



T.C.

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



YÜKSEK LİSANS TEZİ

PANKREATİK β -HÜCRE FARKLILAŞMASINDA BAZI
HİSTON DEASETİLAZLARIN ROLÜ

EDİZ ÇOŞKUN

Biyoloji Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji Programı

Danışman

Doç. Dr. Selda GEZGİNCİ-OKTAYOĞLU

Haziran, 2016

İSTANBUL

Bu çalışma 21/06/2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı Moleküler Biyoloji programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi:



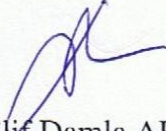
Doç. Dr. Selda GEZGİNCİ-OKTAYOĞLU
(Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Prof. Dr. Şehnaz BOLKENT
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Prof. Dr. Refiye YANARDAĞ
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi



Doç. Dr. Elif Damla ARISAN
İstanbul Kültür Üniversitesi
Fen-Edebiyat Fakültesi



Yard. Doç. Dr. Serap SANCAR-BAŞ
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 59162 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Sevgiyi, iyi niyeti, gülümsemeyi, renkliliği hep yanında gördüğüm ikinci annem, danışman hocam Doç. Dr. Selda GEZGİNCİ-OKTAYOĞLU'na bana kattığı bilimsel ve insani değerler için sonsuz teşekkür ederim. Bu deneyevine onun sevgisiyle geldim ve onun sevgisini yüreğimde taşıyarak gidiyorum.

Yüksek lisans dönemim boyunca bana tüm içtenliği, hoşgörüsü ve iyi niyeti ile yaklaşan değerli hocam Prof. Dr. Şehnaz BOLKENT'e, asetillenmiş ve metillenmiş H3K9 antikorlarından yararlandığımız Doç. Dr. Sibel ÖZDEN'e, çok yardımlarını gördüğüm Yrd. Doç. Dr. Serap SANCAR-BAŞ'a ve her konuda fikir alabileceğiniz nadir hocalardan biri olan, Uzm. Biyolog Özgecan KAYALAR'a tüm yardımları için teşekkür etmeyi bir borç bilirim.

Bir yaz yanında staj yapabilme imkanı bulduğum, GEN-KÖK Bitki Biyoteknolojisi Bölümü'nden, Yrd. Doç. Dr. Kahraman GÜRCAN'a, bilim konusunda kazandırdığı bakış açısı nedeniyle ve yaptığı tüm iyi niyetli yardımlar için ne kadar teşekkür etsem az kalır.

Bu çalışmanın ortaya çıkmasında, yapılan tüm deneylerde emeği bulunan Biyolog Merve ERÇİN'e, Biyolog Merve YILDIRIM'a, Uzm. Biyolog Eda OYAR YILMAZ'a, Biyolog Cansu ÖZAL'a ve Biyolog Ecem GÖĞÜŞ'e teşekkür etmek isterim.

Genova'dan Mehtap Köksal'a miRNA çalışmalarına katıldığı için ve Medsantek'ten Çiğdem Ayçiçek'e, Real Time PCR cihazını sağladığı için teşekkür ederim.

Üniversitenin ilk günlerinde, bir matematik not defteriyle başlayan ve bugüne kadar gelen dostluğumuz, kardeşliğimiz, arkadaşlığımız, en önemlisi bölünmez bütünlüğümüz nedeniyle Biyolog Ertan ÇELİK'e her şey için çok teşekkür ederim. Hayatıma sonradan katılan fakat tamamen şansım olarak gördüğüm, pazar günleri çay-1 lira buluşmalarımızın kahramanları, Tarihçi Mehmet EVLİ ve Felsefeci Abdurrahman GÜLER'e güzel sohbetleri için teşekkür ederim.

İlkokul sınıf öğretmenim Gülbiye KARAGÖZ'e bize eğitimin gerçekten ne olduğunu daha çok küçük yaşlarda tattırdığı için teşekkür etmeyi bir borç bilirim. Beni büyüten, bugünlere gelmemin nedenleri olan, ÇOŞKUN ailesinin bireyleri, annem Pakize ÇOŞKUN'a, babam Cemal ÇOŞKUN'a ve kardeşim İzzet ÇOŞKUN'a, benim en kıymetlilerim olduklarını bir kez daha ifade etmek isterim.

Ulu önderimiz Mustafa Kemal ATATÜRK ile tüm şehit ve gazilerimize, bize bu rahat ortamı sağladıkları için teşekkür etmek boynumun borcudur.

Haziran, 2016

Ediz ÇOŞKUN

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİL LİSTESİ	iv
TABLO LİSTESİ	vii
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	viii
ÖZET	x
SUMMARY	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR	6
2.1. EPİGENETİK.....	6
2.2. PLURİPOTENSİ	11
2.2.1. Pluripotensi Faktörleri	11
2.2.2. Pluripotensinin Epigenetik Mekanizmalarla Düzenlenmesi	12
2.3. VALPROİK ASİT (VPA).....	14
2.4. PANKREAS OLUŞUM SÜRECİ	15
2.4.1. Genel Bakış	15
2.4.2. Moleküler Mekanizma.....	15
2.4.3. Tip ve Trunk Hücreler	17
2.4.4. Pankreatik Gelişimin Epigenetik Olarak Düzenlenmesi	22
2.4.5. MiRNA'lar ve β -Hücreleri Üzerindeki Etkileri	25
2.4.6. IN VITRO β -HÜCRE FARKLILAŞTIRMA PROTOKOLÜ	31
3. MALZEME VE YÖNTEM	33
3.1. HÜCRE KÜLTÜRÜ	33
3.1.1. Deney Şartlarının Hazırlanması	33
3.2. MTT TESTİ İLE HÜCRE CANLILIĞININ BELİRLENMESİ.....	34
3.3. B-HÜCRE FARKLILAŞMASININ TESPİTİ.....	35
3.3.1. İnsülin Üreten Hücrelerin Tespit Edilmesi	35
3.3.2. β -Hücrelerine Özgün Moleküllerin Gen Ekspresyon Seviyelerinin Belirlenmesi	35
3.3.3. İnsülin Sekresyon Testi	36
3.4. DCFDA İLE FLOW STOMETRİK ROS ÖLÇÜMÜ	37
3.5. WESTERN EMDİRİMİ.....	37

3.5.1. Hücre Lizatlarının Hazırlanması	37
3.5.2. Bradford Tekniği İle Protein Seviyelerinin Belirlenmesi	38
3.5.3. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE).....	39
3.5.4. Proteinlerin Jelden Membrana Aktarılması	40
3.5.5. Özgün Protein Bantlarının İşaretlenmesi.....	40
3.6. MİRNA GEN EKSPRESYONU SEVİYELERİNİN BELİRLENMESİ	42
3.6.1. MikroRNA İzolasyonu	42
3.6.2. RNA Seviyelerinin Ölçülmesi	43
3.6.3. cDNA Eldesi	43
3.6.4. qRT-PCR	43
3.7. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER	44
4.BULGULAR	45
4.1. HÜCRE CANLILIK TESTİ BULGULARI	45
4.2. B-HÜCRE FARKLILAŞMASI İLE İLGİLİ BULGULAR.....	46
4.2.1. Gen Ekspresyonu Seviyesinde β -hücre Farklılaşması İle İlgili Bulgular	47
4.2.2. Mikroskopik Bulgular	49
4.2.3. Reaktif Oksijen Türlerinin Üretimindeki Değişiklikler ile İlgili Bulgular	52
4.2.4. İnsülin Sekresyon Bulguları.....	53
4.3. PLURİPOTENT KARAKTER DEĞİŞİKLİĞİ İLE İLGİLİ BULGULAR	54
4.4. SINIF I HDAC'LARDAN BAZILARINDA VE HİSTON MODİFİKASYONLARINDA MEYDANA GELEN DEĞİŞİKLİKLER İLE İLİŞKİLİ BULGULAR.....	56
4.5. BAZI MİRNA'LARIN GEN EKSPRESYONU SEVİYELERİNDE OLUŞAN FARKLILIKLAR İLE İLİŞKİLİ BULGULAR.....	59
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	66
KAYNAKLAR	90
ÖZGEÇMİŞ	107

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

- Şekil 2.1:** HAT, HMT ve HDAC'ın kromatin yapısı üzerine etkileri özetlenmiştir (<https://www.wikiwand.com>'dan alınmıştır).7
- Şekil 2.2:** HDAC ve HDAC inhibitörlerinin temsili etki mekanizması gösterilmiştir (Kazantsev ve diğ., 2008'den alınmıştır).8
- Şekil 2.3:** miRNA oluşumu ve mRNA hedefleme durumları özetlenmiştir (<https://krauthammerlab.med.yale.edu>'dan alınmıştır).10
- Şekil 2.4:** Hücreler pluripotensi özelliklerini kaybettikçe daha çok kararlanma ve özelleşme sürecine girerler. Pluripotensiyi sağlayan etkenler giderek azalır ve bunların yerini özelleşmiş hücre özellikleri alır. Yeniden programlamayla bu özellikler geri kazanılır (kesikli çizgi) (Fisher ve Fisher, 2011'den alınmıştır).13
- Şekil 2.5:** VPA'nın kimyasal yapısı resmedilmiştir (<https://en.wikipedia.org>'dan alınmıştır). ..14
- Şekil 2.6:** Embriyonik gelişim sürecinde tip ve trunk hücreler resmedilmiştir (Shih ve diğ., 2013'den alınmıştır).18
- Şekil 2.7:** Embriyonik gelişim sürecinde, duktal hücreler, asinar hücreler ve endokrin hücre farklılaşması özetlenmektedir (Shih ve diğ., 2013'den alınmıştır).21
- Şekil 2.8:** Pankreas hücrelerinin dönemsel epigenetik gelişim süreci özetlenmektedir (Shih ve diğ., 2013'den alınmıştır).22
- Şekil 2.9:** Histon etkileşimli epigenetik düzenleyicilerin endokrin ve ekzokrin kısım üzerindeki etkisi özetlenmektedir (Sandovici ve diğ., 2013'den alınmıştır).24
- Şekil 2.10:** Pankreatik endokrin kısmın gelişim sürecinde ve β -hücre insülin salgılanması sürecinde bazı miRNA'ların etkisi gösterilmiştir (Özcan, 2014'den alınmıştır).30
- Şekil 2.11:** *In vitro* İnsan Pluripotent Kök Hücreler (iPKH)'den β -hücre oluşturma protokolü (Rachel ve diğ., 2015'den alınmıştır).32
- Şekil 4.1:** 0.75-3 mM VPA'nın PAK-MKH canlılığı üzerindeki etkileri % Kontrol olarak verilmiştir. *** $p < 0,001$ kontrole göre.45
- Şekil 4.2:** 25mM Glukoz, 1mM VPA ve 25 mM Glukoz+ 1 mM VPA'nın, 10., 20. ve 30.gün sonunda β -hücre farklılaşmasına olan etkileri gösterilmiştir. Flow sitometrik insülin⁺ hücre sayısını (% Fluoresans yoğunluk) gösteren histogram plotları (A), analiz sonuçlarını yansıtan grafik (B) veortalama \pm SEM değerleri verilmiştir * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ kontrole göre.46
- Şekil 4.3:** 20 gün süreyle PAK-MKH'lere uygulanan deney şartlarının mRNA üretimi üzerindeki etkisi. mRNA seviyelerinin (Katlı Artış) analiz sonuçlarının yansıtan grafik (A) ve ortalama \pm SEM değerleri (B) verilmiştir. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ ve *** $p < 0,001$ kontrole göre.48

- Şekil 4.4:** 20 günlük deney süresi sonunda sonunda tam medyum uygulanan kontrol grubu (a) ve glukoz uygulanan grubun (b) mikroskopik fotoğrafları veilmiştir. Üst panel X4, orta panel X10 ve alt panel X20 kez büyütülmüştür.50
- Şekil 4.5:** 20 günlük deney süresi sonunda sonunda VPA uygulanan grup (a) ve VPA+glukoz uygulanan grubun (b) mikroskopik fotoğrafları veilmiştir. Üst panel X4, orta panel X10 ve alt panel X20 kez büyütülmüştür.51
- Şekil 4.6:** 20 gün süreyle PAK-MKH'lere uygulanan deney şartlarının ROS üretimi üzerindeki etkisi. Flow sitometrik DCF Floresans yoğunluğunu (Katlı Artış) gösteren dot plotlar (A), analiz sonuçlarını yansıtan grafik (B) ve ortalama±SEM değerleri verilmiştir. **p<0,01 ve ***p<0,001 kontrole göre; #p<0,01 ve ###p<0,001 glukoz uygulanan gruba göre.52
- Şekil 4.7:** 5.5 Mm glukoz ve 25 Mm glukoz uygulanması sonucunda hücrelerden salınan insülin miktarları (ng/µg protein) verilmiştir. **p<0,01 ve ***p<0,001 kontrol gruplarına göre.53
- Şekil 4.8:** PAK-MKH'lerin sitoplazmik (sol panel) ve nuklear (sağ panel) fraksiyonlarında OCT3/4, c-Myc ve Nanog protein bantları ve bu bantların yoğunluklarını gösteren grafikler verilmiştir. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 kontrole göre, #p<0,01; ###p<0,001 glukoz uygulanan gruba göre ve +p<0,05 valproik asit uygulanan gruba göre. A.U.:Arbitrary Unit.54
- Şekil 4.9:** PAK-MKH'lerin sitoplazmik (sol panel) ve nuklear (sağ panel) fraksiyonlarında HDAC1 ve HDAC3 protein bantları ve bu bantların yoğunluklarını gösteren grafikler verilmiştir. **p<0,01, ***p<0,001 kontrole göre, #p<0,01; ###p<0,001 glukoz uygulanan gruba göre. A.U.:Arbitrary Unit.....57
- Şekil 4.10:** PAK-MKH'lerin H4-K12 Ace, H3-K9 Ace ve H3-K9 TriMe protein bantları ve bu bantların yoğunluklarını gösteren grafikler verilmiştir. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 kontrole göre, #p<0,01; ###p<0,001 glukoz uygulanan gruba göre, +p<0,05 VPA grubuna göre. A.U.:Arbitrary Unit.58
- Şekil 4.11:** Glukoz uygulanan grup ile kontrol grubunda bazı miRNA'ların ekspresyon seviyelerinde meydana gelen değişiklikleri göstermektedir. Kırmızı içi boş yuvarlaklar gen ekspresyon seviyelerinde artış meydana gelen miRNA'ları gösterirken, yalnızca mavi çizginin üzerinde kalan miRNA'larda istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edilmiştir (p<0,05).....60
- Şekil 4.12:** VPA uygulanan grup ile kontrol grubuna bazı miRNA'ların ekspresyon seviyelerinde meydana gelen değişiklikleri göstermektedir. Kırmızı içi boş yuvarlaklar gen ekspresyon seviyelerinde artış meydana gelen miRNA'ları gösterirken, yeşil içi boş yuvarlaklar ekspresyon seviyeleri azalan miRNA'ları göstermektedir. Yalnızca mavi çizginin üzerinde kalan miRNA'larda istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edilmiştir (p<0,05).....61
- Şekil 4.13:** VPA+glukoz uygulanan grup ile kontrol grubunda bazı miRNA'ların ekspresyon seviyelerinde meydana gelen değişiklikleri göstermektedir. Kırmızı içi boş yuvarlaklar gen ekspresyon seviyelerinde artış meydana gelen miRNA'ları gösterirken, yeşil içi boş yuvarlaklar ekspresyon seviyeleri azalan miRNA'ları göstermektedir. Yalnızca mavi çizginin üzerinde kalan miRNA'larda istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edilmiştir (p<0,05).....62

Şekil 4.14: VPA+glukoz uygulanan grup ile glukoz uygulanan grupta bazı miRNA'ların ekspresyon seviyelerinde meydana gelen değişiklikleri göstermektedir. Kırmızı içi boş yuvarlaklar gen ekspresyon seviyelerinde artış meydana gelen miRNA'ları gösterirken, yeşil içi boş yuvarlaklar ekspresyon seviyeleri azalan miRNA'ları göstermektedir. Yalnızca mavi çizginin üzerinde kalan miRNA'larda istatistiksel olarak anlamlı bir artış veya azalma tespit edilmiştir ($p<0,05$).....63

Şekil 4.15: VPA+glukoz uygulanan grupta VPA grubuna göre bazı miRNA'ların ekspresyon seviyelerinde meydana gelen değişiklikleri göstermektedir. Kırmızı içi boş yuvarlaklar gen ekspresyon seviyelerinde artış meydana gelen miRNA'ları gösterirken, yeşil içi boş yuvarlaklar ekspresyon seviyeleri azalan miRNA'ları göstermektedir.....64

Şekil 4.16: Her bir grupta miRNA'ların gen anlatım düzeyi derecelendirilmiştir. Gen ekspresyon düzeyleri yeşilden kırmızıya doğru artmaktadır65



TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 3.1: SDS-PAGE jelleri hazırlanmasında kullanılan maddeler ve miktarları belirtilmiştir.	39
Tablo 3.2: Western Emdirimi yönteminde kullanılan antikorlar, bu antikorlar için kullanılan seyreltme oranları, inkübasyon şart ve süreleri belirtilmiştir.	41
Tablo 4.1: Bazı miRNA'ların tüm deney gruplarındaki $2^{\Delta C_T}$ değerleri verilmiştir.	59



SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler Açıklama

β	: Beta
α	: Alfa
γ	: Gama
κ	: Kappa
ml	: Mililitre
μ l	: Mikrolitre
mM	: Milimolar
mg	: Miligram
dL	: Desilitre

Kisaltmalar Açıklama

Ago 2	: Argonaute 2 Protein
BSA	: Sığır Serum Albumini
DCF	: Diklorfloresin
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
FBS	: Fötal Sığır Serum
FITC	: Floresans İzotiosiyanat
GSIS	: Glukoz Uyarımlı İnsülin Sekresyonu
H ₂ DCFDA	: 2'7'-diklorodihidrofloresin diasetat
HAT	: Histon Asetil Transferaz
HDAC	: Histon Deasetilaz
HDACi	: Histon Deasetilaz İnhibitörü
HMT	: Histon Metil Transferaz
hPSCs	: İnsan Pluripotent Kök Hücreler
HRP	: Yaban Turbu Peroksidazı
MEM	: Minimum Esansiyel Medyum
miRNA	: mikroRNA
MTT	: Metil-tiazol Tetrazolyumbromid
NaB	: SodyumButirat
Ngn3	: Neurogenin 3
PAK-MKH	: Pankreatik Adacık Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre
PP	: Pankreatik Polipeptid
PVDF	: Polivinilidenflorit
qRT-PCR	: Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RISC	: RNA-Uyarımlı Susturma Kompleksi
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
RT	: Ters Transkriptaz
STZ	: Streptozotosin
T2D	: Tip2 Diyabet
TSA	: Trikostatin A

VPA : Valproik Asit
WHO : Dünya Sağlık Örgütü



ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

PANKREATİK β -HÜCRE FARKLILAŞMASINDA BAZI HİSTON DEASETİLAZLARIN ROLÜ

Ediz ÇOŞKUN

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Selda GEZGİNCİ-OKTAYOĞLU

Pankreatik gelişim sırasında, transkripsiyon faktörleri ekzokrin ve endokrin farklılaşmada önemli rol oynarlar. Transkripsiyon faktörlerinin, görevlerini yerine getirebilmeleri genin yapısal durumuna bağlıdır. Epigenetik düzenlenmeyi ortaya çıkaran önemli enzim gruplarından bir tanesi olan Histon deasetilaz (HDAC)'lar pankreas gelişimi sırasında süregelen hücre farklılaşmasında çok önemli roller üstlenirler. Valproik Asit (VPA), sınıf I HDAC engelleyicisi olarak bilinen küçük molekül yapısında kimyasal bir bileşiktir. Bu çalışmada, pankreatik adacık kaynaklı mezenkimal kök hücre (PA-MKH)'lere 20 gün boyunca VPA ve/veya glukoz uygulanarak pankreatik β -hücre farklılaşması ve ilişkili moleküler mekanizmanın araştırılması amaçlanmıştır. Çalışma kapsamında literatürde ilk kez PAK-MKH'lerde sınıf I HDAC'ların pluripotensi faktörleri üzerine olan etkileri araştırılmıştır. Bu faktörler kök hücre karakterlerinin korunması ve fonksiyonlarının devamlılığının sağlanmasında temel rol üstlenen Oct $3/4$, c-Myc ve Nanog'tur. Ayrıca, HDAC'lar, pluripotensi faktörleri, erken pankreatik gelişim, kompenzasyon ve β -hücre fonksiyonu ile ilgili olmak üzere dört gruptan seçilen toplam 39 adet mikroRNA (miRNA)'nın gen ekspresyon düzeylerindeki değişimler araştırılmıştır. HDAC inhibitörlerinin PA-MKH üzerine etkilerinin daha önce araştırılmamış olması çalışmamızın özgünlüğünü açıkça ortaya koymaktadır.

Bu çalışma kapsamında PAK-MKH'lere, glukoz ve/veya VPA uygulanarak bu hücrelerin β -hücrelerine farklılaşma oranı insülin üreten hücrelerin flow sitometrik yöntemle ve ELISA yöntemiyle insülin sekresyonun ölçülmesiyle belirlendi. Ayrıca Pdx-1, Pax4, Nkx6.1, Neurogenin-3, ins2 ve Glut-2'nin gen ekspresyonu seviyelerinin gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) ile ölçülmesi ile β -hücre farklılaşması bulguları desteklendi. Pluripotent karakter ile ilgili değişiklikleri inceleyebilmek için, Oct3/4, c-Myc ve Nanog transkripsiyon faktörlerinin seviyelerindeki değişimler western emdirimi yöntemi ile belirlendi. Pankreatik β -hücre farklılaşmasında önemli olduğunu düşünülen sınıf I HDAC'lardan HDAC1 ve asetilenmiş H3 ve H4 ile metillenmiş H3 seviyelerindeki değişiklikler de western emdirimi yöntemiyle ölçüldü. β -hücre farklılaşmasında etkili olabileceğini

düşündüğümüz aynı zamanda epigenetik süreçte önemli rol alan bazı miRNA'ların gen ekspresyon seviyelerindeki değişimler qRT-PCR yöntemi ile belirlendi.

Sonuç olarak, bu çalışma, PAK-MKH'lerin β -hücrelerine farklılaşmasını kontrol eden epigenetik mekanizmanın aydınlatılmasına önemli katkılar sağlamıştır. Sınıf I HDAC'lar ile miR-18a, miR-19b, miR-30d, miR-124, miR-146a, miR-184, miR-335, miR-433-5p ve miR-503'ün bu farklılaşmanın gerçekleşebilmesinde rol aldığı tespit edilmiştir. Dolayısıyla, çalışmamız β -hücre farklılaşması sürecinin kontrolü açısından, yeni bir bakış açısı oluşturarak, hem süreci anlama hem de özellikle T2D'nin hücresel tedavisi için kullanılacak yeni moleküllerin keşfine zemin hazırlayabilecek niteliktedir.

Haziran 2016, 120 sayfa.

Anahtar kelimeler: β -hücre farklılaşması, glukoz, histon deasetilaz, kompenzasyon, mikroRNA, pankreatik adacık kaynaklı mezenkimal kök hücre, pluripotensi, tip 2 diyabet, valproik asit.

SUMMARY

M. Sc. THESIS

THE ROLE OF SOME HISTONE DEACETYLASES IN PANCREATIC β -CELL DIFFERENTIATION

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Science and Engineering

Department of Biology

Supervisor: Doç. Dr. Selda GEZGİNCİ-OKTAYOĞLU

Transcription factors play a crucial role in differentiation to endocrine and exocrine parts of pancreas during pancreatic development. Performing the functions of transcription factors is dependent on structural condition of the gene. Histone deacetylases (HDACs) are one of important enzyme group revealing epigenetic regulation, play important roles in cell differentiation during pancreas development. Valproic acid (VPA), is known as a small chemical compound and class I HDACs inhibitor. In this study, it was aimed to investigate the pancreatic β -cell differentiation and relevant molecular mechanism by administering VPA and/or glucose to pancreatic-islet derived mesenchymal stem cells (PID-MSCs) for 20 days. Within the context of our study, the effects of class I HDACs on pluripotency factors in PID-MSCs are investigated for the first time in literature. These factors are Oct $3/4$, c-Myc and Nanog that play a fundamental role in maintaining stem cell character and providing their functional continuity. Besides, totally 39 miRNA selected from four groups related to HDACs, pluripotency factors, early pancreatic development-compensation stage and β -cell function, are investigated in terms of changing in the level of gene expression. The effect of HDAC inhibitors on PID-MSCs did not study before, so it clearly reveals the originality of our work.

Within the context of this study, the differentiation of PID-MSCs to β -cells by administration of glucose and/or VPA to these cells, insulin-producing cells are determined by flow cytometric analysis and insulin secretion levels are measured by ELISA method. Moreover, the findings of differentiation to β -cell are supported by measuring the gene expression levels of Pdx-1, Pax4, Nkx6.1, Neurogenin-3, ins1/2 and Glut2 by using real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR). For examining the changes related to pluripotent character, the changes in the levels of Oct3/4, c-Myc, and Nanog transcription factors are determined by western blotting. Class I HDACs are considered important for pancreatic β -cell differentiation. Also, the changes in the levels of HDAC1 and acetylated H3/H4 and methylated H3 are determined by western blotting. Some miRNAs that we think as important in β -cell differentiation and at the same time in epigenetic stage are determined by qRT-PCR.

Consequently, this study made a significant contribution for illuminating the epigenetic mechanism that controls the differentiation of PID-MSCs to β -cells. It was determined that Class I HDACs with miR-18a, miR-19b, miR-30d, miR-124, miR-146a, miR-184, miR-335, miR-433-5p and miR-503 take place in this differentiation process. Therefore, our investigation laid the groundwork to understand the process and discover new molecules could be used for cellular treatment of T2D by creating a new approach in terms of controlling of β -cell differentiation process.

June 2016, 120 pages

Keywords: β -cell differentiation, glucose, histone deacetylase, compensation, microRNA, pancreatic islet derived mesenchymal stem cell, pluripotency, type 2 diabetes, valproic acid.

1. GİRİŞ

Diyabet hastalığının küresel artışı pankreatik β -hücre sayısının artırılması veya rejeneratif biyoloji gibi yeni terapötik stratejilerin geliştirilmesini zorunlu kılmaktadır. Her iki tip diyabet için uygulanmakta olan terapiler arasında yer alan ekzojen insülin veya hipoglisemik ajan uygulamaları tedavi edici olmadığından ve diyabet ile ilişkili ikincil komplikasyonların gelişmesini engellemede yetersiz kaldığından son yıllarda araştırmalar hücresel tedavi üzerinde yoğunlaşmaktadır. Hücresel tedavi için öne sürülen uygulama, kadavraların pankreaslarından elde edilen β -hücre sayısının çok az olması ve transplantasyon sonrası immünreaksiyonların gelişmesi sebebiyle kısıtlanmaktadır. Son yıllarda çalışmalar, hastanın kendisinden izole edilen mezenkimal kök hücre (MKH)'lerin β -hücrelerine farklılaştırılarak hastaya tekrar transplantasyonu üzerine odaklanmıştır. Hücre transplantasyonuna alternatif bir yaklaşım olarak hastanın pankreasında bulunan endojen β -hücre kütlelerinin büyüme faktörü uygulamalarıyla artırılması düşünülebilir. Her iki yaklaşımın uygulanabilmesi için de pankreatik β -hücre kütlelerini düzenleyen mekanizmanın aydınlatılması gerekmektedir. Tip 2 diyabetin başlangıcı olarak bilinen kompenzasyon aşamasında hiperglisemi ile paralel olarak pankreatik adacıklardaki β -hücrelerinin kütlelerinin de arttığı bilinmektedir. Halen yeni oluşan β -hücrelerinin kaynağı ve dolayısıyla oluşum mekanizmaları tam olarak aydınlatılamamıştır.

