1.4). İnsülin reseptörün tamamen knock-out edilmesi her dokuda insülin direnciyle ve ölümlle sonuçlanmıştır [2]. IRS-1'in tüm vücutta knock-out edilmesi, glukoz intoleransı ve artan serum TG seviyeleri ve hipertansiyon ile sonuçlanmıştır ve bu farelerde global büyüme yavaşlaması ve gerilemesi gözlenmiştir. IRS-1'in adenovirüs vektör sistemi ile siRNA iletimi ile karaciğerde susturulması, glukokinaz sentezinde azalma ve hepatik glukozun kana verilmesinde bir artış ile sonuçlanır. TG artışı, kandan TG emiliminin azalmasına, büyümedeki problemler, IGF-1'in sinyalini iletememesine bağlanmıştır [2, 3, 8, 41, 42]. IRS-2 knock-out farelerde, hepatik insülin direnci ve pankreatik β hücrelerinde oluşan hücresel büyüme

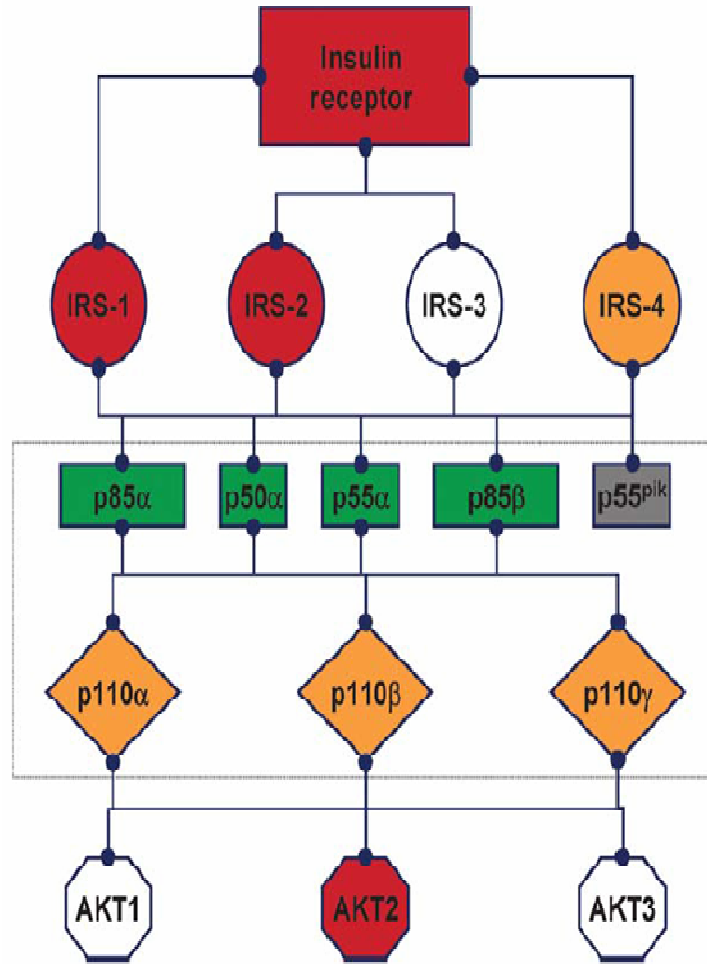
problemlerine bağlı olarak, diyabet gelişir. IRS-2 knock-out fareler dislipidemi ve hipertansiyon gösterirler. IRS-2'nin siRNA yoluyla karaciğerde susturulması sonucunda SREBP-1c'de, FAS'ta ve ayrıca hepatik lipit birikiminde artış ile sonuçlanır fakat glukoz toleransta bir değişim gözlenmez. IRS-1 ve IRS-2 nin birlikte knock-out edilmesi çalışmalarında fareler erken-fetal dönemde ölmektedirler. Karaciğer spesifik IRS1 ve IRS2'nin birlikte susturulması çalışmalarında fareler glukoz entolerans ve hepatik steatozis gösterirler [2, 3, 8, 41, 42, 43].

İnsülin sinyal yolu elemanlarından, sinyali Ras-MAPK yoluna aktarmakta görev yapan Gab-1'in karaciğer spesifik knock-out edilmesi, glukoz toleransın iyileşmesini ve insülinin IRS1 ve IRS2 yoluyla hassasiyetinin artmasını sağlamıştır. Bu iyileşme, aşağıda düzenlenme mekanizmalarında belirtilen IRS'lerin MAPK yoluyla fosforillenmesi engellendiği için görülmektedir. ERK1'in knock-out edilmesi çalışmalarında fareler, adiposit sayısındaki azalmaya bağlı olarak, adipozitede azalma gösterirler. Bu alışma ERK1'in adipogenez'de rolü olduğunu desteklemektedir [2, 8, 44, 45].

PI3K'nın düzenleyici alt biriminin  ve hücrelerde en çok bulunan izoformlarını kodlayan Pik3r1 geninin farelerde knock-out edilmesi doğumdan birkaç hafta sonra ölümlle sonuçlanır. İlginç olarak düzenleyici alt birimlerin birinin, örneğin p85'nın knock-out edilmesi, insülin hassasiyetini artırmaktadır. Bu durum diğer izoformlar için de geçerlidir. Hatta bu mutasyonların yanında, bir başka insülin sinyal elemanının, örneğin insülin reseptörünün heterozigot olması durumunda bile, PI3K'nın düzenleyici alt biriminin bir formunu taşımayan farelerde diyabet gelişmemektedir [2, 8]. Bu durumun nedeninin,  katalitik alt birim izoformu, sekiz düzenleyici alt birim izoformuna bağlanmak için rekabet etmeleri, hücrede mevcut tüm düzenleyici altbirimler birlikte IRS'lere bağlanamadığından, onlara bağlanan katalitik alt birimleri aktive edememeleri olduğu düşünülmektedir [8]. PI3K'nin katalitik alt ünitelerinin delesyonu ölümcül olmaktadır. p110+/- ve p110+/- çift heterozigot modellerde glukoz entolerans ve açlıkta hafif hiperinsülinemi görülmektedir [2].

Akt1'in knock-out edilmesi global büyüme defektleri ile sonuçlanır. B hücrelerinde, iskelet kasında ve WAT'da sentezlenen Akt2'nin knock-out edilmesi, glukoz entoleransına ve hiperinsülinemiye neden olur. İskelet kasının glukoz alımı azalır ve hepatik glukoz salınımı artar.

Ayrıca Akt2 platelet hücrelerde de sentezlendiğinden, Akt2 eksikliği, farelerde tromboz oluşumunda ve platelet agregasyonunda defektler görülür. Akt3'ün knock-out edilmesi, üretildiği beynin boyutunda küçülmeye neden olur fakat glukoz metabolizmasında bir değişikliğe sebep olmaz [2, 8, 46].



Şekil 1.4. İnsülin sinyal yolu elemanlarının knock-out edilmesi çalışmalarının glukoz metabolizması üzerine etkilerinin şematik gösterimi. Yeşil: Pozitif, Turuncu: Hafif negatif, Kırmızı: Negatif, Beyaz: Etkisi yok, Gri: Etkisi bilinmiyor [2].

1.3.2. İnsülin Sinyal Elemanlarının Negatif Düzenlenimi

İnsülin direncinin oluşması, insülin sinyal moleküllerinin inaktivasyonuna bağlıdır. İnsülin sinyal ağının birinci elemanı, insülin reseptörünün serin/treonin fosforilasyonlarının artması sonucunda tirozin kinaz aktivitesinin azalması veya mutasyon sonucu kaybolması, hücrelerde tam insülin direncine neden olur. Tip A insülin direnci, IR'ün tirozin kinaz bölgesinde bir heterizogot mutasyon sonucu oluşur ve insülin bağlandıktan sonra içeri sinyal iletiminde azalma olur. Rabson-Mendenhall sendromu ve leprekaunizm'de (Donohue sendromu) IR'ün α alt ünitesinde görülen mutasyon insülinin bağlanmasını engeller ve insülin direnci oluşur [2, 3, 48].

IR'ün tirozin fosforilasyonlarının azalması yada IRS'lerin fosforilasyon bölgelerine bağlanmalarının sterik olarak engellenmesi insülin sinyal iletimini başlamadan bitirir [2, 3, 8]. IR'ünün yanında IRS substratları da tirozin fosforilasyonlarının azalması, serin/treonin fosforilasyonlarının artışı ve protein yıkımının artması yoluyla negatif olarak düzenlenir. Tirozin fosforilasyonlarını azaltan ve doğrudan IR'e etki eden PTP1B'nin aşırı ekspresyonu şiddetli insülin direncine neden olur. PTP1B knock-out modeller, *in vivo* insülin hassasiyetinde artış göstermişlerdir. Stres sinyal yolları ile aktive olan SOCS proteinleri IR'ün IRS'lere bağlanmasını sterik olarak bloke eder ve insülin direncine neden olur. Stresin aktive ettiği serin/treonin kinazlar, örneğin TNF- α 'nın aktive ettiği JNK ve IKK, IRS'larını belirli pozisyonlardan fosforilleyerek IR ile interaksiyonunu engellerler. IRS'larını serin/treonin bakiyelerinden fosforilleyen, ERK, PKC, S6K gibi birçok kinaz belirlenmiştir. Serin/treonin fosforilasyonlarını yapan stres kinazlar, obezitenin neden olduğu artan inflamatuvar sitokin ve FFA'ların salınımı sonucu aktive olmalarının yanında insülin uyarımına cevap olarak da aktive olabilirler. İnsülin sinyal iletimi, normal koşullar altında çok etkili bir negatif düzenlenim içindedir [2, 3, 4, 7, 8, 29, 30, 47].

PI3K'nın pozitif etkisi, fosfatidil fosfatazlarla negatif olarak düzenlenir. Örneğin PTEN ve SHIP-2 proteinleri, PIP₃'ü defosforile eder ve PI3K'nin aşağı sinyal akışını engeller. PTEN'in *in vivo* delesyonu insülin hassasiyetinin artması ile sonuçlanmıştır. SHIP-2 knock-out fare modelinde, fareler obezite teşvikli insülin direncinden korunmuşlardır [8].

Adipoz doku, salgıladığı FFA'lar, inflamatuvar sitokinler, gliseroller ve hormonlarla metabolizmayı düzenler. Obezite'de, adipoz dokunun salgıladığı metabolik araçların birçoğunda artış görülür. Adipoz dokudan salgılanan ve AMPK ve PPAR- α aracılığı ile serbest yağ asidi oksidasyonunu uyararak insülin hassasiyetinin artmasını sağlayan adiponektinin seviyesi, adipoz doku genişledikçe azalır. Merkezi sinir sisteminde, hipotalamusta yer alan arkuat nükleus'ta oreksijenik-anoreksijenik yolları, yani iştahı düzenleyen leptine karşı, obez bireylerde direnç gelişir ve bu bireylerde artan besin alımı görülür [3, 4].

Adipoz dokunun artması ile TNF- α salınımı artar. Artan TNF- α , serbest yağ asidi (FFA) salınımının önemli bir aracısı olarak görev yapar. Adipositlerden salınan FFA'lerin plazma seviyesinin akut artışından birkaç saat sonra insanlarda insülin direnci gelişir. FFA'lerinin bir antilipolitik ajan acipimox ile muamele sonrası serum seviyesindeki azalma sonucu, insülin aracılı glukoz alımı artar ve glukoz toleransı normale döner. TNF- α , hedef hücrelerde JNK ve IKK-NF κ B sinyal yollarını aktive ederek birçok potansiyel inflamasyon aracısının salınımını uyarır. TNF- α reseptör genlerinin susturulmasına dayalı çalışmalarda, TNF- α 'nın işlevini yapamamasından dolayı, β hücrelerinden insülin salınımının, perifer dokularda insülin hassasiyetinin arttığı gösterilmiştir [3, 4, 47].

1.4. Endoplazmik Retikulum (ER) Stresi ve UPR Sinyal Yolu

İnsülin sinyal elemanlarını negatif düzenleyen hücre içi sinyal mekanizmaları sayesinde insülinin reseptörüne bağlanmasının ve hücre içine sinyal iletiminin sürekliliği sağlanmış olur. Fakat negatif düzenleyen mekanizmaların sürekli aktivasyonu sonucu insülin, sinyalini hücre içine iletmez ve insüline karşı direnç gelişir.

Negatif düzenlenim mekanizmalarının sürekliliği hücre içi stres ve inflamasyon durumlarında gözlenir. Hücre içi stres, dış sinyallerin, örneğin insülinin, sürekli uyarımı sonucunda obezitede hücre içi lipit birikimi, hücre içi enerji akışı ve aşırı besin varlığı ve genişleyen adipoz dokudan salınan inflamatuvar sitokinler nedeni ile oluşur. Ayrıca obezite, birçok salgı organında hücrelerin, örneğin pankreas β hücrelerinin, salgı sistemlerine binen yükün artmasına neden olur. Hücresel stres cevabının önemli elemalarından biri ER'dur. İnsülin

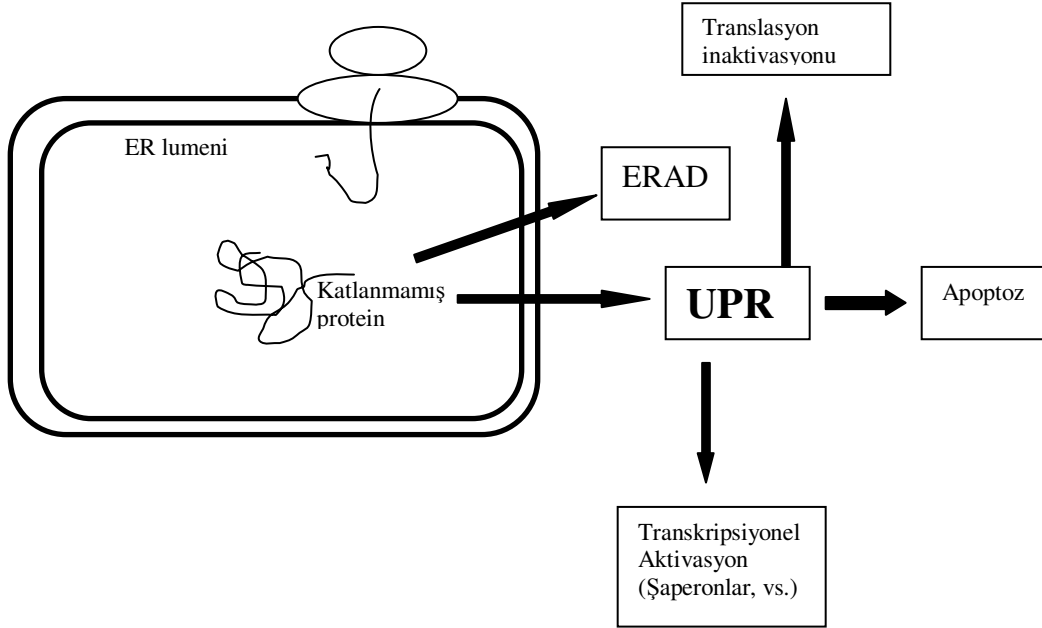
direncine neden olan negatif düzenlenim mekanizmaların sürekliliğini tetikleyen mekanizmaların başında ER stres cevabı gelir [1-13].

Endoplazmik retikulum (ER), salgı ve membran proteinlerinin translasyon sonrası katlanma işlemlerinin gerçekleştiği, lipid ve sterol sentezinin yapıldığı ve hücre içi Ca^{2+} 'nin depolandığı, her ökaryotta bulunan, lümeni ekstraselüler alanla aynı kimyasal özelliklere sahip, etrafı membranla çevrili hücre içi büyük bir organeldir [10-13]. Artan protein sentez ve salgı talebi gibi fizyolojik ve mutant proteinlerin tam olarak katlanamaması gibi patolojik stres koşullarında ER'un katlama kapasitesi aşılır, yani translasyon sonrası modifikasyonlarda proteinlere eşlik eden ER şaperonlarının miktarı ve ER lümen hacmi, hücrenin talep ettiği iş yükünü karşılayamaz. Bu durumda ER stresi oluşur. ER stres cevabı, hücrenin talebini karşılamaya yönelik bir sinyal akışını başlatır: UPR (Şekil 1.5). ER, lipid metabolizmasına ve steroid üretimine ev sahipliği yapan bir organeldir. Lipid metabolizmasındaki bozukluklar da ER stres cevabını uyarır, fakat lipid metabolizmasındaki bozuklukların nasıl UPR'yi uyardığı konusunda çok az şey bilinmektedir [10-13].

ER'un düzgün çalışması, katlanamayan polipeptid zincir yükü ER katlama kapasitesini aştığında bozulur. Bu durum, kan koagülasyon faktörü VIII gibi yüksek moleküler ağırlıklı ve modifikasyonu zor olan veya antitrombin gibi küçük ve yapısal olarak basit proteinlerin aşırı ekspresyonu ile gerçekleşebilir. Bu proteinlerin ER şaperonları ile kompleks oluşturdukları veya yüksek moleküler ağırlıklı agregatlar oluşturdukları gösterilmiştir. Mutant ve tam katlanamayan proteinlerin ekspresyonu, ER şaperonların ekspresyonuna neden olmaktadır. Bu durum, ER depo veya konformasyonel hastalıkları denilen çeşitli hastalıkların biyokimyasal temelini oluşturmaktadır. Yakın zamanda yapılan çalışmalar, B lenfosit hücrelerinin plazma hücresine farklılaşması esnasında, viral enfeksiyonlarda ve bitkilerin mikrobik enfeksiyonlarında ER stresi cevabı olduğu gösterilmiştir [10, 11, 12].

ER üzerindeki talebi karşılamak amacı ile ER kapasitesini artırmak için, UPR yoluyla katlanma talebi azaltılır ve ER genişletilerek katlama kapasitesi artırılır. Katlanma talebini azaltmak amacı ile salgı proteinlerini kodlayan genlerin ekspresyonu ve translasyon baskılanır ve yavaş katlanan veya katlanamayan proteinlerin yıkımı ERAD (ER associated degradation-ER

ilişkili yıkım) yolu ile artırılır. Ayrıca, hücrenin dışından gelen ve birçok proteinin sentezini uyaran büyüme sinyallerinin, örneğin insülinin, sinyal iletimi inaktive edilerek hücre dış sinyallere kapatılır [9-13].



Şekil 1.5. ER stresi ve katlanmamış protein cevabı UPR. Katlanmamış proteinler ERAD'a gönderilir. ER'a binen yük katlama kapasitesini aşarsa UPR sinyal ağı aktive edilir. UPR sinyal ağı translasyonu durdurur, ER katlama kapasitesini artıran ve stresin azalmasında görevli genlerin transkripsiyonunu uyarır. ER, protein yüküne cevap veremezse, yani UPR'nin ER stresini azaltmadığı durumlarda hücre apoptoza yönlendirilir.

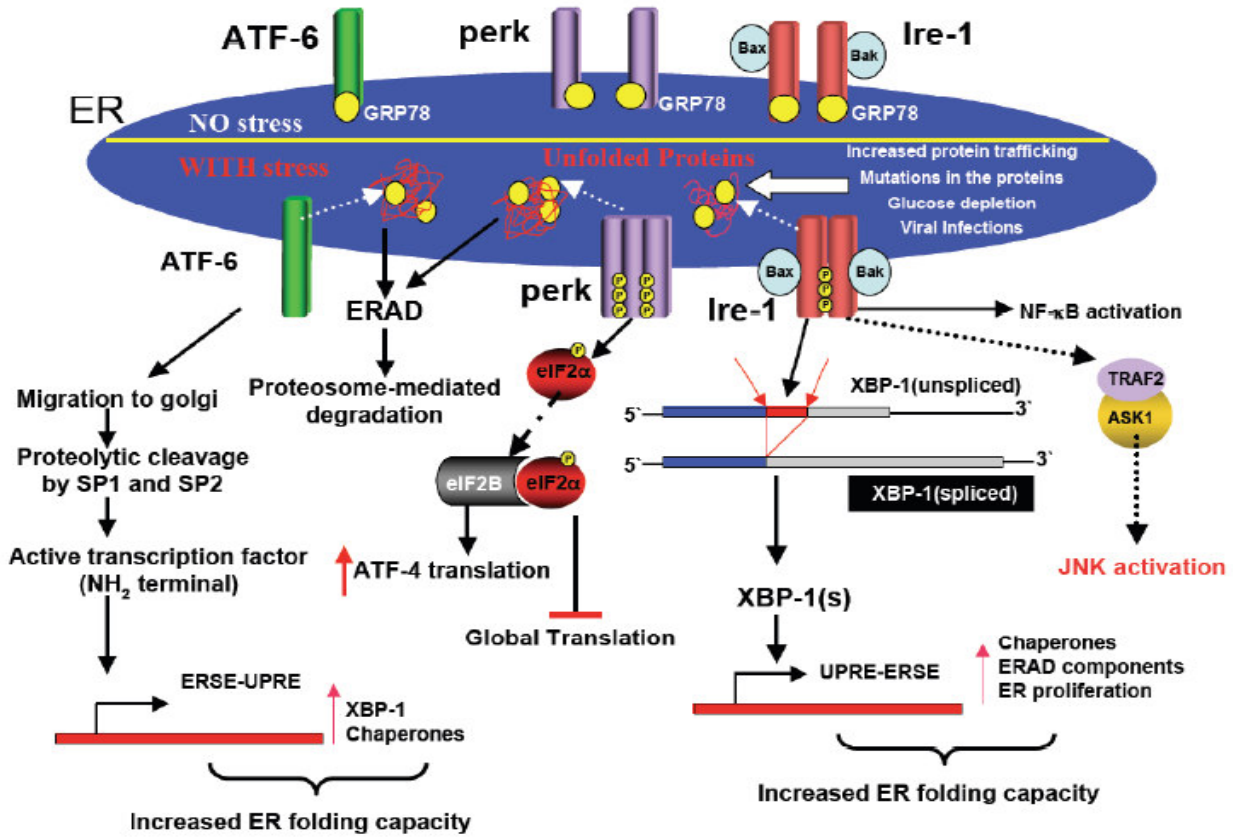
1.4.1. ER'da Protein Katlanması

ER, sitoplazmadan sonra en önemli protein katlanma bölgesidir. Sitolozdeki protein katlanma kuralları ER'da da geçerlidir fakat, katlanması için ER'a aktarılan proteinler N-bağlı glikozilasyon ve disülfid bağı oluşumu gibi posttranslasyonel modifikasyona uğradıklarından, ER'da gerçekleşen protein katlanması sitozoldekinden daha karmaşıktır. ER, sadece doğru düzgün katlanmış ve birleşmiş proteinlerin çıkış yapmasını garanti altına almak için "kalite kontrol" denilen bir sistem geliştirmiştir. Kalite kontrol sisteminden beklenen, katlanmış ve

katlanmamış veya yanlış katlanmış proteinleri birbirinden ayırmaktır. Bazı proteinler, mutasyonlar veya hücrenin enerji ihtiyacı nedeniyle, şaperon döngüsünü tamamlayamazlar ve tam olarak katlanamazlar. 30-90 dakikalık bir lag fazından sonra yanlış katlanmış proteinler ERAD'a gönderilirler. ERAD substratları olan bu katlanmamış proteinler sitozole ulaştıkları anda ubiquitin/proteozom yıkım yolu ile yıkılırlar. Kalite güvencesi sağlayan bu yolun etkili işlemesi için ER'daki katlanma talep yükünün sitozole ve çekirdeğe devamlı olarak bildirilmesi gereklidir. ER talebi karşılayamayacak durumda ise "ER Stresi" denilen durum oluşur ve bir sinyal ağı başlatılır. ER'daki protein katlanma durumu sitozole ve çekirdeğe UPR sinyal ağı aracılığı ile bildirilir [12, 13, 50].

1.4.2. UPR Sinyal İletimi

ER, ait olduğu hücreye gelen protein sentezi talebine göre anlık protein modifikasyon talep artışı ile karşılaşabilir. Böyle durumlarda oluşan ER Stresi ilk etapta, ER'un katlama kapasitesini artırmaktan ziyade transkripsiyondan bağımsız olarak, hatalı protein katlama ihtimalini azaltmak amacı ile translasyonu UPR aracılı kontrol altına alır. Buna rağmen ER katlama kapasitesi yeterli olmaz ise hücrede ER şaperonları ve katlama makinesi elemanlarının transkripsiyonunu artıracak UPR sinyalleri çekirdeğe ulaştırılır. Uzayan UPR sinyal iletimi bazı hücrelerin fenotipinin değişmesi, yani farklılaşması ile ilişkilidir. Bir hücre salgı hücresine dönüşeceği zaman aşırı protein sentezi ve modifikasyonu talebi ER'un UPR yolu ile kapasitesini artırması ve sitoplazmada yayılması ile sonuçlanır. Bu nedenle UPR hücresel farklılaşmada rol oynar. ER stresi, hücrenin adapte olamayacağı kadar büyük olursa hücre ölebilir. UPR, ER stresinin azalmaması durumunda hücreyi apoptoza yönlendirir. UPR sinyal ağı ilk olarak tip I transmembran kinazlar PERK ve IRE-1'in aktivasyonu ve ardından tip II transmembran proteini ATF-6 aktivasyonu ile başlatılır (Şekil 1.6) [10-13, 18, 51].



Şekil 1.6. UPR sinyal iletimi. Stres olmadığında GRP78 şaperon proteini, ER stresi algılayıcıları ATF-6, PERK ve IRE-1 ER membran proteinlerinin luminal bölgelerine bağlı konumdadır. Artan protein trafiği, mutant proteinlerin sentezi, viral enfeksiyonlar ve glukoz açlığı gibi stres durumlarında GRP78 ER stresi algılayıcı proteinlerinden ayrılır, katlanmamış proteinlerin hidrofobik bölgelerine bağlanır ve katlanmayan proteinleri ERAD'a gönderir. GRP78'in ayrılması ile aktive olan PERK eIF2α'yı fosforilleyerek translasyonu durdurur. Bir diğer ER stresi algılayıcısı olan ATF-6 Golgiye göç eder, orada aktive olur, nükleuse gider ve ERSE-UPRE içeren genlerin transkripsiyonunu aktive ederek ER'un katlama kapasitesini artırır. IRE-1 TRAF2 yolu ile JNK'ı aktive eder. JNK serin kinaz enzimi büyüme faktörlerinin uyardığı sinyal yollarını baskılayarak protein sentezi yönündeki talepleri engeller. IRE-1 endoribonükleaz bölgesi ile XBP-1 mRNA'sını kesip yeniden düzenler ve aktif transkripsiyon faktörü XBP-1s oluşur. XBP-1s ERSE-UPRE içeren, şaperon, ERAD bileşikleri ve ER'un genişlemesi ile ilgili genleri aktive ederek ER'un kapasitesini artırır ve ER stresinin azalmasını sağlar [51].

1.4.2.1. PERK Aktivasyonu

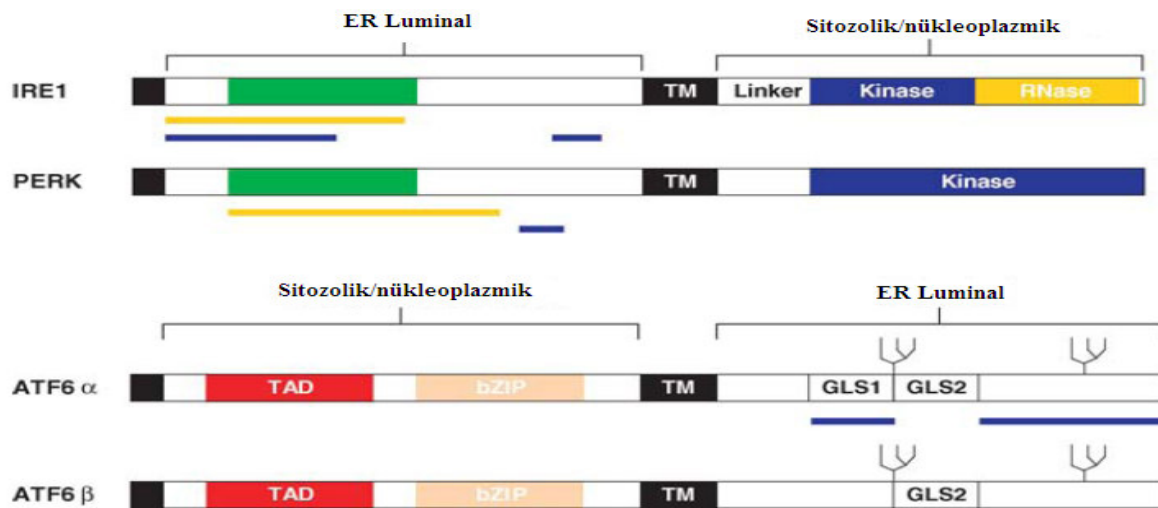
ER transmembran proteini olan PERK tüm hücrelerde sentezlenir fakat salgı hücrelerinde sentezi artar. Son yıllarda yapılan bir çalışmada PERK'in ER stresi tarafından aktive edildiği gösterilmiştir. PERK, lüminal bölgesinde protein katlanma döngüsünde rol oynayan bir şaperon olan GRP78/BiP proteini ile bağlanma bölgesi içerir. Katlanmamış yada yanlış katlanmış proteinlerin lümeninde birikmesi GRP78'in PERK'ten ayrılmasına ve PERK'in oligomerize olmasına neden olur. Oligomerizasyon sonucunda PERK otoposforile olur ve kendini aktive eder. Aktive olan PERK translasyon başlangıç faktörü eIF2 α 'yı fosforiler. eIF2 α fosforile durumda iken GEF görevi gören eIF2B'ye bağlı kalır ve böylece translasyon başlangıç kompleksi eIF2 α /GTP/Met-tRNA_i oluşumu engellenir ve translasyon durdurulur. Böylece ER'a binen iş yükü azalır. eIF2 α 'nın fosforilasyonu sonucu global olarak translasyonu azaltırken belirli mRNA'ların translasyonunu uyarılmaktadır. ER stresi durumunda eIF2 α 'nın fosforilasyonu, ER stresi cevabında rol oynayan ATF-4 transkripsiyon faktörünün translasyonunu ve dolayısı ile aminoasit metabolizması ve transportunda, ERAD'da, ER'un genişlemesinde görev alan genlerin transkripsiyonunu uyarır [10, 12, 50, 52].

PERK^{-/-} farelerde, artan apoptoz ve azalan büyüme nedeni ile 2-3 haftalık iken şiddetli diyabet gelişir. PERK^{-/-} hücreler ER stresine çok yatkındırlar ve bu hücrelerde hücre döngüsü kontrol altında tutulamaz. ER stresi durumunda PERK aktivasyonu sonucu Siklin D1 sentezinin azalması hücreleri G1'de tutar iken PERK^{-/-} hücrelerde Siklin D1 sentezi devam eder ve hücreler kontrolsüzce çoğalırlar [12, 50-53].

1.4.2.2. ATF-6 Aktivasyonu

ATF-6, sitozolik bölgesi bZIP transkripsiyon faktörü olarak görev yapan tip II ER transmembran proteinidir. Memelilerde ATF-6 α ve ATF-6 β /CREB-RP olmak üzere iki homoloğu bulunur. ER'da protein katlanması inhibe olduktan sonra ATF-6 Golgi kompleksine göç eder. ATF-6'nın Golgi'ye göç etmesinde, GRP78'in rolü vardır. ATF-6'nın lüminal bölgesinde GLS1 ve GLS2 olarak adlandırılan Golgi lokalizasyon dizisi mevcuttur (Şekil 1.7). GRP78 GLS1'e bağlanır ve ATF-6'yı ER membranında tutar. ER lumeninde katlanmamış proteinlerin varlığı

GRP78'in GLS1'den ayrılmasına neden olur ve GLS2 aktive olarak ATF-6'nın Golgi'ye göçünü uyarır. Bir serin proteaz olan S1P enzimi, ATF-6'nın luminal bölgesini keser. Bir diğer enzim metalloproteaz S2P, ATF-6'nın transmembran bölgesini keser. Bu reaksiyon sonucunda ATF-6'nın sitozolik bZIP bölgesi serbest kalır ve nükleusa giderek transkripsiyonu başlatır. ATF-6, DNA üzerindeki ATF/CRE bölgelerine, ERSE-I'e (CCAAT-N₉-CCACG) ve ERSE-II'ye (ATTGG-N-CCACG) bağlanır. ATF-6'nın ERSE-I ve ERSE-II'ye bağlanabilmesi için NF-Y/CBF'ye ihtiyacı vardır. ATF-6, ER stresinin azalmasında büyük rolü olan UPR'nin önemli elemanlarından XBP-1'in transkripsiyonunu uyarır. XBP-1 mRNA'sının aktivasyon için splice işlemine uğraması gerekmektedir. XBP-1'in splice edilmiş formu (XBP-1s) UPR'nin transkripsiyonel cevaplarını tetikleyerek ER'un genişlemesini ve şaperonların artmasını sağlar ve uzun süreli ER stresini azaltır [10-13].



Şekil 1.7. ER stresi algılayıcı proteinlerinin primer yapılarının şematik gösterimi. IRE-1, PERK ve ATF-6. Sarı ince çubuklar sinyal iletimi ve oligomerizasyon için yeterli bölgeleri göstermektedir. Mor çubuklar GRP78'le ilişkiye girilen bölgeleri göstermektedir. Siyah kutular sinyal peptidlerini, yeşil kutular ise IRE1 ve PERK arasındaki homoloji bölgelerini temsil etmektedir. bZIP: basic leucine zipper, GLS1 ve GLS2: Golgi lokalizasyon dizisi 1 ve 2, TAD: Transkripsiyonel aktivasyon bölgesi, TM: transmembran bölge [Kaynak 12'den modifiye edilmiştir].

1.4.2.3. IRE-1 Aktivasyonu

IRE-1 enzimi, ER luminal dimerizasyon ve sitozolik kinaz ve endoribonükleaz bölgeleri içeren tip I ER transmembran proteindir. ER stresi durumunda GRP78'in dimerizasyon bölgesinden ayrılması ile IRE-1 dimerize olur ve transotofosforilasyona uğrayarak aktivasyon kazanır. Memelilerde IRE-1'in iki izoformu vardır. IRE-1 α bütün dokularda gözlenirken IRE-1 β sadece barsak epitelyum hücrelerinde görülmektedir. IRE-1 α -/- fareler yaşamazken IRE-1 β -/- fareler sağlıklıdır fakat barsak iltihaplarına (kolit) daha yatkındırlar. UPR'nin IRE-1 kolu evrim süresince en iyi korunmuş ve moleküler anlamda UPR sinyal ağının bulunan ilk sinyal koludur [12, 50].

IRE-1 endoribonükleaz bölgesinin keşfedilen ilk substratı bZIP transkripsiyon faktörü olan XBP-1 mRNA'sıdır. XBP-1'in 26 nükleotidlik inhibitör intron bölgesinin IRE-1 endoribonükleaz tarafından kesip atılmasından sonratranslasyonel çerçeve kayması sonucu oluşan XBP-1s plazma hücrelerinin farklılaşmasında rol oynar. XBP-1 salgı hücrelerinde yüksek seviyelerde exprese edilmektedir. XBP-1s, hücrelerin artan protein sentezi ve modifikasyonu taleplerine cevap verebilmesi için ER'un genişlemesinden sorumlu genlerin transkripsiyonunu artırarak hücrelerin farklılaşmasında rol oynamaktadır. XBP-1s ERSE-I, ERSE-II ve UPRE (TGACGTGC/A) motiflerine bağlanarak şaperon, ER ilişkili yıkım ve ER genişlemesini sağlayan fosfolipit sentezi ile ilgili genlerin transkripsiyonunu artırır [10, 12, 50, 54].

IRE-1'in kinaz domaininin aktivasyonu ile JNK sinyal yolunun aktivasyonunda rol oynar. IRE-1'in sitoplazmik domaini bir adaptör protein olan TRAF2 ile etkileşerek aşağı sinyal akışını aktive eder. TRAF2 ASK1'e bağlanır ve ASK1 JNK'ı fosforilleyerek aktive eder. IRE-1'in bu etkisi ER stresi ile büyüme faktörleri ve mitojenler arasında köprü kurulmasını sağlar. Aktive olan JNK insülin sinyal elemanları IR, IRS1 ve IRS2'yi serin bakiyelerinden fosforilleyerek insülinin hücre içine sinyal iletmesini inhibe eder ve böylece insülin direnci oluşur. Bu yol ile IRE-1, ER üzerine binecek insülin uyarımlı protein sentezi ve modifikasyonu yükünü engellemiş olur [9, 10, 12, 50, 54, 55, 56].

1.5. ER stresi ile İlişkili Patolojik Durumlar

ER'un işlevini düzgün olarak yerine getirememesi birçok hastalığa neden olmaktadır. ER'un işlevini düzgün yapamaması birçok nedene bağlı olabilir. ER'dan beklenen iş yükünün artması, viral enfeksiyonlar, inflamatuvar sinyal yollarının aktive edilmesi ve salgı veya membran proteinleri gibi translasyon sonrası modifikasyona uğrayan proteinleri kodlayan genlerdeki mutasyonlardan kaynaklanan hastalıklarda ER'un bünyesindeki bir bozukluktan daha çok, ER dışındaki etmenler rol oynar. ER dışı etmenlerden başka, ER'un işlevini yerine getirmesini sağlayan ev sahibi proteinler ve UPR sinyal yolu proteinlerindeki genetik defektler de ER depo hastalıklarına neden olabilirler. Birçok genetik geçişli hastalık ER stresi ile ilişkilidir [10, 12, 13].

1.5.1. Viral Enfeksiyonlar

Virüsler, çoğalmaları için zarf proteinlerini ve lipitlerini konak hücreye sentezlettirirler ve bu nedenle birçok konak hücre proteinini, dolayısı ile ER'u kullanırlar ve UPR'yi kendi kullanımları için düzenlerler. Virüslerin UPR'yi nasıl ayarladıkları henüz tam olarak açık değildir. Esas itibari ile UPR sinyal yollarından PERK'in viral enfeksiyonlara karşı bir savunma oluşturması beklenir, çünkü PERK, çift sarmallı RNA bağımlı protein kinaz olan ve hücrel antiviral savunmada rol oynayan PKR enzimi ile yüksek homoloji taşır. Gerçekten de, PERK -/- fibroblast hücrelerinin, viral enfeksiyonlara yatkınlığının ve bu hücrelerde virüs üretiminin normal (wild type) fibroblastlardan daha yüksek olduğu gösterilmiştir. PERK'in viral replikasyonu engellemesi, eIF2 α fosforilasyonu sonucunda translasyonun bloke edilmesine bağlıdır. Buna rağmen viruslar enfekte ettikleri hücrelerde çoğalabilmektedirler. Bazı viruslar, bu mekanizmaya karşı bir yol geliştirmişlerdir. Örneğin tip I HSV'ün kodladığı bir protein ICP34.5, eIF2 α 'yı defosforilleyen hücrel bir enzim GADD34 ile homologtur. ICP34.5'ten yoksun HSV'ler hücrelerde çoğalma yeteneklerini yitirmişlerdir. Virüsler ER stresi kendi lehlerine de kullanabilirler. Örneğin bir sitomegalovirus US11, sınıf I major histokompatibilite kompleksinin degradasyonunu artırmak için UPR'yi aktive eder. Artan UPR aktivasyonu, virusun konak bağışıklık sisteminden kaçmasını sağlar. Hepatit B virusu, ER stresi tarafından aktive olabilen bir promoter gen bölgesi taşır. Görüldüğü gibi bazı viruslar ER stresin negatif etkisinden kaçmak için UPR tarafından aktive edilebilen mekanizmaları kendi lehlerine kullanabilmektedirler [13].

1.5.2. Genetik Hastalıklar

Genetik hastalıklar, bireylerin genetik materyali, yani genomlarında meydana gelen mutasyonlar sonucu ortaya çıkar. Genetik hastalıklar multifaktöriyel gen hastalıkları, mitokondriyel gen hastalıkları, kromozom anomalileri ve tek gen hastalıkları olarak dört gruba ayrılır [57]. Poligenik ve multifaktöriyel kavramları birbirinden farklı olmakla birlikte genellikle aynı anlamda kullanılır. Poligenik kavramında birden fazla genin etken olduğu nitelikler anlaşılırken, multifaktöriyelde ise hem genlerin hem de çevresel etkenlerin bir arada rol oynadığı hastalıklar akla gelmektedir [57]. Bu tip hastalıklar, çevresel faktörlerin ve birçok gendeki bozuklukların birlikte etkisiyle oluşurlar. Örneğin, meme kanserine yatkınlık sağlayan genler değişik kromozomların üzerinde bulunmaktadır. Bu karmaşık yapıları nedeniyle bu tip hastalıkların analizi tek gen ve kromozomal hastalıklara göre çok daha zordur. ER stresi ile ilişkili obezite, kalp hastalıkları, yüksek tansiyon, tip 2 diyabet ve kanser bu grubun önemli hastalıklarıdır [9, 10, 12, 13, 18].

Kompleks hastalıklar, tek gen hastalıklarına göre daha az kalıtım ile aktarılırlar. Örneğin, diyabetle yakından ilgili genler sadece %2–5 oranında aktarılır. Bu oran, ER stresi ile ilişkili tek gen hastalığı olan kistik fibroza göre oldukça düşüktür. Yani, tek gen hastalıklarında bir gendeki bozukluk hastalığın oluşmasından sorumlu iken kompleks hastalıklarda genler dışında kötü beslenme, zararlı kimyasallara maruz kalma gibi çevresel faktörler de önemlidir [57]. Tek bir gendeki bozukluk nedeniyle oluşan 10.000'den fazla hastalık vardır. Bu tek gen hastalıkları [unifaktöriyel ya da monogenik de denebilir] bir popülasyonda %1 sıklıkta görülür. Tek gen hastalıkları X'e bağlı hastalıklar, otozomal dominant geçişli ve otozomal resesif geçişli hastalıklar olarak sınıflandırılabilir [57]. Kistik fibroz, hemofili, çoğu endokrinopatiler, örneğin Tay-Sachs hastalığı ve çoğu nörodejeneratif hastalıklar, örneğin Huntington hastalığı, ER stresine ve UPR'a neden olan tek gen hastalıkları grubuna girer [13, 57].

1.5.2.1. İnsülin Direnci Sendromu

İnsülin direnci, tip 2 diyabet oluşumunun temel nedenlerinden biridir. Periferik insülin direncine pankreatik β hücrelerde, vücudun insülin ihtiyacını kapatmaya çalışırken insülin salınımında meydana gelen bozuklukların eklenmesi ile tip 2 diyabet oluşur.

Obezite, tip 2 diyabet gibi insülin direnci ile ilişkili metabolik hastalıklar, çevresel nedenlerin yanında genetik nedenler de barındırır. Örneğin leptin genindeki mutasyonlar obeziteye, leptin reseptöründe meydana gelen mutasyonlar tip 2 diyabete neden olur. Bu iki mutasyonu taşıyan bireylerde insülin direnci oluşumu görülür. İnsülin sinyal yolu, ER homeostazindeki ve hücrel redoks durumundaki değişimlere karşı çok hassastır. Obezitede artan FFA'lar ve TNF- α gibi inflamatuvar sitokinler JNK stres kinazları aktive ederek karaciğer ve yağ hücrelerinde insülin direncine neden olur. Obezitede inflamatuvar sitokin salınımının artması adipositlerde hücre içi stres olduğunu işaret eder. Hücre içi stresin önemli merkezlerinden biri ER'dur. Yapılan bir çalışma, obezitede hücre içi stresin kaynaklandığı yerin ER olduğunu göstermiştir. ER stresi, yukarıda da açıklandığı gibi, IRE-1 ER membran proteini aracılığı ile TNF- α reseptörlerinin ilişkili olduğu faktör 2 (TRAF2)'yi aktive ederek bir stres MAP kinaz sinyal akışını başlatır ve sonuçta JNK aktive olur. JNK'nın IRS1'i serin 307 bakiyesinde fosforile etmesi, IR tarafından tirozin bakiyelerinin fosforillenmesini azaltmaktadır. İnsülin sinyal yolunun hücre içi birinci basamağında gerçekleşen bu inhibisyon hücreyi insüline karşı tam olarak dirençli yapar [1, 4, 6, 7, 9, 47, 48].