Son birkaç on yıl içinde, dünya çapında metabolik hastalıkların oranında ciddi bir artış gözlemlenmiştir. Hareketsiz bir yaşam ve sağlıksız beslenme alışkanlıkları özellikle obezite ve Tip 2 diyabet (**T2D**)'in yüksek oranda görülmesine neden olmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (**WHO**)'nün verilerine göre 2008 yılında, dünya çapında 1.4 milyar aşırı kilolu yetişkin bulunmakta ve bunların 500 milyon kadarının ise obez bireyler olduğu bilinmektedir. Bu durum, obezite ile ilişkili metabolik hastalıkları doğru tanımlamanın T2D'den korunabilmek için ne kadar önemli olduğunu göstermektedir. Obezite ve T2D'nin ortaya çıkmasında temel rol oynayan pankreas hücrelerinin oluşum süreci, bu

süreçte rol alan sinyal yolları ve epigenetik faktörlerin iyi tanımlanması bu tip hastalıkların erken tanısı ve tedavisi için temel oluşturacaktır.

Pankreas ekzokrin ve endokrin kısımlardan oluşan karma bir organdır. Ekzokrin kısım sindirim enzimlerini salgılamak, Langerhans adacıkları olarak bilinen endokrin kısım değişik hormonlar salgılar. Her bir adacık, çok sayıda özelleşmiş endokrin hücreden oluşur ve bu hücreler salgıladıkları kendilerine özel hormonlar nedeniyle birbirlerinden ayrılırlar (Bonner-Weir ve diğ., 1982). İnsülin salgılayan β -hücresi, glukagon salgılayan α -hücresi, somatostatin salgılayan δ -hücresi ve pankreatik polipeptid salgılayan PP hücreleri adacığı meydana getiren dört ana tip özelleşmiş hücre çeşididir.

Pankreasın gelişim süreci oldukça karmaşıktır. Embriyo gelişimi sırasında, bağırsaktan kökenlenen öncül hücreler hiyerarşik bir düzen içinde özelleşmiş pankreatik hücrelere farklılaşarak pankreatik oluşumu doğumdan önce tamamlar. Kemirgenlerde, β -hücre oluşumu yenidoğanlarda da devam eder fakat anne bakımı ortadan kalktıktan kısa süre sonra durur (Paris ve diğ., 2004; Deltour ve diğ., 1991). Herhangi bir çevresel stres veya herhangi bir uyarıcı, embriyonik ve yenidoğan pankreas hücre gelişimlerini etkileyerek, özellikle endokrin kısım ve β -hücre fonksiyonunu değiştirerek, büyüyen bireylerin yaşamın ilerleyen safhalarında ciddi sıkıntılara yol açar (McMillen ve diğ., 2005).

Epigenetik, DNA dizisindeki değişikliklerden kaynaklanmayan, ama aynı zamanda kalıtsal olan, gen ifadesi değişikliklerini inceleyen bilim dalıdır. Bu değişiklikler hücreyi ya da organizmayı doğrudan etkilemektedir. Epigenetik en temel seviyede kromatin düzenlenmesini ve bu kromatin düzenlenmesine neden olan histonlar, transkripsiyon faktörleri, histon asetilazlar (**HAT**), histon deasetilazlar (**HDAC**), histon metiltransferazlar (**HMT**) ve mikroRNA'lar (**miRNA**) gibi birçok molekülün hücresel süreçlerin düzenlenmesindeki rolünü araştırmaktadır.

Kök hücre karakterlerinin korunmasında da epigenetik düzenlenmenin önemli olduğu bilinmektedir. Yamanaka ve arkadaşlarının olgunlaşmış somatik bir hücreyi embriyonik kök hücre benzeri hücrelere dönüştürürken kullandıkları bazı transkripsiyon faktörleri ile epigenetik süreci değiştirerek bu yeniden programlanmayı başarabilmeleri dikkat çekicidir (Takahashi ve diğ., 2008). Bu transkripsiyon faktörleri Oct4, Sox2, c-Myc ve

Klf4'tür. Daha sonra bazı araştırmacılar daha farklı transkripsiyon faktörleri karışımları deneyerek yine somatik bir hücreyi kök hücre durumuna çevirmeyi başardılar. Oluşan bu kök hücreler, pluripotent yani çoğu hücreye farklılaşabilme gücünü içinde barındıran hücrelerdi.

Pluripotent kök hücreden özelleşmiş bir hücreye geçiş aşamasında da epigenetik sürecin temeli olan bazı genlerin açılması bazı genlerin ise kapanması olayı yatar. Sonuçta tüm hücrelerimizde kendine özgü küçük farklılıklar haricinde aynı genetik bilgi bulunmaktadır. Fakat vücudumuzda yüzlerce hücre çeşidi bulunmaktadır. Bu genlerin anlatımı veya sessizleştirilmesi işinin büyük bir kısmını, histonlar ve onlarla etkileşimde olan HAT, HMT ve HDAC'lar gerçekleştirirler.

Pankreatik β -hücre oluşumu sırasında, Pdx-1, Neurogenin3, Nkx6.1, MafA ve NeuroD1 gibi transkripsiyon faktörlerinin ilgili gen bölgelerine bağlanıp hücre kaderini belirlediği bilinmektedir. Bu bağlanmanın gerçekleşebilmesi için H3K27me3'ün ortamda olmaması gerekir. Çünkü lizin27'den metillenmiş Histon H3, bu genlerin kapanmasına yol açmaktadır (Schaffer ve diğ., 2010; Schaffer ve diğ., 2013). HDAC'lar da HMT'lere benzer bir iş görürler. Asetillenmiş olan histonun asetil kısmını kaldırarak, o histonu metillenebilme olasılığını arttırmaları. Örneğin, Pdx1 transkripsiyonu histon deasetilasyonu sayesinde azalır. HDAC1 histon asetilasyonunu engeller ve H3K9'un metillenmesine neden olur (H3K9me2). Pdx1'in baskılanmasına yol açar. Bu durum VPA, TSA, Sodyum Bütirat gibi histon deasetilaz inhibitörleriyle (**HDACi**), β -hücre farklılaşmasının sağlanabileceğini göstermektedir (Park ve diğ., 2008). Fakat her zaman H3-lizin metillenmeleri transkripsiyonel baskılanmaya sebep olmaz. Örneğin, fonksiyonel β -hücrelerinde H3K4me2 bulunmaktadır (Deering ve diğ., 2009). Hiperglisemi veya endoplazmik retikulum stresi gibi durumlarda, insülin promotöründe bulunan H3K4me2 kaybına, bu da azalan β -hücre salgılama fonksiyonuna neden olmaktadır (Evans-Moline ve diğ., 2009). Sonuç olarak histon asetillenmesinde veya metillenmesinde hangi histonun ve bu histonun hangi lizininin asetillendiği veya metillendiği çok önemlidir.

Epigenetik sürecin diğeri önemli elemanlarından birisi de miRNA'lardır. Endokrin hücre olgunlaşmasında miRNA'ların ekspresyon seviyeleri ve etkileşimleri çok önemlidir. Örneğin, miRNA olgunlaşmasının önemli bir elemanı olan Dicer kaybı, endokrin hücrelerin kaybına ve aynı şekilde bu endokrin hücrelerin farklılaştığı Ngn3⁺ hücre kaybına da neden olur (Kanji ve diğ., 2013). Doğal olarak, Dicer, asinar kısım farklılaşması için de hayati öneme sahiptir (Prevot ve diğ., 2013). Örneğin, miR-7 özel olarak, Ngn3⁺ hücrelerde ve olgun fonksiyonel β hücrelerinde üretilen miRNA'dır (Kredo-Russo ve diğ., 2012). MiR-375'in zebra balıklarında pankreatik gelişim sürecine katıldığını ve çok önemli olduğu gösterilmiştir (Kloosterman ve diğ., 2007). Aynı şekilde kanda dolaşan miR-375'i T2D belirteci olarak gösteren çalışmalar da mevcuttur (Erener ve diğ., 2013).

Sonuç olarak pankreatik β -hücre farklılaşması tek bir yönden bakılamayacak kadar karmaşık bir süreçtir. Bu sürecin anlaşılması obezitenin ve bununla ilişkili olarak kanser ve T2D hastalıklarının moleküler mekanizmasının daha iyi anlaşılmasını sağlayacaktır.

Çalışmamızın amaçları ve çıktıları şöyle sıralanabilir:

Amaçlar

- Pankreatik Adacık Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler (**PAK-MKH**)'e, bir HDACi olan Valproik Asit (VPA) uygulanması sonucu bu hücrelerin β -hücrelerine farklılaşması ile ilgili süreçleri incelemek.
- VPA uygulanması sonucunda PAK-MKH'lerin pluripotent karakterinde meydana gelen değişiklikleri incelemek.
- Bu süreçlerde etkili olan bazı histonların asetilenmiş ve metilenmiş formlarını ve asetillenme ilişkisi olarak bazı HDAC'ların seviyesindeki değişiklikleri belirlemek.
- Epigenetik düzenleme pluripontensi faktörleri, erken pankreatik gelişim, kompenzasyon ve β -hücre fonksiyonu ile ilgili olmak üzere dört gruptan seçilen miRNA'ların gen ekspresyon düzeylerindeki değişimlerini araştırmak.

.Çıktılar:

Pankreatik β -hücre farklılaşması epigenetik düzenlenmenin önemli rol oynadığı oldukça karmaşık bir süreçtir. Günümüzde artan obezite ve diyabet oranları düşünüldüğünde, bu karmaşıklığı çözmeye katkıda bulunmak bilim ve insanlık adına büyük yarar sağlayacaktır. Bu çalışmada, uygulanan VPA ile, PAK-MKH'lerden β -hücre oluşumu süresinde, pluripotensi faktörleri, HDAC'lar, Histonlar modifikasyonları ve ilişkili miRNA'ların gen ekspresyon seviyelerindeki değişiklikler araştırılacaktır. Bu çalışmanın sonuçları, T2D gelişiminin ilk ve en uzun aşaması olarak bilinen kompenzasyon evresinin çok daha iyi anlaşılmasına olanak sağlayarak, bu hastalığın erken tanısı ve tedavisi için hedef moleküllerin keşfine ve yeni ilaçların geliştirilmesine de yardımcı olacaktır.

Diğer taraftan, uzun süre VPA kullanımının küçük yaştaki epilepsi hastalarında insülin direnci ve T2D gelişimine neden olduğu bilinmektedir. VPA ile uyarılan kompenzasyonun bu mekanizmada yer alan miRNA'lar gibi anahtar moleküllerin hedeflenmesi yoluyla baskılanarak bu ilacın önemli bir yan etkisi olan T2D gelişiminin engellenmesi mümkün olabilir. Ayrıca, özellikle VPA+glukozun literatürde ilk defa çalışmamızda tespit edilen doz ve sürelerde MKH'lere uygulanması ile erişkin β -hücreleri elde edilip diyabetik bireylere transplante edilerek bu hastalığın hücresele tedavisinde kullanılabilir. Bu noktada, çalışmamızda yeni bir β -hücre farklılaştırma protokolü önerilmiştir. Bu çalışmadan elde edilen tüm bulgular literatürde ilk kez tarafımızca yapılan deneylerin sonucu olması bakımından, çalışmamız oldukça özgün ve yaygın etkisi yüksek bir araştırma niteliğindedir.

2. GENEL KISIMLAR

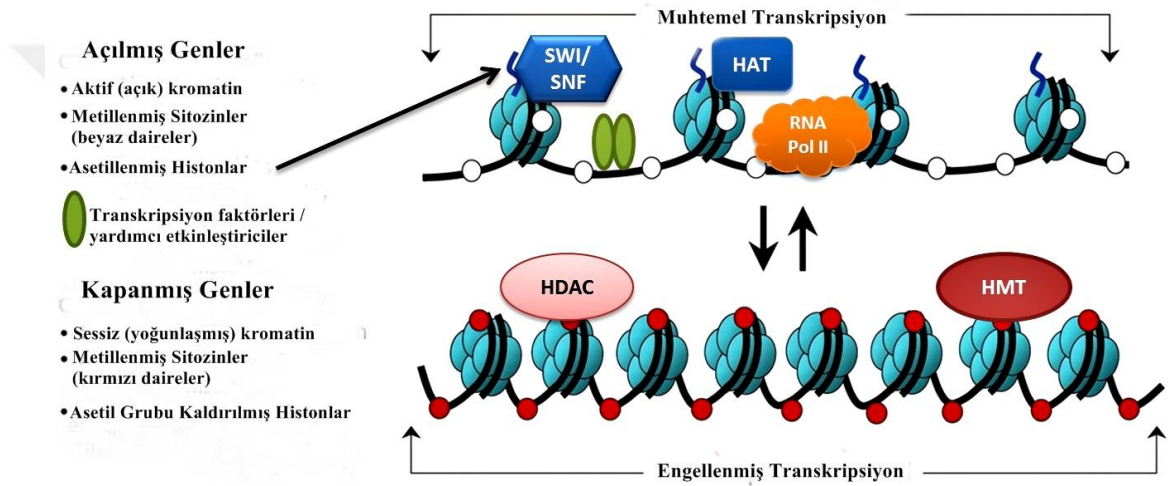
2.1. EPİGENETİK

Epigenetik, etimolojik olarak üzerinde, ötesinde anlamına gelen “epi” ve yaratılış, oluşum anlamına gelen “genesis” kelimelerinin birleşiminden oluşmuştur. Epigenetik çeşitliliğin oluşmasını sağlayan ana faktör olarak karşımıza çıkmaktadır. Örnek verecek olursak, pankreatik β hücresi ile deri hücresi neredeyse aynı genetik yapıya sahiplerdir. Aynı genetik yapıya sahip olmalarına rağmen, birinin β hücresi, diğerinin ise deri hücresi olmasını sağlayan temel mekanizmalardan birisi epigenetiktir. Moleküler açıdan epigenetik tanımlanmak istendiğinde, transkripsiyon süreci iyi bir örnek olacaktır.

En temel tanımıyla transkripsiyon, bir DNA kalıbından mesajcı RNA (mRNA) üretim sürecidir. Bu süreç, birçok transkripsiyon faktörü aracılığıyla yürütülür. Kromatinin en temel alt birimi olan nukleozom, H3/H4 tetrameri ve H2A/H2B dimerleri olan histonlar üzerinde 146 baz çifti içeren DNA'nın sarılmasıyla oluşan yapıdır (Ito ve diğ., 2000). Histonlar, diğer proteinlerden farklı olarak, translasyon sürecinden sonra asetilasyon, metilasyon, ubikitinasyon gibi bir takım moleküler süreçlerden geçerek aldığı sinyaller doğrultusunda aktivitesini gösteren proteinlerdir (Min-Hao Ku ve diğ., 1998). Özellikle, histonların asetillenmesi ve metillenmesi, nukleozomal yapıyı değiştirerek transkripsiyonel sürece en başında etki eder ve bu süreç epigenetik değişiklikler olarak isimlendirilir (Carey N, 2011). Transkripsiyon sürecinde en büyük engellerden biri, DNA bölgesine erişimi kısıtlayan bir nukleozomal bariyerin bulunmasıdır (Tsuklyama ve diğ., 1997; Grunstein ve diğ., 1997). Bu yüzden, DNA'nın histonlar üzerinde sıkıca paketlenmiş yapıda oluşabilecek gevşeme veya daha fazla sıkılaşma gibi değişiklikler transkripsiyonu doğrudan etkilemektedir.

Nukleozomun ana elemanları olan histon proteinlerinin N-terminal ucundan lizin aminoasitinin metillenmesi ya da asetillenmesi sonucunda DNA yapısı sıkılaşır ya da gevşer. Genel olarak hem histon proteinlerinin hem de özellikle DNA'daki CpG adacıklarının metillenmesi, transkripsiyonu baskılayıcı niteliktedir (Cedar ve diğ., 2009)

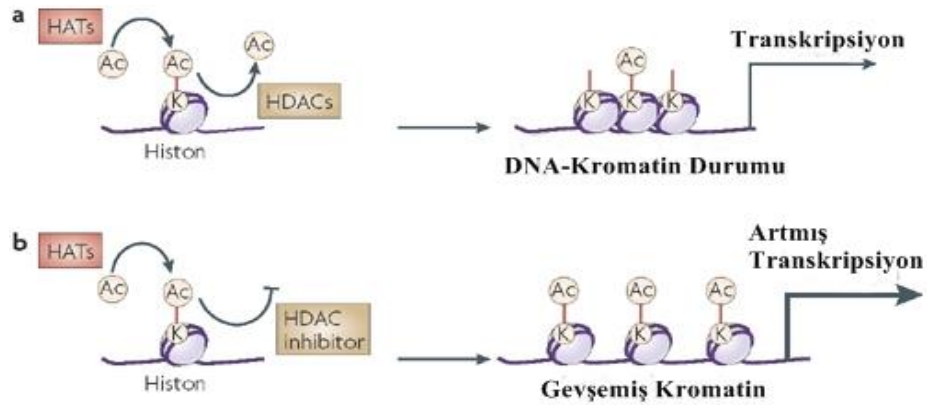
ve bu süreç, histon metiltransferazlar (HMT) aracılığıyla yürütülür (Rice ve diğ., 2003). Aksine, histon proteinlerinin asetillenmesi, sıkıca paketlenmiş olan DNA kalıbını gevşeterek, transkripsiyonel sürecin başlamasına olanak tanır. Bu süreç, histon asetil transferaz (HAT)'lar ya da histonların üzerindeki asetillenmeyi kaldıran, histon deasetiltransferaz (HDAC)'ların engellenmesi ile yönetilir. Yani kısaca özetlenecek olur ise, genellikle, histon proteinlerinin metilasyonu o genin anlatım kaybına, asetilasyonu ise o genin anlatımının başlamasına neden olur (Şekil 2.1:).



Şekil 2.1: HAT, HMT ve HDAC'ın kromatin yapısı üzerine etkileri özetlenmiştir (<https://www.wikiwand.com>'dan alınmıştır).

HAT'lar ve HDAC'lar birçok dokuda sırasıyla gevşek ya da sıkı kromatin yapılarının oluşmasına sebep olarak hücre proliferasyonu ve/veya farklılaşmasını düzenler. HDAC'lar, dizi benzerliği ve kofaktör benzerliğine göre 3 gruba ayrılır. Sınıf I HDAC'lar: HDAC 1,2,3,8; Sınıf II HDAC'lar: HDAC 4,5,6,7,9,10; ve Sınıf III HDAC'lar: Sirtuinler'den oluşur. Sınıf I HDAC'lar nukleusta iş görürken, Sınıf II HDAC'lar hem sitoplazmada hem de nukleusta iş görür. Sınıf II HDAC'lar daha kısıtlı hücre tipinde (kalp, beyin ve iskelet kası) eksprese edilir ve özgün transkripsiyon faktörleriyle bağlantı kurabilen N-terminal uzantıya sahiptir, dolayısıyla genom ile hücre dışı çevre arasında bağlantı kuran birçok sinyal iletim yolağında iş görür (Martin ve diğ., 2007).

Küçük molekül HDAC inhibitörleri kromatin etkileri ve hücre hattı özgünlüğü arasındaki bağlantıların çalışılmasında temel araçlardır. HDAC'ların farmakolojik inhibisyonu kromatinin yeniden modellenmesinin sistematik analizinin yapılmasına ve deneysel manipülasyonuna imkan sağlar (Marks ve diğ., 2004). HDAC inhibitörlerinin etkileri seçicidir (Mariadason ve diğ., 2000) ve bu sebeple sıklıkla HDAC'ları özgün olarak inhibe etmek için kullanılırlar (Marks ve diğ. 2004; Xu ve diğ., 2007). Kanser, diyabet ve kalp hastalıkları gibi yaygın hastalıklar ile ilgili çalışmalarda, HDAC inhibitörleri (HDACi) sıklıkla kullanılmaktadır. Bunlar arasında en çok kullanılanlar; Valproik asit (VPA) ile MS275 (tercihen Sınıf I HDAC'ları inhibe ederler, Hu ve diğ., 2003) ve Trichostatin A (TSA) ile Sodyum Butirat (NaB) (Sınıf I ve II HDAC'ları inhibe ederler (Yoshida ve diğ., 1990; Davie, 2003). HDAC inhibitörleri HDAC'ların incebağırsak (Tou ve diğ., 2004), oligodendrosit (Shen ve diğ., 2005), nöron (Hsieh ve diğ., 2004), adiposit (Yoo ve diğ., 2006), osteoblast (Lee ve diğ., 2006) ve T-hücreleri (Tao ve diğ., 2007)'nin farklılaşma programlarının gösterilmesi amacıyla başarıyla kullanılmıştır ve bir kanser ilacı olarak da klinik çalışmaları sürmektedir (Minucci., 2006). (Şekil 2.2:).



Şekil 2.2: HDAC ve HDAC inhibitörlerinin temsili etki mekanizması gösterilmiştir (Kazantsev ve diğ., 2008'den alınmıştır).

Epigenetik süreçlerin en önemli elemanlarından biri de mikroRNA (miRNA)'lardır. miRNA'lar, kodlanmayan RNA'lar olmasına rağmen birçok biyolojik aktivitede ve

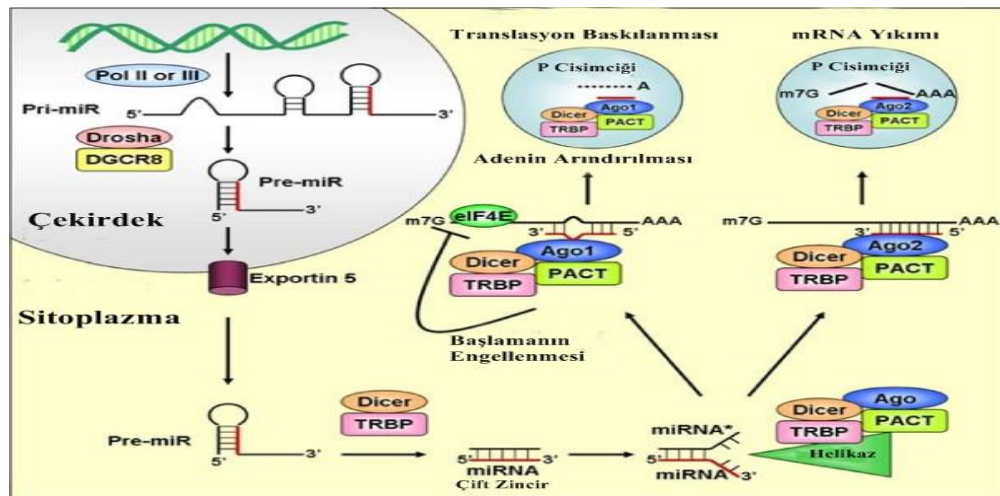
patolojik durumlarda kendini gösterir. miRNA dizileri, gen içinde ekzon, intron veya intergenik alanlarda dağılır. Genellikle RNA polimeraz II sayesinde transkripsiyonları başlar fakat bazı miRNA'ların, RNA polimeraz III tarafından transkripsiyonları başlatılır. Ve bunun sonucunda, ilkel miRNA olarak bilinen, 33 baz çiftlik pri-miRNA oluşmuş olur. Bu, miRNA'nın öncül hali olmakla birlikte genellikle 5' ucu metillenmiş ve 3' ucuna da çoklu adenin kalıntıları eklenmiş olarak bulunurlar (Lee ve diğ., 2004; Cai ve diğ., 2004). Transkripsiyondan sonra, bir RNA parçalayıcı olan RNaz III Drosha, pri-miRNA'nın toka kısmının kökünden 11 baz çiftini kopartır (Blaszczyk ve diğ., 2001). Drosha pri-miRNA'nın yıkımının kolaylaşması için iki farklı yol izler. Birincisi p68 ve p72 gibi RNA helikazlar ve heterojenik nüklear ribonükleoproteinler, diğeri ise mikroşlemci olarak bilinen ve Drosha ve DGCR8 tarafından oluşturulan, çift zincirli-RNA bağlanma proteini, C-ucundan Drosha'nın çalışmasını sağlar. Drosha sindirimi transkripsiyon ile beraber veya alternatif kesim aşamalarından önce gerçekleşebilir. Bu sindirimden sonra yaklaşık 22 nükleotidi kök kısmında, 48 nükleotidi toka kısmında olan, bir pre-miRNA oluşmuş olur (Zeng ve diğ., 2003).

Alternatif olarak, bazı bilinen oluşum süreçleriyle bağlantısı olmayan, mRNA kesim işlemleri sırasında açığa çıkan miRtrons'lar vardır. Bu moleküller mRNA'lardan kesilerek atılmış, intron kısımlarından oluşurlar ve fonksiyonel olarak pre-miRNA'lara benzerler. Bu nedenle, miRtron'ların oluşumu sürecinde, Drosha ile herhangi bir bağlantısı yoktur (Berezikov ve diğ., 2007).

Drosha ile sindirimi takiben, Ran-GTP bağımlı çift zincirli RNA bağlanma proteini olan Exportin-5, GTP bağımlı bir süreç ile, pre-miRNA'yı çekirdekten sitoplazmaya taşır (Yi ve diğ., 2003). Exportin-5'in aynı zamanda, pre-miRNA'yı nüklear bozulmadan koruduğu da söylenebilir. Sitoplazmaya geçtikten sonra, diğeri bir RNaz III olan Dicer, pre-miRNA'nın toka kısmını sindirip kopararak, 22 nükleotidlik çift zincirli bir olgun miRNA oluşumunu gerçekleştirir (Gregory ve diğ., 2005). Dicer'in olmaması, miRNA olgunlaşmasına geçilememesine ve buna bağlı olarak ölüme yol açar (Bernstein ve diğ., 2003; Davis ve diğ., 2008).

Çift zincirden biri, RNA-uyarımlı susturma kompleksi (**RISC**)'ne gider. RISC, TRBP, PACT, Argonaute 2 protein (**Ago2**) ve Ago2'nin sağlam kalmasını sağlayan GW182 birimlerinden oluşur (Chendrimada ve diğ., 2005; Maniataki ve diğ., 2005; Daschkey ve diğ., 2013). İki zincirden hangisinin RISC'e katıldığı ile ilgili yaygın görüşe göre, termonidamik olarak sağlam olan zincir yerinde kalırken, diğer daha az sağlam olan zincir, RISC kompleksine katılır. Geride kalan zincir ise, genellikle bir süre sonra bozulmaya uğrar. Fakat, bazı çalışmalarda, geride kalan miRNA zincirlerinden (passenger-strand), bir çoklarının da bozulmaya uğramadan, diğer RISC kompleksine katılan kardeşi gibi, RISC kompleksine katıldıkları gözlemlenmiştir (Romero-Cordoba ve diğ., 2014). Sonuç olarak, bir miRNA dizisinden iki adet olgun miRNA üretilmiş ve üretilen bu iki olgun miRNA'nın farklı biyolojik hedeflere odaklanmaları söz konusu olmuştur.