UPR sinyal elemanı PERK'in kaybı, pankreatik β hücrelerinin prenatal kaybına yol açar. Bu bireylerde Wolcott-Rallison Sendromu denilen insülin bağımlı diyabet görülür. UPR sinyal yolunun uygun olarak çalışmamasından kaynaklanan pankreatik β hücrelerinin apoptozu, perifer dokuların insüline cevap vermemesi nedeni ile β hücrelerin, gelen insülin üretim ve salınım talebini karşılayamaması durumunda UPR'nin hücreleri apoptoza yönlendirmesinden dolayı da görülebilir. Bu durumda insülin direnci β hücre kaybına neden olur [10, 13, 50].

1.6. Tuberoz Sklerozis Kompleksi (TSC)

Tuberoz sklerozis (TSC), popülasyonda 6000-10000 bireyden 1'ini etkileyen, belirli bir etnik yatkınlığı olmayan, otozomal dominant geçişli bir tümör baskılayıcı gen sendromudur. TSC böbrek, kalp, beyin, deri ve diğer yaşamsal organlarda gelişen, hamartoma adı verilen tümör benzeri displastik lezyon yapılarıyla karakterizedir [15, 16, 17]. Kortikal tuberler, sub-ependimal nodüller, sub-ependimal dev hücre astrositomaları tuberoz sklerozun nörolojik hasarlarıdır ve zeka geriliğini, epilepsiyi, otizmi içeren en önemli klinik komplikasyonların nedenidirler. Bu hasarlar etkilenmiş bireylerin %50'sinden fazlasında meydana gelir ve çocuklar arasında birincil ölüm nedenidirler. Böbrek hasarları da çok yaygındır ve anjiyomiyolipoma olarak hastaların %80'inde görülür. Malign anjiyomiyolipomalar ve renal hücre karsinomaları az görülse de bu lezyonlar çok şiddetli olabilir ve çocukluk çağının erken dönemlerinde görülürler. Okuler, iskelet, gastrointestinal, hepatik sistemler ve dalak da sıklıkla hasara uğrar [15, 16].

Tuberoz skleroz, iki tümör baskılayıcı gende (*TSC1* ve *TSC2*) görülen mutasyonlar sonucu bu genlerin kodladığı TSC1/Hamartin ve TSC2/Tuberin proteinlerinin birlikte oluşturdukları tümör baskılayıcı kompleksin hücre büyüme mekanizmasının aktivitesini sınırlandırma işlevini yitirmesi nedeniyle oluşur [15, 58]. *TSC2* geni 16p13.3 kromozomal bölgesinde yer alır [58]. Bu gen 1993 yılında klonlanmıştır, 41 ekzondan oluşmaktadır ve 5.5 kb büyüklüğünde mRNA transkripti verir [3]. *TSC1* geni 9q34 kromozomal bölgesinde yer alır [58] ve 1997 yılında klonlanan bu gen 21 ekzondan oluşur [17]. Genin ürünü olan 8.6 kb büyüklüğündeki mRNA transkripti küçük bir 5' ve 4 kb büyüklüğünde bir 3' translasyona uğramayan bölgeler içerir [17].

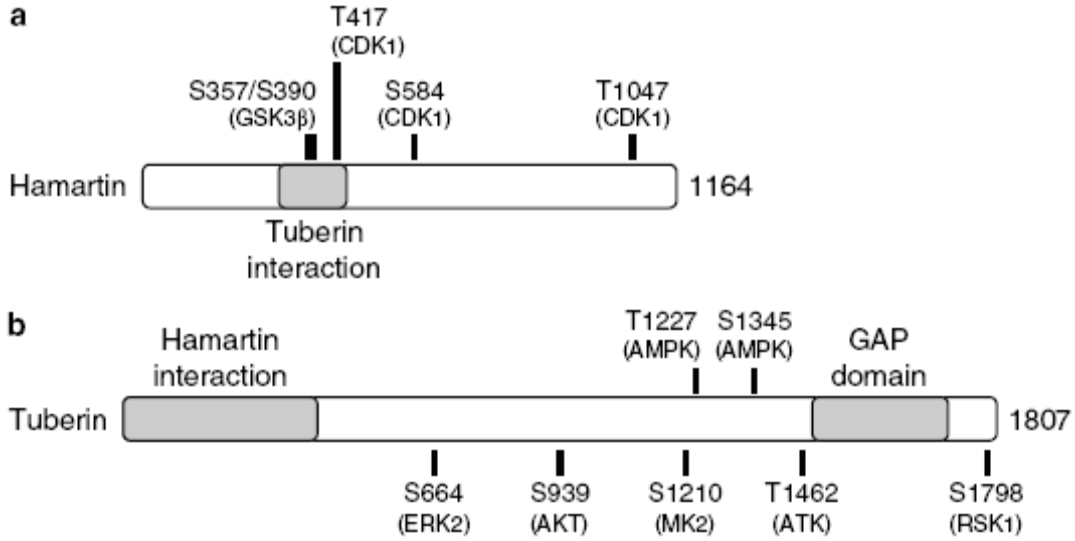
TSC, otozomal dominant geçiş gösteren genetik bir hastalık olmasına rağmen TSC hastalarının sadece %20'si bu hastalığı kalıtımla almışlardır. Hastaların geri kalan %80 gibi büyük bir bölümünde *TSC1* veya *TSC2* genlerinde *de novo* (sporadik) mutasyonlar görüldüğü rapor edilmiştir [17]. Bu grupta olan TSC hastaları, her bir somatik hücrelerinde *TSC1* veya *TSC2* gen mutasyonu taşımaktadırlar ve hastalarda oluşan TSC tümörlerinde “heterozigositenin kaybı” görülmüştür [58].

Bir aile hikayesi olmayan ve tümör baskılayıcı genlerin kaybı nedeniyle görülen tümörlerin oluşumu için Knudson'un ortaya attığı iki vuruşlu tümör baskılayıcı gen hipotezine göre hasta bireyler, her somatik hücrelerinde, tümör baskılayıcı gen allel çiftinin birinde meydana gelmiş olan germline mutasyonu taşırlar. Bu mutasyon, tümör baskılayıcı gene yapılan birinci vuruştur. İkinci vuruş, bireyin yaşam süresi içinde gerçekleşen sporadik, yani *de novo* bir mutasyonla ikinci allelin kaybına neden olur. Knudson hipotezine göre, tümör oluşumu için tümör baskılayıcı genin her iki allelinin kaybı gerekmektedir: Heterozigositenin kaybı-Loss of Heterozygosity [59].

TSC2 geni için, üç yüzden fazla germ line mutasyon rapor edilmiştir. Bunlar anlamsız, yanlış anlamlı, çerçeve kayması, delesyonlar, insersiyonlar, splice birleşme bölgesi mutasyonlarını içermektedir. *TSC2*'de en sık görülen mutasyonlar 611. ve 1675. kodonlardaki yanlış anlamlı değişiklikler ve 40. ekzonda 18 bp'lik çerçeve içi delesyondur. *TSC1* geni mutasyonlarının neredeyse tamamı ise anlamsız yada çerçeve kaymasıdır. Genotip-fenotip ilişkisi belirlenmemiş olsa da, *TSC1* mutasyonlu hastalar, *TSC2* mutasyonlulara göre, hastalıktan daha az şiddette etkilenirler [17].

1.6.1. TSC Protein Kompleksinin Düzenlenmesi

TSC1 ve *TSC2* genlerinin ürünleri, sırasıyla, TSC1/hamartin ve TSC2/tuberin proteinleridir. Hamartin ve tuberin bir heterodimer kompleks oluştururlar [15, 16, 17, 58]. TSC1, 1164 aminoasitten oluşur ve 130 kDa moleküler ağırlığındadır. TSC1'in 302.-430. aminoasitleri arasında TSC2 bağlanma bölgesi vardır. CDK1/cyclin B1 tarafından T417, S584 ve T1047, GSK3 β tarafından T357 ve T390 bakiyelerinden fosforillenir. TSC2, 1807 aminoasit uzunluğunda ve 200 kDa moleküler ağırlığındadır. TSC1 ile, 1.-418. aminoasitleri arasındaki bölgeden bağlanarak, kompleks oluşturur. C-terminal ucunda, Rheb spesifik GAP domaini vardır. Akt/PKB tarafından S939 ve T1462, MK2 tarafından S1210, RSK1 tarafından S1798, AMPK tarafından T1227 ve S1345, ERK/MAPK tarafından S664 bakiyelerinden fosforillenir (Şekil 1.8) [17].

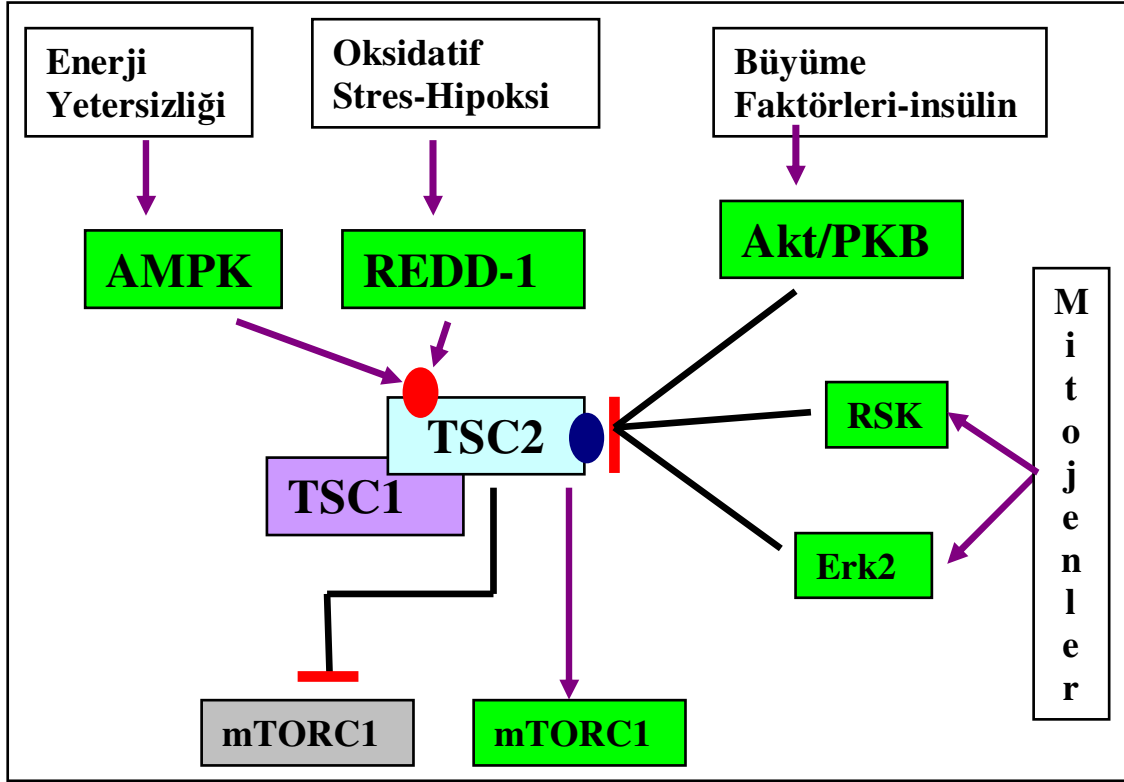


Şekil 1.8. TSC1/Hamartin ve TSC2/Tuberin tümör baskılayıcı proteinlerinin primer yapılarının ve fosforilasyon bölgelerinin şematik gösterimi [17].

TSC proteinleri transkripsiyon, nöronal farklılaşma, hücre adezyonu ve hücre büyümesi gibi çeşitli hücresel işlevlerin düzenlenmesinde rol oynamaktadırlar [17, 58]. TSC proteinlerinin fonksiyonlarına dair ilk ipuçları *Drosophila* ile yapılan çalışmalardan sağlanmıştır. *TSC1* ve *TSC2* genlerinin *Drosophila* homoloğu olan, sırasıyla, *dTsc1* ve *dTsc2* mutant hücreler, artan hücre ve organ boyutları göstermişlerdir [17]. TSC2 GTPaz aktive edici (GAP) domain içerir ve TSC1/TSC2 protein kompleksi, büyüme ve farklılaşma gibi hücrenin hayati kararlarının düzenlenmesinde çok önemli bir yeri olan, aşağıda ayrıntıları ile anlatılacak mTOR (Rapamisin'in hedefi olan memeli proteini) sinyal yolunun üst elemanı Rheb (Ras homolog enriched in brain)'in zayıf intrinzik GTPaz bölgesinin aktivasyonuna yol açar. GTPaz bölgesi aktive olan Rheb, GTP bağlı aktif formdan GDP bağlı inaktif forma döner ve mTOR sinyal yolunu aktive edemez hale gelir [15, 16, 17, 18, 58]. Böylelikle, hücre büyümesi ve farklılaşmasında negatif düzenleyici olarak hareket eder.

TSC1/TSC2 sitozolik [17] protein kompleksi; büyüme faktörleri, hipoksi ve hücresel enerji düzeyi gibi hücre içi ve hücre dışı sinyalleri toplama görevi olan bir sensör gibi çalışır (Şekil 1.9). TSC1/TSC2 kompleksi hipoksiyi REDD-1 yoluyla, hücre içi enerji değişimlerini AMPK enzimi aracılığı ile algılar ve aktive olur [60]. Bunun sonucunda mTOR sinyal yolunu

inaktive ederek protein sentezi, ribozom biyogenezi, hücre büyümesi, farklılaşması ve bölünmesi ile ilgili genlerin transkripsiyonu engellenmiş olur [15, 17, 58, 60].



Şekil 1.9. TSC1/2'yi kontrol altında tutan mekanizmalar. Enerji yetersizliği durumunda AMPK ve hipoksi gibi oksidatif stres koşullarında REDD-1, TSC2'yi fosforilleyerek aktive eder ve mTORC1'in baskılanması sağlanır. İnsülin gibi büyüme faktörleri varlığında Akt/PKB ve mitojenler varlığında 90 kDa ribozomal protein S6 kinaz (RSK) ve Erk2 TSC2'yi fosforilleyerek inaktive eder ve mTORC1'in aktive olması sağlanır.

TSC1/TSC2, mitojenik sinyaller ile aktive olan ERK2 tarafından tuberin'in S664 bakiyesinden fosforilasyonu sonucunda birbirlerinden ayrılırlar ve mTOR sinyal yolunu baskılama görevlerini yapamazlar [58, 60].

Hücre döngüsü kontrolü kontrol noktalarında, faz geçişleri CDK enzimleri ve cyclin'ler tarafından kontrol edilir. Bilinen iki CDK inhibitör protein ailesi mevcuttur: INK4 (p15, p16, p18, p19) CDK4 ve CDK6'yı, Cip/Kip protein ailesi (p21, p27, p57) birçok CDK çeşidini inhibe eder

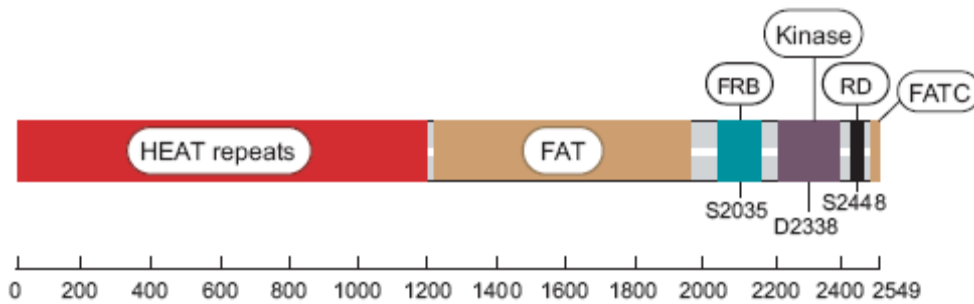
[58]. TSC1/TSC2'nin hücre döngüsü üzerindeki etkilerinin araştırıldığı çalışmaların sonucunda TSC2/tüberin'in p27 inhibitör proteinin stabilitesini etkilediği gösterilmiştir. TSC2/tüberin, p27 tümör baskılayıcı proteinine bağlanarak, p27'nin proteozomlar tarafından parçalanmasını önlemektedir [58]. p27'nin işlevini yerine getirebilmesi için nükleusa göç etmesi gerekmektedir. Yapılan bir çalışmada, TSC2-/- hücrelerde p27'nin hücre döngüsü üzerinde bir kontrolü olmadığı gösterilmiştir. Bu gösteriyor ki tüberin, sadece p27'yi degradasyondan korumamakta, aynı zamanda, şaperon gibi davranarak, doğru çalışma bölgesine transferinde ona eşlik etmektedir [58].

Bir büyüme faktörü olan insülin, reseptör tirozin kinaz (RTK) ailesine mensup, hücre yüzeyindeki reseptörüne bağlanır ve aktive eder. Böylece hücre içine sinyal akışı başlar. Yapılan bir genetik çalışmada, insülin sinyal yolunun bir elemanı olan Akt/PKB'nin TSC2'yi birkaç aminoasit bakiyesinden fosforile ettiği gösterilmiştir (S939, S981, S1130, S1132, T1462). Bu fosforilasyon bölgelerinden en önemlileri S939 ve T1462'dir. Bu bakiyeler fosforile olduklarında TSC1/TSC2 inaktive olmaktadır. Bunun sonucunda, Rheb-GTP aktif formundan GDP bağlı konuma geçemediği için mTOR aktif hale gelir. mTOR, hedefi olan S6K ve 4E-BP1 proteinlerini fosforilleyerek aktive eder. S6K, sinyali kendisine ulaştıran akışı başlatan protein olan IRS1 ve IRS2 proteinlerini fosforilleyerek negatif geri cevap yoluyla, insülin sinyal akışını düzenler. TSC1/TSC2'nin inaktive olması ile, mTOR sinyal yolu üzerinden, şapka-bağımlı mRNA translasyonu, ribozom biyogenezi, hücre boyutunun ve metabolizmanın düzenlenmesi işlemleri başlar [15-18, 58, 60].

1.7. TSC Tarafından Düzenlenen mTOR Protein Kompleksi

TOR (rapamisinin hedefi olan protein-target of rapamycin), hücre büyümesini, proliferasyonu ve hücre farklılaşmasını kontrol eden, buradan doğru ribozom biyogenezini, protein sentezini, hücreye besin alımını ve otofajiyi düzenleyen bir sinyal yolunun merkezinde yer alır [32, 36, 61, 62, 63].

Memelilerde mTOR (aynı zamanda FKBP12-rapamisin ilişkili protein (FRAP), rapamisinin ve FKBP12'nin hedefi olan protein (RAFT), rapamisinin hedefi (RAPT) olarak da bilinir) evrim süresince korunmuştur [32, 36, 61-64]. TOR, fosfatidil inozitol kinaz'la akraba protein kinaz (PIKK) ailesinin bir üyesidir. TOR'un karboksi-terminal bölgesi lipit kinazlarla yüksek homoloji göstermektedir, fakat TOR bir serin/treonin kinaz olarak aktivite göstermektedir. TOR, yapısal olarak birkaç protein-protein etkileşim bölgesi içerir. N-terminalde HEAT tekrar dizileri, arada FAT domain, FKBP12/FPR1-rapamisin kompleksinin bağlandığı FRB domaini, katalitik domain ve karboksil ucunda FATC domaininden oluşur (Şekil 1.10). Yapısında protein-protein etkileşim domainleri içermesinden anlaşılacağı gibi TOR, çoklu protein komplekslerinin bir parçasıdır [36, 62].



Şekil 1.10. mTOR'un primer yapısı ve içerdiği bölgeler. HEAT tekrar dizileri, FAT bölgesi, FRB: FKBP12 bağlanma bölgesi, Kinaz bölgesi, RD: Düzenleyici bölge, C-terminal FATC bölgesi [36].

TOR proteini yaklaşık olarak 280 kDa moleküler ağırlığındadır. Mayada, yapısal ve işlevsel olarak birbirinden farklı iki TOR kompleksi (TORC1 ve TORC2) tanımlanmıştır. TORC1; TOR1 veya TOR2, KOG1 ve LST8 proteinlerinden, TORC2; TOR2, AVO1, AVO2 ve

AVO3 proteinlerinin bir araya gelmesiyle oluşur [62]. Memelilerde bir çeşit TOR vardır. mTOR %42 oranında TOR1 ile, %45 oranında TOR2 ile homoloji göstermektedir [36]. mTOR, mayalarda olduğu gibi, başka memeli proteinleri ile etkileşerek birbirinden farklı yapı ve işlevlere sahip iki kompleks (mTORC1 ve mTORC2) oluşturur. mTORC1; mTOR, raptor ve mLST8/GβL proteinlerinin, mTORC2; mTOR, rictor/mAVO3, mLST8/GβL ve mSIN1 proteinlerinin bir araya gelmesi ile oluşur [32, 36, 51, 62, 63]. mTORC1 rapamisine duyarlıdır ve hücre büyümesini, proliferasyonu ve metabolizmayı, mRNA translasyonunda rol oynayan 4E-BP1 ve ribozomal protein S6 kinazların (S6K1 ve S6K2) mTOR aracılı fosforilasyonları yoluyla düzenler. mTORC2 rapamisin duyarlı değildir ve insülin sinyal yolunun bir elemanı olan Akt/PKB proteininin S473 fosforilasyonundan sorumludur [32, 36, 62, 63, 65, 66, 67].