Oluşan miRISC kompleksi, mRNA susturmasında görev alır. Ago2, GW182, Poly-A bağlanma proteini (PABP), PAN2-PAN3 miRNA aracılı mRNA susturmasında merkezi bir rol üstlenirler (Hutvagner ve diğ., 2008). miRNA aracılı 3 adet mRNA susturma ihtimalinden bahsedebiliriz. Bunlar, mRNA'yı doğrudan hedef alarak, başlama ve uzama dönemlerinde protein oluşumunu durdurarak ve mRNA'yı P cisimciklerine götürerek oluşan süreçlerdir (Eulalio ve diğ., 2007; Liu ve diğ., 2005) (**Şekil 2.3**):



Şekil 2.3: miRNA oluşumu ve mRNA hedefleme durumları özetlenmiştir (<https://krauthammerlab.med.yale.edu>'dan alınmıştır).

2.2. PLURİPOTENSİ

Pluripotensi, etimolojik kökenine inildiğinde, çok fazla anlamına gelen “plurimus” ve güce sahip olma anlamına gelen “potens” kelimelerinin birleşiminden oluşmuştur. Hücre için kullanıldığında, birçok şey yapabilme gücüne sahip anlamına gelmektedir. Bu şu anlama gelir, pluripotensiye sahip bir hücre endoderm, mezoderm ve ektoderm olarak adlandırılan üç farklı germ tabakasına da farklılaşabilme yeteneğine sahiptir. Endoderm olarak, mide, sindirim kanalı ve karaciğer; ektoderm olarak, epidermal dokular ve sinir doku; mezoderm olarak da, kas, kemik, kan ve ürogenital sistem örnek verilebilir. Pluripotent hücrelere embriyonik kök hücreler örnek verilebilir. Bunlar vücudumuzdaki tüm hücreleri oluşturan hücrelerdir.

2.2.1. Pluripotensi Faktörleri

Son farklılaşmasını tamamlamış, belli bir özel göreve sahip olan hücreyi tekrardan ilk haline yani pluripotent haline getirme işlemine uyarılmış pluripotensi denir. Bundan 10 sene önce, 2006 yılında, Shinya Yamanaka ve grubu, olgun bir somatik hücreyi (fibroblast), 4 adet transkripsiyon faktörünü kullanarak, pluripotent geçmişine yeniden programladı ve bu yönteme de yeniden programlama; oluşan hücreye de uyarılmış pluripotent kök hücre adını verdi (Takahashi ve diğ., 2006). Bu 4 adet transkripsiyon faktörü Oct4, Sox2, Klf4 ve c-Myc idi. Daha sonra farklı araştırmacılar, farklı transkripsiyon faktörleri karışımları denediler. Sonuç olarak, çok iyi bilinen bu dört transkripsiyon faktörüne Nanog eklendi. Yapılan çalışmalarda hangi karışım denenirse denensin, Oct-4 ve Sox-2'nin hayati olduğu, beraber üretildikleri anlaşıldı.

Oct-4, insanda *POU5F1* geninden kodlanan bir proteindir. Bu protein, farklılaşmamış embriyonik kök hücrelerde, farklılaşma olmaksızın kendini yenilemede hayati öneme sahiptir. Sıklıkla, farklılaşmamış hücrelerin genel bir belirteci olarak çalışmalarda kullanılır. Oct-4 maternal olarak annenin yumurtasında aktiftir (Looijenga ve diğ., 2003). *Oct-4* geni kaybı, ya da anlatımının yok olması, anında hücre farklılaşmasını uyarır (Zaehres ve diğ., 2005). Diğer bir deyişle, Oct-4 pluripotensi için olmazsa olmazdır ve hücrenin çoğalırken farklılaşmadan devamlılığını sağlar. Oct-4, Sox-2 ile heterodimer oluşturur.

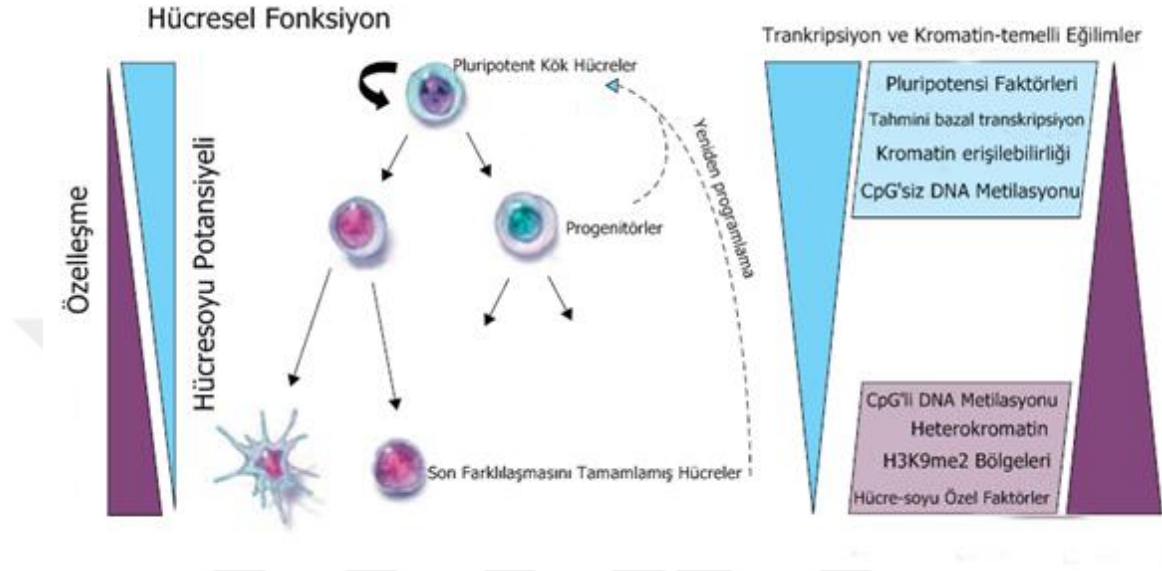
c-Myc, apoptoz, hücre döngüsü süreci ve hücrel değişim gibi bir çok alanda etkili olan, aynı zamanda pluripotensiyi sağlayan bir transkripsiyon faktörüdür. Birçok kanser çeşidinde, mutasyona uğramış olarak bulunan c-Myc'in, sürekli anlatımda olduğu görüldü. Kolon, meme, akciğer ve mide kanserlerindeki etkisi gösterildi. Bu yüzden c-myc birçok anti-kanser ilacının hedefi olmaktadır. c-Myc'in yaklaşık olarak tüm genlerin %15'ini transkripsiyona soktuğu anlaşılmıştır. Bu büyük bir orandır. Bunu, genlerin enhancer bölgelerine bağlanarak ve genel olarak HATs üretimini arttırarak yaptığı keşfedilmiştir (Claveria ve diğ., 2013).

Nanog, farklılaşmamış embriyonik kök hücrelerin çoğalırken farklılaşmalarının engellenmesinde hayati bir öneme sahip olan transkripsiyon faktörüdür. İnsanlarda *Nanog* geninden üretilir. Embriyonik kök hücrelerde pluripotensiyi korumada Oct-4 ve c-Myc ile beraber en önemlileri oldukları düşünülmektedir. Kanser geçiş çalışmaları ve özellikle kanser kök hücre çalışmalarında, sıklıkla hedef alınan bir transkripsiyon faktörüdür (Santagana ve diğ., 2006).

2.2.2. Pluripotensinin Epigenetik Mekanizmalarla Düzenlenmesi

DNA metilasyonu zigot döneminde aniden düşer, implantasyona giren blastokistte ise giderek artar (**Şekil 2.4:**). Erken dönemdeki embriyonun genomu CpG adaları dışında kalan CpG dinükleotidlerinde metilasyon gösterirken, CpG adalarında metilsizlik veya hipometilasyon mevcuttur. Buna ek olarak erken embriyoda histon metilasyonu da olur ve hatta bu DNA metilasyonundan daha önce gerçekleşir. Özetle, embriyodaki DNA metilasyonu non-CpG bölgelerinde gerçekleşir ve histon 3'ün 4. Lizinin metilasyonu (H3K4me) CpG adalarındaki DNA metilasyonunun oluşmasını engeller. Buradan anlaşılacağı üzere, DNA metilasyonu ile histon değişimleri farklı kimyasal tepkimeler ve farklı enzimler sayesinde gerçekleşse de, genlerin baskılanması söz konusu olduğunda bu ikisi arasındaki biyolojik bir ilişkinin varlığı kaçınılmazdır. Erken embriyo gelişiminde DNA metilasyonu ile histon değişimleri arasında karşılıklı bir etkileşimin olduğu düşünülmektedir. Histon metilasyonu DNA metilasyon modelini etkilerken DNA metilasyonu da histon düzenlenişi için bir kalıp görevi yapar. Son verilere göre histon metiltransferazlar ile DNA metiltransferazlar arasında doğrudan bir ilişki vardır. Genlerin sessizleştirilmesinde histon üzerinde meydana gelen değişimler

geri dönüşümlü ve zayıf bir baskı oluştururken, DNA metilasyonu kalıcı ve geri dönüşümsüz baskıya neden olur (Can, 2014).



Şekil 2.4: Hücreler pluripotensi özelliklerini kaybettikçe daha çok kararlanma ve özelleşme sürecine girerler. Pluripotensiyi sağlayan etkenler giderek azalır ve bunların yerini özelleşmiş hücre özellikleri alır. Yeniden programlamayla bu özellikler geri kazanılır (kesikli çizgi) (Fisher ve Fisher, 2011'den alınmıştır).

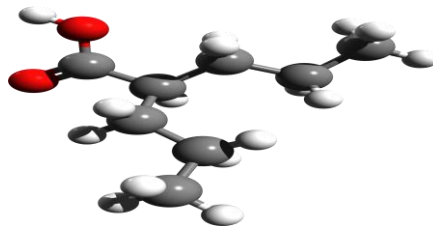
Kromatin örüntüsüyle hücre işlevleri ve dolayısıyla hücrenin farklılaşma durumu arasında bir ilişki olduğu bilinir (Joffe ve diğ., 2010). Farklılaşmamış hücrelerde daha fazla ökromatin yapısı görülür ve H2A ve H3 histonlar DNA'ya daha gevşek bağlanırlar. Bu tür hücrelerde genel transkripsiyon faktörü ve kromatin düzenlenmesinden sorumlu proteinler oldukça fazladır. Embriyonik kök hücrelerde kromatin transkripsiyona daha açıktır, nükleaz etkinliği yüksektir ve H3K4me3 ve H3K27me3 gibi çok sayıda histon değişimi görülür (Fisher ve Fisher 2011). Buna karşın farklılaşma yolunda ilerleyen hücrelerde heterokromatin örüntüsü artar.

Embriyonik kök hücrelerdeki kromatin, etkinleştirici ve baskılayıcı olmak üzere bazı epigenetik işaretler taşır. Bunlara birbirine zıt iki işlevi olan anlamı taşıyan bivalan bölgeler adı verilir ve gelişimde rol alan ama pek fazla ifadelemeyen transkripsiyon faktörlerini kodlarlar. Bu bölgelerin etkinlik işareti, histon 3'ün 4. Lizin'indeki üç adet

metilasyon (H3K4me3); baskılayıcı işareti ise histon 3'ün 27. Lizin'indeki üç adet metilasyondur (H3K27me3). Bu kromatin bölgelerinin %50'si Oct4, Nanog veya Sox2 için bağlanma bölgeleri taşıyor (Can, 2014).

2.3. VALPROİK ASİT (VPA)

Valproik asit (VPA) (2-propil pentanoik asit), kas kasılmalarını engelleyen ve duyu durumunu dengede tutma yeteneğine sahip olan bir yağ asididir (Henry, 2003). Yaygın oranda epilepsi ve bipolar hastalıkların tedavisinde kullanılır. Bu etkilerini merkezi sinir sisteminin düzensiz elektriksel aktivitesini azaltarak gerçekleştirir. Gastrointestinal sistemde valproat iyonlarına ayrıldıktan sonra, GABA'nın inhibisyonunu engelleyerek, onun seviyesini yüksek seviyede tutmuş olur ve GABA eksikliği sonucunda görülen aşırı endişe ve kaygının giderilmesine bağlı olarak etkisini gösterdiği düşünülmektedir. Karaciğerde tamamen metabolize olur. Moleküler düzeyde ise etkisini HDAC'ların inhibisyonu sağlayarak, hedef genleri hiperasetillenmiş durumda tutarak gösterir. Sonuç olarak VPA, kromatinin yeniden düzenlenmesine neden olarak, epigenetik süreçte hücrelerin kaderinin belirlenmesinde çok önemli işlevler görür. Şu ana kadar yapılan çalışmalarda, VPA'nın, nöral hücre farklılaşmasına yol açtığı kesin olarak kanıtlanmıştır (Hsley ve diğ., 2004; Jeon ve diğ., 2013; Almutawaa ve diğ., 2014). VPA epigenetik süreçle ilişkili çok etkin bir ajandır ve kanser, tip-2 diyabet, obezite gibi birçok önemli hastalıkla ilişkileri gösterilmiştir (Khan ve diğ., 2016; Shi ve diğ., 2016; Zhao ve diğ., 2016). Moleküler formülü $C_8H_{16}O_2$ ve moleküler ağırlığı 144.21 g/mol'dür (Şekil 2.5:).



Şekil 2.5: VPA'nın kimyasal yapısı resmedilmiştir (<https://en.wikipedia.org>'dan alınmıştır).

2.4. PANKREAS OLUŞUM SÜRECİ

2.4.1. Genel Bakış

Pankreas temel besinlerin metabolizması için hem endokrin hem de ekzokrin fonksiyonu olan hayati bir organdır. Ekzokrin pankreas, besinlerin sindirilmesinde temel rol oynayan, asinar ve duktal hücrelerden meydana gelir. Bu kısımdan salgılanarak, on iki parmak bağırsağına giden, enzim ihtiva eden pankreatik öz suyu, protein, karbonhidrat ve lipidlerin yıkımını gerçekleştirir. Buna karşın, endokrin pankreas ise, kana hormonlar salarak kan glukoz dengesinin sağlanmasında görev yapar. Endokrin pankreas Langerhans adacığında konumlanan α (glukagon üretir), β (insülin üretir), δ (somatostatin üretir), **PP** (pankreatik polipeptid üretir) ve ϵ (ghrelin üretir) hücrelerinden oluşur (Shih ve diğ., 2012).

Pankreasın endokrin ve ekzokrin kısmının, genel olarak embriyonik gelişim sürecinde bağırsak endodermindeki progenitör hücre havuzundan tüvelendiği bilinir (Gu ve diğ., 2002). Pankreas ilk olarak embriyonik (E) 8.5. gün civarında, önbağırsak endoderminin karşısında, küçük epiteliyal tomurcuklar şeklinde kendini gösterir. E12.5. güne gelene kadar hücreler çoğalmaya devam ederler. Bu da büyümüş bir pankreatik tomurcuk görünümüne neden olur. Bu erken faz ya da birincil geçiş denilen, E12.5. güne kadar olan sürede, pankreas kendi dallanmış yapısını oluşturmaya başlamış gözükmekte olmasına karşın, hala farklılaşmamış hücreler, çok sıkı bir şekilde, mezenkimal hücreler etrafında çevrelenmiş bir görünüm sergilemektedir. (Pictet ve diğ., 1972).

E12.5. günden doğuma kadar olan sürece ise ikincil geçiş denir (Shih ve diğ., 2013). İkincil geçiş aşamasından sonra pankreas, endokrin, asinar ve duktal hücreleri oluşturmaya başlamış olup, olgun pankreas görüntüsüne neredeyse ulaşmış olur. E15.5. güne gelindiğinde, asinar hücreler iyice dallanmış, duktal kısım oluşmuş ve endokrin kümeler oluşmaya başlamıştır.

2.4.2. Moleküler Mekanizma

E.8.5. günde, pankreatik tomurcuklanma oluşmadan önce, bağırsak endoderminin prepankreatik bölgesinde, dorsal ve ventral olmak üzere iki ayrı tomurcuğun varlığı tespit edilmiştir (Slack, 1995). Ventral ve dorsal tomurcuklar birbirlerinden farklı

yerlerde olsalar da, gelişim süreçleri birbirlerine benzerdir. Retinoik asit (RA), bağırsak endoderminin yapılanmasında etkin rol oynar. RA'nın eksikliğinin, zebra balıklarında pankreasın tamamen oluşmamasına, farelerde ise sadece pankreatik dorsal tomurcuğun oluşmamasına neden olduğu gösterilmiş (Chen ve diğ., 2004; Martin ve diğ., 2005; Molotkov ve diğ., 2005) ve RA'nın özellikle pankreatik dorsal gelişimin önemli bir aracısı olduğu ortaya konmuştur.

Ventral ön bağırsak endodermi, ventral pankreası ve karaciğeri oluşturur (Zorn, 2009). Bu kısımdan salgılanan FGF ve BMP prohepatik gelişim için hayati önem taşımaktadır. Ventral ön bağırsak endodermi bu sinyalleri, onu çevreleyen kardiyak mezenşimden alır.

Dorsal tomurcuk ise, sinyallerini ayrıca endotelial hücrelerden alır. Endotelium eksikliği yaratılan farede, erken pankreatik gelişimin durduğu, dolayısıyla bir pankreasdan söz edilemeyeceği gösterilmiştir (Lammert ve diğ., 2001; Yoshitomi ve diğ., 2004). Fakat, zebra balıklarında yürütülen benzer bir çalışmada, endotelial kısım olmadan da pankreatik gelişimin sorunsuz bir şekilde gerçekleşebileceği gösterilmiştir (Field ve diğ., 2003).

Pankreatik progenitörlerde birçok transkripsiyon faktörü gösterilmesine rağmen, esas olarak, Pdx1, Ptf1a ve Sox9 etkindir (Ahlgren ve diğ., 1996; Seymour ve diğ., 2007) Örneğin, Ptf1a'nın silinmesi, pankreatik progenitörlerin başka endodermal soylara doğru gelişmesine neden olur (Burlison ve diğ., 2008). Ayrıca, Ptf1a ve Pdx1 dışarıdan duodonal preküsörlere aynı anda uygulandığında onları pankreatik preküsörlere çevirebilme yeteneğine sahip oldukları da gösterilmiştir (Afelik ve diğ., 2006).

Bunlara ilave olarak, tüm erken pankreas gelişim transkripsiyon faktörlerinin, ileriki gelişim için gerekli olduğu akıldan çıkarılmamalıdır (Pan ve diğ., 2011). Örneğin, Tcf2 ve Ptf1a Onecut-1'e bağımlıyken, Onecut-1 ekspresyonu da Tcf2 ve Ptf1a'ya bağımlıdır (Thompson ve diğ., 2012). Benzer karşılıklı etkileşimler, Sox9, Pdx1, Hes1 ve Ptf1a arasında da gösterilmiştir (Ahnfelt-Ronne ve diğ., 2012; Hale ve diğ., 2005).

Hes1 ve Sox9, Notch sinyali ile düzenlenir (Kageyama ve diğ., 2007). Bu da Notch sinyalinin erken pankreatik gelişim için hayati olduğunu gösterir. *Notch* geni taşımayan bir farede, erken pankreas gelişiminden öteye geçilememesi bunun bir göstergesidir (Fujikura ve diğ., 2006). *Hes1* geninin silinmesi sonucunda hücre çoğalması inhibitörü olan p57'nin pankreatik progenitörlerde arttığı gözlemlenmiştir. Bu da neden *Notch* geni silindiğinde erken pankreastan herhangi bir gelişim olmadığını açıklamaktadır. Kısacası Notch ile hücre döngüsü ve transkripsiyon faktörleri arasında çok sıkı bir ilişki vardır.

Notch sinyalinin epitelyumdan gelmesine karşın, pankreatik gelişim ayrıca onu çevreleyen mezenşimden aldığı sinyallerle de kontrol edilir. Burada en iyi bilinen mezenşimal sinyal FGF yolağıdır. Birincil geçiş evresinde, FGF10 yüksek oranda pankreatik mezenşimde üretilmektedir (Bhushan ve diğ., 2001; Dichmann ve diğ., 2003). FGF10 hücre çoğalmasında ve erken pankreatik tomurcuk gelişimini devam ettirmede çok önemlidir. Ayrıca FGF10, epitelyumdaki Ptf1a ve Sox9'u da düzenleyerek, aslında genel gelişim için en az Notch kadar etkili olduğunu bizlere gösterir.

Erken pankreatik mezenşimal doku kaynaklı olması muhtemel olan iki önemli protein daha vardır. Bunlar, Wnt ve BMP'dir (Jonckheere ve diğ., 2008). Hala tam olarak nereden salgılandıkları bilinmese de, mezenşim tarafından salgılandıkları çok daha olası görülmektedir.

2.4.3. Tip ve Trunk Hücreler

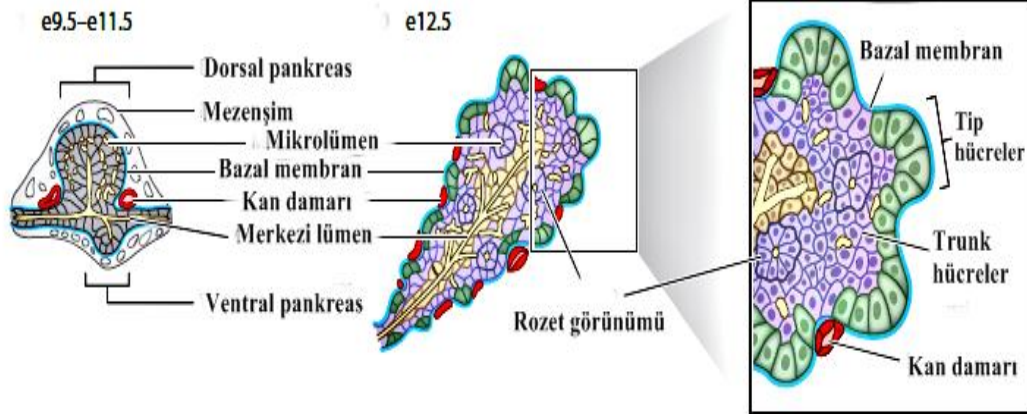
Birincil geçiş sırasında pankreatik tomurcuk hala makroskobik düzeye ulaşamamış ve pankreas oluşumu için gerekli olan hücreleri henüz verememiştir. Bu aşamada pankreatik tomurcukta konumlanan hücrelerin neredeyse hepsi, olgun hücreleri oluşturacak olan progenitör hücreler halindedir. Olgun organ oluşturabilmek için, ikincil geçişin başında, bu progenitörlerden ilk önce tip ve trunk hücreler oluşur (Zhou ve diğ., 2007). Tip ve trunk hücreler olgun hücrelere geçişte bir aşama olarak görülebilir.

Bu süre zarfında, pankreatik epitelyum hızlıca bir yapısal değişime uğramaya başlar. Kenar bölgelerinden çıkıntılar oluşur. Bu yapılar Ptf1a ile c-Myc üretimi gerçekleşen tip

kısımları ve Nkx6.1/6.2, Sox9, Tcf2, Onecut-1, Hes1 üreten trunk kısımlarıdır (Jacquemin ve diğ., 2003; Klinck ve diğ., 2011). Bu kısımlar, olgun pankreas oluşumuna başlangıcın işaretidir. Bu kısımlardan trunk hücreler endokrin ve ductal hücrelere gelişecekken, tip hücreleri asinar hücre soyuna hedeflenirler (Kopp ve diğ., 2011; Pan ve diğ., 2013).

Bu sürecin ana iki transkripsiyon faktörü Nkx6.1/6.2 ve Ptf1a'dır. Çünkü bu proteinlerin hangi kısımda üretimine devam edileceğine göre pankreas hücre soylarının seçimleri gerçekleştirilir. Nkx6.1/6.2, trunk özelliği destekleyip, hücreleri bu yöne sevk ederken; Ptf1a ise, tip hücrelerinin oluşumunu destekler.

Notch sinyalinin de trunk hücrelerini sağlamada önemli bir görevi vardır. Bu aşamada Notch baskılanmasının aşırı artmış bir tip formasyonuna yol açtığı çalışmalarla gösterilmiştir (Magenheim ve diğ., 2011; Horn ve diğ., 2012;). Özetlenecek olursa, bu aşamada Notch sinyalinin olduğu yerlerde tip karakteri baskılanıp, trunk özellik ön plana çıkar (Şekil 2.6:)



Şekil 2.6: Embriyonik gelişim sürecinde tip ve trunk hücreler resmedilmiştir (Shih ve diğ., 2013'den alınmıştır).

2.4.4. Asinar, Duktal ve Endokrin Hücre Soylarının Gelişimi

Asinar hücreler pankreasın yaklaşık %95'ini oluştururlar ve enzim salgılama fonksiyonlarının dışında, β -hücrelerinin yerine konulabilmesi için de ilgi çekici bir hücre popülasyonudur (Zhou ve diğ., 2008). Pankreatik kanserlerin en sık karşılaşılanı asinar hücrelerden kaynaklanmaktadır. Yukarıda bahsedildiği gibi, asinar hücreler tip hücrelerden türevlenmiştir. E15.5. gün civarında birçok tip hücresi, asinar hücre soyuna farklılaşıp, çoğalmaya başlarlar (Zhou ve diğ., 2007).

Ptfla'nın tip oluşumu yani asinar hücreye geçiş için en önemli transkripsiyon faktörü olduğu belirtilmiştir. Asinar hücreye geçiş aşamasında Ptfla sayesinde asinar hücreler için hayati bir kompleks olan PTF1-L, asinar hücre genlerinin anlatımına neden olarak, doğrudan asinar hücreye farklılaşmaya neden olur (Holmstrom ve diğ., 2011). Benzer bir şekilde, Ptfla'nın hedefi olan *Nr5a2* geni de, asinar hücre farklılaşması için gereklidir.

PTF1-L'den bağımsız olarak asinar soya farklılaşmayı sağlayan proteinlerden en önemlisi *Mist*'tir. *Mist* geni silinmiş olan farelerde, asinar hücre karakterinde azalma, hücre polarite kaybı ve ekzositozda bozukluk ortaya çıkar (Pin ve diğ., 2001)

Şu ana kadar tam olarak bilinmeyen bir durum ise, asinar hücre popülasyonunun doğuma kadar olan sürede, çok hızlı çoğalma ve genişleme hızına sahip olmasıdır. Bilindiği gibi, Ptfla ve *Mist1*, asinar hücre genişlemesini engelleyen, daha çok farklılaşmayla bağlantılı olan transkripsiyon faktörleridir. *Nr5a2* ise ekzokrin hücre hattının çoğalmasını sağlar. İlave olarak c-Myc ve β -catenin de bu ekzokrin genişleme için adaydır. Erken pankreatik progenitörlerde bu proteinlerin eksikliklerinin asinar hücre hipoplazisine neden olduğu bildirilmiştir (Nakhai ve diğ., 2008).

Tip hücreler monopotent olarak sadece asinar hücrelere dönüşmelerine rağmen, trunk hücreler hem duktal hem de endokrin hücreleri verebildiklerinden bipotent hücreler olarak bilinirler. Duktal hücreler ya da duktal kanal aynı zamanda progenitör havuzu olarak da bilinir ve özellikle gerektiğinde endokrin kaynaklı hücreler, bu kanaldan ayrılarak, kümelenirler (Hick ve diğ., 2009; Kopp ve diğ., 2011). İkincil geçiş döneminde, bazı duktal hücreler *Ngn3* salgılayarak kanaldan ayrılmaya başlarlar

(Schwitzgebel ve diğ., 2000). Bu da endokrin kısmın başlangıcı olur. Trunk hücreler hiçbir şekilde Ngn3 üretimi yapamazlar (Beucher ve diğ., 2012). Bu nedenle Ngn3'ün kontrol edilebilmesi endokrin kısmı yönlendirebilmek için kilit rol oynayacaktır.

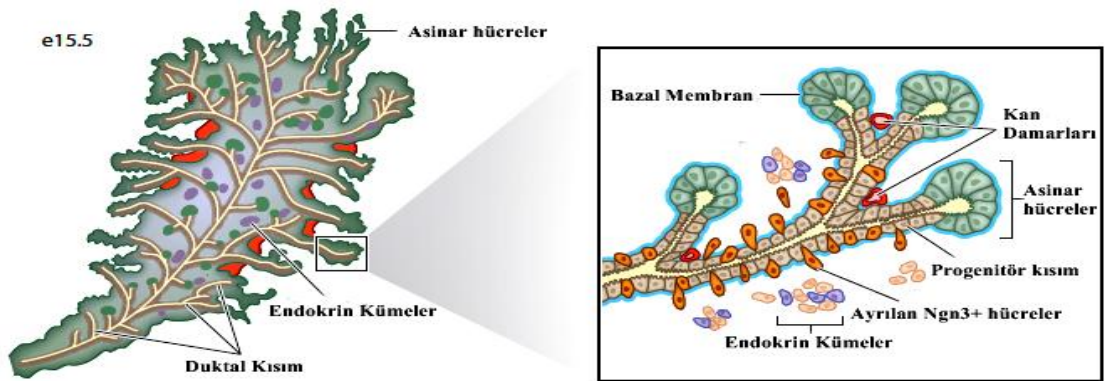
Bugüne kadar duktal gelişime nazaran, endokrin farklılaşma aşaması çok daha yoğun bir şekilde incelenmiştir. Bunun nedenlerinin başında β -hücrelerinin gelişim aşamalarını anlayıp, diyabet hastalığına tedavi sunabilme umudu yer almaktadır. Duktal kısmın belirli transkripsiyon faktörleri arasında Sox9, Onecut-1 ve Tcf2 sayılabilir. İlginçtir ki, bu transkripsiyon faktörleri aynı zamanda Ngn3 üretilebilmesi için de hayati öneme sahiptirler (Maestro ve diğ., 2003; Kang ve diğ., 2009). Ngn3, ilkel kanalda belirli hücre alt gruplarında üretilirken, nasıl oluyor da embriyonik duktal hücrelerde üretimi baskılanabiliyor sorusu hala cevaplanabilmiş değildir. Hes1 proteini bu konuya ışık tutabilir. Hes1, Ngn3 transkripsiyonunu ve aktivasyonunu engelleyen çok önemli bir proteindir (Apelqvist ve diğ., 1999; Lee ve diğ., 2001). Son zamanlarda, Hes1'in Ngn3 protein yıkımına neden olduğu da gösterilmiştir. (Qu ve diğ., 2013). Bu da Hes1'in sadece transkripsiyon baskılama sürecinde, Ngn3 üzerinde etkili olmadığını göstermektedir.

Fakat unutulmamalıdır ki, duktal kısım aynı anda Ngn3'ün, hem pozitif hem de negatif düzenleyicilerini üretmektedir. Buradan da şu sonuç çıkmaktadır: o anki şartlara göre hangi düzenleyici yüksek miktarda ise onun yönlendirdiği süreç işlemektedir. Buna örnek olarak Notch sinyalini verebiliriz. Notch sinyali Ngn3 aktivasyonunu engeller ve duktal hücre karakterini korur (Greenwood ve diğ., 2007). Bu durum da bize, eğer duktal hücrelerden endokrin yolağa girmek yani duktal kısımdan kaçmak isteyenler olursa, Notch sinyalinden de kaçması gerekeceğini göstermektedir. Fakat Notch, iki durumu da sağlar. Yüksek Notch seviyesi, Hes1 ve Sox9 seviyesini yüksek tutarak Ngn3 üretiminin baskılanmasına dolayısıyla, endokrin kısmın baskılanması, duktal kısmın karakterinin korunmasına yol açar. Fakat Notch üretilmesine rağmen düşük miktarda üretildiğinde, sadece Sox9 üretimine yol açar, Hes1 üretimini gerçekleştirmez ve sonuç olarak Ngn3 yıkılmadan, gerekli hücreleri duktal kısımdan ayrılmaya ve endokrin farklılaşmaya girmelerine neden olur (Shih ve diğ., 2012). Buradan da Sox9'un Ngn3'ün pozitif düzenleyicisi olduğunu sonucunu çıkartabiliriz.

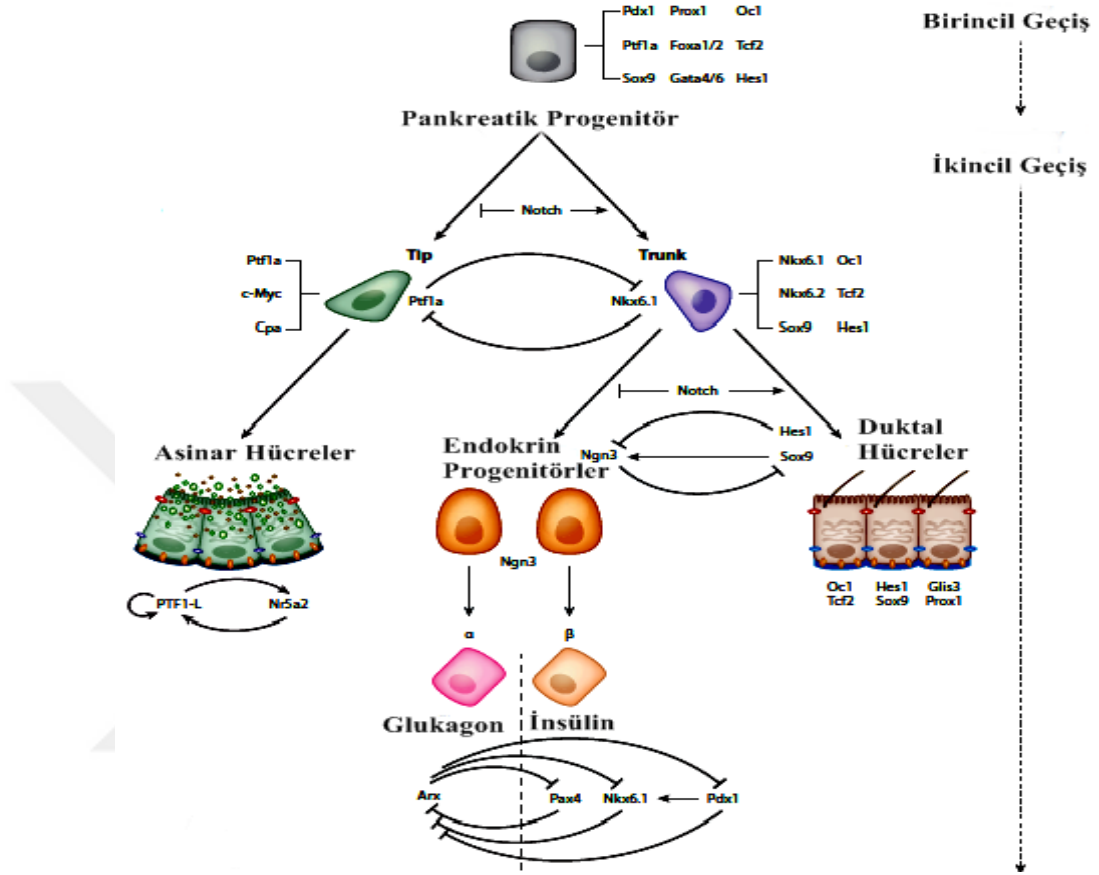
Ngn3⁺ün üretimi ile duktal kısımdan kaçan hücrelerin endokrin farklılaşmaya girip, kümelenmeye başladıklarından daha önce bahsedilmişti. Ngn3⁺ hücreler, Langerhans adacıklarını oluştururlar ve beş farklı hücre tipine dönüşebilme kapasitesine sahiptirler. Bunlar, glukagon üreten α -hücresi, insülin üreten β -hücresi, somatostatin üreten δ -hücresi, pankreatik peptidler üreten PP-hücresi ve grelin üreten ϵ -hücresidir.

Ngn3⁺ hücreler gen ekspresyon seviyesinde bazı değişikliklere sahip olurlar. Bu değişiklikler Ngn3'e bağımlı transkripsiyon faktörleri olan, Pax4, Arx, Rfx6, NeuroD1, Pax6, Isl1'in üretime başlanmasıdır. Bunu takiben farklılaştıkları hücre tipine özel hormonları da üretmeye başlarlar. Çalışmamızın konusu kapsamında beş hücrenin hepsinden ziyade enerji metabolizmasının ana hormonları olan insülin ve glukagon hormonlarını üreten α ve β -hücreleri üzerinde durulacaktır.

Pax4, Pdx1 ve Nkx6.1 transkripsiyon faktörleri β -hücreleri için hayati öneme sahipken, Arx ise α -hücrelerinin belirlenmesinde rol oynar. α -hücrelerinde Pax4, Pdx1 ve Nkx6.1 üretimi gerçekleştirildiğinde, onların β -hücrelerine dönüştükleri tespit edilmiştir (Schaffer ve diğ., 2013). Pax4 ve Nkx6.1, Arx'in doğrudan transkripsiyonel baskılayıcılarıdır. Aynı şekilde Arx de, Pax4, Nkx6.1 ve Pdx1'in doğrudan veya dolaylı yollardan baskılayıcıdır. (Collombat ve diğ., 2005; Yang ve diğ., 2011) (Şekil 2.7: ve Şekil 2.8:).



Şekil 2.7: Embriyonik gelişim sürecinde, duktal hücreler, asinar hücreler ve endokrin hücre farklılaşması özetlenmektedir (Shih ve diğ., 2013'den alınmıştır).



Şekil 2.8: Pankreas hücrelerinin dönemsel epigenetik gelişim süreci özetlenmektedir (Shih ve diğ., 2013'den alınmıştır).

2.4.4. Pankreatik Gelişimin Epigenetik Olarak Düzenlenmesi

Epigenetik mekanizmalar, pankreas gelişimi sürecinde hücrelerin kaderinin belirlenmesinde önemli bir rol oynar. Pluripotent kök hücreler, multipotent karakterli mezoderme, ektoderme ve endoderme farklılaşırlar. Embriyonik pluripotent kök hücreler (ESCs)'in, genlerinde, CpG adacıklarından zengin promotörler ile beraber, trimetilasyon taşıyan histon H3 lizin 4 (H3K4me3) ile H3K27me3 bulunur. Bu durum, ESC'lerin gelişimsel genlerinin inaktif konumda tutulmasını, sonuç olarak pluripotensinin devamını sağlar (Bernstein ve diğ., 2006). Farelerin ventral ön bağırsak endoderminde hücreler, ventral pankreatik progenitörler oluşmadan önce pluripotent olarak kalırlar, ve daha sonrasında E10.5. günde, Pdx1⁺ hücrelerde H3K27me3

kaybolmaya başlar (van Arensbergen ve diğ., 2010). H3K27me3'ün kaybı, dorsal pankreatik kısımda da kaydedilmiştir. Ancak, yine de başka bir organın hücresine dönüşmek gibi alternatif gelişimleri kısıtlamak adına, E10.5. günde Pdx1⁺ hücrelerde, bir çok gen heterokromatin pozisyonunda kalmaya devam eder (van Arensbergen ve diğ., 2010). Olgun β -hücrelerinde ise artık, Pdx1⁺ hücrelerde gözlenen H3K27me3 ihtiva eden genlerin birçoğu, trimetilasyonu kaybetmiştir. Özel olarak bir histon metil transferaz olan *Ezh2* geni silindiğinde, E10. günde, ortaya çıkan karaciğer tomurcuğuna rağmen, geniş bir oranda Pdx1⁺ hücre sayısı gözlemlenmiştir (Xu ve diğ., 2011). Bu sonuçtan yola çıkılarak *Ezh2*'nin pankreas ve karaciğer arasındaki geçiş sürecini kontrol eden önemli bir protein olabileceği düşünülmüştür.

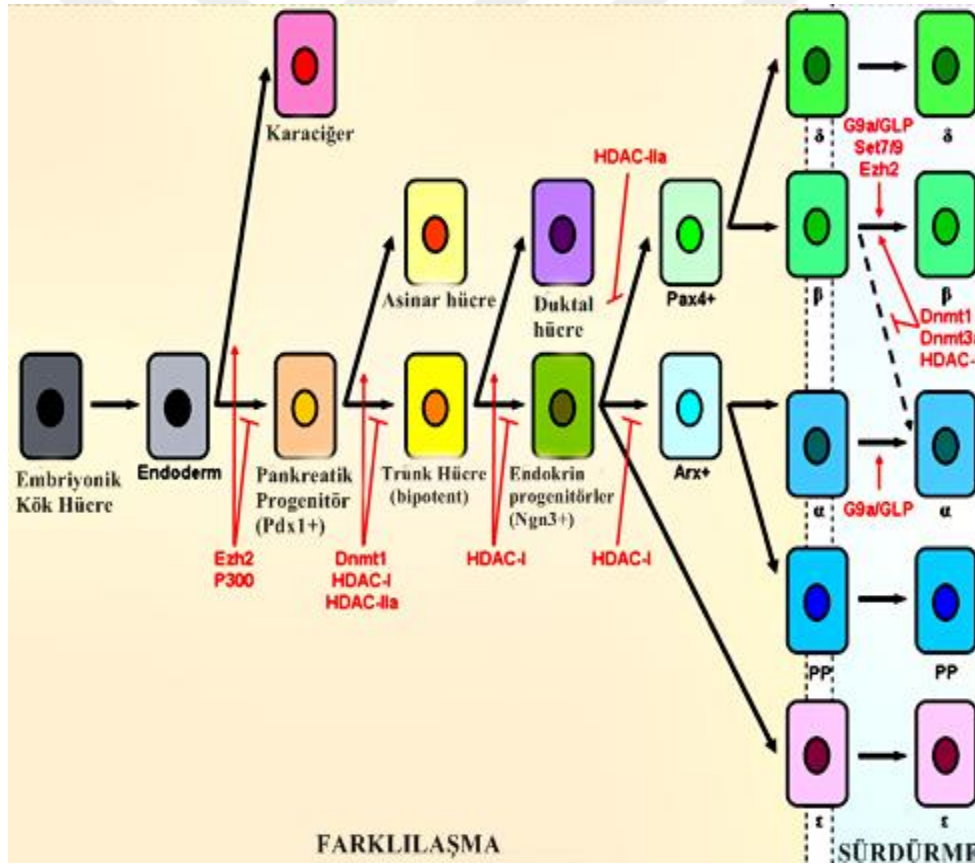
E10. günde, H3K9, H3K14, H2BK5 ve H4K5'teki lizin amino asitlerini asetilleyen bir histon asetil transferaz olan P300'ün silinmesi, ventral pankreatik kısımda, daha küçük karaciğer tomurcuğuna karşın, çok daha fazla Pdx1⁺ hücre soyuna yol açmıştır (Xu ve diğ., 2011). Bu bilgiden de P300'ün daha çok, karaciğer gelişiminin bir parçası olduğu sonucu çıkabilir.

HDAC'lar da pankreatik gelişim sürecinde çok etkindirler. Sınıf I HDAC (1-3 ve 8), pankreatik endokrin kısmın gelişmesinde önemli rol oynarlar (Haumaitre ve diğ., 2008). *In vitro* sınıf I HDAC inhibitörü (VPA veya MS275) uygulaması yapılan sıçan pankreaslarında, asinar hücre popülasyonunun kayda değer oranda azaldığı ve duktal popülasyonun güçlü bir şekilde arttığı gözlemlenmiştir. Dahası, Ngn3'ün koruyucusu olarak bilinen sınıf I HDAC inhibitörleri sayesinde, Ngn3⁺ endokrin progenitör havuzunun da arttığı gözlemlenmiştir. Daha ileriki gelişim döneminde ise, sınıf I HDAC inhibisyonunun Arx aktivitesini baskıladığı ve sonuç olarak α ve PP hücrelerini kısıtladığı tespit edilmiştir (Haumaitre ve diğ., 2008).

Aksine, sınıf II HDAC (4,5,7,9)'lar doğrudan Pax4'ü hedef alarak, β ve δ -hücrelerinin terminal farklılaşmalarına engel olmuştur (Lenoir ve diğ., 2011). Farelerde *HDAC 5* ve *9* genlerinin silinmesi sonucunda, artmış sayıda β -hücresi ve *HDAC 4* ve *7* genlerinin silinmesi sonucunda artmış sayıda δ -hücresi tespit edilmiştir (Lenoir ve diğ., 2011).

Ayrıca, sınıf II HDAC inhibitörü olan MC1568, Pax4 üretimini aktive etmiş, β ve δ - hücre sıklığını artırmıştır (Lenoir ve diğ., 2011).

Olgun β -hücrelerine sınıf I HDAC inhibitörleri uygulandığında, α -hücre belirteçleri olan MafB ve Arx, sonuç olarak da glukagonun yüksek oranlarda sentezlendiği gözlemlenmiştir. Fakat bu süre zarfında, β -hücrelerinin kendi belirteçlerinde kayda değer bir değişiklik meydana gelmemiştir. (Kubicek ve diğ., 2012). Bu da bize sınıf I HDAC'ların, endokrin hücrelerin birbirlerine farklılaşmasında (neogenez) ve olgun β -hücresinin özelliklerini korumaya yönelik bir etkisi olduğunu düşündürmüştür (Şekil 2.9:).



Şekil 2.9: Histon etkileşimli epigenetik düzenleyicilerin endokrin ve ekzokrin kısım üzerindeki etkisi özetlenmektedir (Sandovici ve diğ., 2013'den alınmıştır).

2.4.5. MiRNA'lar ve β -Hücreleri Üzerindeki Etkileri

Yaklaşık 22 nükleotitten oluşan olgun miRNA'lar, tamamlayıcı olabildikleri mRNA'ların 3' bölgesine bağlanma yeteneğine sahiptir. miRNA üzerinde yapılan birçok başlangıç çalışması, Dicer, Drosha, Ago2 ve DGCR8 genlerinin silinmesini hedef alarak miRNA'ların temel özelliklerini ortaya çıkarmıştır. İnsan genomu, yaklaşık olarak 2500 adet olgun miRNA dizisi taşımaktadır ve bunların tüm mRNA'ların %75'inden daha fazlasını düzenlediği tahmin edilmektedir (Miranda ve diğ., 2006). Bu nedenle, miRNA'ların protein oluşum sürecinde ve sinyal yollarında hayati rol oynadığını söylemek mümkündür. Birçok miRNA'nın fazlalığı veya eksikliğinin kanser, diyabet, sinirsel hastalıklar, kalp ve damar hastalıkları ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Lee ve diğ., 2004).

Kan-glukoz seviyesinin normal düzeyde tutulması, insulinin üretilmesi ve kana salınmasına bağlıdır. Kana salınan insülin, insüline duyarlı olan, kas, yağ, karaciğer gibi dokulara etki ederek kandaki glukozun bu dokular tarafından alınmasını sağlar. Kan-glukoz dengesi ile ilişkili olan, Langerhans adacıklarında keşfedilmiş ilk miRNA, miRNA-375'dir (Poy ve diğ., 2004). O günden sonra, birçok adacık-kaynaklı miRNA'nın kan-glukoz dengesi üzerine etkisi gösterilmiştir.

MiR-7, evrimsel olarak korunmuş, fare ve insanda 3 farklı genomik bölge tarafından üretilir. Ayrıca, insan ve sıçan pankreas adacıklarında en bol üretilen miRNA'dır. Fetal dönem pankreas oluşumu süresince de, yüksek oranda üretilir. İmmün-işaretleme çalışmaları sonucunda, miR7'nin glukagon ve insülin üreten hücrelerde birlikte bulunup, duktal ve asinar hücrelerde bulunmadığı gösterilmiştir (Bravo-Egana ve diğ., 2008; Correa-Medina ve diğ., 2009; Joglekar ve diğ., 2009; Kredo-Russo ve diğ., 2012). İlk çalışmalar, erken pankreatik gelişimde α ve β hücrelerinin farklılaşması için miR7'nin bir görevi olduğunu göstermiştir (Kredo-Russo ve diğ., 2012). MiR7, endokrin progenitörlerde üretilir ve Ngn3 yolağında önemli bir eleman olan Pax6'yı hedefler (Yasudo ve diğ., 2002). Üretiminin, Ngn3 geni taşımayan farelerde kayda değer oranda düştüğünün bulunmasıyla, kesinlikle endokrin progenitörler için hayati olduğu ortaya çıkarılmıştır. Fakat, E12.5. günde, aşırı üretimi yaptırılan miR7'nin pankreatik tomurcukta, düşmüş insülin üretimi ile birlikte Pax6 mRNA seviyesi ve

proteininde de azalma gözlemlendiği bildirilmiştir (Kredo-Russo ve diğ., 2012). Sonuç olarak, β ve α -hücreleri farklılaşma sürecinde, miR-7'nin bir inhibitör olarak görev yaptığı tespit edilmiştir. Bu bilgilere dayanarak Ngn3⁺ progenitörlerin oluşumu için hayati olan miR-7'nin farklılaşmaya girilen sürede etkisinin kaybolduğunu söylemek mümkündür.

İnsan ve fare pankreatik adacıklarını kullanarak yapılan çalışmalarda, miR-7a'nın olgun β -hücresi çoğalmasını engellediği tespit edilmiştir (Wang ve diğ., 2013). Mir-7a'nın inhibisyonu mTOR'u aktive ederek olgun β -hücrelerinin çoğalmasını sağlamıştır. Mir-7a'nın yol açtığı etkiler, olgun β -hücrelerinde mTOR'un inhibitörü olan rapamisin kullanılarak da gerçekleştirilmiştir (Wang ve diğ., 2013). Buradan da miR-7a'nın mTOR sinyal yolağını çalıştırarak β -hücre çoğalmasını gerçekleştirme olasılığı düşünülebilir.

Son çalışmalarla miR-7a2, glukoza bağımlı insülin sekresyonu (GSIS)'nin, negatif düzenleyicisi olarak ortaya çıkarıldı (Latreille ve diğ., 2014). Mir-7a2 eksik olan farede, artmış insülin sekresyonu gözlemlenmiştir. Mir-7a2'nin yüksek üretimi ise, insülin sekresyonunun durmasına ve β -hücrelerinin farklılaşmalarının engellenmesine, sonuç olarak da diyabete neden olduğu görülmüştür (Latreille ve diğ., 2014). İlginç olarak obez veya diyabetik bireylerin adacıklarında miR-7a seviyesi düşmüş olarak gözlemlenmiştir. Bu sonuçlardan yola çıkarak, miR-7a ve onun izoformlarının, GSIS ile ilişkili olan hastalıklar olan obezite ve diyabette meydana gelen β -hücre adaptasyonunda hayati bir öneme sahip olduğu belirlenmiştir.

MiR-9 üretiminin beyin ve pankreatik adacıklar ile kısıtlanmış olduğu keşfedilmiştir. Ayrıca, pankreatik adacık gelişimi sırasında da yüksek oranda üretildiği tespit edilmiştir (Joglekar ve diğ., 2009). Detaylı çalışmalar miR-9'un aşırı üretiminin glukoza veya potasyuma duyarlı olarak insülin sekresyonunu engellediğini tespit etmiştir. Özellikle potasyum klorüre karşı β -hücresini duyarsızlaştırdığı için, miR-9'un insülin ekzositozunu engellediği düşünülebilir. Kısaca, miR-9'un insülin sekresyonunu özellikle Onecut-2'yi hedefleyerek, engellediğini söylenebilir (Plaisance ve diğ., 2006).

Mir-15, miR-15a ve miR-15b özellikle pankreas rejenerasyonu sırasında tespit edilen miRNA'lardır. Normal gelişime oranla, rejenerasyonun olduğu kısımda 200 kata kadar artan oranlarda üretildiği gösterilmiştir (Joglekar ve diğ., 2007). Dahası, miR-15a/b'nin Ngn3'ü hedeflediği de gösterilmiştir (Gu ve diğ., 2002; Joglekar ve diğ., 2007). MiR-15a ve miR-15b'nin pankreatektomiden sonraki 3. günde yüksek oranda üretildiği gösterilmiştir. MiR-15'in inhibisyonu Ngn3 seviyesini artmasına yol açmıştır. Ayrıca, miR-15'in inhibisyonu NeuroD ve NkX2.2'nin yani Ngn3'ün hedeflerinin de yüksek oranda üretilmesine yol açmıştır. Bu sonuçlardan hareketle, miR-15a/b'nin rejenerasyon sürecinde etkin olduğu ve bu etkisini Ngn3'ü engelleyerek yerine getirdiği söylenebilir.

Yapılan çalışmalar, miR-21'in β -hücre fonksiyonlarının düzenlenmesinde olumsuz bir etkisi olduğunu ortaya koymuştur. Bu etki, insülin ekzositozunun bozulmasından kaynaklanmaktadır. Ayrıca, miR-21'in β -hücre apoptozu ile ilişkisi vardır. NF- κ B ailesinin miR-21'in üretimini arttırdığı, sonuç olarak da β -hücre apoptozunun miR-21 sayesinde baskılandığı çalışmalarla gösterilmiştir. (Frankel ve diğ., 2008; Bravo-Egana ve diğ., 2012; Ruan ve diğ., 2011).

Farklı bir çalışma olarak, miR-24'ün HNF1 α ve NeuroD'nin baskılanmasını sağladığı bildirilmiştir (Zhu ve diğ., 2013). Obez ve diyabetik farelerde ise miR-24 seviyesinin aşırı artmış olduğu bulunmuştur. Ek olarak, miR-24 seviyesinin oksidatif stres ve yüksek glukoz ile artmış olduğu gösterilmiştir. MiR-24'ün, insulinoma β -hücre soyu olan MIN6 β -hücrelerinde aşırı ürettirilmesi sonucu hücre çoğalmasının azaldığı ve GSIS'in düştüğü gözlemlenmiştir. Bir tümör baskılayıcı gen olan *Menin*'in silinmesi, genişlemiş adacıklara neden olur. Bir insan β -hücre soyu olan β lox5'de miR-24'ün aşırı ürettirilmesi *Menin* mRNA ve protein seviyesinin düşmesine neden olmuş ve artmış β -hücre kitlesi elde edilmiştir (Vijayaraghavan ve diğ., 2014). Kısaca bu sonuçlar miR-24'ün, hücre soyunun hangi hayvan kaynağından olduğuna bağlı olarak, β -hücre çoğalmasında, insülin üretimi ve sekresyonunda ve aynı zamanda glukoliptoksisistede önemli bir düzenleyici görevi olduğunu göstermektedir.