1.7.1. mTOR Sinyal Yolunun Düzenlenmesi

Hücrelerin kendilerine özgü bir boyuta ulaşmaları için hücre büyümesi ve hücre bölünmesi olayları genelde birlikte yürür. Bunun dışında kalan, iki olayın birbirinden bağımsız yürüdüğü belirli durumlar da vardır. Örneğin; büyüme olmadan bölünme, erken dönemde embriyonik hücreler büyümeye başlamadan önce olur. Bölünme olmadan büyüme, immatur timositler gibi farklılaşma öncesi hücrelerde ve nöron ve kas hücreleri gibi farklılaşmış hücrelerde olur [62].

Her organın ve organizmanın, tüm hücrelerinin boyutları tarafından belirlenen karakteristik boyutları vardır. Böylelikle, hücre büyümesinin düzenlenmesi, organ boyutlarının doğru orantılı olmasını sağlayan bir vücut planı varlığını garantiler. Hücre büyümesinin düzenlenmesindeki arızalar ya kansere yada organ boyutlarında patolojik büyümeye (hipertrofi) veya küçülmeye (atrofi) neden olur [62].

Besin ve büyüme faktörlerinin varlığı gibi çevresel faktörler ve fiziksel faktörler hücre büyümesini tetikler. Fakat normal hücreler belirlenmiş bir boyuta ulaştıktan sonra, etrafta ne kadar çok dış uyaranlar olursa olsun, daha fazla büyüyemiyorlar. Bu, hücre büyümesini yöneten, hücre, organ ve organizma boyutlarını kontrol altında tutan bir genetik programın varlığını düşündürmektedir [62].

Mayalarda, karbon ve nitrojen gibi besinler büyüme uyarır. Yapılan çalışmalar TOR sinyal yolunun karbon ve nitrojen gibi uyarılara cevap verdiğini göstermiştir. TOR1 ve TOR2'nin yokluğunda veya rapamisin muamelesinden sonra hücreler besinsiz bir ortamda verdikleri cevapla aynı cevabı verirler yada G0 fazında dururlar. TOR sinyal yolu hipoksi ve hücre içi enerji durumuna göre de cevap verir. Hipoksi durumunda ya doğrudan REDD yoluyla yada dolaylı olarak AMP/ATP oranını etkileyerek AMPK yoluyla TSC1/TSC2 üzerinden TORC1 sinyal akışı başlar. Doğrudan TOR üzerinden mi ya da dolaylı olarak TSC1/TSC2 veya Rheb üzerinden mi bilinmemekle birlikte TORC1 amino asitlere de cevap vermektedir. Yakın zamanda yapılan bir çalışma, endozomal membran trafiğinde rol alan, sınıf III PI3K ailesinden olan Vps34 proteininin mTOR'un aminoasit uyarısına cevap vermesinde de rolü olabileceğini ileri sürmektedir [68]. Tüm bu uyarılara verilen cevaplar; protein sentezinin ve ribozom biyogenezinin azalması, ubiquitin bağımlı protein yıkımının ve otofajinin uyarılması, transkripsiyonda duruma özgü değişimler ve mRNA geri dönüşümünde artış olaylarını kapsar [32, 36, 62, 63].

TOR2'de oluşan arızalar hücre bölünmesine bağlı aktin hücre iskeleti polarizasyonunda hatalara neden olur. Polarize aktin hücre iskeleti, salgı yollarını ayarlar ve sonuç olarak, yeni sentezlenen protein ve lipidlerin maya hücresi yüzeyindeki büyüme veya bölünmekte olan tomurcuklanma bölgesine iletilmesini sağlar. TORC2, aktin hücre iskeleti polarizasyonunu ve böylece maya tomurcuklanmasını ve dışa doğru büyüme kontrol eder [62]. Bu sinyal yolu rapamisin bağımsızdır [36, 61-66]. Fakat yine de sürekli rapamisin muamelesi TOR2'yi bloke edebilir [63]. Bu durumda, Akt/PKB aktive olamayacağından TORC1, TSC1/TSC2 tarafından baskılanmaya devam edecektir ve sonuçta her iki kompleks de çalışmayacaktır.

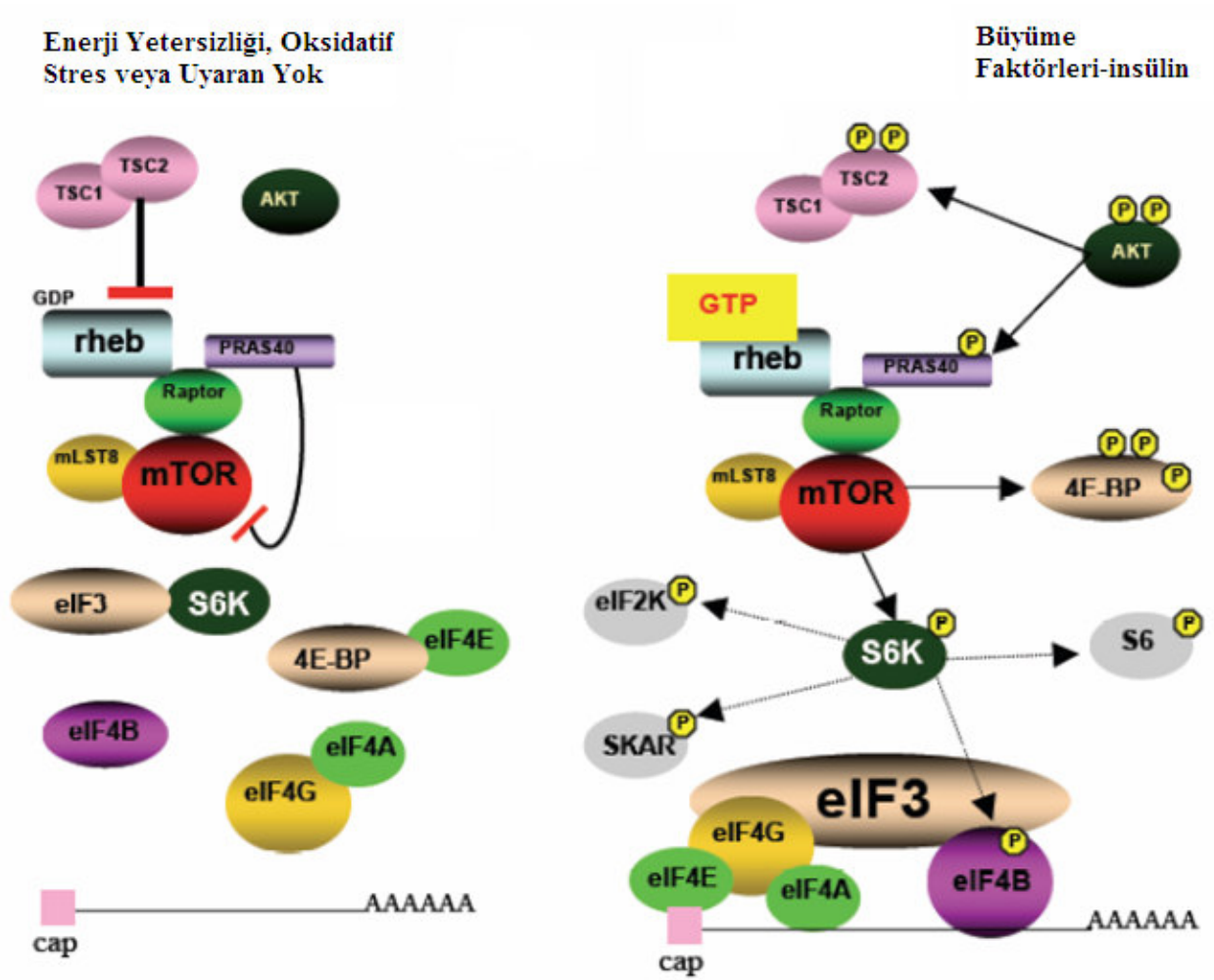
Memeli hücrelerinde, hücre büyümesi, bölünmesi ve farklılaşması olayları birçok besin ve büyüme faktörünün kombinasyonu ile uyarılır. mTOR, memeli hücrelerinde her iki uyarana da cevap verebilir. Büyüme faktör sinyal yolları MAPK ve PI3K üzerinden mTORC1'e ulaşırlar. MAPK/ERK, RSK'yi aktive ederek, PI3K ise Akt/PKB yoluyla TSC1/TSC2'yi fosforiller ve çalışmasını bloke eder. Böylece mTORC1 hücrenin büyümesi için gerekli koşulların mevcut

olduğu mesajını alarak aktive olur ve protein sentezi, ribozom biyogenezi gibi hücre büyümesine yönelik cevapları başlatır [32, 51, 62].

1.7.2. mTOR Sinyal Yolu

Memelilerde, mTOR birçok hücresel olayı düzenlemektedir. Bunlar arasında mRNA translasyonu, ribozom biyogenezi, otofaji ve besin cevabı mekanizmaları vardır [32, 36, 62, 63, 65-68]. Şimdiye kadar, CLIP-170, eEF2 kinaz, glikojen sentaz, HIF-1 α , 4E-BP1, PKC δ , PKC ϵ , lipin, PP2A, S6K1 ve S6K2, p21 ve p27 CDK inhibitörleri, Rb ve STAT3 gibi proteinler mTOR'un hedefi olarak belirlenmiştir. Bunlardan en iyi araştırılanları S6K1 ve 4E-BP1 proteinleridir (Şekil 1.11) [36, 51].

S6K1, çok önemli bir ribozomal protein S6 (rpS6 veya S6^{p70}) kinazdır. S6K ve fosforilleği rpS6, mTOR sinyal yolunun aktivite belirteçleri olarak kullanılırlar [32, 36]. Yapılan çalışmalarda, S6K'den yoksun *Drosophila*'ların vücut boyu ve hücre boyutu olarak kontrollerden daha küçük oldukları, TOR'dan yoksun *Drosophila*'ların da aynı sonucu verdiği ve S6K'nin aşırı ekspresyonunun durumu normale çevirdiği gösterilmiştir [69, 70]. Bu çalışma gösteriyor ki, S6K TOR sinyal yolunun bir parçasıdır ve TOR, S6K üzerinden hücre boyutunun kontrolünden sorumludur. S6K1'nin hücre boyutunu nasıl kontrol ettiği yeterince açık değildir. 5'TOP (tract of pyrimidines-pirimidin demeti) bölgesi içeren, hücrede yüksek miktarda bulunan mRNA translasyon kontrolü yoluyla etki ettiği düşünülüyordu fakat yeni çalışmalar bu öneriyi desteklememektedir [32, 36]. S6K1'i olmayan embriyonik kök hücrelerde mitojen sinyal varlığında veya aminoasit açlığında TOP mRNA'lar translasyona uğramaktadır. Ayrıca, S6K1'den yoksun bu hücrelerde rpS6 fosforile olmamaktadır. S6K1 ve rpS6'in TOP mRNA translasyonunun kontrolünde gerekli olmadığı gösterilse de, TOP mRNA translasyonunda birçok kontrol mekanizmasının rol alabileceği düşünülerek, bu iki proteinin görev yapmadıkları söylenemez [36]. S6K1'in, rpS6 dışında, substratı olarak tanımlanan proteinler; eEF2 kinaz ve eIF4B'dir [32].



Şekil 1.11. mTORC1 sinyal yolu. Enerji yetersizliği gibi stres durumlarında veya uyarı olmadığı durumlarda mTORC1 TSC1/2 protein kompleksi tarafından baskılanır ve protein sentezi önlenir. İnsülin gibi büyüme faktörleri veya bir mitojen varlığında Akt TSC2'yi fosforilleyerek mTORC1 üzerindeki baskının kalkmasını sağlar ve protein sentezi başlatılır [51].

4E-BP1, ilk olarak adipositlerde, insülin cevabında fosforilasyon artışına giden protein olarak tanımlanmıştır. Uyarılmamış hücrelerde proteinin görevi translasyonu baskılamaktır. Bu görevin inhibisyonu, mTOR'un şapka bağımlı mRNA translasyonu üzerindeki etkisine katkı sağlar. 4E-BP1, fosforile durumda değil iken, eIF-4E'ye bağlanır ve eIF-4G ile etkileşimine engel olarak şapka-bağımlı mRNA translasyonunu bloke eder. 4E-BP1'in mTORC1 tarafından fosforilasyonu ile eIF-4E, bağlı bulunduğu 4E-BP'ye olan afinitesini kaybeder ve eIF-4G'ye bağlanır ve şapka bağımlı mRNA translasyonu başlar [32, 36, 51].

TOR kinaz motifi, vezikül trafiğinde çok önemli olan PI3K ailesi proteinleri ile yakın homoloji göstermektedir. Henüz mTOR için lipit substratlar tanımlanmış değil, fakat, yapılan çalışmalarda TOR'un ve bazı regülatör proteinlerinin endozomal membranlarda ve hücre içi veziküllerin yüzeyinde lokalize olduklarının gösterilmesi, mTOR'un membran trafiğinde görev alabileceğini düşündürmüştür. TOR'un Rheb ile aktivasyonu, Rheb'i Golgi yada endozomal veziküllere hedefleyen özel farnesilasyon motifine bağlıdır. Ayrıca TSC1 ve TSC2, deterjan muamelesine dirençli lipit raftlarında veya kaveola'larda lokalize olurlar. En yeni bulgular, vezikül trafiğinde önemli, sınıf III PI3K proteini hVps34'ün mTOR'un besin cevabının düzenlenmesinde görev aldığını göstermektedir. Bu bulgular, TOR aktivasyonu için gerekli birkaç basamağın membran yüzeyinde gerçekleştiğini gösterir [36, 63, 66, 68].

ATP'nin yüksek Km değeri nedeni ile mTOR'un hücre içi ATP miktarına göre enerji ihtiyacına cevap verebileceğini düşündürmüştür. ATP'nin konsantrasyon değişim aralığı çok küçüktür. Birçok durumda ATP konsantrasyonlarının mTOR'un Km değerinden [~ 1 mM] daha yüksek olduğunun anlaşılması, ATP'deki küçük değişimlerin mTOR'un kinaz aktivitesini etkileyeceği ihtimalini geçersiz kılmıştır. Buna karşın, metabolik ihtiyacın artması ile AMP konsantrasyonunda anlamlı bir artış olur. Bu, AMP'yi ATP'den daha iyi bir enerji sensörü yapar. Artan AMP, glikojenoliz ve glukoz alımı gibi enerji üreten yolları aktive ederken, protein sentezi gibi çok enerji harcayan yolların baskılanmasına neden olur. AMP, bu etkilerinin çoğunu AMPK aracılığı ile yürütür. AMPK aktivasyonu 4E-BP1 fosforilasyonunda azalmaya, S6K1 aktivasyonunun inhibisyonuna neden olur. Rapamisine dirençli S6K, AMPK aktivasyonu sonucunda inhibe olmamaktadır. Bu sonuç, AMPK'nın etkisini mTOR yoluyla ilettiğini göstermektedir. Yakın zamanda yapılan çalışmalar AMPK'nın mTOR'u TSC1/TSC2 yoluyla baskıladığını göstermektedir [36].

Büyüme faktörleri, PI3K veya MAPK/ERK üzerinden hücre büyümesi ve bununla ilgili olan protein sentezi, ribozom biyogenezi gibi sinyallerini mTOR yoluyla iletirler. Bu sinyal akışında PI3K'ye kadar olan ilk basamaklar, insülin ve diğer lipit kinaz aktive edici hormon ve büyüme faktörleri için farklıdır fakat sonraki basamaklar ortaktır. Forbol esterler gibi mitojenik sinyallerin akışı MAPK üzerinden RSK yoluyla mTOR'a iletilir [32, 36, 63, 65, 67, 71].

İnsülin, hedef hücre yüzeyinde bulunan ve reseptör tirozin kinaz ailesine ait tetramerik bir transmembran proteini olan insülin/insülin benzeri büyüme faktörü 1 reseptörüne (IR/IGF-1R) bağlanır ve konformasyonel değişikliğe neden olarak sitoplazmik tirozin kinaz bölgesinin aktivasyonu ile otofosforilasyonuna neden olur. Reseptörün tirozin bakiyelerinin fosforilasyonu IRS1'in reseptörle ilişki kurmasını ve tirozin bakiyelerinin fosforilasyonunu sağlar. PI3K'nın regülör altbirimi p85, IR ile ilişki içindeki IRS1'e bağlanarak katalitik altbirim p110'u aktive eder ve PI2P (fosfoinositid 3,4 fosfat)'yi fosforiller ve PI3P oluşur. PI3P, PDK'yı aktive eder ve PDK, Akt/PKB'yi fosforiller. Aktive olan Akt, TSC1/TSC2 kompleksinde TSC2'yi fosforilleyerek kompleksi inaktive eder. TSC kompleksi aktif olduğu zaman, içerdiği GAP bölgesi ile, hedefi olan Rheb'in GTP bağlı aktif formdan, GDP bağlı inaktif forma geçmesini sağlar. TSC kompleksi, insülin veya diğer büyüme faktörleri aracılığı ile aktif olan Akt ile fosforile olup inaktif tutulduğunda Rheb-GTP aktif proteini, mTORC1 kompleksini aktive ederek S6K1 ve 4E-BP1 gibi aşağı sinyal elemanlarının fosforilasyonunu uyarır [15-18, 32, 36, 58, 60-63, 66, 67].

mTORC1'in oksijen cevabı da TSC1/TSC2 kompleksini gerektirir. Fakat bu cevap, büyüme faktörlerinden yada enerji cevabından farklı yukarı sinyal elemanları ile iletilir. Hipoksi drumunun teşvik ettiği faktör (HIF)-bağımlı REDD1 ve REDD2 ekspresyonu sonucu TSC kompleksi aktive edilir ve mTORC1 sinyal yolu baskılanır.

mTORC2, yukarıda değinildiği gibi, mTOR, rictor/mAVO3, mLST8/GβL ve mSIN4 proteinlerinin oluşturduğu, mTORC1'den farklı olarak, rapamisine dirençli bir komplekstir. mTORC1'in herhangi bir bileşenin knockdown edilmesi S6K1 fosforilasyonunu azaltırken, mTORC2 bileşeni olan rictor'un knockdown edilmesi S6K1 fosforilasyonunu etkilememektedir. mTORC2'nin herhangi bir komponentinin yokluğu hücre morfolojisinde ve adezyonunda değişmelere yol açar. Raptor'un yokluğu hücre morfolojisini çok az etkilemektedir. mTORC2, hücre morfolojisini, PKCα ve Rho proteinleri aracılı bilinmeyen bir mekanizma ile aktin hücre iskeleti polimerizasyonunu düzenleyerek etkiler [32, 71].

mTORC1'in yukarı sinyal elemanı olan, TSC1/TSC2 kompleksini baskılayarak, dolaylı olarak mTORC1'i uyaran Akt'nin mTORC2 tarafından fosforillendiği gösterilmiştir. Akt'nin tam aktivasyonu için önce PDK1 tarafından aktivasyon bölgesindeki T308 bakiyesinden, sonra bir başka kinaz olan ve PDK2 olarak düşünülen protein tarafından karboksi terminal hidrofobik bölgesindeki S473 bakiyesinden fosforillenmesi gerekir. Rictor'un yokluğu, memeli ve Drosophila hücrelerinde, Akt fosforilasyonunda azalmaya neden olmuştur. İmmünopresipite edilen mTOR ile yapılan kinaz assay çalışmaları, mTORC2'nin Akt S473 bakiyesinden fosforile ettiğine dair doğrudan bir biyokimyasal kanıt oluşturmuştur [32, 71].

1.8. TSC Eksikliği, İnsülin Direnci ve ER Stresi: Konu ile İlgili Çalışmalar

Tuberoz sklerozis kompleks 2 (TSC2), memelilerde, Akt'ın fosforilasyon tanıma dizisine karşı üretilen bir antikör yardımıyla, substratlarının tarandığı bir çalışmada insülin sinyal yolunda yerini almıştır. Akt TSC2'yi birçok bakiyesinde fosforiller. TSC2 S939 ve T1462 fosforilasyon bölgeleri TSC1/2 kompleksinin aktivasyonunun bloke edilmesinde önemlidirler. İnsülin uyarımı, TSC1/2 kompleksini Akt yoluyla bloke eder [72].

TSC2, C-terminalinde barındırdığı GAP bölgesi ile, mTOR'un aktivasyonunu kontrol eden küçük G proteini Rheb'in aktivasyonunu kontrol altında tutar. Akt yoluyla TSC2'nin fosforilasyonu, Rheb üzerindeki GAP aktivitesini engellediğinden, insülin uyarımı sonrası Rheb'in aktif, GTP bağlı formunda artış olur ve mTORC1'i aktive eder. Aktive olan mTORC1 aşağı sinyal elemanlarını, S6K1/2 ve 4E-BP1'i fosforillerek aktive eder. Böylece insülin, mTOR yoluyla translasyonel kontrolü ve hücre büyümesini yönlendirir [73].