MiR-30 ailesinin üyeleri, insan fetal pankreasında yüksek oranda üretilip epiteliyal-mezenkimal geçiş ile de ilişkilidirler (Joglekar ve diğ., 2009; Ozcan., 2009). Bu

miRNA'lar vimentin ve Snail1 gibi mezenkimal mRNA'ları inhibe edip pankreatik mezenkimal kök hücrelerin insülin üreten hücrelere değişmesine olanak tanırırlar (Joglekar ve diğ., 2009). Bu aileden miR-30d'nin, β -hücresi transkripsiyon faktörü olan MafA'yı düzenlediği fakat Pdx-1 ve NeuroD1'e etki etmediği gösterilmiştir (Zhao ve diğ., 2012). MiR-30d, MafA seviyesini ve insülin geninin transkripsiyonunu arttırmıştır. İnsan pluripotent kök hücrelerden (**hPSCs**) insülin üreten β -hücrelerine farklılaşma aşamalarında da miR-30d'nin seviyesinin arttığı gösterilmiştir. Bu aileden diğeri olan miR-30a5p'nin ise glukotoksik koşullara duyarlı olarak seviyesinin arttığı, insülin üretimi ve GSIS'ı NeuroD üretimini baskılayarak azalttığı ortaya çıkartılmıştır (Kim ve diğ., 2004). Mevcut araştırmalardan hareketle, miR-30 ailesinin β -hücrelerindeki birçok transkripsiyon faktörünü hedef aldığı söylenebilir.

Sıçan adacıklarında yapılan bir çalışmada, artan kolesterol seviyesine karşın miR-145'in GSIS azalmasına yol açtığı belirtilmiştir (Kang ve diğ., 2013). Aynı şekilde, miR-145'in inhibe edilmesinin, artmış GSIS'e yol açtığı görülmüştür. İlginç olarak, yüksek kan glukoz seviyesine karşın miR-145'in azaldığı ve sonuç olarak GSIS'in uyarıldığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, miR-145'in GSIS üzerinde olumsuz bir etkisi olduğunu açığa çıkartmıştır.

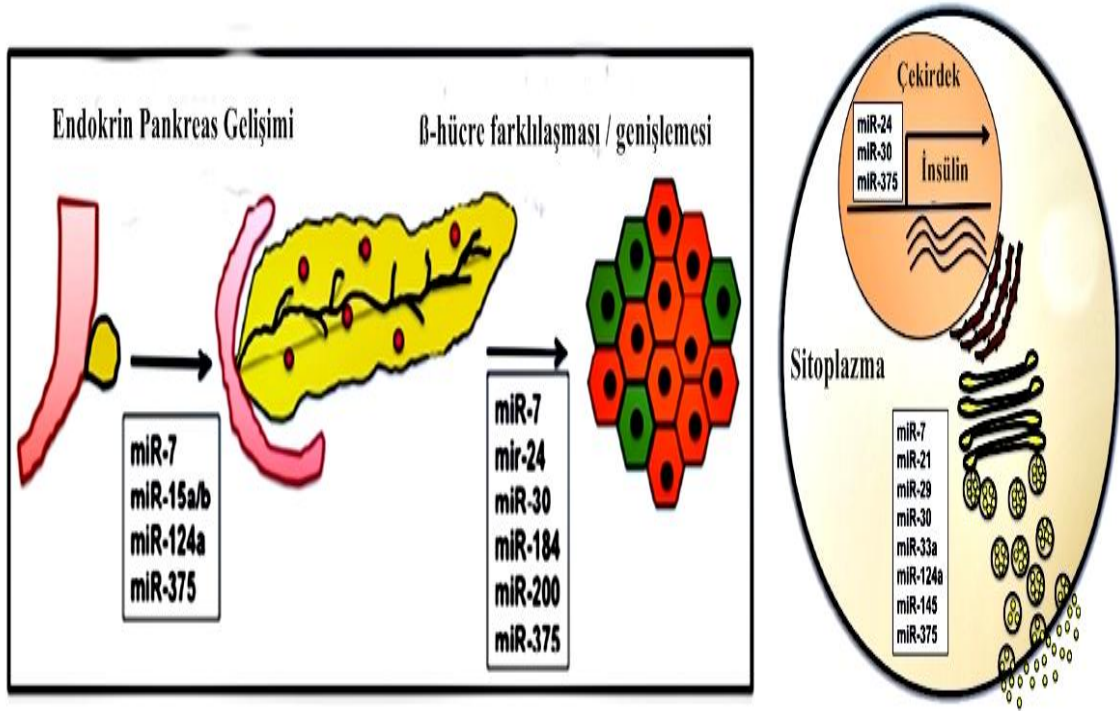
MiR-124a, farklı genlerden kodlanan, miR-124a1, miR-124a2 ve miR-124a3 üyelerinden meydana gelir. Bu ailenin üyelerinin, insülin sekresyonu, β -hücre çoğalması ve pankreas gelişimi üzerinde çok önemli görevleri bulunmaktadır. İlk çalışma olarak, miR-124a2'nin pankreas gelişimi sırasında arttığı bildirilmiştir. Ayrıca, β -hücre farklılaşmasında önemli bir rol oynayan FoxA2'yi hedef aldığı gösterilmiştir (Baroukh ve diğ., 2007). MiR-124a'nın Ngn3'ü hedeflediği de ortaya çıkarılmıştır (Joglekar ve diğ., 2007). Fare üzerinde yapılan bir çalışmada, bu ailenin tamamının kısmi pankreatektomi sonrasında üretildikleri ve β -hücre rejenerasyonu için Ngn3'ü inhibe ettikleri dolayısıyla rejenerasyonu destekledikleri gösterilmiştir (Joglekar ve diğ., 2007). FoxA2, β -hücresi kanal proteinlerinin alt üniteleri olan Kir6 ve Sur1 ile ilişkilidir. MiR-124a'nın doğrudan FoxA2'i hedeflediği göz önünde bulundurulacak olursa, insülin ekzositozu üzerinde de bir etkisi olduğu düşünülebilir. Bu bilgilerden

yola çıkararak, miR124a ve ailesinin, β -hücresine ait proteinlerin üretimi ve insülin sekresyonunda, özellikle FoxA2'yi hedefleyerek hayati görevleri olduğu söylenebilir.

Pankreatik β -hücreleri ile ilgili olarak ilk gösterilen ve β -hücrelerinde yüksek yoğunlukta bulunan miRNA miR-375'tir. İlk çalışmalar, miR-375'in insülin sekresyonun negatif düzenleyicisi olduğunu göstermiştir (Poy ve diğ., 2004). Aynı çalışmada, miR-375'in aktin depolimerizasyonunun önemli bir düzeleyicisi olan miyotrofini (Mtpn) de hedef aldığı gösterilmiştir. Bunu takip eden çalışmalarda, MIN6 β -hücre soyunda, miR-375'in büyük oranda GSIS'i uyardığı gösterilmiştir (Tattikota ve diğ., 2013). İlginç olarak, miR-375'in inhibisyonuna benzer olarak MIN6 β -hücrelerinde Ago2 inhibisyonu, artmış insülin salınımına yol açmıştır. Sonuç olarak, Ago2 ve miR-375'in pankreatik β -hücrelerinde benzer role sahip olup, GSIS'i olumsuz yönde etkilediği gösterilmiştir. β -hücrelerinde miR-375'in diğer bir hedefi de Pdk1'dir. MiR-375'in Pdk-1'i hedef alarak, glukoza bağımlı insülin genlerinin düzenlenmesini azalttığı gösterilmiştir. Ayrıca, diyabetik GK sıçanlarda yapılan bir çalışmada, miR-375 seviyesinin düşmüş olduğu gösterilmiştir. Farklı bir çalışmada, miR-375'in E14.5. günde gelişen endokrin pankreasta yüksek oranda Pdx1 ile beraber üretildiği keşfedilmiştir (Joglekar ve diğ., 2009). Bu sonuç, endokrin pankreas gelişiminde miR-375'in önemli bir rolü olduğunu göstermektedir. Bir başka çalışmada ise, endokrin kısmın oluşması için miR-375'in hayati olduğu ortaya konmuştur (Kloosterman ve diğ., 2007). Farede yapılan bir çalışmada, miR-375 geninin silinmesi, artmış sayıda α -hücresine ve azalmış oranda β -hücresine neden olmuştur. Aynı zamanda glukagon üretimi insüline nazaran çok daha yüksek oranda bulunmuştur. MiR-375 eksikliği olan farede, β -hücresi oluşmasının engellenmesine bağlı olarak, kan glukoz seviyesinin yükseldiği ortaya konmuştur (Poy ve diğ., 2009). DNA mikrodizilemesi ile birlikte biyoinformatikten yararlanılan bu çalışmada, miR-375'in β -hücre çoğalmasında olumsuz etkileyen birçok düzenleyiciyi hedef aldığı ortaya çıkarılmıştır (Poy ve diğ., 2009). MiR-375'in, miR-7 gibi, embriyonik kök hücrelerin, insülin üreten β -hücrelerine farklılaşma aşamalarında birlikte üretildiği düşünülmüştür. Başka bir çalışmada ise, miR-375'in aşırı üretiminin bağırsak endodermi/pankreatik progenitör belirteci olan Hnf1 β ve Sox9'un üretiminin azalmasına yol açtığı tespit edilmiştir. İlginç olarak, miR-375'in β -hücre ölümü ve dolayısıyla diyabet hastalığının bir belirteci olarak

kullanılabileceği de teklif edilmiştir. Yüksek oranda streptozotosin (STZ) uygulanmış obez olmayan diyabetik NOD farede, miR-375 yüksek oranda bulunmuştur. STZ uygulanmış farede, kan glukoz seviyesi yükselmeden önce miR-375 seviyesinin belirgin oranda arttığı gözlemlenmiştir. Aynı şekilde, bu farede diyabet başlangıcı oluşma aşamasından iki hafta önce kanda miR-375 seviyesinin kayda değer oranda arttığı gözlemlenmiştir. Bu nedenle, kanda dolaşan miR-375'in, diyabet başlangıç aşamasında potansiyel tanı biyobelirteci olarak hizmet edebilme olasılığı yüksektir.

Tüm bu bilgilerden yola çıkarak, pankreatik endokrin gelişim ve özellikle insülin üreten β -hücre oluşum aşamalarında miRNA'ları endokrin progenitörlerin oluştuğu dönem, β -hücresi oluştuğu dönem ve β -hücre çoğalmasının gerçekleştiği dönemde gruplayarak ele almak miRNA'ların pankreatik gelişim ve fonksiyonun devamlılığındaki etkin rollerinin anlaşılabilmesi açısından en sağlıklı yöntem olacaktır (Şekil 2.10:).

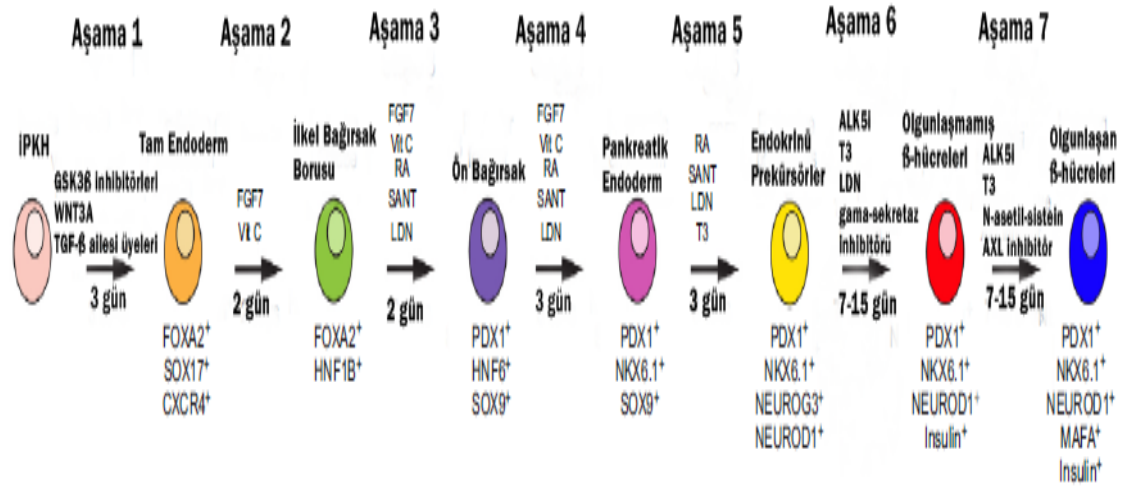


Şekil 2.10: Pankreatik endokrin kısmın gelişim sürecinde ve β -hücre insülin salgılanması sürecinde bazı miRNA'ların etkisi gösterilmiştir (Ozcan, 2009'den alınmıştır).

2.4.6. IN VITRO β -HÜCRE FARKLILAŞTIRMA PROTOKOLÜ

Pluripotent kök hücre biyolojisinin ortaya çıkması, *in vitro* koşullarda insülin salgılayan β -hücresi üretimi için kolayca uygulanabilen ve erken gelişim aşamalarında gerçekleşen hücrel olayları aydınlatabilmemizi sağlayan modeller ortaya çıkardı (Pagliuca ve diğ., 2013). Pluripotent kök hücrelerin β -hücrelerine farklılaştırılmaları diyabet tedavisi ve diyabet hastalığına bağlı gelişen birçok hastalığın tedavisi için umut vaatmektedir. Önceki kısımlarda *in vivo* pankreas gelişimi, endokrin gelişim ve β -hücre gelişimi detaylıca ele alındı. Bu gelişimin laboratuvar koşullarında nasıl olduğunu belirlemek ise şu anda çok fazla sayıda bilim insanının çalıştığı bir konudur. Diyabetin tedavisine fonksiyonel β -hücre üretimi ile çok yaklaşıcağına belki de tedavi edileceğine inanılmaktadır.

İlk kez pluripotent kök hücrelerden β -hücre gelişimi rapor edildiğinden bu yana (Assady ve diğ., 2001), bir çok farklılaştırma protokolleri oluşturulmuştur. Her ne kadar bu farklılaştırma protokolleri, glukagon ve insülin üretmeye meğilli pankreatik progenitör hücreler üretseler de, ortak bir β -hücre farklılaştırma protokolüne doğru emin adımlarla ilerlenmektedir (D'Amour ve diğ., 2006; Docherty ve diğ., 2007). Melton ve arkadaşları pluripotent kök hücreden laboratuvar koşullarında üretilmiş β -hücresi ile yenidoğan β -hücresi arasında birçok transkripsiyonel benzerlikler tanımladılar (Pagliuca ve diğ., 2013). Embriyonik β -hücreleri ilk üç aylık dönemde glukozu duyarlı olarak insülin salgılamalarına rağmen, kan glukoz seviyesinin belirli bir seviyede tutulmasında annesel glukoz transferinin önemi unutulmamalıdır. Fonksiyonel olamayan β -hücre konusunda az da olsa son yıllarda yapılan iki grubun geliştirilmiş protokol çalışmalarıyla belirli bir yol kat edilebilmiştir (Pagliuca ve diğ., 2014; Rezania ve diğ., 2014). Bu protokoller ve diğer bir çok araştırma grubunun çalışmaları sonucunda elde edilen bilgiler **Şekil 2.11:**'de gösterilmiştir.



Şekil 2.11: *In vitro* İnsan Pluripotent Kök Hücreler (iPKH)'den β-hücre oluşturma protokolü özetlenmiştir (Rachel ve diğ., 2015'den alınmıştır).

Kısaca özetlenecek olursa, pluripotent kök hücrelerden fonksiyonel β-hücreyi oluşturmak için 7 aşama gereklidir. Ve her bir aşamadan diğer bir aşamaya geçiş için ayrı ayrı uyarılar gereklidir. Bu ne kadar sonuç odaklı bir protokol olsa da, zaman, kullanılan maddeler ve çok dikkat gerektirmesinden dolayı birçok sıkıntıları da beraberinde getirmektedir. Pluripotent kök hücreden tek veya birkaç uyarıyla fonksiyonel β-hücre farklılaştırması ya da en azından birkaç aşamayı doğrudan geçmeye imkan tanıyan ajanlar bulunması, pankreatik β-hücre oluşturma potansiyelini dünyadaki çoğu laboratuvara yayabilme üstünlüğünü tanyacaktır.

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. HÜCRE KÜLTÜRÜ

Bu çalışmada kullanılan pankreatik adacık kaynaklı mezenkimal kök hücreler (PAK-MKH), araştırma grubumuzun önceki çalışmaları kapsamında, erişkin (2,5-3 aylık) *Wistar albino* sıçanlardan izole edilip karakterizasyon çalışmaları tamamlanmıştır. Tüm hücre kültürü çalışmaları İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı, Primer ve Kök Hücre Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. Bu çalışmada 6-9. pasaj aralığındaki PAK-MKH'ler kullanıldı. Hücreler, tam medyum olarak isimlendirdiğimiz ısı ile inaktive edilmiş %10 fetal sığır serumu (**FBS**, Gibco, 10500), antibiyotik karışımı (100 ünite/ml penisilin, 100 µg/ml streptomisin, Gibco-15240-122) ve glutamin (2mM, Gibco, 25030) içeren Minimum Esansiyel Medyum (**MEM**, Gibco, 21090-022) içinde standart kültür şartları olarak bilinen 37°C, %5 CO₂ ve %95 hava içeren nemli inkübatörde büyütüldü. Steril kültür kaplarında çoğaltılan hücreler, kültür kabı yüzeyinin en az %80'ini doldurduktan sonra pasajlama işlemi uygulandı. Bu işlem kapsamında, hücrelere %0,25'lik tripsin-EDTA (Sigma-T4174) uygulanarak kültür kabının yüzeyinden kalkmaları sağlandı. Tam medyum eklenerek tripsin inaktive edildikten sonra hücreler 1500 rpm hızda 5 dakika santrifüjlenerek toplandı, hücre sayımını takiben yeni bir kültür kabına ekim yapıldı.

3.1.1. Deney Şartlarının Hazırlanması

PAK-MKH'lere dört farklı deney şartı uygulandı. Bunlar; *i.*) hücrelerin normal büyüme ve gelişme ortamı olan tam medyum, *ii.*) 25 mM glukoz içeren tam medyum, *iii.*) 1mM Valproik asit içeren tam medyum, *iv.*) 1 mM Valproik asit+25 Mm glukoz içeren tam medyum koşullarıdır. Glukoz içeren şartları oluşturmak için, D-(+)-Glucose (Sigma G7021) tercih edildi ve valproik asit içeren koşullar için ise sodyum valproat (Sanofi Aventis, Depakine) kullanıldı.

3.2. MTT TESTİ İLE HÜCRE CANLILIĞININ BELİRLENMESİ

MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazolium bromid) testi doğrudan hücre canlılığını ve dolaylı olarak hücre ölümünü değerlendirmeyi amaçlayan bir toksisite testidir. Bu yöntemin temelinde, canlı hücrelerde MTT'nin tetrazolyum halkasının mitokondriyal bir enzim olan süksinat dehidrogenaz tarafından mavi-mor renkli, suda çözünmeyen formazana indirgenmesi yatar. Hücrelerin, MTT'yi indirgeme özellikleri, hücre canlılığının ölçütü olarak kabul edilir ve bu reaksiyon sonucunda meydana gelen formazan yoğunluğu ile canlı hücre sayısı doğru orantılıdır. Canlı ve mitokondri fonksiyonu bozulmamış hücreler mor renkte boyanırken, ölmüş ya da mitokondri fonksiyonu bozulmuş olan hücreler ise boyanmamaktadır. MTT uygulanan canlı hücrelerin oluşturduğu formazan kristalleri dimetilsülfoksit (**DMSO**) ile çözünür hale getirildikten sonra, reaksiyon sonucu kolorimetrik ölçüm yöntemiyle belirlenir.

MTT testi için 5.000 adet PAK-MKH 96 kuyucuklu kültür plaklarına ekilip hücrelerin kültür kabının yüzeyine yapışması ve çoğalması için standart kültür şartlarında 24 saat inkübe edildi. VPA'nın toksik olmayan dozlarının belirlenebilmesi amacıyla literatüre uygun olarak seçilmiş olan 0.75 mM, 1 mM, 1.5 mM, 2 mM, 2.5 mM, 3 mM dozda VPA 24 saat süreyle uygulandı. (Haumaitre ve diğ., 2008) Tam medyumda büyütülen hücreler kontrol grubu olarak kullanıldı. 50 mg MTT (Applichem, A2231 0001) MEM ile 10 ml'ye tamamlanarak çözüldürüldükten sonra 0.22 µl'lik filtreden geçirilerek steril edildi. Deney sürelerinin sonunda her kuyucuğa 100 µl medyum için 30 µl hacimde MTT çözeltisi eklendi ve kültür plakları alüminyum folyo ile sarılarak standart kültür şartlarında 4 saat süreyle inkübe edildi. Bu sürenin sonunda, formazan kristallerini çözünür hale getirmek için, medyum kuyucuklardan uzaklaştırıldı ve her kuyucuğa 100 µl DMSO eklendikten sonra kültür plağı, 2 dk süreyle 250 rpm'de orbital çalkalayıcıda çalkalandı. Çalkalama bittikten sonra, kültür plağı mikropilaka okuyucusuna (Biotek, Microquant) konularak 570-630 nm dalga boyunda absorbans değerleri alındı. Kontrol grubundaki hücrelerin absorbans değerlerinin ortalaması %100 olarak kabul edilerek diğer gruplardaki canlılık oranı % kontrol olarak hesaplandı. Deneyler üç kez tekrar edildi ve her bir grup için 10 kuyucuk kullanıldı.

3.3. B-HÜCRE FARKLILAŞMASININ TESPİTİ

3.3.1. İnsülin Üreten Hücrelerin Tespit Edilmesi

Olgun bir β -hücresinin spesifik belirteci olan insülinin gösterilmesi son farklılaşmanın tespiti için şarttır. Bu amaçla insülin pozitif hücreler madde uygulamasını takiben 10, 20 ve 30 gün sonra flow sitometri tekniği ile tespit edildi. Bu yöntem için %2 paraformaldehit +4°C'de 10 dk uygulanarak hücreler fikse edildi ve %0,05 triton X-100 içeren PBS ile 10 dk permeabilizasyon yapıldı. Daha sonra insülin primer antikoru (Santa Cruz, sc-9168, 1:10) 30 dk boyunca oda ısısında uygulandı. Hücreler PBS ile yıkandıktan sonra fluorescein isothiocyanate (FITC) bağlı sekonder antikor (Invitrogen-65-6111, 1:10) 30 dk karanlıkta uygulanıp yıkandı. FL-1 kanalında analiz yapıldı. Net floresans yoğunlukların hesaplanabilmesi için BD Cell Quest Pro programı kullanılarak kontrol grubuna ait floresans yoğunluk değeri tüm grupların floresans yoğunluk değerlerinden çıkarıldı.

3.3.2. β -Hücrelerine Özgün Moleküllerin Gen Ekspresyon Seviyelerinin Belirlenmesi

β -hücre farklılaşmasının tespiti için insülin üretiminde rol alan transkripsiyon faktörleri ve β -hücrelerine özgün diğer proteinler olan Pdx-1, Pax4/6, Nkx-2.2/6.1, Neurogenin-3, ins2 ve Glut-2'nin gen ekspresyon seviyeleri gerçek zamanlı geri transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) yöntemiyle gösterildi. Tüm işlemler steril ortamda steril malzemeler kullanılarak yapıldı. Steril kabin ve mikropipetler önce alkolle ve daha sonra RNAase ZAP (Sigma,-R20203) ile temizlendi. Hücreler soğuk PBS (1M, pH:7.4) ile 2 kez yıkandı. 1×10^6 hücre için 1 ml soğuk Trizol (Invitrogen-15596-026) ependorflara eklendi. Her bir ependorf, buz içerisinde 5 dakika bekletildi. Tüm ependorflara, +4°C'ye soğutulmuş, 200 μ l kloroform eklendi ve 15 saniye karıştırıldı. Bu işlemden sonra ependorflar buzda 5 dakika bekletildi. Tüpler 12.000 rpm hızda 15 dakika +4°C'de santrifüjlendi. Nükleik asitleri içeren şeffaf kloroform fazı dikkatlice toplandı ve yeni hazırlanmış ependorflara aktarıldı. Bu ependorflara +4°C'ye soğutulmuş isopropanol eklendi ve ependorflar hafifçe elde çalkalandı. Ependorflar buzda 10 dakika bekletildi ve 12.000 rpm'de 10 dakika +4 °C'de santrifüjlendi. Ependorflara 1 ml -20°C'ye soğutulmuş DEPC (Diethylpyrocarbonate, Sigma-D-

5758)'li su içinde hazırlanmış %78 etanol eklendi ve 7600 rpm hızda 5 dakika +4 °C'de santrifüj edildi. Son olarak ependorflara 20 µl DEPC'li su eklenerek total RNA'nın çözülmesi sağlandı. Total RNA seviyesi Qubit® RNA HS Assay Kiti (Thermofisher, Q32852) kullanılarak Qubit Fluorimetre (Invitrogen)'de ölçüldü. 1µg RNA reverse transkriptaz enzimiyle (NEB, ProtoScript First Strand cDNA Synthesis Kit, E6300S) cDNA'ya çevrildi. Her bir örnek için, öncelikle RNA ve primer d(T)₂₃ karışımı hazırlandı. 5 dakika süreyle 70°C'de RNA denatürasyonu gerçekleştirildi. Tüplere reaksiyon karışımı ve enzim karışımı eklendikten sonra 1 saat süreyle 42°C'de inkübasyonu takiben enzim aktivitesinin durdurulması amacıyla 5 dakika süreyle 80°C'de inkübasyon yapıldı. Bu basamaklar için Termal Cyler cihazı (Techne) kullanıldı. Total cDNA seviyesi Qubit ssDNA Assay Kit kullanılarak Qubit Fluorimetre (Invitrogen)'de ölçüldü. PCR için 300 ng cDNA, Prob+Primerlerden oluşan gen ekspresyon assayları ve TaqMan master mix (Applied Biosystems) kullanıldı ve ürünler kitin öngördüğü talimatlara uyularak elde edildi. 50°C'de 2 dakika inkübasyonu takiben 10 dakika 95 °C'de denatürasyon gerçekleştirildi. Amplifikasyon için 15 saniye 95°C ve 1 dakika 60°C'de inkübasyondan oluşan basamak 40 döngü uygulandı. Bu işlem için 7500 Fast Real Time PCR Sistemi (Applied Biosystems) kullanıldı (Gezginci-Oktayoğlu ve diğ., 2012). Sonuçlar, 2^{-ΔC_T} değerleri üzerinden katlı artış olarak hesaplandı.

3.3.3. İnsülin Sekresyon Testi

Farklılaşan β-hücrelerinin fonksiyonel olup olmadığını test etmek amacıyla bu hücrelerin yükselen glukozu cevaben insülin salabilme kapasiteleri ölçüldü. Bu amaçla madde uygulamasından 20 gün sonra hücreler PBS ile yıkandıktan sonra 5.5 mM/L glukoz ve %0.5 BSA içeren DMEM medyumunda iki saat süreyle inkübe edildiler. Kültür medyumunu toplandıktan sonra hücreler PBS ile yıkandı ve yüksek konsantrasyonda glukoz (25 mM/L) içeren DMEM medyumunda iki saat süreyle inkübe edildiler. Toplanan medyumların insülin seviyeleri Sandoviç ELISA tekniği ile kitin (Milipore, EZRMI-13K) öngördüğü protokol uygulanarak belirlendi. Hücrelerin içerdiği toplam protein miktarı Bradford testi ile hesaplandı ve insülin seviyeleri protein seviyelerine oranlanarak normalizasyon yapıldı (Gezginci-Oktayoglu ve diğ., 2012).

3.4. DCFDA İLE FLOW STOMETRİK ROS ÖLÇÜMÜ

2',7'-diklorofloresin diasetat (DCFDA) hücre zarından rahatlıkla geçebilen ve hücre içinde hidroksil ve peroksil gibi reaktif oksijen türleri (ROS)'nin seviyelerinin ölçülmesine imkan sağlayan fluorogenik bir maddedir. DCFDA, hücre içine girdiğinde asetil grubu bazı esterazlar tarafından kopartılır ve floresan ışımaya yapabilme özelliğini kaybeder. Hücre içinde ROS ile etkileştiğinde ise oksitlenerek 2',7'-diklorofloresin (DCF)'e dönüşür ve tekrardan floresan ışımaya yapmaya başlar. Oluşan floresans ışımaya yoğunluğu maksimum eksitasyon (495nm) ve maksimum emisyon (529nm) değerlerinde tespit edilebilir. Bu çalışmada deney grupları arasındaki ROS seviyesi değişiklikleri DCFDA kullanılarak flow sitometri yöntemiyle tespit edildi. Her gruptan 50.000 hücre alınarak yapılan analizler en az 3 kez tekrarlandı. Hücrelere 10 µM konsantrasyonda DCFDA (Sigma-D6883) eklenerek 30 dakika süreyle karanlıkta standart kültür şartlarında inkübe edildi ve flow sitometre cihazında (BD, FACS Calibur) FL1 kanalında analiz yapıldı. Kontrol grubundan elde edilen ortalama floresans yoğunluğu 1 kabul edilerek diğer gruplardaki ROS seviyeleri kontrol grubuna göre katlı artış olarak hesaplandı.

3.5. WESTERN EMDİRİMİ

Hücre peletinin üzerine proteaz-fosfataz inhibitör karışımı (Serva-39055) eklenmiş olan lizis tamponu (İnvitrogen, FNN0011) eklendi. Buz üzerinde 10 dakikada bir kez karıştırılarak 30 dakika bekletildi. 5 kez 10 saniye süreyle ultrasonikasyon işlemine maruz bırakıldı. 13000 rpm hızda 10 dakika +4°C'de santrifüjlendikten sonra süpernatant sitoplazmik fraksiyon olarak kullanılmak üzere -86°C derin dondurucuda saklandı. Pelete 5 mM HEPES, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM DTT, %26 glycerol (v/v), 300mM NaCl; pH 7.9 ilave edilip 24.000 g hızda 20 dakika santrifüjlenerek nuklear fraksiyon elde edildi (Abcam protokol kitapçığı).

3.5.1. Hücre Lizatlarının Hazırlanması

Hücre peletinin üzerine proteaz-fosfataz inhibitör karışımı (Serva-39055) eklenmiş olan lizis tamponu (İnvitrogen, FNN0011) eklendi. Buz üzerinde 10 dakikada bir kez karıştırılarak 30 dakika bekletildi. 5 kez 10 saniye süreyle ultrasonikasyon işlemine maruz bırakıldı. 13000 rpm hızda 10 dakika +4°C'de santrifüjlendikten sonra

süpernatant sitoplazmik fraksiyon olarak kullanılmak üzere -86°C derin dondurucuda saklandı. Pelete 5 mM HEPES, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM DTT, %26 glycerol (v/v), 300mM NaCl; pH 7.9 ilave edilip 24.000 g hızda 20 dakika santrifüjlenerek nuklear fraksiyon elde edildi (Abcam protokol kitapçığı).

3.5.2. Bradford Tekniği ile Protein Seviyelerinin Belirlenmesi

Elde edilen fraksiyonların içerdiği protein miktarı Bradford yöntemiyle belirlendi. 80, 40, 20, 10 ve 8 µg/ml Sığır Serum Albumini (**BSA**; Biorad Assay Standart II BSA-500-0007) standart olarak kullanıldı. 96 kuyucuklu plakalarda ölçüm yapıldı. Her bir standarttan ve örnekten üç tekrarlı çalışıldı. Hazırlanan 1:50 sulandırılmış örneklerden ve standartlardan 160 µl kuyucuklara pipetlendi. Üzerine 40 µl boya (Biorad Protein Assay Dye Reagent-500-0006) eklenip karıştırıldı. 5 dakika inkübasyon süresini takiben absorbanslar 595 nm dalga boyunda mikrolaka okuyucu (Biotek-Microquant)'da okundu. Standart grafikten faydalanılarak protein konsantrasyonları (µg/ml) hesaplandı.

3.5.3. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroföresi (SDS-PAGE)

Yürütme ve yükleme jellerinin hazırlanması sırasında kullanılan maddeler Tablo 3.1’de verilmiştir.

Tablo 3.1: SDS-PAGE jelleri hazırlanmasında kullanılan maddeler ve miktarları belirtilmiştir.

Malzemeler	Yükleme Jeli (%3)	Yürütme Jeli (%7.5)	Yürütme Jeli (%10)	Yürütme Jeli (%12)	Yürütme Jeli (%15)	Yürütme Jeli (%18)
Su (dH ₂ O)	3,262 ml	5,425 ml	4,81 ml	4,309 ml	3,545 ml	2,81 ml
Akrilamid/BisAkrilamid	412,5 ml	1,875 ml	2,49 ml	2,997 ml	3,74 ml	4,49 ml
Tris HCl pH:8.8	-	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
Tris HCl pH: 6.8	980 µl	-	-	-	-	-
SDS %10	50 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
APS	50 µl	66 µl	66 µl	66 µl	66 µl	66 µl
TEMED	7 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl

Sitoplazmik fraksiyon için 30 µg, nüklear fraksiyon için 10 µg protein içeren örnekler 10 µl hacimde hazırlandı ve 10 µl laemli tamponu eklenerek elde edilen toplam 20 µl’lik karışım, 100°C’ye ısıtılmış kuru blok ısıtıcıda (Techne Dri-Block DB-2D) 5 dakika bekletilerek denatürasyon işlemi gerçekleştirildi. Kısa bir santrifüj işleminden sonra, hazırlanmış olan jellerin kuyucuklarına yükleme yapıldı. Yürütme tamponu olarak 25 mM Tris, 192 mM Glisin, %0,1 SDS; pH:8,3 kullanıldı. Proteinler 30 dakika 70 V, 45 dakika 100 V ve yürütme bitene kadar 120 V’da ve +4°C’de yürütüldüler.

3.5.4. Proteinlerin Jelden Membrana Aktarılması

Elektroforez ile jelde ayrımı yapılan proteinler ıslak aktarım ile jelden **PVDF** (Polyvinylidene fluoride) membrana aktarıldı. 20 kDa'dan küçük proteinlerin aktarımı için por çapı 0.2 µm olan membranlar (Millipore-İmmobilon-P^{SQ}) kullanılırken, 20 kDa'dan büyük proteinlerin aktarımı için por çapı 0.45 µm olan membranlar (Millipore-İmmobilon-P) tercih edildi. Aktarım işlemi %30 metanol ihtiva eden Tris-Glisin SDS tamponunda 12 saat süreyle 80mA akım şiddetinde ve +4°C'de gerçekleştirildi. Membrana 5 dk boyunca Ponceau S boyama solusyonu uygulanarak aktarımın etkinliği, oluşan bant yoğunlukları gözlenerek kontrol edildi. Bantlar gözlemlendikten sonra, Poncaue S boyasını membrandan uzaklaştırmak için 5 dk boyunca 0.1 M NaOH uygulandı.

3.5.5. Özgün Protein Bantlarının İşaretlenmesi

Membran, %5'lik yağsız süt tozu ile hazırlananan bloklama solüsyonuyla 1 saat oda sıcaklığında çalkalılıcıda bekletildi. Membranlar, bloklama işlemi sonrası uygun sulandırma oranıyla hazırlanan primer antikorlar ile (Tablo 3.2) bir gece +4°C'de, inkübe edildiler. Bu işlem sonrasında yıkama tamponu TBS-T (%95 TBS, %5 Twin-20) yıkanan membranlar, **HRP** (Yaban turbu peroksidazı) işaretli primer antikora spesifik olan sekonder antikorlar ile (Tablo 3.2) 1 saat oda sıcaklığında muamele edildiler. Membranlar yıkama tamponu ile yıkandıktan sonra Western Blotlama Luminol Ajanı (Cell Signaling Technology, 7003) kemilüminesans substratı kullanılarak, özgün protein bantları Kodak GL1500 jel görüntüleme sistemi ile görüntülendi. Kodak Molecular Imaging Systems yazılımı ile kemilüminesans oranına bağlı olarak, protein bantlarının yoğunluk analizleri yapıldı. Yoğunluk analizleri yapılan protein örneklerine ait bant yoğunlukları, sitoplazmik fraksiyonda çalışılan proteinler için β-aktin proteininin yoğunluğuna, nüklear fraksiyonda çalışılan proteinler için ise TFIIB proteininin yoğunluğuna oranlanarak normalizasyon yapıldı.

Tablo 3.2: Western Emdirimi yönteminde kullanılan antikolar, bu antikolar için kullanılan seyreltme oranları, inkübasyon şart ve süreleri belirtilmiştir.

Primer Antikolar	Marka-Katalog No	Seyreltme Oranı	İnkübasyon Süresi
Tavşan anti-Acetyl-Histone H4 (Lys12)	CST-2591	1:1000	Tüm gece,+4°C
Tavşan anti-Acetyl- and Phospho-Histone H3 (Lys9/Ser10)	CST-9711	1:1000	Tüm gece,+4°C
Tavşan anti-TriMe- H3 (Lys9)	Millipore-07442	1:1000	Tüm gece,+4°C
Tavşan anti-Histone Deacetylase 3 (HDAC3)	CST-2632	1:1000	Tüm gece,+4°C
Fare anti-HDAC1 (10E2)	CST-5356	1:1000	Tüm gece,+4°C
Tavşan anti-Nanog, N-terminus	Millipore-AB5731	1:500	Tüm gece,+4°C
Tavşan anti-c-Myc	CST-9402	1:1000	Tüm gece,+4°C
Tavşan anti-Oct3/4 (H-134)	sc-9081	1:500	Tüm gece,+4°C
Fare anti-β-aktin	sc-47778	1:500	Tüm gece,+4°C
Tavşan anti-TFIIB	sc-225	1:500	Tüm gece,+4°C
Keçi anti-tavşan IgG	CST-7074	1:1000	Tüm gece,+4°C
Sığır anti-tavşan IgG	sc-2370	1:2500	Tüm gece,+4°C
At anti-fare IgG	CST-7076	1:1000	Tüm gece,+4°C

3.6. MİRNA GEN EKSPRESYONU SEVİYELERİNİN BELİRLENMESİ

Bu çalışmanın planlanma aşamasında yaptığımız kapsamlı literatür taraması sonucunda pluripotensi, erken pankreatik gelişim, son pankreas olgunlaşması, Tip2 diyabet ve HDAC'lar ile ilişkili olan mikroRNA (miRNA)'ları tespit ederek çalışmamızla ilgili olabilecek 39 adet miRNA belirlenmiştir. Bunlar; mir-375, let7a-1, miR-7a1, miR7a2, let7a2-1, let7d, let7f,-1 mir-7, mir-16, mir-195, miR-30a, miR-30d, miR-142-5p, miR-335, miR-26a, miR-3545-3p, miR-206, miR-19b-1, miR-494, miR-503, miR-18a, miR-92b, miR-342, miR-184, miR-338, miR-124-1, miR-124a, miR-15b, miR-24-1, miR-296, miR-134, miR-145, miR-148b, miR-187, miR-449a, miR-99b, miR-146a, miR-181a-1, miR433-3p, miR433-5p. İnternal kontrol olarak U6 kullanıldı. Sonuçlar, $2^{\Delta C_T}$ değerleri üzerinden hesaplandı.

3.6.1. MikroRNA İzolasyonu

QIAGEN miRNeasy Mini Kit protokolü kullanıldı. 20 gün süreyle deney şartları uygulanmış olan 2.5×10^6 PAK-MKH 1.5 ml'lik ependorf tüplere alındı. 700 µl QIAzol Lysis Reagent tüm tüplere eklenip iyice karıştırılarak homojenizasyon yapıldı. 5 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 140 µl kloroform eklendi, 15 saniye boyunca aşağı yukarı hareketlerle nazikçe çalkalandı. Tüpler 3 dakika oda sıcaklığında kendi haline bırakıldıktan sonra 15 dakika boyunca, $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 12,000 g hızda santrifüj edildi. Çok ince ara faz ve alt faza dokunmadan üst faz nazikçe toplandı ve yeni toplama tüplerine aktarıldı. Elde edilen üst fazın hacminin 1.5 katı kadar %100 etanol ilave edilip karıştırıldı. Bu karışımdan 700 µl alınıp 2 ml'lik filtireli toplama tüplerine aktarıldı. 8000 g hızda 15 saniye oda sıcaklığında santrifüjlendi. Kolonlara 700 µl RWT tamponundan eklendi. 8000 g hızda 15 saniye oda sıcaklığında santrifüj edildi. RPE tamponundan 500 µl eklendi ve 8000 g hızda 15 saniye oda sıcaklığında santrifüj edildi. Tekrar RPE tamponundan 500 µl eklendi ve 2 dakika boyunca 8000 g hızda oda sıcaklığında santrifüj edildi. Kolon 1.5 ml'lik ependorfların içine konuldu. Kolona 50 µl Rnase-içermeyen su eklendi. Kapağı kapattıktan sonra 1 dakika 8000 g hızda santrifüjlendi. Su ile beraber miRNA'ların da tüpe geçmesi sağlandı.

3.6.2. RNA Seviyelerinin Ölçülmesi

İzolasyon sonucu elde edilen RNA'ların miktarlarının ölçümü için Qubit® RNA HS Assay Kiti (Thermofisher, Q32852) kullanıldı. Standartlar ve örnekler için 0.5 ml'lik tüpler hazırlandı. Qubit RNA HS Reagent, Qubit RNA HS Buffer içinde 1:200 oranında sulandırılarak, standart ve örneklerin çalışması için gereken solüsyon hazırlanmış oldu. Hazırlanan bu solüsyondan, 190 µl hazırlanan standartların tüplerine, 199 µl ise hazırladığımız örnekler için olan tüplere aktarıldı. Standartlardan 10 ul, örneklerden ise 1 µl eklendikten sonra oda sıcaklığında, karanlıkta 5 dakika inkübasyon süresinin ardından Qubit Florimetre 2.0 (İnvitrogen) cihazı ile RNA seviyeleri belirlendi.

3.6.3. cDNA Eldesi

Yaklaşık 1µg RNA, reverse transkriptaz enzimi (Qiagene, 218073) kullanılarak cDNA'ya çevrildi. Her bir örnek için, toplam 20 ul'lik karışım oluşturuldu. Bu karışım; 4 µl 5x miScript tamponu, 2µl 10x miScript karışımı, 2 µl miScript Reverse Transkriptaz, 5.75 µl RNaz içermeyen su, 6,25 µl RNA'dan oluşturuldu. cDNA eldesi için 60 dakika 37°C'de inkübasyonu takiben geri transkriptaz enziminin inaktivasyonunu sağlamak amacıyla 95°C'de 5 dakika inkübasyon yapıldı. Bu basamaklar için Termal Cyler cihazı (Techne) kullanıldı.

3.6.4. qRT-PCR

100 µl'lik tüpler ve QIAGEN miScript SYBR Green PCR Kit kullanıldı. Toplam 20 µl hacimde hazırlanan reaksiyon karışımının 4,5 µl'si Rnaz içermeyen su (QIAGEN), 10µl'si SYBR green (2xQuantiTect SYBR Green PCR), 2 µl'si master mix (10x miScript Universal Primer), 2 µl'si primer karışımı (QIAGEN, miscript primer Assays) ve 1,5 µl'si cDNA'dan oluşturuldu. Negatif kontrol olarak cDNA yerine 1,5 µl Rnaz içermeyen su eklenen reaksiyon karışımı kullanıldı. U6 miRNA internal kontrol olarak kullanıldı. qRT-PCR analizi Rotor-Gene Q Series Software 2.3.1 (Qiagen) programı kullanılarak gerçekleştirildi. Amplifikasyon programı olarak 95°C'de 15 dakika denatürasyonu takiben, sırasıyla 94°C'de 15 saniye, 55°C'de 30 saniye ve 70°C'de 30 saniye'den oluşan çevrim 40 kez tekrarlandı. Elde edilen CT değerleri RT² Profiler PCR Array Data Analysis (Qiagen) programı kullanılarak analiz edildi.

3.7. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

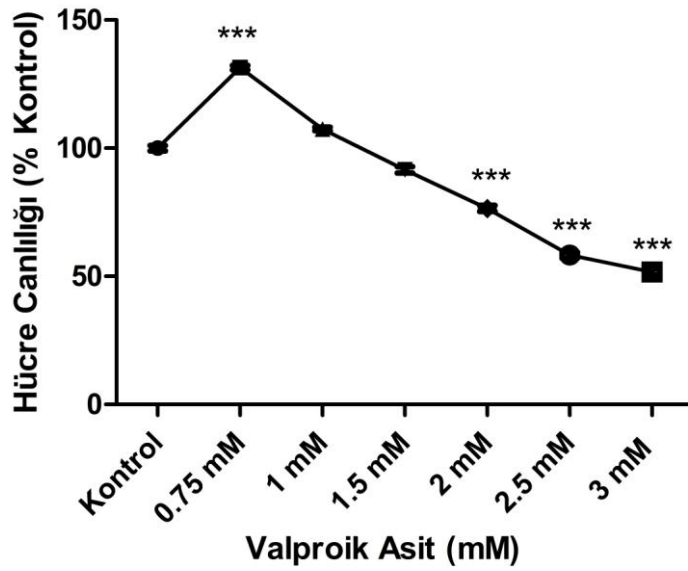
Sonuçlar Ortalama±SEM olarak verildi. Two-way ANOVA testini takiben çoklu karşılaştırmalar için Bonferroni post hoc testi uygulandı. İstatistiksel analizler Graph-Pad Prism 5 programı kullanılarak yapıldı. $p<0,05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



4.BULGULAR

4.1. HÜCRE CANLILIK TESTİ BULGULARI

PAK-MKH'lere valproik asit 0.75-3 mM doz aralığında 24 saat süreyle uygulandı. Valproik asitin belirlenen doz aralığında hücre canlılığı üzerindeki etkisi MTT tekniği ile belirlenerek sonuçlar Şekil 4.1.'de gösterildi.



Şekil 4.1: 0.75-3 mM VPA'nın PAK-MKH canlılığı üzerindeki etkileri % Kontrol olarak verilmiştir. ***p<0,001 kontrole göre.

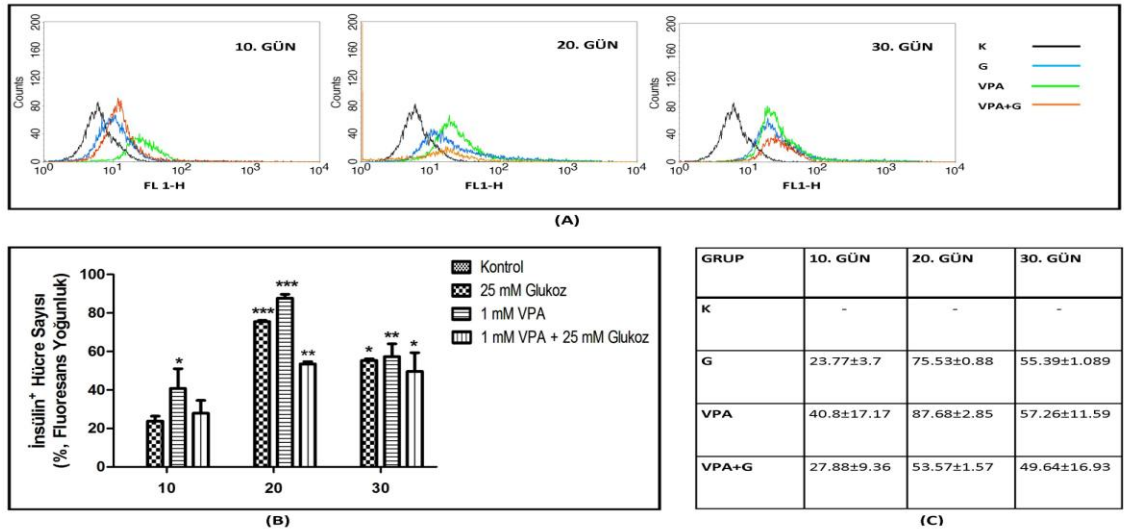
Hücre canlılığı değerleri (% Kontrol) kontrol grubunda %100±0.00; 0.75 mM VPA uygulanan grupta 131.40±1.53; 1 mM VPA uygulanan grupta 107.50±1.76; 1.5 mM VPA uygulanan grupta 91.58±2.52; 2 mM VPA uygulanan grupta 76.48±2.12; 2.5 mM VPA uygulanan grupta 58.28±2.08 ve 3 mM VPA uygulanan grupta 51.63±2.17 olarak tespit edildi. Kontrol grubuna göre, sadece 0.75 mM VPA uygulanan grupta anlamlı bir hücre sayısı artışı bulundu. 1 mM VPA uygulanan gruptan sonraki yükselen VPA konsantrasyonlarında ise anlamlı bir hücre canlılığı azalması gözlemlendi. Bu sonuçlardan yola çıkarak, hücre canlılığını artıran veya değiştirmeyen dozlar olan 0.75

mM ve 1 mM VPA uygulanarak β -hücre farklılaşması çalışmalarına devam edilmesine karar verildi.

4.2. B-HÜCRE FARKLILAŞMASI İLE İLGİLİ BULGULAR

0.75 ve 1mM konsantrasyonda VPA'nın 10 gün süreyle PAK-MKH'lere uygulandıktan sonra hücreler insülin antikoruyla işaretlenerek pozitif hücre sayısı akım sitometri yöntemiyle belirlendi. Sonuç olarak her iki doz uygulamasının β -hücre farklılaşmasını uyardığı, ancak 1mM VPA'nın nispeten daha fazla farklılaşmaya neden olduğu tespit edildi. 1mM VPA %28,46 oranında β -hücre farklılaşmasına neden olur iken; 0.75 mM VPA %26,25 oranında farklılaşmayı uyardığı kaydedildi. Çalışmalara hücre canlılığının korunarak β -hücre farklılaşmasının uyarıldığı 1 mM derişimli valproik asit ile devam edilmesi uygun görüldü.

PAK-MKH'lere tam medyum, 25 mM Glukoz, 1 mM VPA ve 1 mM VPA + 25 mM Glukoz'un 10, 20 ve 30 gün boyunca uygulanmasını takiben kaydedilen insülin⁺ hücre oranları Şekil 4.2:'de belirtilmiştir.

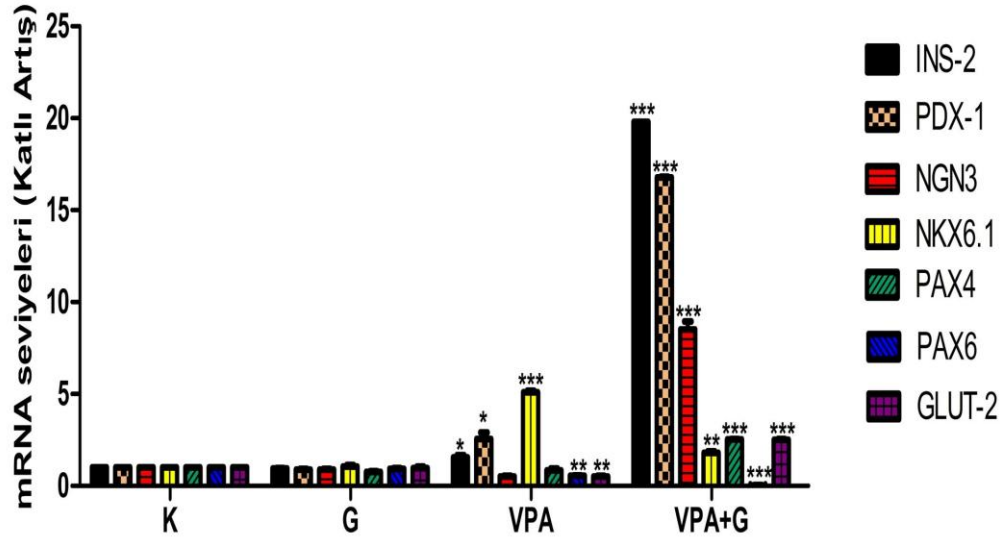


Şekil 4.2: 25mM Glukoz, 1mM VPA ve 25 mM Glukoz+ 1 mM VPA'nın, 10., 20. ve 30.gün sonunda β -hücre farklılaşmasına olan etkileri gösterilmiştir. Flow sitometrik insülin⁺ hücre sayısını (% Fluoresans yoğunluk) gösteren histogram plotları (A), analiz sonuçlarını yansıtan grafik (B) ve ortalama±SEM değerleri verilmiştir *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 kontrole göre.

10. günün sonunda, sadece 1 mM VPA uygulanan grup için anlamlı β -hücre farklılaşması gözlemlendi. 20. ve 30. günlerin sonunda, 25 mM Glukoz; 1 mM VPA ve 1 mM VPA+25mM Glukoz uygulanan gruplarda, anlamlı bir β -hücre farklılaşması gözlemlendi. En yüksek oranda β -hücre farklılaşmasının 20 gün süreyle uygulama yapılan gruplarda meydana geldiği tespit edildi. Bu sonuçlardan yola çıkarak, 20 günlük deney süresi ile araştırmanın devam etmesine karar verildi.

4.2.1. Gen Ekspresyonu Seviyesinde β -hücre Farklılaşması İle İlgili Bulgular

PAK-MKH'lere tam medyum, 1 mM VPA, 25 mM Glukoz ve 1 mM VPA+25 mM Glukoz 20 gün boyunca, her gün medyumlar değiştirilerek uygulandı. Deney süresinin sonunda tüm gruplara ait hücrelerin RNA izolasyonu yapıldı. cDNA elde edildi ve qRT-PCR yöntemi ile ins2, Pdx1, Ngn3, Nkx6.1, Pax4, Pax6, Glut2 ve ACTB gen anlatım seviyeleri belirlendi. Sonuçlar **Şekil 4.3:**'de gösterildi.



(A)

	INS-2	PDX-1	NGN3	NKX6.1	PAX4	PAX6	GLUT-2
K	1.00±0	1.00±0	1.00±0	1.00±0	1.00±0	1.00±0	1.00±0
G	0.94±0.02	0.87±0.05	0.88±0.07	1.04±0.13	0.75±0.14	0.91±0.01	0.94±0.03
VPA	1.55±0.18	2.55±0.52	0.51±0.09	5.09±0.12	0.85±0.15	0.55±0.03	0.52±0.08
VPA+G	19.8±0.02	16.78±0.08	8.51±0.62	1.76±0.04	2.53±0.05	0.04±0.04	2.51±0.08

(B)

Şekil 4.3: 20 gün süreyle PAK-MKH'lere uygulanan deney şartlarının mRNA üretimi üzerindeki etkisi. mRNA seviyelerinin (Katlı Artış) analiz sonuçlarının yansıtan grafik (A) ve ortalama±SEM değerleri (B) verilmiştir. *p<0,05; **p<0,01 ve ***p<0,001 kontrole göre.