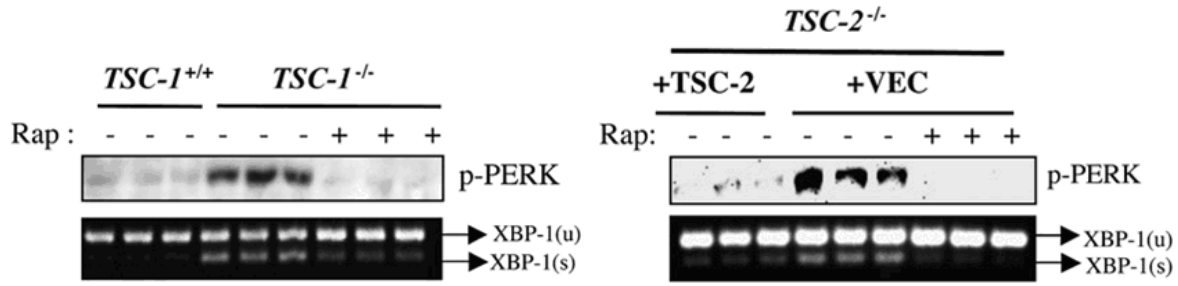
TSC yetersizliği, post reseptör sinyal yollarının IRS seviyesinde düzenlenmesini içeren çok şiddetli insülin ve IGF direncine neden olmaktadır. TSC1 veya TSC2 eksik hücreler, artan mTOR ve S6K1 aktivasyonu gösterirler. TSC1/2 eksik hücreler, rapamisin muamelesi ile mTOR'un inhibisyonu sonrasında S6K1 ve 4E-BP1 fosforilasyonlarında azalma göstermenin yanında IRS1 ve IRS'nin serin fosforilasyonlarında azalma, tirozin fosforilasyonlarında artma göstermekte ve Akt'nin insüline duyarlılığı artmaktadır. Kısa dönemde (1 saat), insan IRS

Ser307'nin fosforilasyonu S6K1 ve/veya S6K2 tarafından yapılmaktadır. IRS1 ve IRS2 Ser307, PTB bölgesinde yer alır. IRS1 ve IRS2'nin her ikisi, aktive IR üzerindeki fosfoY960 bakiyesine bu bölgeden bağlanır. Ser307 fosforillenince, bu bağlanma, dolayısı ile IRS'lerin aktivasyonu engellenmekte ve insülin direnci oluşmaktadır. Serin fosforilasyonlarının yanında, TSC eksik hücrelerde IRS mRNA ve protein seviyelerinde azalma gözlenmiştir [18].

Tuberoz sklerozis eksikliği mTOR sinyal yolunu aktive ederek S6K yoluyla insülin direncine ve ribozomal biyogeneze, 4E-BP1 yoluyla artan protein sentezine neden olur [15, 16]. Hücrelerde kontrolsüz protein sentezi ve besin varlığındaki algılamada hatalardan kaynaklanan enerji yetersizliği ER'un işlevinin bozulması ile yani ER stresi ile sonuçlanır. Yakın zamandaki çalışmalar, metabolik talebin artmasının ER stresi yoluyla insülin direncine neden olduğunu göstermiştir [9]. ER stres yoluyla insülin direncinin temel mekanizmasının IRE-1'in aktive ettiği JNK'nın IRS1 ve IRS2'yi Ser307 bakilelerinden fosforillemesi, sonuçta, aktif IR tarafından tirozin bakiyelerinin fosforilasyonunun engellenmesi olduğu gösterilmiştir [9].

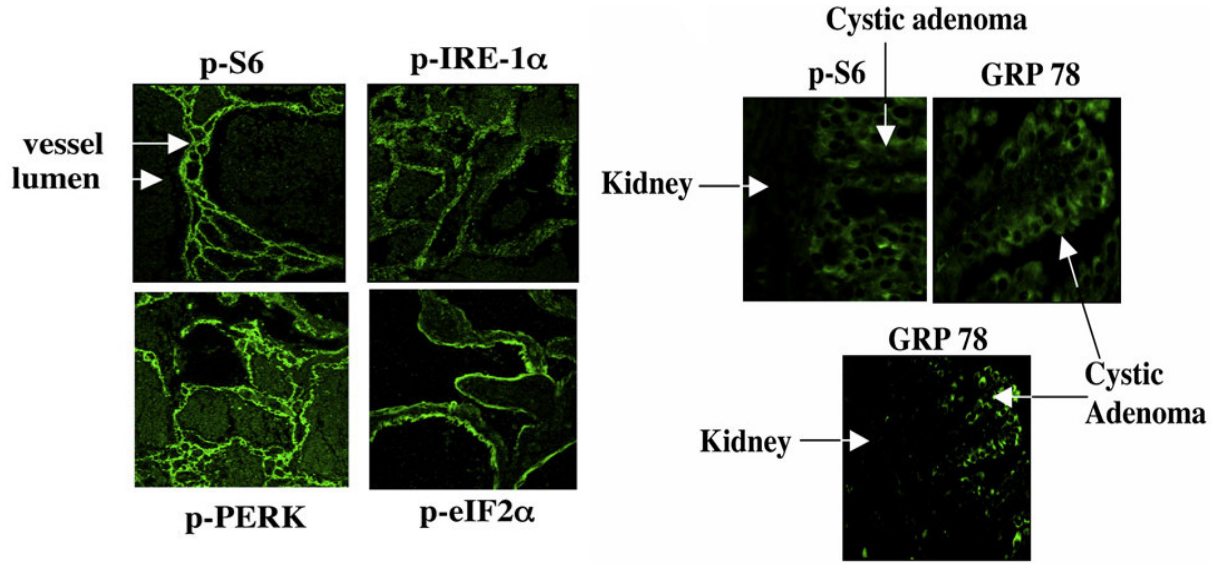
Bu ilişkiden yola çıkarak, TSC yetersizliğinden kaynaklanan kontrolsüz mTORC1 sinyal aktivasyonu ER stresine neden olabileceği düşünülmüş ve oluşan ER stresin TSC eksik hücrelerde görülen insülin direncinin oluşumunda rol alabileceği ortaya atılmıştır [18].

Tez çalışmasının yapıldığı laboratuardaki ekip tarafından yapılan çalışmada, TSC1-/- ve TSC2-/- MEF hücre hatları kullanılmıştır. Kullanılan hücre hatlarında ER stresi oluşup oluşmadığının anlaşılması için ER stresi belirteci olarak PERK Thr 980 fosforilasyonuna bakılmış. Bu hücrelerde PERK Thr980 fosforilasyonu kontrol hücrelere göre anlamlı bir artış göstermiştir. Ayrıca her ükü hücre hattında XBP-1s mRNA seviyesi kontrol hücrelere göre daha fazla olarak gözlenmiştir (Şekil 1.12). Bu, ER stresinin uyardığı UPR'nin IRE-1 kolunun da TSC1/2 eksik hücrelerde aktif olduğunu göstermektedir [18].



Şekil 1.12. *TSC1*^{-/-} ve *TSC2*^{-/-} MEF hücrelerinde ER stresi belirteci p-PERK seviyeleri TSC allellerinden herhangi birinin yokluğu ER stresi ile sonuçlandığını gösterir. XBP-1s'nin, ER stresi görülen hücrelerde artması bu hücrelerde UPR'nin IRE-1 kolunun da aktif olduğu anlamına gelmektedir. Bu hücrelerde görülen ER stresi rapamisin uygulaması ile azalmaktadır [18].

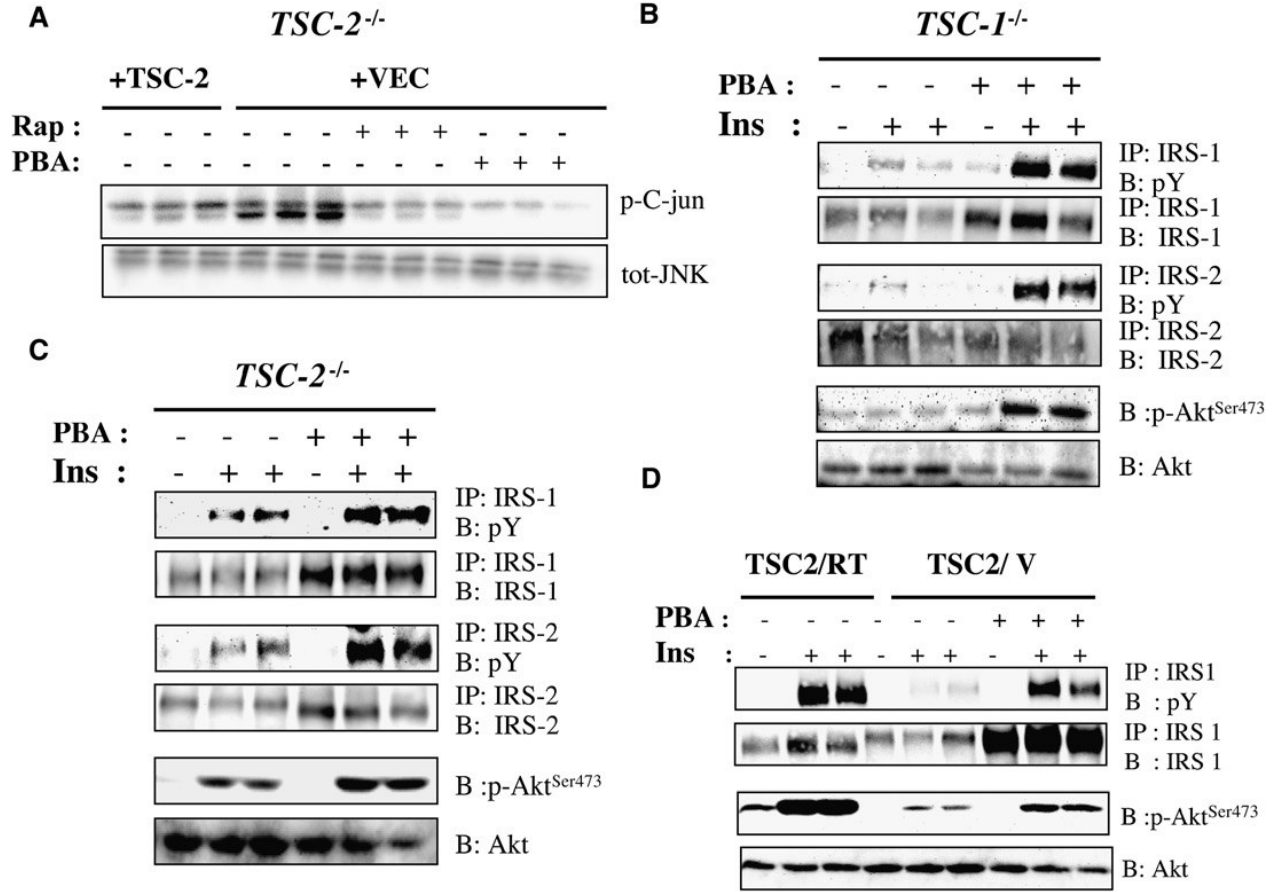
Bu çalışmada, TSC eksikliğinde UPR sinyal yolu elemanlarının fosforilasyonu *in vivo* düzeyinde de incelenmiştir. *TSC2*^{+/-} (heterozigot) farelerde oluşan hemanjiyomlardan ve böbrek kistik adenomlardan alınan doku örneklerinin her ikisinde p-S6 seviyesinde artış olduğu gösterilmiştir. S6 fosforilasyon seviyesindeki artış, mTORC1 sinyal yolunun bu dokularda aktif olduğunu göstermektedir. ER stresi belirteci olarak UPR sinyal elemanları PERK, IRE-1 α ve eIF2 α 'nın fosforile formları hemanjiyomlarda, tümörün etrafını saran dokulara göre daha fazla immünoreaksiyon göstermiştir. Kistik adenomlarda GRP78'in göstrediği, adenomun etrafını saran normal dokuya göre artmış immünoreaksiyon bu dokularda *in vivo* ER stresi görüldüğünü kanıtlamaktadır (Şekil 1.13) [18].



Şekil 1.13. TSC2^{+/-} farelerde hemanjiyom (sağ) ve böbrek adenomları (sol) gelişmektedir. Hemanjiyom ve böbrek kistik adenomlarından alınan doku örneklerinde mTORC1 sinyal yolunun aktif olduğu p-S6 ile gösterilmiştir. Hemanjiyomlarda ER stresi varlığı p-IRE-1 α , p-PERK ve p-eIF2 α ER stresi belirteçlerinin, kistik adenomda ER stresi varlığı, ER lümenal şaperonu GRP78 ER stresi belirtecinin immüno Floresan boyamaları ile gösterilmiştir [18].

TSC eksik hücrelerde ER stresin varlığının gösterilmesinin ardından, bu hücrelerdeki insülin direncinin ER stresinden kaynaklanıp kaynaklanmadığı sorusuna yanıt aranmıştır. ER stresi, IRE-1 tarafından aktive edilen JNK enziminin IRS1 ve IRS2'yi S307 pozisyonunda fosforile etmesi ile insülin direncine neden olur. Bu çalışmada TSC2^{-/-} hücrelerde JNK aktivasyonunun kontrol hücrelere göre daha fazla olduğu görülmüş. Önceki yıllarda yapılan bir çalışmada PBA kimyasal şaperonunun ER stresi azalttığı gösterilmişti. Bu çalışmada hücrelerin PBA ile yada mTORC1 sinyal yolunu inhibe eden rapamisin ile muamelesinden sonra JNK aktivasyonunda azalma gözlenmiş. TSC eksik hücrelerde gözlenen insülin duyarsızlığının bu hücrelerde uyarılan ER stresi ile ilişkisinin araştırılması için hücreler PBA ile muamele edilmiş ve TSC eksik hücrelerde insülin sinyal yolu elemanlarının fosforilasyon seviyeleri incelenmiştir. TSC1^{-/-} ve TSC2^{-/-} MEF hücrelerde insülin uyarımlı IRS1, IRS2 ve Akt Ser 473

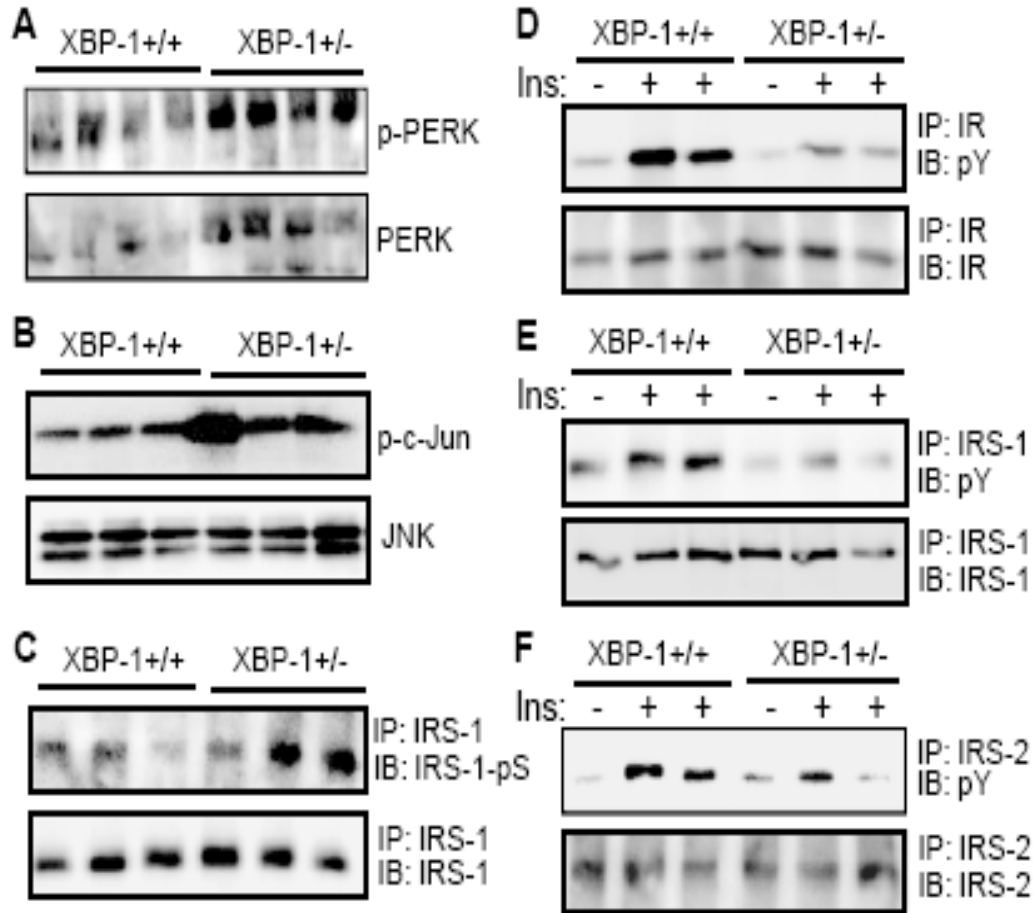
fosforilasyonlarında anlamlı artış olduğu gösterilmiştir (Şekil 1.14). Buradan anlaşılıyor ki, TSC eksik hücrelerde görülen insülin duyarsızlığı, oluşan ER stresi ile doğrudan ilişkilidir [18].



Şekil 1.14. TSC1^{-/-} ve TSC2^{-/-} MEF hücrelerinde insülin direnci gelişiminde UPR'nin rolü. A) TSC2^{-/-} hücrelerin TSC2 ekspresyon vektörü veya kontrol vektörü ile enfeksiyonu sonrasında rapamisin ve PBA uygulamalarına bağlı JNK aktivasyonu. B ve C) TSC1^{-/-} ve TSC2^{-/-} MEF'lerde PBA muamelesi sonrasında insülin uyarımlı IRS1 ve IRS2 tirozin fosforilasyonları, Akt Ser473 fosforilasyonu artmaktadır. D) TSC2^{-/-} MEF'lerde PBA uygulaması sonrası artan IRS1 ve Akt fosforilasyonlarının TSC2 eksprese eden MEF hücreleri ile karşılaştırılması [18].

Önceki yıllarda yapılan bir çalışmada XBP-1'nin ER stresini azalttığı ve XBP-1 eksprese eden dokularda insülin hassasiyetinin arttığı gösterilmiştir. Yüksek yağ diyeti (HFD) ile beslenen XBP-1^{+/-} ve XBP-1^{+/+} farelerin karaciğer dokuları incelendiğinde ER stresi belirteci PERK fosforilasyonunun, JNK aktivasyonunun ve IRS-1'in Ser307 fosforilasyonunun XBP^{+/-} farelerde

kontrol farelerine göre arttığı, insülin sinyal elemanları IR, IR1 ve IR2'nin insülin uyarımlı tirozin fosforilasyonlarının XBP-1^{+/-} farelerde, kontrol farelerine göre azaldığı gösterilmiştir (Şekil 1.15). *in vivo* koşullarda XBP-1s ER stresinin azalmasını, dolayısı ile insülin hassasiyetinin artmasını sağlayabilmektedir [9, 13].



Şekil 1.15. XBP-1^{+/-} farelerde ER stresi ve insülin sinyal iletimi. 16 hafta HFD ile beslenmiş XBP-1^{+/-} ve XBP-1^{+/+} farelerin karaciğer dokularında A) ER stresi belirteci PERK fosforilasyon seviyeleri, B) JNK aktivitesi, C) IRS-1 Ser307 fosforilasyon seviyeleri, portal ven'den enjekte edilen insülin (1 U/kg) uyarımlı D, E, F) IR, IRS-1 ve IRS-2 tirozin fosforilasyonları. XBP-1^{+/-} farelerde görülen ER stresine JNK aktivasyonu ve IRS Ser307 fosforilasyonunda artış ve insülin uyarımlı IR, IRS1 ve IRS2 tirozin fosforilasyonlarında azalma eşlik etmektedir [9].

Bu verilere dayanarak, TSC eksikliğinde XBP-1s'nin insülin hassasiyetini düzeltebileceği hipotezi ortaya atıldı. TSC eksikliğinde görülen insülin direncinin ER stresine bağlı olduğunu gösteren çalışmada, TSC2-/- MEF hücrelerde XBP-1s'nin aşırı ekspresyonunun insülin hassasiyetini, IRS1 tirozin fosforilasyonunu ve Akt Ser473 fosforilasyonunu artırarak iyileştirdiği gösterilmiştir [18]. Hipotezi doğrulamak amacı ile TSC2-/- MEF hücreleri, XBP-1s adenovirüs vektör sistemi ile enfekte edildi ve sonrasında hücreler insülin ile uyarılarak IRS1'in insülin uyarımlı tirozin fosforilasyon değişimini tekrar göstermek ve diğer insülin sinyal yolu elemanları IR ve IRS2'nin tirozin fosforilasyon düzeylerini incelemek amaçlanmıştır. XBP-1s'nin mTOR sinyal yolunun S6K kolunu inaktive edip etmediği sorusuna cevap bulmak amacı ile mTOR sinyal yolunun bir elemanı olan ribozomal S6 proteininin serin 235/236 fosforilasyonuna bakıldı.

2.MATERYAL ve YÖNTEM

2.1.Materyal

2.1.1. Kullanılan Biyokimyasal Maddeler

DMEM, Fetal Bovin Serum, Penisilin/Streptomisin (Gibco, GrandIsland, NY), 10X Trypsin-EDTA, Tris-HCl, EDTA, EGTA, APS, TEMED, PMSF, NaCl, NaVO₄, Na₄P₂O₇, NaF, NP-40, Glisin, SDS, Tween-20, Gliserol, BSA, β-mercaptoethanol, BPB, İnsülin (Sigma, St. Louis, MO), Acrylamide bis (Bio-Rad), Aprotinin, Leupeptin, Okadaic acid, Protein-A sepharose, anti-Tuberin/TSC2 antibody (# 3612, rabbit, Cell Signaling Technology, Beverly, MA), anti-XBP-1s antibody, anti-IRβ (sc-711, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), anti-IRS1 ve anti-IRS2 antikorları (Upstate Biotechnology, Charlottesville, VA), anti-fosfoTirozin antikoru (sc-7020, Mouse monoclonal, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) anti-fosfoS6 antikoru (# 22115, lot:8, rabbit, Cell Signaling Technology, Beverly, MA), anti-mouse IgG-HRP (sc-2055, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), anti-rabbit IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), BM Chemiluminescence blotlama substratı (POD) (Roche Diagnostics Inc., Indianapolis, IN)

2.1.2. Kullanılan Kimyasal Solüsyonlar

DMEM besiyeri: 500 ml DMEM (+4,5 g/L D-Glucose + L-Glutamine – Sodium Pyruvate) + %10 FBS + %1 P/S

Hücre Lizis Tamponu (CLB): 25 ml/L 1 M Tris-HCl (pH 7.4), 0.368 g/L (2 mM) NaVO₄, 100 ml/L 100 mM NaF (son konsantrasyon 10 mM), 4.468 g/L (10 mM) Na₄P₂O₇, 0.380 g/L (1 mM) EGTA, 0.372 g/L (1 mM) EDTA, 10 ml/L NP-40 (%1), 5 µg/ml leupeptin, 5 µg/ml aprotinin, 10 nM okadaic acid, 1 mM PMSF

5X Laemlie Tamponu: 30 ml 1 M Tris (pH 6.8), 50 ml Gliserol, 20 ml β -merkaptoetanol, 10 g SDS, 1 ml (0.05 g) BPB (%1)

3X Ayırma Tamponu: 750 ml 1.5 M Tris (pH 8.8), 30 ml %10'luk SDS, 1 L'ye dH₂O ile tamamlanır.