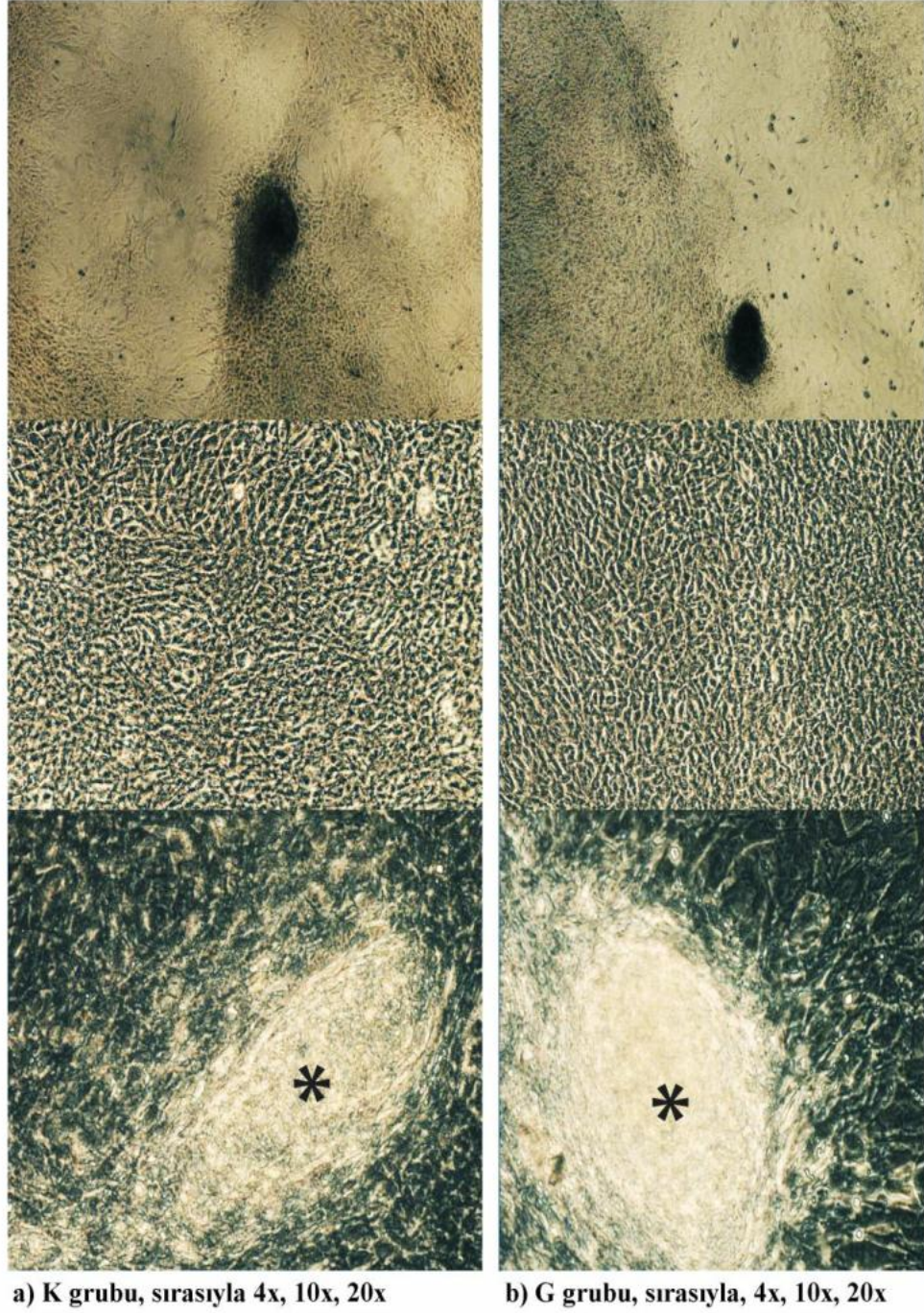
Glukoz uygulanan gruptaki β -hücre farklılaşması ve fonksiyonlarının devamlılığında rol alan moleküllerin ekspresyon seviyelerinin kontrol grubuna benzer olduğu belirlendi ($p>0,05$).

VPA grubu kontrol grubuyla kıyaslandığında; ins2 ve Pdx-1 gen ürünlerinde ($*p<0,05$) ve NKX6.1 gen ürününde ($***p<0,001$) anlamlı bir artış; Pax6 ve Glut-2 gen ürünlerinde kayda değer bir azalma belirlendi ($**p<0,01$).

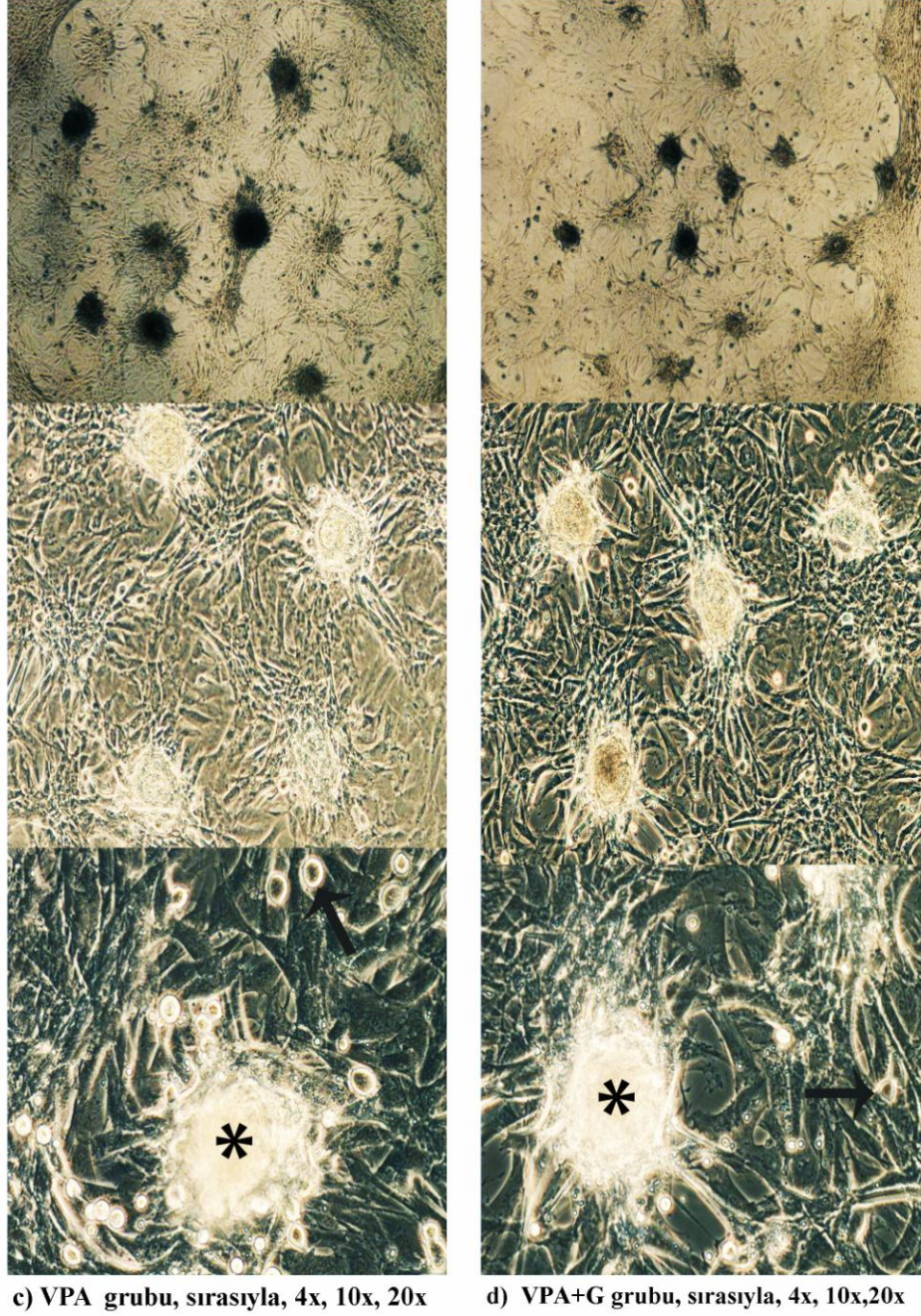
VPA+glukoz uygulanan grup kontrol grubuyla kıyaslandığında; ins2, Pdx-1, Ngn3, Pax4 ve Glut-2 gen ürünlerinde ($***p<0,001$) ve NKX6.1 gen ürününde ($**p<0,01$) anlamlı bir artış; Pax6 gen ürününde ise kayda değer bir azalma belirlendi ($***p<0,001$).

4.2.2. Mikroskopik Bulgular

Şekil 4.4: ve **Şekil 4.5:**'te 20. gün sonunda invert ışık mikroskopunda çekilen fotoğraflar bulunmaktadır. Glukoz uygulanan PAK-MKH'lerin tam medyum uygulanan hücelere morfolojik yönden benzerliği dikkat çekicidir. Her iki grubun ortak özelliği çok sayıda değişen büyüklüklerde kök hücre kolonileri oluşturmalarıdır (**Şekil 4.4:**) Bu görüntü pluripotent hücre karakterine uymaktadır. Buna karşın VPA ve VPA+glukoz uygulanan PAK-MKH'lerde koloni benzeri yapılarda yoğunlaşmış yuvarlak hücrelerin varlığı dikkat çekicidir. Bu tip hücrelerden oluşan kolonilerin etrafındaki PAK-MKH'lerin sayıca azalarak kolonilerin etrafının boşaldığı ve genel olarak bu kolonilerden ayrılan yuvarlak hücrelerin bu boşluklara yayıldığı gözlenmiştir. Ayrılan yuvarlak görümlü hücrelerin adherent formdan süspanse forma geçişi dikkat çekicidir (**Şekil 4.5:**) Bu bakımdan VPA ve VPA+glukoz uygulanan gruptaki kolonileri oluşturan hücrelerin pankreatik adacık hücrelerine benzer şekilde yuvarlak oldukları tespit edilmiştir.



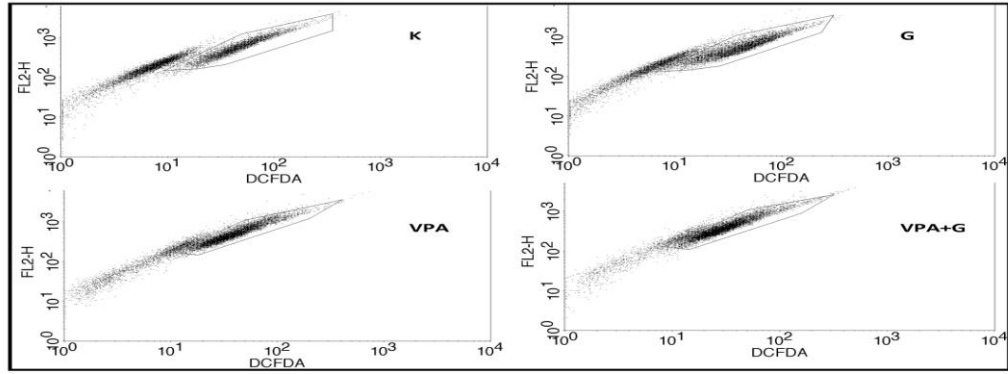
Şekil 4.4: 20 günlük deney süresi sonunda tam medyum uygulanan kontrol grubu (a) ve glukoz uygulanan grubun (b) mikroskopik fotoğrafları veilmiştir. Üst panel X4, orta panel X10 ve alt panel X20 kez büyütülmüştür. * kök hücre kolonisini göstermektedir.



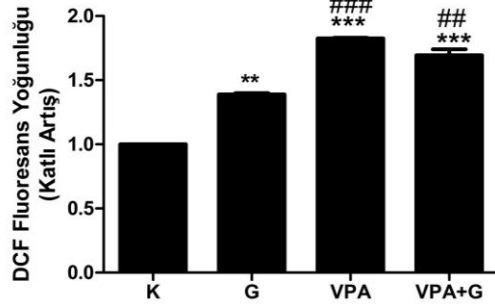
Şekil 4.5: 20 günlük deney süresi sonunda VPA uygulanan grup (a) ve VPA+glukoz uygulanan grubun (b) mikroskopik fotoğrafları verilmiştir. Üst panel X4, orta panel X10 ve alt panel X20 kez büyütülmüştür. * hücre kolonisini ve → β -hücre benzeri yuvarlak yapı hücreyi göstermektedir.

4.2.3. Reaktif Oksijen Türlerinin Üretimindeki Değişiklikler ile İlgili Bulgular

Farklılaşan hücrelerin önemli özelliklerinden birisi olan oksidatif fosforilasyondaki artış sonucu açığa çıkan reaktif oksijen türleri (ROS)'nin seviyelerindeki değişimler belirlendi. 20 günlük deney süresinin sonunda hücrelere ROS için indikatör olarak kullanılan DCFH-DA uygulanarak akım sitometri yöntemiyle ROS seviyeleri ölçüldü. Sonuçlar kontrol grubuna göre katlı artış olarak hesaplandı (Şekil 4.6:).



(A)



(B)

Grup	DCF Yoğunluğu (Katlı Artış)
K	1.000±0
G	1.390±0.014
VPA	1.825±0.007
VPA+G	1.695±0.06

(C)

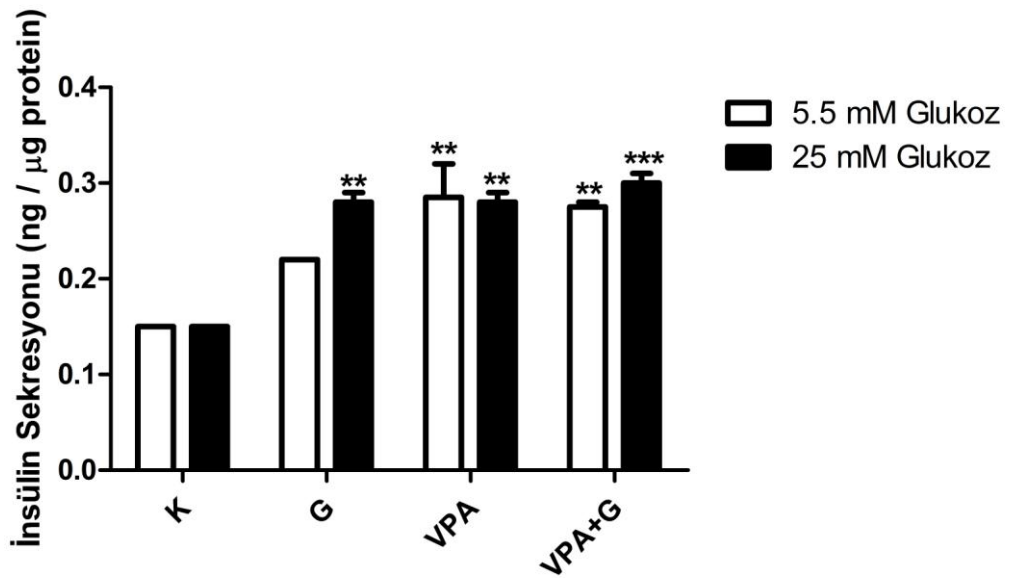
Şekil 4.6: 20 gün süreyle PAK-MKH'lere uygulanan deney şartlarının ROS üretimi üzerindeki etkisi. Flow sitometrik DCF Fluoresans yoğunluğunu (Katlı Artış) gösteren dot plotlar (A), analiz sonuçlarını yansıtan grafik (B) ve ortalama±SEM değerleri verilmiştir.

p<0,01 ve *p<0,001 kontrole göre; ##p<0,01 ve ###p<0,001 glukoz uygulanan gruba göre.

Sonuçlar karşılaştırıldığında, Kontrol grubuna göre diğer tüm gruplarda anlamlı bir artış, Glukoz grubuna göre de VPA ve VPA+G gruplarında anlamlı bir artış tespit edildi.

4.2.4. İnsülin Sekresyon Bulguları

20. günün sonunda tüm deney gruplarındaki hücreler, yükselen glukozu karşı insülin salabilme yeteneklerini ölçme amacıyla insülin sekresyon testine tabi tutuldular. Hücrelere düşük glukoz koşulu olarak 5.5 mM, yüksek glukoz şartı olarak 25 mM glukoz derişimi uygulandı. Her bir grup için elde edilen sonuçlar, toplam protein seviyelerine oranlanarak normalizasyon yapıldı (Şekil 4.7:).



Şekil 4.7: 5.5 mM glukoz ve 25 mM glukoz uygulanması sonucunda hücrelerden salınan insülin miktarları (ng/µg protein) verilmiştir. **p<0,01 ve ***p<0,001 kontrol gruplarına göre.

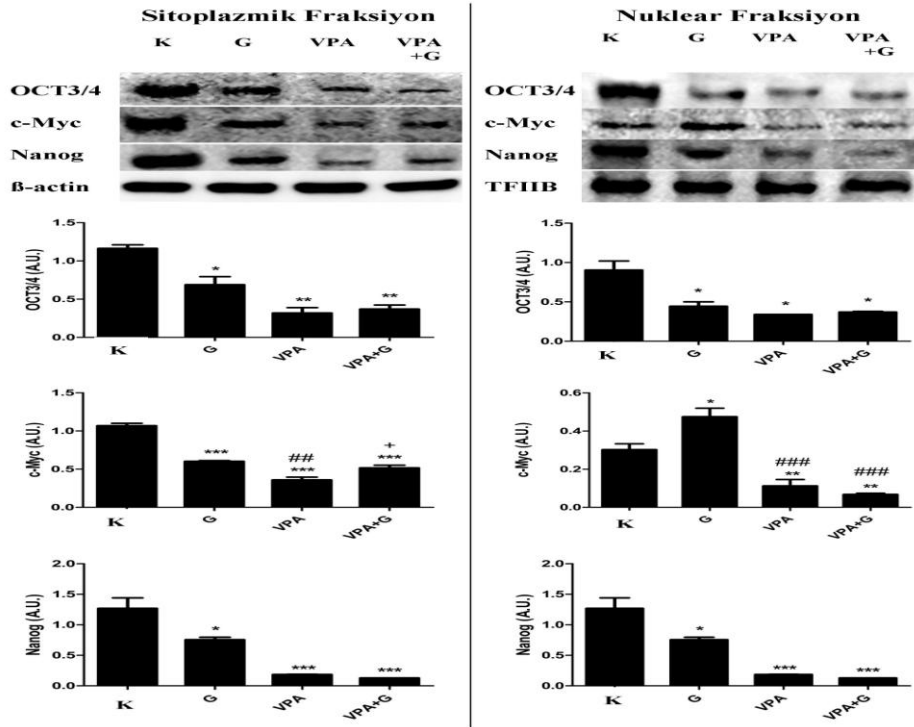
5.5 mM derişimli glukoz uygulandığında kontrol grubu 0.15 ± 0.01 ; glukoz uygulanan grup 0.22 ± 0.01 ; VPA uygulanan grup 0.29 ± 0.05 ve VPA+glukoz uygulanan grup 0.28 ± 0.01 ng/µg protein seviyelerinde insülin salınımı gösterdiler. Gruplar birbirleriyle karşılaştırıldığında, VPA ve VPA+glukoz gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı olarak artmış bir insülin sekresyon seviyesigözlemlendi ($p < 0,01$).

25 mM derişimli glukoz uygulanan deneyde, kontrol grubu 0.15 ± 0.01 ; glukoz grubu 0.28 ± 0.01 ; VPA grubu 0.28 ± 0.01 ve VPA+glukoz grubu 0.30 ± 0.01 ng/µg protein seviyelerinde insülin salınımı gösterdiler. Gruplar birbiriyle karşılaştırıldığında, kontrol

grubuna göre, tüm gruplar anlamlı olarak artmış bir insülin sekresyonu gösterdiler (G ve VPA için $p<0,01$; VPA+glukoz için $p<0,001$).

4.3. PLURİPOTENT KARAKTER DEĞİŞİKLİĞİ İLE İLGİLİ BULGULAR

PAK-MKH'lere tam medyum, 1 mM VPA, 25 mM Glukoz ve 1 mM VPA+25 mM Glukoz 20 gün boyunca, her gün medyumlar değiştirilerek uygulandı. Deney süresinin sonunda hücre lizatlarından sitoplazmik ve nükleer fraksiyonlar elde edildi ve western emdirimi yöntemi ile Oct3/4, c-Myc ve Nanog seviyeleri belirlendi. Elde edilen optik yoğunluk değerleri sitoplazmik fraksiyon için β -aktin yoğunluğuna, nükleer fraksiyon için ise TF-IIB yoğunluğuna oranlanarak normalize edildi (Şekil 4.8:).



Şekil 4.8: PAK-MKH'lerin sitoplazmik (sol panel) ve nükleer (sağ panel) fraksiyonlarında OCT3/4, c-Myc ve Nanog protein bantları ve bu bantların yoğunluklarını gösteren grafikler verilmiştir. * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ kontrole göre, ### $p<0,01$; ### $p<0,001$ glukoz uygulanan gruba göre ve + $p<0,05$ valproik asit uygulanan gruba göre. A.U.: Arbitrary Unit.

Sitoplazmada bulunan OCT3/4 miktarı kontrol grubu için 1.17 ± 0.06 ; glukoz grubu için 0.69 ± 0.18 ; VPA grubu için 0.32 ± 0.10 ; VPA+G grubu için 0.37 ± 0.09 olarak hesaplandı. Nükleer OCT3/4 oranları ise kontrol grubu için 0.91 ± 0.16 ; glukoz grubu için 0.45 ± 0.078 ; VPA grubu için 0.34 ± 0.07 ; VPA+G grubu için 0.37 ± 0.02 olarak bulundu. Sitoplazmik fraksiyondaki OCT3/4 değişimleri ele alındığında, kontrol grubuna göre tüm gruplarda anlamlı bir oranda azalma gözlemlendi (G grubu için $p < 0,05$, VPA ve VPA+G grupları için $p < 0,01$). Nükleer fraksiyondaki OCT3/4 seviyeleri karşılaştırıldığında kontrol grubuna göre tüm gruplarda anlamlı bir oranda azalma tespit edildi ($p < 0,05$).

Sitoplazmik c-Myc miktarları, kontrol grubu için 1.07 ± 0.04 ; glukoz grubu için 0.60 ± 0.015 ; VPA grubu için 0.36 ± 0.06 ; VPA+G 0.52 ± 0.06 olarak hesaplandı. Nükleer c-Myc oranları ise kontrol grubu için 0.30 ± 0.06 ; glukoz grubu için 0.48 ± 0.09 ; VPA grubu için 0.11 ± 0.07 ; VPA+G için 0.07 ± 0.01 olarak bulundu. Sitoplazmik c-myc seviyeleri karşılaştırıldığında kontrol grubuna göre tüm gruplarda anlamlı bir azalma tespit edildi ($p < 0,001$). Glukoz grubu ile VPA grubu karşılaştırıldığında ise glukoz grubuna göre VPA grubunda c-myc seviyelerinde anlamlı bir azalma tespit edildi ($p < 0,01$). VPA ile VPA+G grubu karşılaştırıldığında VPA+G grubuna göre VPA grubunda c-myc seviyelerinde anlamlı bir azalma gözlemlendi ($p < 0,05$). Nükleer fraksiyonda c-myc seviyeleri kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, glukoz grubunda anlamlı bir artış tespit edildi ($p < 0,05$). Kontrol grubuyla VPA ve VPA+G grubu karşılaştırıldığında ise, VPA ve VPA+G gruplarında anlamlı bir azalma görüldü ($p < 0,01$). Glukoz grubuna göre VPA ve VPA+G gruplarında anlamlı bir azalma tespit edildi ($p < 0,001$).

Sitoplazmik Nanog miktarı, kontrol grubu için 1.32 ± 0.21 ; glukoz grubu için 0.74 ± 0.07 ; VPA grubu için 0.1 ± 0.01 ; VPA+G grubu için 0.12 ± 0.01 olarak bulundu. Nükleer Nanog oranları ise kontrol grubu için 1.27 ± 0.24 ; glukoz grubu için 0.76 ± 0.07 ; VPA grubu için 0.19 ± 0.01 ; VPA+G grubu için 0.13 ± 0.01 olarak tespit edildi. Sitoplazmik Nanog seviyeleri açısından gruplar birbirleriyle karşılaştırıldığında, tüm gruplar kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma gösterdi (G grubu için $p < 0,05$, VPA ve VPA+G

grupları için $p<0,001$). Nükleer fraksiyondaki Nanog seviyelerinde de benzer bir şekilde kontrol grubuna göre tüm gruplarda anlamlı bir azalma tespit edildi (G grubu için $p<0,05$, VPA ve VPA+G grupları için $p<0,001$). Glukoz grubuna göre VPA grubunda anlamlı bir azalma gözlemlendi ($p<0,05$). VPA+G grubunda G grubuna göre anlamlı bir azalma görüldü ($p<0,001$).

4.4. SINIF I HDAC'LARDAN BAZILARINDA VE HİSTON MODİFİKASYONLARINDA MEYDANA GELEN DEĞİŞİKLİKLER İLE İLİŞKİLİ BULGULAR

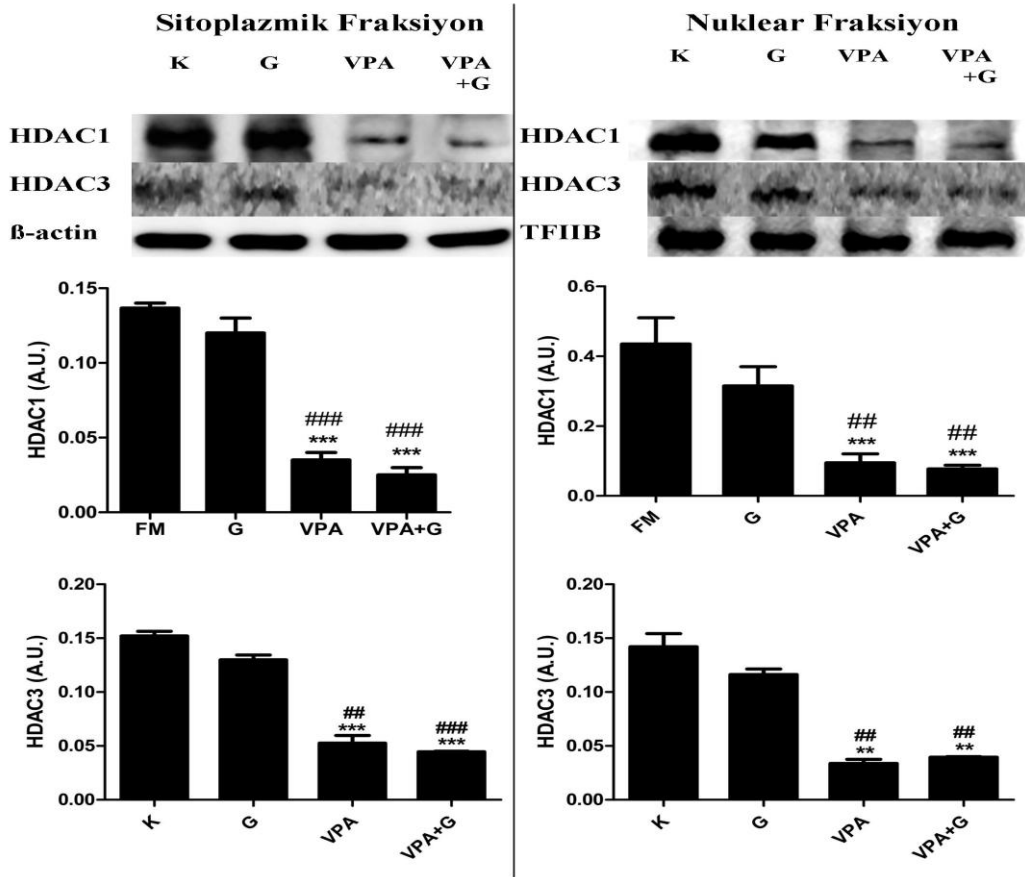
PAK-MKH'lere 20 gün boyunca tam medyum, 1 mM VPA, 25 mM glukoz ve 1 mM VPA+25 mM glukoz, her gün medyumlar değiştirilerek, uygulandı. Ardından hücre lizatlarından sitoplazmik ve nükleer fraksiyonlar elde edildi ve HDAC1 ve 3, H3K9-Ace, H3K9-Met, H4K12-Ace seviyeleri western emdirimi yöntemi ile belirlendi. Protein bantlarının optik yoğunluk değerleri sitoplazmik fraksiyon için β -aktin yoğunluğuna, nükleer fraksiyon için ise TF-IIB yoğunluğuna oranlanarak normalize edildi .