2X Paketleme Tamponu: 250 ml 1 M Tris (pH 6.8), 20 ml %10'luk SDS, 1 L'ye dH₂O ile tamamlanır.

5X Yürütme Tamponu: 30.3 g Tris, 142.5 g Glisin, 5 g SDS (%20'lik SDS'ten 25 ml), 2.92 g EDTA, 1 L'ye dH₂O ile tamamlanır.

5X Transfer Tamponu: 86.4 g Glisin, 15.4 g Tris, 1 g SDS (%20'lik SDS'ten 5 mL), 1 L'ye dH₂O ile tamamlanır.

1X Membran Arındırma Tamponu: 45 ml 1X TBS (pH 7.5), 5 mL %20'lik SDS, 252,5 μ L β -merkaptoetanol

1X TBS: 1.2 g Tris, 8.75 g NaCl, 0.3 g EDTA, pH 7.5'e ayarlanarak 1 L'ye dH₂O ile tamamlanır.

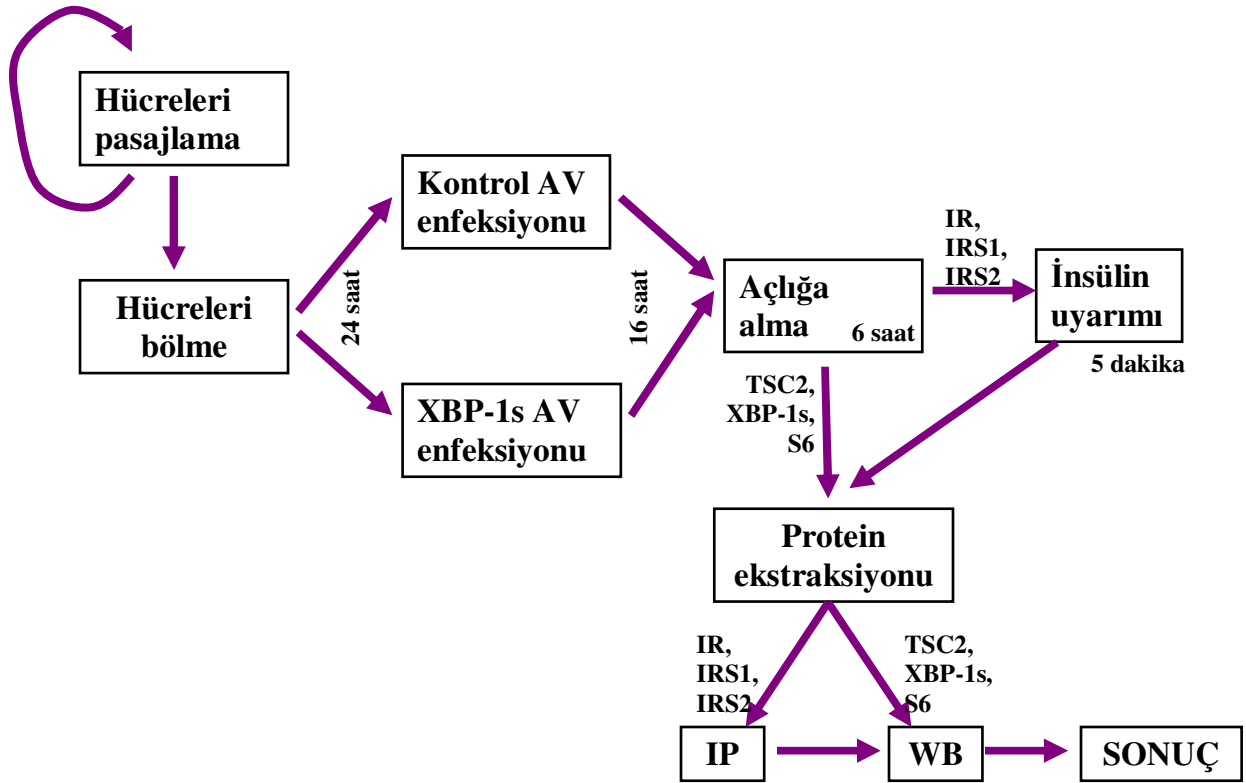
5X TBS-T: 6 g Tris, 43.9 g NaCl, 1.5 g EDTA, 5 ml Tween-20, pH 7.4'e ayarlanarak 1 L'ye dH₂O ile tamamlanır.

2.1.3. Kullanılan Cihazlar ve Diğer Malzemeler

2-1000 μ l Mikropipetörler ve uçları, 25-200 μ l Multi pipetörler (Gilson), Buzdolabı (+4°C , -20°C ve -80°C dondurucu), Sıvı azot tankı, Manyetik karıştırıcı, Shaker, Vorteks (VWR), Pipet tabancası, ELISA plakları, 15 ml ve 50 ml Santrifüj tüpleri, Petri kapları, Beher, Buz kapları, Cam pipet, Laminar Flow Cihazı-Hood, CO₂ inkübatör, Santrifuj cihazı (Eppendorf), Hassas Tartı, Router, pH metre, Spektrofotometre, İvert Mikroskop, Western Blotlama aparatları, Güç sağlayıcı, Western Blot Film Kaseti (Bio-Rad), Film Developer (Kodak)

2.2.Yöntem

Uygulanan protokoller, konu ile ilgili yapılan çalışmalarda belirtilen protokollerden modifiye edilmiştir [9, 18].



Şekil 2.1. Tez çalışmasında belirlenen deney düzeninin ve uygulanan yöntemlerin şematik gösterimi.

2.2.1. Hücre Kültürü

Deneylerde kullanılan TSC2^{-/-} ve TSC2^{+/+} fare embriyonik fibroblast (MEF) hücre hatları David J. Kwiatkowski (Boston, MA, USA) tarafından sağlanmıştır.

2.2.1.1. Alt Kültürleme

Pek çok hayvan hücre hattı plastik ya da cam yüzeye yapışarak, tek bir hücre tabakası oluşturacak şekilde büyür. Yüzey hücrelerle tam olarak kaplandığında (confluent culture) büyüme önce yavaşlar, sonra durur. Hücrelerin büyümeye devam etmesi için düzenli aralıklarla alt kültürleme (subculturing) yapılması gerekir. Alt kültürleme, hücre-hücre ve hücre-substrat arasındaki bağların tripsin, dispaz ya da kollagenaz gibi proteolitik enzimlerle kırılmasını gerektirir. Birbirlerinden ve tutundukları yüzeyden ayrılmış hücreler sayılır, istenilen dilüsyon yapılarak taze besi yeri içeren yeni kültür kabına (flask, petri kabı vs.) alınır. Yeni kültür kabında hücreler önce substrata tutunur, sonra büyümeye ve bölünmeye başlar. Başlangıçtaki inokulasyon miktarına, kültür koşullarına ve hücre hattına bağlı olan inkübasyon zamanının sonunda kültür, yeniden konfluent hale gelir ve alt kültürleme (pasaj) tekrarlanır.

Çalışmada konfluent haldeki kültürler için rutin olarak yapılan alt kültürlemede izlenen protokol şu şekildedir:

- 1) Kültürdeki besi yeri uzaklaştırılır,
- 2) Hücreler 1X tripsin-EDTA ile muamele edilir ve 37°C, % 5 CO₂ inkübatöründe hücreler yüzeyden ayrılana kadar, 5-6 dakika inkübe edilir,
- 3) Taze besi yeri kullanılarak enzimatik reaksiyon durdurulur ve hücre süspansiyonu falkon tüplere alınır (harvesting; toplama),
- 4) 1000 rpm'de, 4.5 dakika santrifüj edilir,
- 5) Süpernatant uzaklaştırılır,
- 6) Pellet, TSC2-/- ve WT MEF hücre hatlarının büyüme eğrileri dikkate alınarak belirlenen dilüsyon oranlarında, besiyerinde çözülür,
- 7) 162 mm² flasklara 19 ml besiyeri koyulduktan sonra her hücre tipinden 1 ml alınıp kendi flasklarına ilave edilir.
- 8) Hücreler % 5 CO₂, % 95 hava içeriğine sahip, nemli CO₂ inkübatöründe, 37°C'de büyütülür,
- 9) Pasajlama (alt kültürleme) hücreler %75 konfluensiye ulaştığında tekrarlanır.

Rutin pasajlama deney planı oluşturulana kadar ve deney devam ederken, hücrelerin devamlılığını sağlamak için uygulanır. Deney planlandıktan sonra, düzeneğe uygun olarak hücreler grup tekrar sayısı kadar 10 cm'lik hücre petri kaplarına pasajlanır. Ayrıca hücre hattının devamı için, rutin pasajlama protokolünün 7., 8. ve 9. basamakları tekrarlanır.

2.2.1.2. XBP-1s ve Kontrol Adenovirus Enfeksiyonu

- 1) Hücreler deney düzeneğine uygun olarak pasajlandı ve %5 CO₂ inkübatöre kaldırıldı.
- 2) Hücreler pasajlandıktan 24 saat sonra mevcut besiyeri uzaklaştırılarak XBP-1s (veya kontrol) adenovirusları ile enfekte edildi (40-80 µg/10 ml).
- 3) Her 15 dakikada bir yukarı aşağı, sağa sola eğerek adenovirusların tüm petri yüzeyine dağılması sağlanarak hücreler bir saat boyunca 1 ml besiyeri içinde %5 CO₂ inkübatörde bekletildi,
- 4) Besiyerleri 10 ml'ye tamamlandı ve %5 CO₂ inkübatörde 16 saat inkübasyona alındı.

2.2.1.3. İnsülin Uyarımı

İnsülin sinyal iletimi deneyleri için hücreler aşağıdaki muamelelere maruz bırakılmıştır.

- 1) Besiyeri petrilere uzaklaştırıldı.
- 2) Hücreler iki defa serumsuz besiyeri ile yıkandı
- 3) Hücrelere serumsuz DMEM besiyeri ilave edildi.
- 4) Hücreler %5 CO₂ inkübatörde 6 saat boyunca serumsuz besiyerinde bırakıldı.
- 5) Açlık sonrası, hücreler 100 nM insülin (veya kontrol olarak, PBS) ile 5 dakika boyunca inkübe edildi.
- 6) İnkübasyondan sonra, hücrelerden besiyeri anında uzaklaştırıldı, hücreler likit nitrojende donduruldu, -80° C dondurucuya kaldırıldı [9, 18].

2.2.2. Protein Ekstraksiyonu, İmmünopresipitasyon, Western Blotlama

İnsülin hassasiyetinin belirlenmesi için, insülin sinyal yolu elemanları IR, IRS1 ve IRS2'nin insülin uyarımı sonrasında tirozin fosforilasyonlarına bakılır. Proteinlerin tirozin fosforilasyonlarının tayini için geliştirilmiş anti-pY antikoru proteinlere değil, sadece pY amino asitlerine spesifiktir. Bu nedenle, pY tayini yapılacak protein, hücrenin total proteinlerinden immünopresipitasyon tekniği kullanılarak ayrıştırılmalıdır [9, 18].

2.2.2.1. Protein Ekstraksiyonu ve Miktar Tayini:

- 1) Hücreler -80°C'den alındı ve anında buzun üzerine yerleştirildi ve erimeleri beklendi,
- 2) Hücrelerin üzerine +4°C'den alınan hücre lizis tamponu (CLB) ilave edildi (200-250 µl),
- 3) Hücre lizatları mikropipetle alınarak, daha önceden hazırlanmış 1.5 ml mikrotüplere aktarıldı,
- 4) Örnekler soğuk odada (+4°C) 15-20 dakika boyunca 25 rpm'de döndürüldü,
- 5) Örnekler soğuk santrifüjde (+4°C) 20 dakika boyunca 14000 rpm'de santrifüj edildi,
- 6) Süpernatantlar yeni 1.5 ml tüplere aktarıldı,
- 7) Bio-Rad protein miktar tayini çözeltileri kullanılarak, Bradford Metodu ile protein konsantrasyonları ölçüldü.
- 8) Her örnekten eşit miktarda toplam protein çözeltilisi (100-250 µg) alınarak yeni 1.5 ml tüplere aktarıldı ve soğuk (+4°C) CLB ile eşit hacme tamamlandı,
- 9) Örneklerin üzerine son konsantrasyonu 1X olacak şekilde 5X Laemlie tamponu ilave edildi,
- 10) Tüpler 5 dakika boyunca 100°C'ta kaynatıldı,
- 11) Örnekler 20 dakika boyunca oda sıcaklığında bekletildi,
- 12) Örnekler oda sıcaklığına geldikten sonra 14000 rpm'de santrifüj edildi.

2.2.2.2. İmmünopresipitasyon:

- 1) Protein Ekstraksiyonu protokolününün 1.-7. maddeleri aynen uygulandı,
- 2) Boş 1.5 ml tüplere, deney düzeneğine göre, 5'er µl anti-IRβ, anti-IRS1 ve anti-IRS2 antikorları ilave edildi,

- 3) Her örnekten eşit miktarda toplam protein çözeltilisi (125-200 µg) alınarak antikor ilave edilmiş 1.5 ml tüplere aktarıldı ve soğuk (+4°C) CLB ile 1 ml'e tamamlandı.
- 4) Örnekler 75 µl protein A sefaroza ilave edildi.
- 5) Örnekler soğuk odada (+4°C) gece boyunca 25 rpm'de döndürüldü,
- 6) Örnekler sonraki sabah her seferinde 1 ml soğuk (+4°C) CLB ile olmak üzere üç defa 30 saniye boyunca +4°C'de 1000 rpm'de santrifüj edilip süpernatant uzaklaştırılarak yıkandı.
- 7) Son yıkamadan sonra süpernatant uzaklaştırıldı ve örnekler 2X Laemmli tamponu ilave edildi,
- 8) Tüpler 5 dakika boyunca 100°C'ta kaynatıldı,
- 9) Örnekler 20 dakika boyunca oda sıcaklığında bekletildi,
- 10) Örnekler oda sıcaklığına geldikten sonra 14000 rpm'de santrifüj edildi.

2.2.2.3. Western Blotlama: SDS-PAGE

Ayırma Jeli:

IR için %8'lik jel (15 ml): 4 ml %33'lük Akrilamid bis, 5 ml 3X Ayırma tamponu, 6 ml ddH₂O, 150 µl %10'luk APS, 15 µl TEMED (%₀ 1 son konsantrasyon).

IRS1, IRS2 ve TSC2 için %6'luk jel (15 ml): 3 ml % 33'lük Akrilamid bis, 5 ml 3X Ayırma tamponu, 7 ml ddH₂O, 150 µl %10'luk APS, 15 µl TEMED (%₀ 1 son konsantrasyon).

XBP-1s ve S6 için %12'lik jel (15 ml): 6 ml %33'lük Akrilamid bis, 5 ml 3X Ayırma tamponu, 4 ml ddH₂O, 150 µl %10'luk APS, 15 µl TEMED (%₀ 1 son konsantrasyon).

Paketleme Jeli:

Paketleme jeli her protein için aynı konsantrasyonda, %4'lük hazırlanır. 30 ml için; 4 ml %33'lük Akrilamid bis, 15 ml 2X Paketleme tamponu, 11 ml ddH₂O, 300 µl %10'luk APS, 30 µl TEMED (%₀ 1 son konsantrasyon).

- 1) SDS-PAGE aparatları kurulup önce resolving jeli döküldü ve hemen üzerine 500 µl izopropanol ilave edildi,
- 2) Ayırma jeli kuruduktan sonra izopropanol uzaklaştırıldı,
- 3) Paketleme jeli döküldü ve taraklar yerleştirildi,
- 4) Jel kasedi tanka yerleştirildi ve tank 1X running tamponu ile dolduruldu,
- 5) Taraklarla oluşturulan kuyucuklara eşit miktarlarda protein yüklendi (TSC2 ve XBP-1s için 35-50 µg, S6 için 10 µg, IR, IRS1 ve IRS2 için 75-150 µg),
- 6) Tank güç sağlayıcısına bağlandı ve yürütme başlatıldı (3-4 saat).

2.2.2.4. Western Blotlama: Membrana Transfer ve Sonuç Görüntüleme

- 1) Transfer işlemi için gerekli süngerler, 3 MM Whatman kağıtları ve PVDF membranlar ve buz kapları hazırlandı,
- 2) Süngerler ve 3 MM kağıtlar soğuk (+4°C) 1X Transfer tamponu ile iyice ıslatıldı,
- 3) Membranlar metanol ile aktive edildikten sonra üç defa distile su ile yıkayıp metanol uzaklaştırıldı ve soğuk (+4°C) 1X Transfer tamponunda ıslatıldı,
- 4) Yürütme durdurulduktan sonra jeller, üzerlerine PVDF membranlar, arada hava kabarcığı kalmayacak şekilde yerleştirilerek transfer kasetlerine alındı,
- 5) Transfer kasetleri transfer tanklarına alındı,
- 6) Tanklara buz kapları ve manyetik çubuklar yerleştirildi ve soğuk (+4°C) 1X Transfer tamponu ile dolduruldu,
- 7) Transfer tankları güç sağlayıcısına bağlandı ve soğuk odada (+4°C) transfer işlemi başlatıldı (100 V-2 saat)
- 8) Transfer işlemi bittikten sonra PVDF membranlar kasetlerden alınıp 1X TBS içinde, oda sıcaklığında, 5 dakika boyunca karıştırılarak yıkandı,
- 9) Spesifik olmayan bölgeleri bloke etmek için, membranlar TBS'ten alınıp 1X Bloklama tamponuna (10X Bloklama tamponu stok solüsyonu, 1X TBS içinde seyreltildi: 1 ml 10X BT + 9 ml 1X TBS) aktarıldı,
- 10) Membranlar, bloklama tamponunda oda sıcaklığında 1 saat (veya soğuk odada (+4°C) gece boyu) karıştırılarak yıkandı,

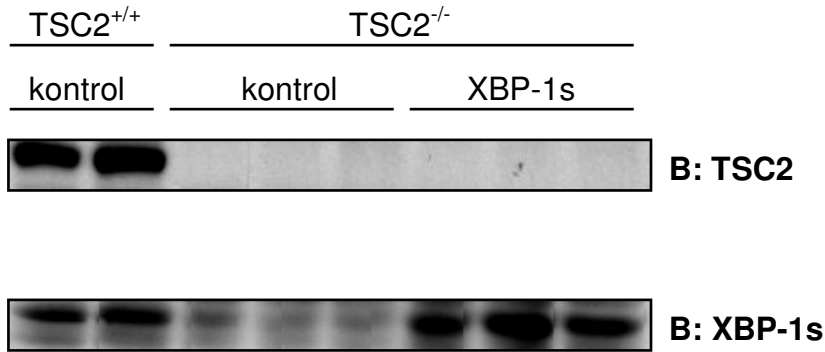
- 11) Membranlar 1X BT'den alındı ve 1X TBS-T içinde 1/700-1/1000 oranında seyreltilmiş primer antikor ile (tot-IR için anti-IR β , tot-IRS1 için anti-IRS1, tot-IRS2 için anti-IRS2, TSC2 için anti-Tuberin/TSC2, XBP-1s için anti-XBP-1s, tot-S6 için anti-S6 antikorları, IR-pY, IRS1-pY ve IRS2-pY için anti-pY antikorları, fosfoS6 için anti-S6^{Ser235/236} antikorları) soğuk odada (+4°C) gece boyu (veya oda sıcaklığında 1 saat) karıştırılarak inkübe edildi,
- 12) İnkübasyondan sonra membranlar bir kere 1X TBS-T'nin içinde çalkalandı,
- 13) Membranlar 1X TBS-T'ye alındı ve oda sıcaklığında üç defa 20'şer dakika boyunca karıştırılarak yıkandı,
- 14) Yıkama işleminden sonra membranlar 1X TBS-T içinde 1/4000-1/8000 oranında seyreltilmiş sekonder antikor ile (pY için anti-mouse IgG-HRP, tot-IR, tot-IRS1, tot-IRS2, tot-S6, fosfoS6, TSC2, XBP-1s için anti-rabbit IgG-HRP antikorları) oda sıcaklığında 1 saat boyunca karıştırılarak inkübe edildi.
- 15) İnkübasyondan sonra membranlar bir kere 1X TBS-T'nin içinde çalkalandı,
- 16) Membranlar 1X TBS-T'ye alındı ve oda sıcaklığında üç defa 20'şer dakika boyunca karıştırılarak yıkandı,
- 17) Membranlar BM Chemiluminesence blotlama kitindeki kemilüminesan solüsyonu ile inkübe edildi (TSC2 membran 30-45 saniye, IRS1, IRS2, XBP-1s membranlar 20-30 saniye, IR ve S6 membranlar 10-20 saniye),
- 18) Membranlar Bio-Rad film kasedine yerleştirildi ve soğuk odada Kodak Film Görüntüleme makinesi ile sonuçlar görüntülendi.

2.2.2.5. Membran Arındırma

- 1) Membranlar 5-10 dk boyunca 1X TBS (pH 7.5) ile yıkandı,
- 2) Aynı zamanda membran arındırma tamponu 50°C su banyosunda ısınana kadar bekletildi,
- 3) Tampon ısındıktan sonra membranlar tampon kabına yerleştirildi ve 50°C su banyosunda 20 dk inkübe edildi,
- 4) Membran arındırma tamponu uzaklaştırıldı (veya ikinci kullanım için saklandı) ve membranlar su ile iki defa çalkalandı,
- 5) Membranlar 1X TBS-T (pH 7.4) içinde oda sıcaklığında dört defa 15'er dk 25 rpm'de yıkandı,
- 6) Protokol 2.2.2.4'ün 9. maddesinden itibaren işleme devam edildi.

3.BULGULAR

3.1. TSC2^{-/-} MEF Hücrelerinin ve XBP-1s Overekspresyonunun Kontrolü

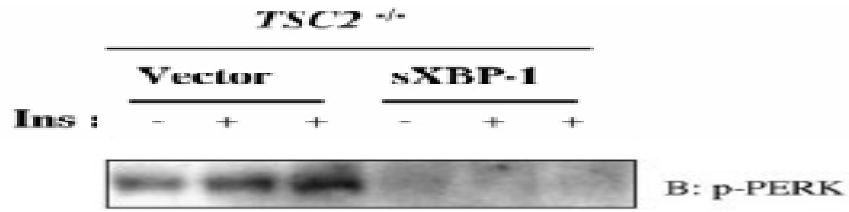


Şekil 3.1. TSC2 ve XBP-1s blotları . Kullanılan hücreler, TSC2^{-/-} MEF hücreleridir ve bu hücrelerin XBP-1s adenovirusu ile enfeksiyonunun ardından XBP-1s'in ekspresyonunda artış olmuştur.

Deneyde kullanılan TSC2^{-/-} MEF ve TSC2^{+/+} MEF hücre hatlarının doğruluğunun kontrolü için TSC2 protein blotting yapıldı ve TSC2^{-/-} hücrelerde TSC2 proteininin olmadığı gösterildi (Şekil 3.1).

Deneylerde kullanılan hücrelerin kontrol (lacZ) veya XBP-1s adenovirus ile enfeksiyonu sonrasında hücrelerdeki XBP-1s protein ekspresyonuna bakılarak XBP-1s ile enfekte edilen hücrelerde kontrole göre yüksek protein miktarı gösterildi (Şekil 3.1).

3.2. TSC2^{-/-} MEF Hücrelerinde ER Stresinin Kontrolü

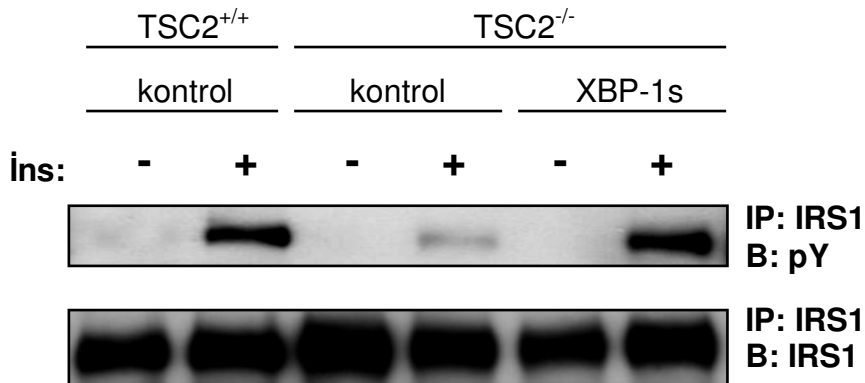


Şekil 3.2. TSC2^{-/-} MEF hücrelerinde, XBP-1s enfeksiyonu sonrası, ER stresi belirteci olarak PERK fosforilasyonu [18].

Kullanılan TSC2^{-/-} MEF hücrelerin ER stresi geliştirdiklerinin ve UPR sinyal yolunun aktive olduğunun gösterilmesi amacı ile hücrelerin XBP-1s AV ile enfeksiyonunun ardından UPR sinyal yolunun ilk basamağı olan PERK'in fosforilasyon değişimleri, tez çalışmasının yürütüldüğü laboratuarda yapılan bir çalışmada yayınlanmıştır (Şekil 3.2) [18].

TSC2^{-/-} hücrelerin, insülin uyarımına bağlı olmaksızın ER stresi geliştirdiği, XBP-1s'in aşırı ekspresyonunun ardından ER stresinin azaldığı gösterilmiştir.

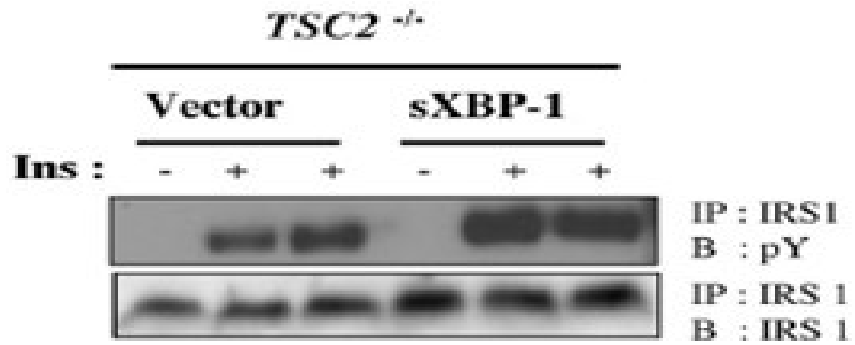
3.3. IRS1 Tirozin Fosforilasyonu



Şekil 3.3. TSC2^{-/-} MEF hücrelerde IRS1 tirozin fosforilasyonu. XBP-1s aşırı ekspresyonunun ardından hücrelerde insülin uyarımlı (100 nM) IRS1 fosforilasyonu iyileşmiştir (jеле yüklenen: 30 µg/well).

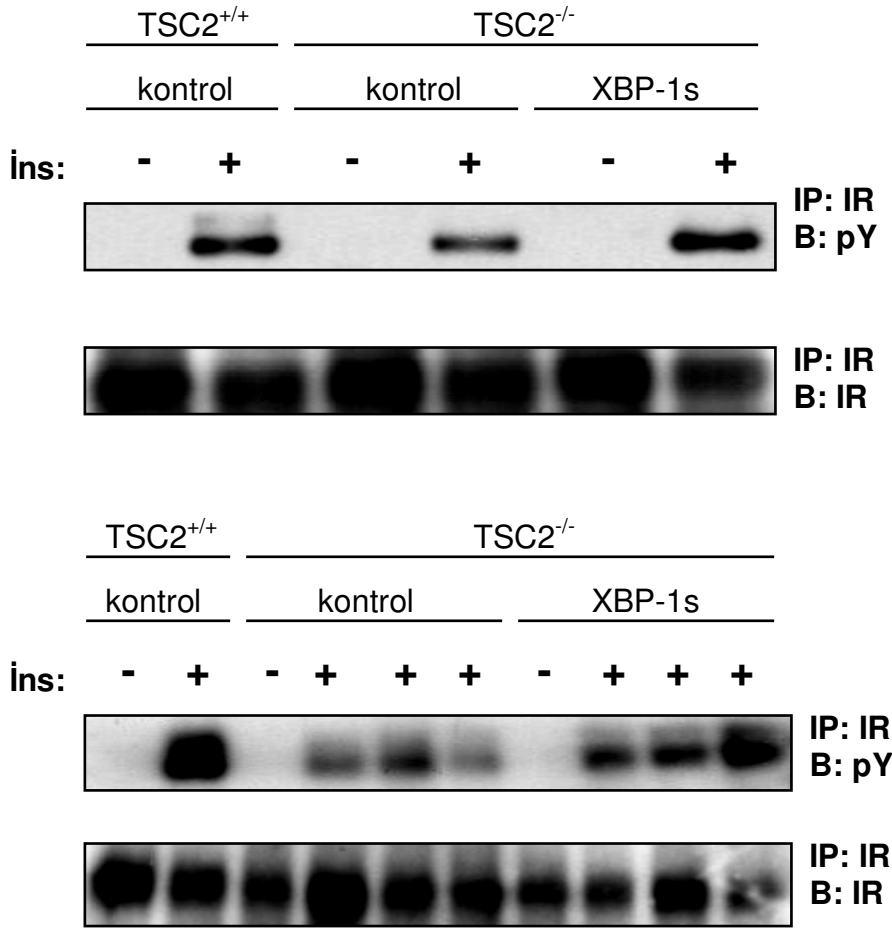
XBP-1s enfeksiyonu sonrasında insülin hassasiyetinde değişim olup olmadığını anlamak amacı ile insülin sinyal yolunda, reseptörden sonraki ilk hücre içi sinyal iletiler arasında önemli olan proteinlerden biri IRS1 proteininin Tirozin aminoasitlerinin fosforilasyon seviyelerindeki değişimin gösterilmesi için hücreler 6 saat açlığa alındı ve sonra 5 dk 100 nM insülin ile uyarıldı. Bu işlemlerin ardından yapılan protein izolasyonu, immünpresipitasyon ve fosfoTirozin (pY) blotu uygulamaları ile XBP-1s ile enfekte edilen TSC2^{-/-} hücrelerde kontrol grubuna göre pY oranında anlamlı bir artış olduğu gösterildi (p<0.005) (Şekil 3.3).

Bu bulgu, tez çalışmasının yürütüldüğü laboratuarda yapılan ve yayınlanan bulgu ile tutarlılık göstermiştir (Şekil 3.4) [18].



Şekil 3.4. TSC2^{-/-} MEF hücrelerinde insülin uyarımı sonrası IRS1 pY değişimleri [18].

3.4. IR Tirozin Fosforilasyonu

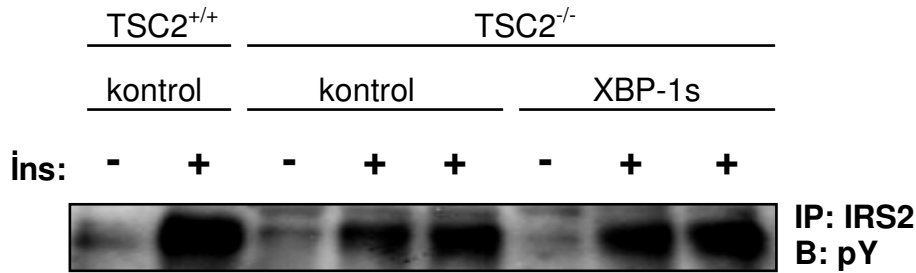


Şekil 3.5. TSC2^{-/-} MEF hücrelerinde IR tirozin fosforilasyonu. Hücrelerin XBP-1s adenovirus enfeksiyonunun ardından insülin uyarımlı (100 nM) IR aktivasyonunda hafif olarak iyileşme görülmüştür (jele yüklenen: 45 µg/well).

XBP-1s enfeksiyonu sonrasında insülin hassasiyetinde değişim olup olmadığını anlamak amacı ile insülin sinyal yolundaki ilk basamak olan, reseptör tirozin kinaz ailesine mensup insülin reseptör'ünün (IR β) Tirozin aminoasitlerindeki fosforilasyon seviyelerindeki değişimin gösterilmesi için hücrelerin 6 saat açlığa alındı ve sonra 5 dk insülin ile uyarıldı. Bu işlemlerin ardından yapılan protein izolasyonu, immünopresipitasyon ve fosfoTirozin (pY) blotu uygulamaları ile XBP-1s ile enfekte edilen TSC2^{-/-} hücrelerde kontrol grubuna göre pY oranında, IRS1-pY'da gözlemlendiği kadar olmamakla birlikte, bir artış olduğu görüldü. (Şekil 3.5). Elde

edilen sonucun doğruluğundan emin olmak amacı ile, üçlü tekrarlarından oluşan gruplar kullanılarak deney tekrar edildi ve yapılan tekrarın sonucunda aynı değişim gösterildi (Şekil 3.5).

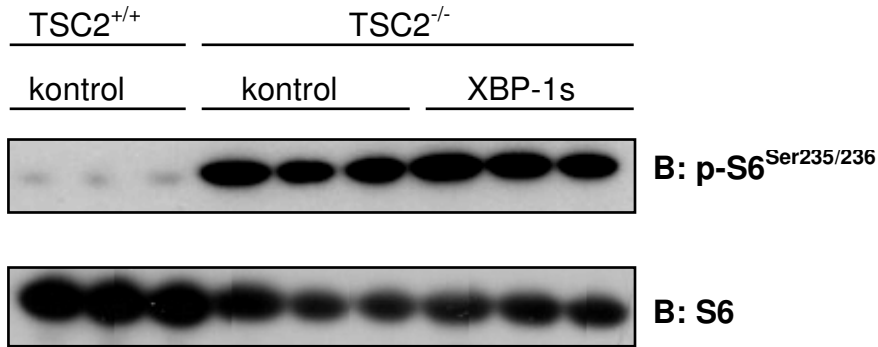
3.5. IRS2 Tirozin Fosforilasyonu



Şekil 3.6. TSC2^{-/-} MEF hücrelerinde IRS2 tirozin fosforilasyonu. XBP-1s'nin aşırı eksprese olduğu hücrelerde insülin uyarımının ardından IRS2 pY seviyelerinde bir değişim gözlenmemiştir (jele yüklenen: 45 µg/well).

XBP-1s enfeksiyonu sonrasında insülin hassasiyetinde değişim olup olmadığını anlamak amacı ile insülin sinyal yolunda reseptörden sonraki ilk hücre içi sinyal iletici proteinlerden biri olan IRS2 proteininin Tirozin aminoasitlerindeki fosforilasyon seviyelerindeki değişimin gösterilmesi için hücreler 6 saat açlığa alındı ve sonra 5 dk insülin ile uyarıldı. Bu işlemlerin ardından yapılan protein izolasyonu, immünopresipitasyon ve fosfoTirozin (pY) blotu uygulamaları ile XBP-1s ile enfekte edilen TSC2^{-/-} hücrelerde kontrol grubuna göre pY oranında bir artış olmadığı gösterildi (Şekil 3.6). Hücrelerdeki toplam IRS2 protein miktarı total IRS2 antikoru olmadığı için bakılamadı ve bu nedenle IRS2-pY miktarı ile karşılaştırma yapılamadı.

3.6. p70 S6 Fosforilasyonu



Şekil 3.7. TSC2^{-/-} MEF hücrelerinde ribozomal protein S6^{Ser235/236} fosforilasyonu (10 µg/well).

XBP-1s ile enfekte edilen hücrelerde mTOR sinyal yolu aktivasyonunun önemli bir belirteci olan p70 S6 proteinin Ser235/236 fosforilasyon değişimlerine bakıldı ve kontrol ile TSC2^{-/-} hücreler arasında S6 protein fosforilasyon seviyelerinde bir değişim gözlenmedi. Hücrelerdeki p-S6 protein miktarı ile toplam S6 protein miktarı karşılaştırıldı ve değişim olmayışının hücrelerdeki S6 protein miktarındaki farklılıklardan dolayı olmadığı gösterildi (Şekil 3.7).

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

İnsülin sinyal iletimi, besin varlığını büyüme ve gelişmeye entegre eder ve hücre düzeyde glukoz ve lipit metabolizması, protein sentezi, hücre büyümesi ve proliferasyonu ve sağkalımı olaylarını düzenler [1, 8]. TSC-mTOR sinyal yolu, besin ve enerji algılama, hücre büyüme ve farklılaşma, metabolizma, sağkalım ve proliferasyon sinyal yollarının birleşme noktasında yer alır. Besin ve enerji varlığı protein sentezi için kritik öneme sahip olduğundan, mTOR sinyal yolunun doğru çalışmaması durumunda organizmada birçok patolojik durum görülür [16, 17, 18].

Endoplazmik retikulum, protein sentezi ve lipit metabolizmasının gerçekleştiği hücre içi membran ağından oluşan bir organeldir. ER fonksiyonları, besin ve enerji durumu ile protein sentezi arasında bir köprü olarak görev yapar. ER'un doğru işleyişi hücre sentetik yolların sağlıklı bir biçimde devam etmesi açısından önemlidir. UPR, hücrenin sentetik taleplerini ER'un kapasitesine göre dengeler. Kısa vadeli protein sentezi artışına cevap olarak ER'un kapasitesini artırmaktan ve hücreyi ER stresinden kurtarmaktan sorumludur. ER'un hücrenin talebine karşılık veremediği durumlarda UPR apoptotik sinyal yollarını başlatır [9, 10, 12, 13, 18]. mTOR sinyal yolu ve ER stresi'nin başlattığı UPR, insülinin metabolik etkilerinin, besin varlığının, hücre büyümesinin ve hücre sağkalımının kontrolünün merkezinde yer alır.

Tez çalışmasında elde edilen bulgular, TSC2^{-/-} MEF hücrelerinde insülin uyarımına rağmen IR, IRS1 ve IRS2'nin tirozin fosforilasyonlarının azaldığını, XBP-1s'nin aşırı ekspresyonunun insülin sinyal elemanları IR ve IRS1 tirozin fosforilasyonlarını, IR'nin daha az olmak üzere, artırabildiğini, fakat IRS2 tirozin fosforilasyonlarını artırmadığını göstermektedir.

Tez çalışmasının yürütüldüğü laboratuarda yapılan çalışmalarda TSC2^{-/-} MEF hücrelerinde ER stresi geliştiği, XBP-1s aşırı ekspresyonu sonucunda ER stresinin azaldığı gösterilmiştir. ER stresinin uyardığı UPR sinyal yolu, IRE-1 enziminin TRAF2 proteini üzerinden JNK1 aktivasyonuna neden olur ve JNK1 stres kinaz enzimi IRS1 ve IRS2'yi Ser307 bakiyesinden fosforilleyerek insülin uyarımlı tirozin fosforilasyonlarını engeller [7, 9, 58]. XBP-1s aşırı ekspresyonu sonrasında ER stresinin azalmasına rağmen IR ve IRS2'nin tirozin

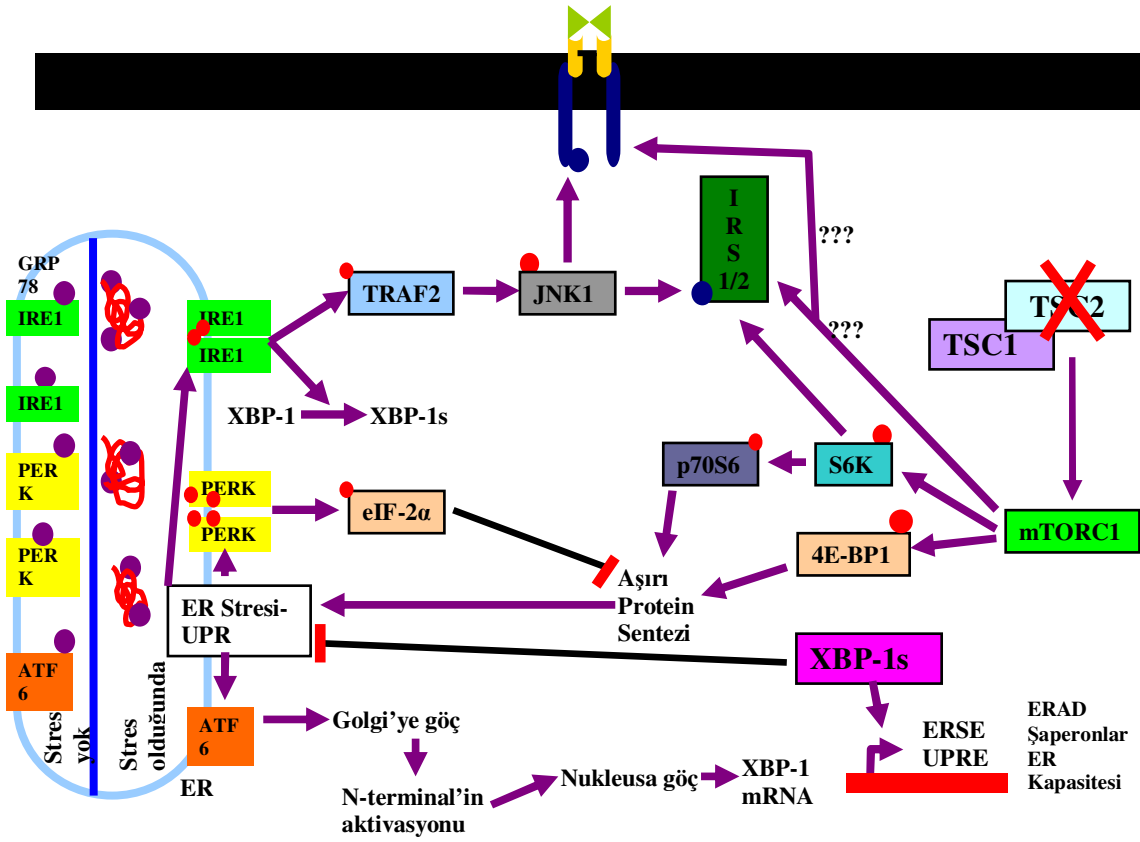
fosforilasyonlarında yeteri kadar artış olmayışından dolayı, XBP-1s adenovirus enfeksiyon sistemi kullanılan TSC2^{-/-} MEF hücrelerinde JNK1 kinaz aktivasyonunun araştırılması gerekir. JNK1 kinaz aktivasyon deneyinin sonucunda enzim aktivasyonunda azalma olması durumunda insülin sinyal yolunun negatif düzenleniminde JNK1 dışında protein kinazların veya tirozin fosfatazların varlığı düşünülebilir.

mTOR sinyal yolunda mTORC1'in hedefi olan protein S6K'nin bulunan ilk substratı p70 ribozomal S6 proteini, S6K aktivasyonu sonrasında fosforillenir ve protein sentezinin, hücre büyümesinin ve farklılaşmasının tetikleyicisi olarak görev yapar. Bu olaylar sonucunda ER'a aşırı yük binmesinden dolayı ER stres oluşur [16, 18].

XBP-1s enfeksiyonu sonrasında insülin hassasiyetinde IR ve IRS1 tirozin fosforilasyon seviyelerinde görülen artış, TSC2 eksikliğinden dolayı artan mTORC1 aktivasyonu sonucunda oluşan ER stresin azalması sonucunda görülür. ER stresin azalmasının mTOR sinyal yolunun inaktivasyonuna bağlı olup olmadığı henüz gösterilmemiştir. Bu sorunun cevabını bulmak için, XBP-1s ile enfekte edilen TSC2^{-/-} MEF hücrelerinde p70 S6 Ser235/236 fosforilasyon seviyelerine bakıldı ve bir değişim olmadığı bulundu. p70 S6 fosforilasyon seviyeleri, hücrelerdeki toplam p70 S6 protein seviyeleri ile karşılaştırıldı ve değişim olmayışının protein seviyelerindeki farklılıktan kaynaklanmadığı gösterildi.

Bu sonuçtan anlaşılıyor ki, insülin hassasiyetinin artmasını sağlayan ve ER stresteki düzelmenin nedeni olan XBP-1s aşırı ekspresyonunun bu etkisini mTORC1 tarafından aktive edilen S6K enzimi tarafından fosforillenen S6'yı inaktive etmeden göstermektedir. Bu sonuç S6K'nin aktivitesini koruduğunu düşündürmektedir.

S6K'nin IRS1 ve IRS2'yi ser307'den fosforillediği bilinmektedir. S6K'nin substratlarından biri olan p70 S6'in Ser235/236 fosforilasyon seviyelerinin TSC2^{-/-} MEF hücrelerde XBP-1s aşırı ekspresyonunun ardından değişmemesi S6K'nin aktivitesini koruduğunu göstermektedir. ER stresinin azalmasına rağmen, insülin hassasiyetinde yeteri kadar artış olmayışı, TSC2^{-/-} MEF hücrelerinde görülen insülin direnci gelişiminde S6K'nin de bir rolü olabileceğini düşündürmektedir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. TSC eksikliği, ER stresi ve insülin direnci. TSC eksikliğinde mTOR'un kalıcı aktivasyonu ve gelişen ER stresi sonucunda insülin hassasiyeti azalır.

Bugüne kadar yapılan çalışmalar dikkate alındığında, TSC2^{-/-} MEF hücrelerde ER stresi ve insülin direnci gelişiminde hangi sinyal yollarının rol oynadığını anlayabilmek için ER stresi sonucunda uyarılan UPR sinyal yolu tarafından aktive edilen JNK aktivasyonunun, mTORC1 sinyal yolu tarafından aktive edilen S6K fosforilasyonunun incelenmesi gerekmektedir.

Hücre içi bağışıklık sisteminin bir parçası olarak çalışan ER stresinin uyardığı UPR ile TSC2 eksikliğinde meydana gelen kalıcı aktivasyonu sonucunda kronik ER stresine neden olan mTORC1 sinyal yolu arasında negatif bir ilişki olduğu düşünülmektedir. Yapılan deneylerde, ER stresinin azalmasını sağlayan transkripsiyon faktörü XBP-1s'nin aşırı ekspresyonu sonucunda S6 fosforilasyonlarında kontrol hücreleriyle karşılaştırıldığında bir değişim gözlenmemesi, bu ilişkinin S6'nın baskılanması üzerinden kurulmadığı görülmüştür. ER stresi ve mTORC1

arasında olması muhtemel negatif ilişkinin daha ayrıntılı olarak araştırılması gerekmektedir. Örneğin, TSC2^{-/-} hücrelerde XBP-1s aşırı ekspresyonunu takiben, mTORC1'in hedefi olan ve protein sentezinin başlamasında önemli rol oynayan 4E-BP'nin fosforilasyon seviyelerindeki değişim incelenebilir. Deney sonucunda 4E-BP fosforilasyonlarında kontrol hücrelere göre bir azalma gözlenmesi, mTORC1 ile ER stresi arasındaki bağıın 4E-BP tarafından kurulmuş olduğunu düşündürülebilir.

ER stresi ile mTORC1 sinyal yolu arasındaki negatif ilişki sadece doğrudan insülin sinyal yolu üzerinden kurulu olabilir. ER stresi insülin direncine neden olarak insülin sinyal iletiminin Akt'a ulaşmasını engellemektedir. Aktive olamayan Akt TSC2'yi fosforilleyip mTORC1 üzerindeki baskıyı kaldıramaz. Böylelikle mTORC1 aktivasyonu nedeni ile ER'a binen aşırı protein yükü azaltılır. Fakat TSC2^{-/-} hücrelerde Akt'ın aktive olması ile olmaması mTORC1'in aktivasyonunu değiştirmeyeceğinden ER stresinin uyardığı UPR ya da XBP-1s'nin aşırı ekspresyonu veya ER stresini azaltan kimyasal şaperonların varlığı insülin hassasiyetini artırmasına rağmen mTORC1'in aktivasyonunda bir değişikliğe neden olmaz. Yine de, ER stresi ile mTORC1 sinyal yolu arasındaki ilişkinin anlaşılması için, TSC2^{-/-} hücrelerde XBP-1s'nin aşırı ekspresyonunun ardından, insülin uyarımlı PDK1'in fosforillediği Akt Ser308 fosforilasyon seviyeleri bakılabilir [30, 31, 37, 71, 72]. Deney sonucunda Akt Ser308 fosforilasyonu kontrol hücrelerine göre artış gösterirse ER stresi ile mTORC1 arasındaki ilişkinin sadece insülin sinyal yolu aracılığı ile kurulduğu düşünülebilir.

Sonuç olarak, TSC2^{-/-} MEF hücrelerde XBP-1s'nin aşırı ekspresyonu ER stresini azaltmaktadır ve en azından IRS1 tirozin fosforilasyonunu, hafif derecede IR tirozin fosforilasyonunu artırarak insülin hassasiyetini iyileştirmektedir. Fakat IRS2 tirozin fosforilasyonda artış sağlamamaktadır. XBP-1s, bu etkilerini S6K serin kinazı inaktive etmeden yapmaktadır. İnsülin hassasiyetinin tam olarak iyileşmemesi, başta mTORC1'in hedefi olan S6K'nin kalıcı aktivasyonu olmak üzere, UPR'dan bağımsız fakat mTOR bağımlı olarak etkisini gösteren Ser/Thr kinazlara veya fosfotirozin fosfatazlara bağılı olabilir. TSC eksikliğinde, ER stresinden bağımsız olarak insülin direncine neden olan mekanizmaların anlaşılabilmesi için ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

5. KAYNAKLAR

1. Withers, D. J. and White, M., Perspective: The insulin signaling system-a common link in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Endocrinology*, 141:6, 1917-1921, 2000
2. Biddinger, S. B. and Kahn, R. C., From mice to men: Insights into the insulin resistance syndromes. *Annu. Rev. Physiol.*, 68, 123–58, 2006
3. Mlinar, B., Marc, J., Janez, A., Pfeifer, M., Molecular mechanisms of insulin resistance and associated diseases. *Clinica Chimica Acta*, 375, 20-35, 2007
4. Kahn, S. E., Hull, R. L. and Utzschneider, K. M., Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature*, 444, 840-846, 2006
5. World Health Organization Consultation on Obesity 1–253, World Health Organization, Geneva, 2000
6. Muoio, D. M. and Newgard, C. B., Insulin resistance takes a trip through the ER. *Science*, 306, 425, 2004
7. Hirosumi, J., Tuncman, G., Chang, L., Görgün, C. Z., Uysal, K. T., Maeda, K., Karin, M., Hotamisligil, G. S., A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature*, 420, 333-336, 2002
8. Taniguchi, C. M., Emanuelli, B. and Kahn, C. R., Critical nodes in signalling pathways : insights into insulin action. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.*, 7, 85-96, 2006
9. Ozcan, U., Cao, Q., Yilmaz, E., Lee, A. H., Iwakoshi, N. N., Ozdelen, E., Tuncman, G., Gorgun, C., Glimcher, L. H., and Hotamisligil, G. S. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science*, 306, 457-461, 2004
10. Kaufman R. J., Orchestrating the unfolded protein response in health and disease. *J Clin Invest*, 110, 1389–98, 2002
11. Kaufman, R. J., Scheuner, D., Schröder, M., Shen, X., Lee, K., Liu, C. Y., Arnold, S. M., The unfolded protein response in nutrient sensing and differentiation. *Nature Rev. Mol. Cell. Biol.*, 3, 411-421, 2002
12. Schröder, M., Kaufman, R. J., The mammalian unfolded protein response. *Annu. Rev. Biochem.*, 74, 739–89, 2005

13. Lin, J., H., Walter, P., Yen, T. S. B., Endoplasmic reticulum stress in disease pathogenesis. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.*, 3, 399–425, 2008
14. Tuberous Sclerosis Alliance, 2008 (online), URL <<http://www.tsalliance.easycgi.com>>
Erişim: 20 Mayıs 2008
15. Shah, O. J. and Hunter, T., Tuberous sclerosis and insulin resistance: Unlikely bedfellows reveal a TORrid affair. *Cell Cycle* 4:1, 46-51, 2005
16. Kwiatkowski, D. J., Tuberous sclerosis: from tubers to mTOR. *Ann Hum Genet.*, 67, 87-96, 2003
17. Astrinidis, A. and Henske, E. P., Tuberous sclerosis complex: linking growth and energy signaling pathways with human disease. *Oncogene*, 24, 7475–7481, 2005
18. Ozcan, U., Ozcan, L., Yilmaz, E., Duvel, K., Sahin, M., Manning, B. D., Hotamisligil, G. S., Loss of the tuberous sclerosis complex tumor suppressors triggers the unfolded protein response to regulate insulin signaling and apoptosis. *Molecular Cell* 29, 541–551, 2008
19. Despopoulos, A. and Silbernagl, S., Hormones and Reproduction, Carbohydrate Metabolism and Pancreatic Hormones (chp. 11) in *Color Atlas of Physiology*, 5th ed., Thieme Press, New York, 2003
20. Hotamisligil, G. S., Inflammation and metabolic disorders. *Nature*, 444, 860-867, 2006
21. Michael, M. D., Kulkarni, R. N., Postic, C., Previs, S. F., Shulman, G. I., et al., Loss of insulin signaling in hepatocytes leads to severe insulin resistance and progressive hepatic dysfunction. *Mol. Cell*, 6, 87–97, 2000
22. Fisher, S. J. ve Kahn, C. R., Insulin signaling is required for insulin's direct and indirect action on hepatic glucose production. *J. Clin. Invest.* 111, 463–68, 2003
23. Hernandez-Ono, A., Zhang Y-L., Chiang. J., Moon, B., Kahn, C. R., et al., Lipoprotein metabolism in the liver insulin receptor knockout (LIRKO) mouse: critical role of insulin signaling in the regulation of very low density lipoprotein (VLDL) secretion. *Diabetes* 54(Suppl.1), A2 (Abstr.), 2005
24. Zierath, J. R. and Wallberg-Henriksson, H., From receptor to effector: insulin signal transduction in skeletal muscle from type II diabetic patients. *Ann. NY Acad. Sci.*, 967, 120–34, 2002

25. Cariou, B., Postic, C., Boudou, P., Burcelin, R., Kahn, C. R., et al., Cellular and molecular mechanisms of adipose tissue plasticity in muscle insulin receptor knockout mice. *Endocrinology*, 145, 1926–32, 2004
26. Bluher, M., Michael, M. D., Peroni, O. D., Ueki, K., Carter, N., et al., Adipose tissue selective insulin receptor knockout protects against obesity and obesity related glucose intolerance. *Dev. Cell*, 3, 25–38, 2002
27. Bluher, M., Wilson-Fritch, L., Leszyk, J., Laustsen, P., Corvera, S., Kahn, C. R., Role of insulin action and cell size on protein expression patterns in adipocytes. *J. Biol. Chem.*, 279, 31902–9, 2004
28. Roden, M., et al., Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans. *J. Clin. Invest.*, 97, 2859–2865, 1996
29. Itoh, Y., et al., Free fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic β cells through GPR40. *Nature*, 422, 173–176, 2003
30. Avruch, J., Insulin signal transduction through protein kinase cascades. *Mol. Cell Biochem.*, 182, 31–48, 1998
31. Sarbassov, D. D., Guertin, D. A., Ali, S. M., Sabatini, D. M., Phosphorilation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science*, 307, 1098-4, 2005
32. Sarbassov D. D., Ali S. M., Sabatini D. M., Growing roles for the mTOR pathway. *Curr. Opin. in Cell Biol.*, 17, 596–603, 2005
33. Frame, S. and Cohen, P., GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. *Biochem. J.*, 359, 1–16, 2001
34. Sano, H., et al. Insulin-stimulated phosphorylation of a Rab GTPase-activating protein regulates GLUT4 translocation. *J. Biol. Chem.*, 278, 14599–14602, 2003
35. Tran, H., Brunet, A., Griffith, E. C., Greenberg, M. E., The many forks in FOXO's road. *Sci. STKE*, RE5, 2003
36. Harris, T. E. and Lawrence, J. C. Jr., TOR signaling. *Sci. STKE*, RE15, 2003
37. Farese, R. V., Sajjan, M. P. and Standaert, M. L., Insulin sensitive protein kinases (atypical protein kinase C and protein kinase B/Akt): Actions and defects in obesity and type 2 diabetes. *Exp. Biol. Med.*, 230, 593-605, 2005
38. Farese, R. V., Sajjan, M. P., and Standaert, M. L., Atypical protein kinase C in insulin action and insulin resistance. *Biochem. Soc. Trans.* 33, 350–353, 2005

39. Osborne, T. F., Sterol regulatory element binding proteins (SREBPs): key regulations of nutritional homeostasis and insulin action. *J. Biol. Chem*, 275, 32379-82, 2000
40. Roux, P. P., Ballif, B. A., Anjum, R., Gygi, S. P., Blenis, J., Tumor-promoting phorbol esters and activated Ras inactivate the tuberous sclerosis tumor suppressor complex via p90 ribosomal S6 kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 13489-13494, 2004
41. Araki, E., et al. Alternative pathway of insulin signaling in targeted disruption of the IRS1 gene. *Nature*, 372, 186–190, 1994
42. Huang, C., Thirone, A. C., Huang, X., and Klip, A., Differential contribution of insulin receptor substrates 1 versus 2 to insulin signaling and glucose uptake in I6 myotubes. *J. Biol. Chem.*, 280, 19426–19435, 2005
43. Kubota, N., Tobe, K., Terauchi, Y., Eto, K., Yamauchi, T., et al. Disruption of insulin receptor substrate 2 causes type 2 diabetes because of liver insulin resistance and lack of compensatory β -cell hyperplasia. *Diabetes*, 49, 1880–89, 2000
44. Bard-Chapeau, E. A., Hevener, A. L., Long, S., Zhang, E. E., Olefsky, J. M., Feng, G. S., Deletion of Gab1 in the liver leads to enhanced glucose tolerance and improved hepatic insulin action. *Nat. Med.*, 11, 567-71, 2005
45. Bost, F., Aouadi, M., Caron, L., Even, P., Belmonte, N., et al. The extracellular signal-regulated kinase isoform ERK1 is specifically required for in vitro and in vivo adipogenesis. *Diabetes*, 54, 402–11, 2005
46. Woulfe, D., Jiang, H., Morgans, A., Monks, R., Birnbaum, M., Brass, L. F., Defects in secretion, aggregation, and thrombus formation in platelets from mice lacking Akt2. *J. Clin. Invest.*, 113, 441–50, 2004
47. Uysal, K.T., Wiesbrock, S. M., Marino, M. W., ve Hotamisligil, G. S., Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF- α function. *Nature*, 389, 610-614, 1997
48. McIntyre, E. A. and Walker, M., Genetics of type 2 diabetes and insulin resistance: knowledge from human studies. *Clin Endocrinol, Oxf*, 57, 303–11, 2002
49. Egea, P. F., Stroud, R. M. and Walter P., Targeting proteins to membranes: structure of the signal recognition particle. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 15, 213-220, 2005
50. Marciniak, S., and Ron, D., Endoplasmic reticulum stress signaling in disease. *Physiol. Rev.*, 86, 1133-1149, 2006

51. Ozcan U., yayınlanmamış veriler, 2008
52. Harding, H. P., Zhang, Y., Bertolotti, A., Zeng, H. and Ron, D., *Perk* is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. *Mol. Cell*, 5, 897–904, 2000
53. Harding, H., Zhang, Y., Ron, D., Translation and protein folding are coupled by an endoplasmic reticulum resident kinase. *Nature*, 397, 271–274, 1999
54. Malhotra, J. D. and Kaufman, R. J., The endoplasmic reticulum and the unfolded protein response. *Seminars in Cell & Dev. Biol.*, 18, 716–731, 2007
55. Urano, F., Bertolotti, A., Ron, D., IRE1 and efferent signaling from the endoplasmic reticulum. *J. Cell Sci.*, 113, 3697–3702, 2000
56. Urano, F., Wang, X. Z., Bertolotti, A., Zhang, Y., Chung, P., Harding, H. P., Ron, D., Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science*, 287, 664–666, 2000
57. Starchan, T., Read. A., *Human Molecular Genetics*, 2nd edition, BIOS Scientific Publishers Ltd., 1999
58. Rosner M., Freilinger A., Hengstschlager M., The tuberous sclerosis genes and regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Mutation Research*, 613, 10–16, 2006
59. Knudson Jr. A. G., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 68, 820–823, 1971
60. Jozwiak J, Jozwiak S., Wlodarski P., Possible mechanisms of disease development in tuberous sclerosis. *Lancet Oncol.*, 9, 73–79, 2008
61. Schmelzle T., Hall M. N., TOR, a central controller of cell growth. *Cell*, 103, 253–262, 2000
62. Jacinto E., Hall M. N., TOR signalling in bugs, brain and brawn. *Mol. Cell Biol.*, 4, 117–126, 2003
63. Arsham A. M., Neufeld T. P., Thinking globally and acting locally with TOR. *Curr. Opin. in Cell Biol.*, 18, 589–597, 2006
64. Heitman J., Movva N. R., Hall M. N., Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science*, 253, 905–909, 1991
65. Loewith, R., Jacinto, E., Wullschleger, S., Lorberg, A., Crespo, J. L., Bonenfant, D., Oppliger, W., Jenoe, P., and Hall, M. N., Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. *Mol. Cell*, 10, 457–468, 2002

66. Dann, S. G., and Thomas, G., The amino acid sensitive TOR pathway from yeast to mammals. *FEBS Lett.*, 580, 2821–2829, 2006
67. Hay, N., Sonenberg, N., Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev.* 18, 1926–1945, 2004
68. Nobukuni, T., Joaquin, M., Rocco, M., Dann, S. G., Kim, S. Y., Gulati, P., Byfield, M. P., Backer, J. M., Natt, F., Bos, J. L. et al., Amino acids mediate mTOR/raptor signaling through activation of class 3 phosphatidylinositol 3OH-kinase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102, 14238-14243, 2005
69. Zhang, H., Stallock, J. P., Ng, J. C., Reinhard, C., Neufeld, T. P., Regulation of cellular growth by the *Drosophila* target of rapamycin dTOR. *Genes Dev*, 14, 2712-2724, 2000
70. Montagne, J., Stewart, M. J., Stocker, H., Hafen, E., Kozma, S. C., Thomas, G., *Drosophila* S6 kinase: A regulator of cell size. *Science*, 285, 2126-2129, 1999
71. Inoki, K., Guan, K. L., Complexity of TOR signaling network. *Trends in Cell Biol.*, 16:4, 206-212, 2006
72. Blenis, J., Cantley, L. C., Identification of the tuberous sclerosis complex-2 tumor suppressor gene product tuberlin as a target of the phosphoinositid 3-kinase/Akt pathway, *Mol. Cell*, 10, 151-62, 2002
73. Garami, A., Zwartkruis, F. J., Nobukuni, T., et al., Insulin activation of Rheb a mediator of mTOR/S6K/4E-BP signaling, is inhibited by TSC1 and TSC2, *Mol. Cell*, 11, 1457-66, 2003

ÖZGEÇMİŞ

Murat Doğru, 1984 yılında Hatay'ın merkez ilçesi Antakya'da doğdu. İlkokulu Samandağ Atatürk İlkokulunda tamamladı ve ardından yine Samandağ'da Yüksel Acun Anadolu Lisesi'ni kazandı ve Matematik-Fen bölümünü 2002 yılında bitirdi. Aynı yıl ÖSS'ye girerek ek yerleştirmeler ile Haliç Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik programına YÖK burslu olarak kaydını yaptırdı ve 2006 yılının Haziran ayında mezun oldu. Bölümde okuduğu süre içinde İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü-Biyokimya Laboratuvarı, Haliç Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Araştırma Laboratuvarı, Dr. Pakize İ. Tarzi Laboratuvarları, GenKord Kordon Kanı Bankası ve Kök Hücre Araştırmaları Laboratuvarlarında staj yapmış ve çalışmıştır. Murat Doğru, yükseköğrenimi süresince, içlerinde Marmara Soroptimist Kulübü Derneği ve Köy Çocuklarını Yükseltme Vakfı'nın da bulunduğu çeşitli vakıf ve derneklerden burslar almış, ayrıca yurtiçi yüksek lisans öğrenimi için TUBİTAK-BİDEB'den burs almaya hak kazanmıştır. 2006 yılında Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Biyoloji Bölümü'nde Yüksek Lisans öğrenimine başlamış, tezini Harvard Üniversitesi, Harvard Tıp Fakültesi, Boston Çocuk Hastanesi, Endokrinoloji Bölümü'nde tamamlamıştır.