Şekil 4.9:'de Sınıf I HDAC'lar arasında yer alan HDAC1 ve 3'ün sitoplazmik ve nükleer fraksiyon seviyelerindeki değişimler gösterilmiştir. Sitoplazmik HDAC1 oranları, kontrol grubunda 0.14 ± 0.01 , glukoz uygulanan grupta 0.12 ± 0.02 , VPA grubunda 0.04 ± 0.01 ve VPA+G grubunda ise 0.03 ± 0.01 olarak hesaplandı. Sonuçlar birbirleriyle karşılaştırıldığında, VPA ve VPA+G gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma tespit edildi ($p<0,001$). VPA ve VPA+G grupları glukoz uygulanan grupla karşılaştırıldığında anlamlı bir azalma tespit edildi ($p<0,001$). Nükleer HDAC1 oranları, kontrol grubunda 0.43 ± 0.12 , glukoz uygulanan grupta 0.31 ± 0.07 , VPA grubunda 0.09 ± 0.05 , VPA+G grubunda ise 0.07 ± 0.02 olarak hesaplandı. Sonuçlar birbirleriyle karşılaştırıldığında VPA ve VPA+G gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma tespit edildi ($p<0,001$). VPA ve VPA+G grupları glukoz uygulanan grupla karşılaştırıldığında anlamlı bir azalma tespit edildi ($p<0,01$).

Sitoplazmik HDAC3 oranları, kontrol grubunda 0.15 ± 0.03 , glukoz uygulanan grupta 0.12 ± 0.02 , VPA grubunda 0.05 ± 0.01 ve VPA+G grubunda ise 0.04 ± 0.00 olarak

belirlendi. Sonuçlar karşılaştırıldığında VPA ve VPA+G grubunda kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma gözlemlendi ($p<0,001$). VPA grubu glukoz grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı oranda bir azalma tespit edildi ($p<0,01$). VPA+G grubu glukoz grubuyla karşılaştırıldığında da anlamlı bir azalma gözlemlendi ($p<0,001$).

Nüklear HDAC3 oranları, kontrol grubunda 0.14 ± 0.01 , glukoz uygulanan grupta 0.11 ± 0.07 , VPA grubunda 0.03 ± 0.00 ve VPA+G grubunda 0.03 ± 0.00 olarak tespit edildi. VPA ve VPA+G gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma belirlendi ($p<0,01$). VPA ve VPA+G grupları glukoz uygulanan gruba göre kıyaslandığında yine anlamlı bir azalma tespit edildi ($p<0,01$).

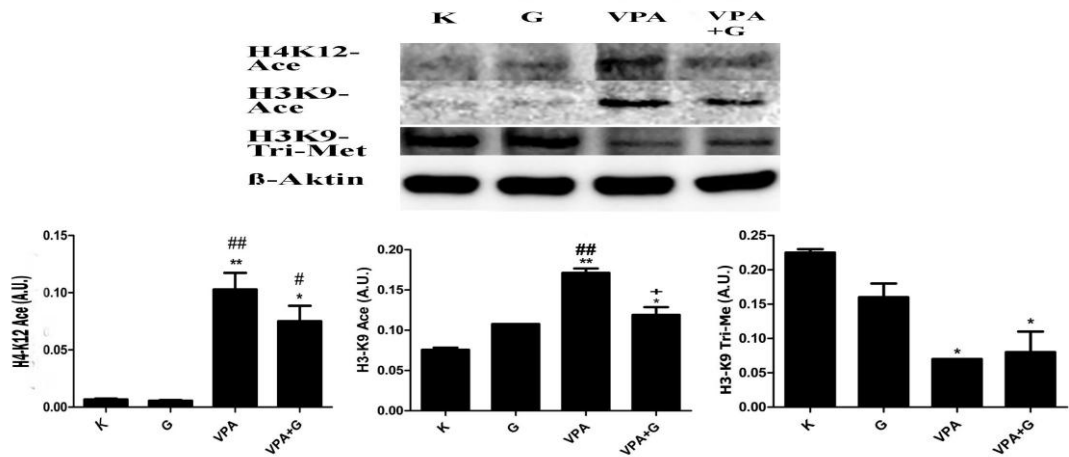


Şekil 4.9: PAK-MKH'lerin sitoplazmik (sol panel) ve nüklear (sağ panel) fraksiyonlarında HDAC1 ve HDAC3 protein bantları ve bu bantların yoğunluklarını gösteren grafikler verilmiştir. ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ kontrole göre, ## $p<0,01$; ### $p<0,001$ glukoz uygulanan gruba göre. A.U.:Arbitrary Unit.

Şekil 4.10:'da histon modifikasyonları ile ilgili bulgular yer almaktadır. H4K12-Ace oranları, kontrol grubunda, 0.006 ± 0.001 , glukoz uygulanan grupta 0.005 ± 0.001 , VPA grubunda 0.103 ± 0.021 ve VPA+G grubunda 0.075 ± 0.019 olarak hesaplandı. Sonuçlar birbirleriyle karşılaştırıldığında, VPA grubunda kontrol ve glukoz grubuna göre kayda değer bir artış gözlemlendi ($p<0,01$). VPA+G grubu ise kontrol ve glukoz gruplarıyla karşılaştırıldığında anlamlı bir artış gösterdi ($p<0,05$). VPA ve VPA+G grupları arasında herhangi bir kayda değer değişiklik gözlemlenmedi ($p>0,05$).

H3K9-Met seviyeleri, kontrol grubunda 0.225 ± 0.001 , glukoz uygulanan grupta 0.160 ± 0.283 , VPA grubunda 0.070 ± 0.001 ve VPA+G grubunda ise 0.080 ± 0.042 olarak hesaplandı. Sadece kontrol grubuna göre VPA ve VPA+G gruplarında kayda değer bir azalma gözlemlendi ($p<0,05$).

H3K9-Ace seviyeleri, kontrol grubunda 0.076 ± 0.004 , glukoz uygulanan grupta 0.108 ± 0.001 , VPA grubunda 0.171 ± 0.001 ve VPA+G grubunda ise 0.119 ± 0.130 olarak hesaplandı. VPA grubunda glukoz ve kontrol gruplarına göre anlamlı bir artış tespit edildi ($p<0,001$). VPA+G grubu VPA grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı bir azalma ($p<0,05$) ve kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı bir artma tespit edildi ($p<0,05$).



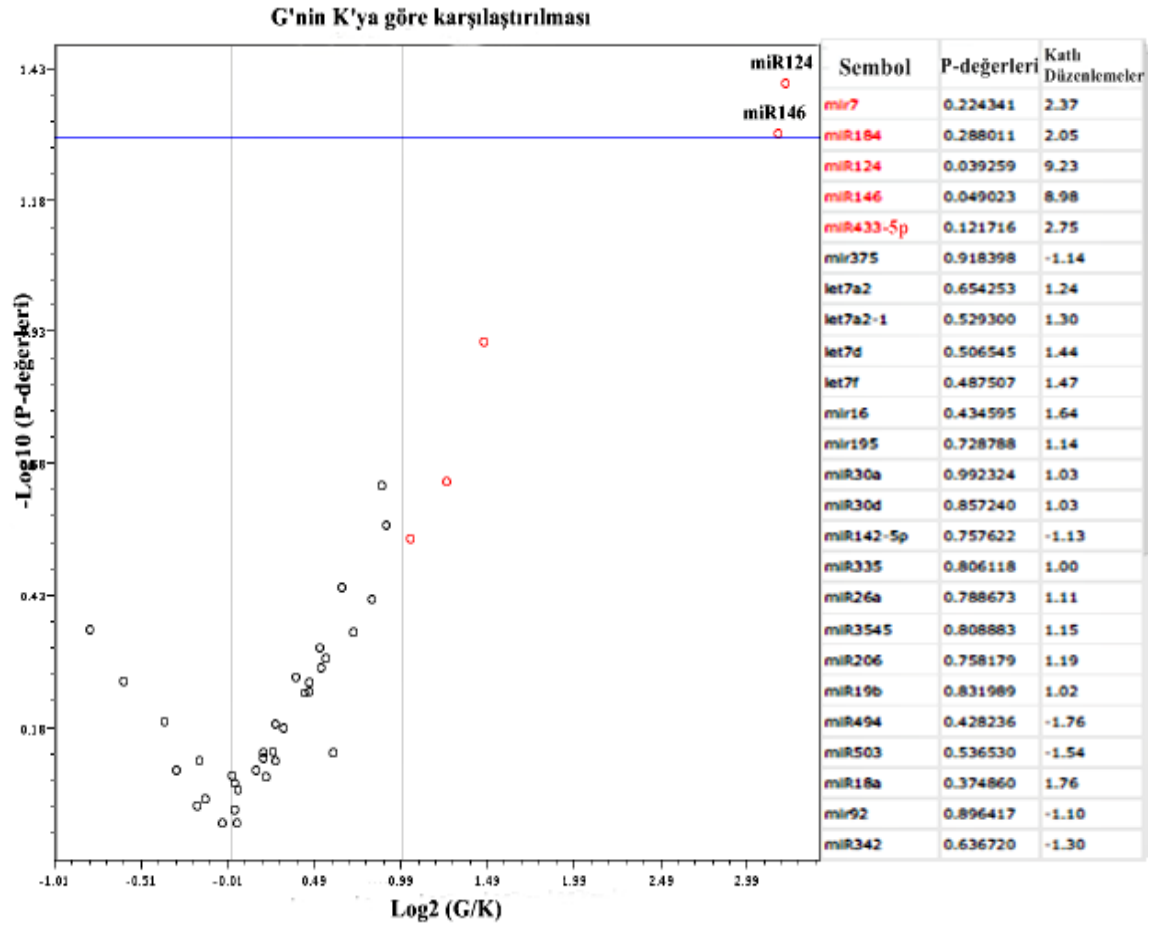
Şekil 4.10: PAK-MKH'lerin H4-K12 Ace, H3-K9 Ace ve H3-K9 TriMe protein bantları ve bu bantların yoğunluklarını gösteren grafikler verilmiştir. * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ kontrole göre, # $p<0,05$ ## $p<0,01$; ### $p<0,001$ glukoz uygulanan gruba göre, + $p<0,05$ VPA grubuna göre. A.U.:Arbitrary Unit.

4.5. BAZI MİRNA'LARIN GEN EKSPRESYONU SEVİYELERİNDE OLUŞAN FARKLILIKLAR İLE İLİŞKİLİ BULGULAR

Oluşturduğumuz 20 günlük deney şartları sonucunda, 39 adet miRNA'nın anlatım değişiklikleri qRT-PCR yöntemiyle belirlendi. Tüm sonuçlar, $2^{-\Delta C_T}$ işlemi kullanılarak hesaplandı (Tablo 4.1:). Ve bu hesaptan yola çıkarak, gruplar arasındaki miRNA üretim değişiklikleri gösterildi (Şekil 4.11:, Şekil 4.12: ve Şekil 4.13:, Şekil 4.14:, Şekil 4.15:, Şekil 4.16:).

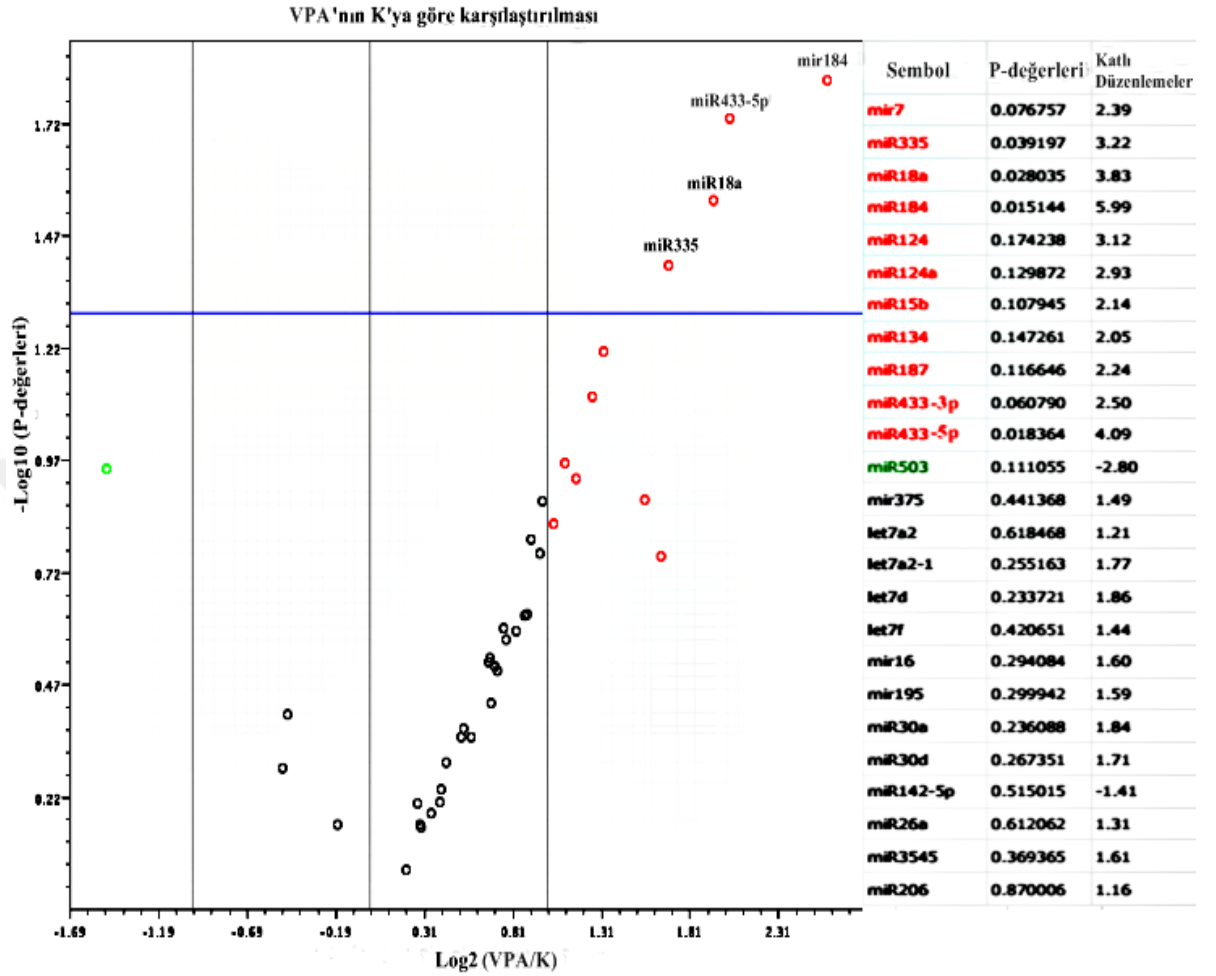
Tablo 4.1: Bazı miRNA'ların tüm deney gruplarındaki $2^{-\Delta C_T}$ değerleri verilmiştir.

Genler	$2^{-\Delta C_T}$			
	K	G	VPA	VPA+G
mir375	0.000868	0.000758	0.001292	0.000602
let7a2	2.163449	2.675855	2.614738	2.881194
let7a2-1	0.006793	0.008810	0.012021	0.007098
let7d	0.863539	1.239708	1.603992	0.905425
let7f	0.029736	0.043586	0.042886	0.028002
mir7	0.069750	0.165511	0.166855	0.178831
mir16	0.008569	0.014017	0.013713	0.012104
mir195	10.009745	11.431953	15.907847	11.366110
miR30a	1.949810	2.000000	3.584239	3.659551
miR30d	0.003136	0.003240	0.005361	0.011359
miR142-5p	0.000183	0.000162	0.000130	0.000120
miR335	0.020809	0.020905	0.067063	0.063007
miR26a	9.052607	10.021316	11.889916	10.495265
miR3545	0.000650	0.000750	0.001044	0.001511
miR206	0.000680	0.000813	0.000786	0.000795
miR19b	0.001515	0.001543	0.002843	0.003636
miR494	0.016326	0.009291	0.014395	0.010685
miR503	0.055297	0.036021	0.019732	0.014748
miR18a	0.003808	0.006708	0.014595	0.018994
mir92	0.007156	0.006479	0.008709	0.006615
miR342	0.020381	0.015625	0.027521	0.024462
miR184	0.000128	0.000263	0.000767	0.001480
miR338	0.001209	0.000977	0.002350	0.002110
miR124	0.000033	0.000301	0.000102	0.000030
miR124a	0.000163	0.000245	0.000477	0.000348
miR15b	0.248847	0.455335	0.532800	0.688566
miR24	10.434817	10.091019	17.168197	16.931838
mir296	0.000135	0.000186	0.000098	0.000156
miR134	0.000089	0.000107	0.000183	0.000190
miR145	5.290241	5.370290	8.643806	4.696763
miR148b	1.093030	1.248331	1.334840	1.054579
miR187	0.000510	0.000700	0.001143	0.002478
miR449	0.017317	0.024775	0.034118	0.035690
miR99b	0.005955	0.007065	0.008529	0.054159
miR433	0.000904	0.001689	0.002262	0.006419
miR146	0.001079	0.009685	0.001426	0.004899
miR181a2	0.223498	0.349492	0.284533	0.236788
miR181a1	0.013261	0.017824	0.022431	0.023628
miR433*	0.000257	0.000707	0.001052	0.001059
U6	1.000000	1.000000	1.000000	1.000000



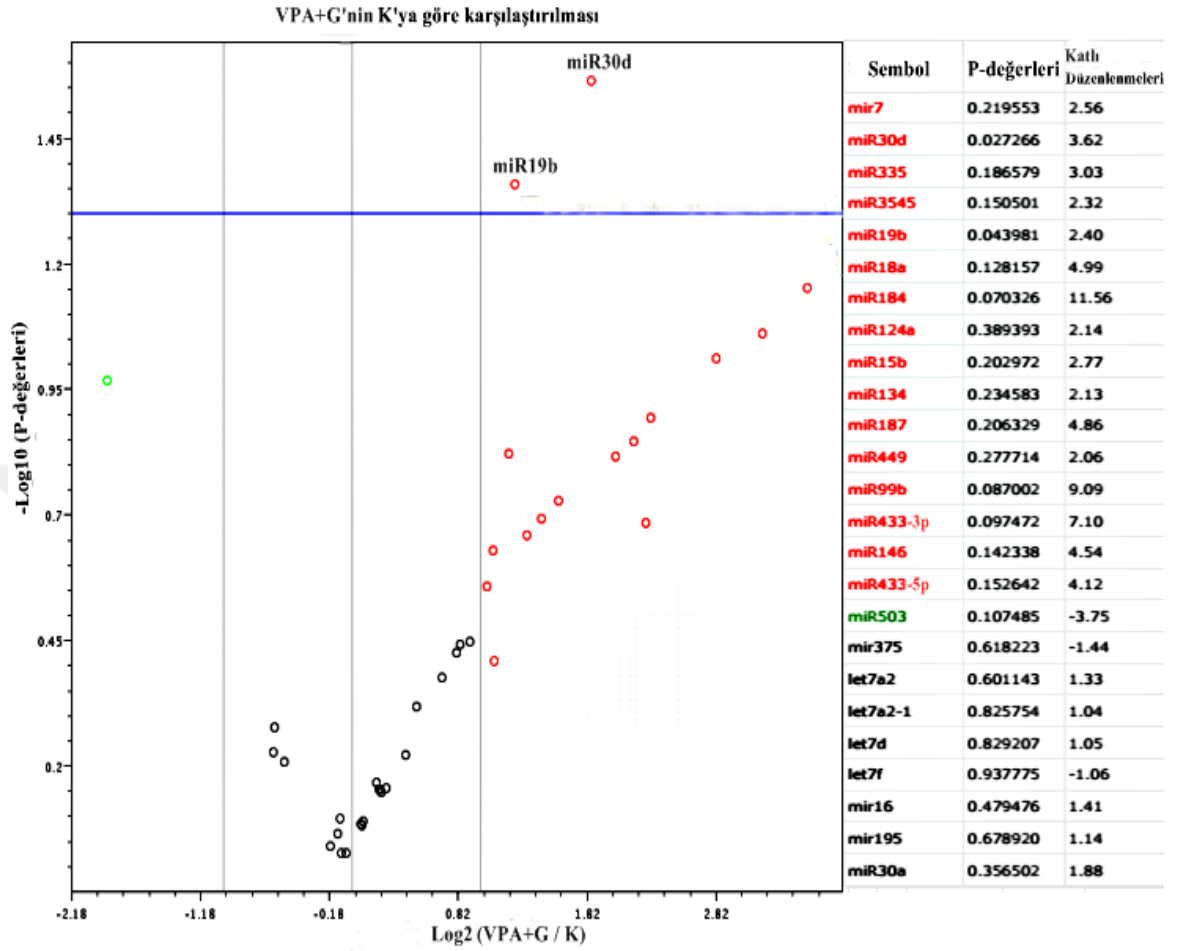
Şekil 4.11: Glukoz uygulanan grup ile kontrol grubunda bazı miRNA'ların ekspresyon seviyelerinde meydana gelen değişiklikleri göstermektedir. Kırmızı içi boş yuvarlaklar gen ekspresyon seviyelerinde artış meydana gelen miRNA'ları gösterirken, yalnızca mavi çizginin üzerinde kalan miRNA'larda istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edilmiştir ($p < 0,05$).

Sonuçlar karşılaştırıldığında, glukoz uygulanan grupta kontrol grubuna kıyasla, miR-124 ve miR-146'nın ekspresyon seviyelerinde anlamlı bir artış gözlemlendi. ($p < 0,05$) Göze çarpan bir şekilde artan fakat anlamlı olmayan artışlar olarak, miR-7, miR-184 ve miR433-5p kaydedildi ($p > 0,05$).



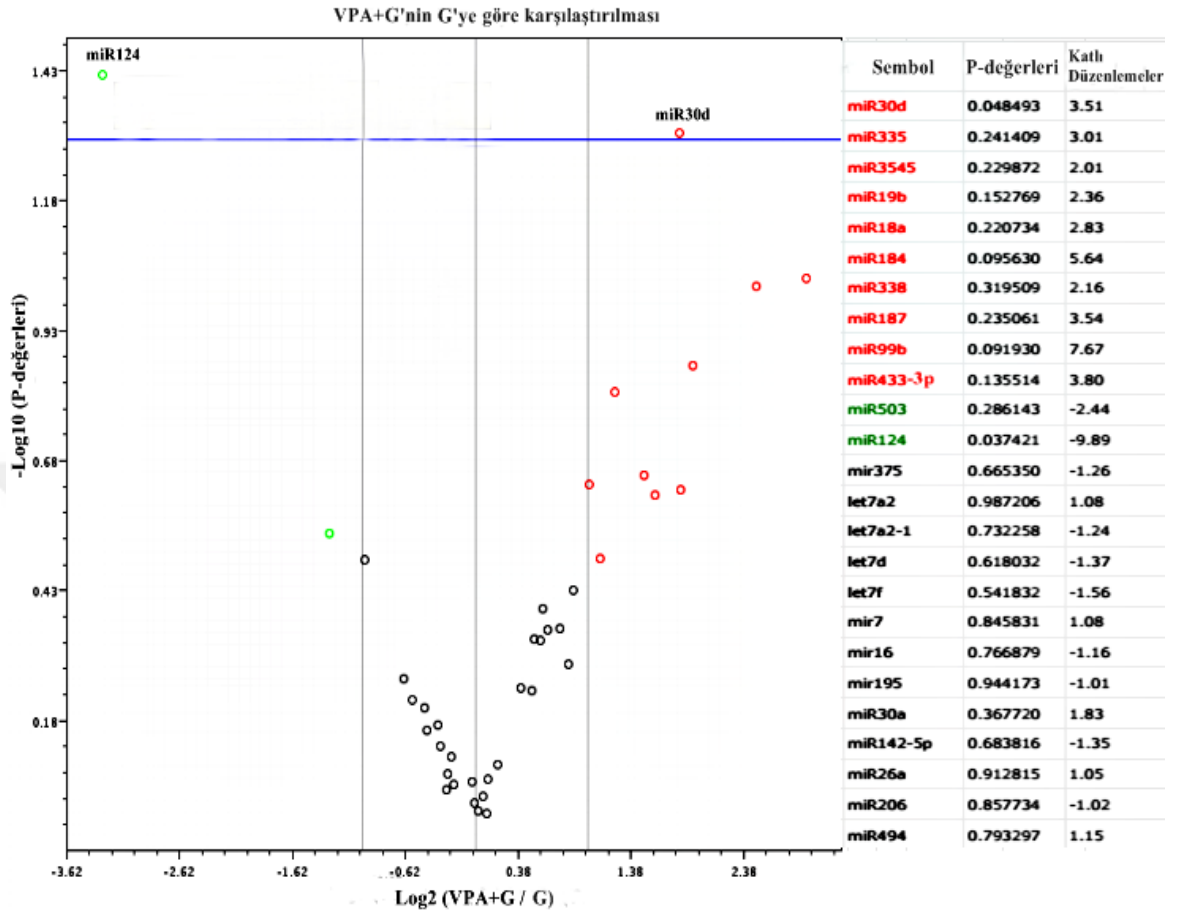
Şekil 4.12: VPA uygulanan grup ile kontrol grubuna bazı miRNA'ların ekspresyon seviyelerinde meydana gelen değişiklikleri göstermektedir. Kırmızı içi boş yuvarlaklar gen ekspresyon seviyelerinde artış meydana gelen miRNA'ları gösterirken, yeşil içi boş yuvarlaklar ekspresyon seviyeleri azalan miRNA'ları göstermektedir. Yalnızca mavi çizginin üzerinde kalan miRNA'larda istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edilmiştir ($p < 0,05$).

Sonuçlar karşılaştırıldığında, VPA grubunda kontrol grubuna kıyasla, miR-335, miR-18a, miR-184 ve miR433-5p ürünlerinde anlamlı bir artış gözlemlendi ($p < 0,05$). Göze çarpan bir şekilde artan fakat anlamlı olmayan artışlar olarak, miR-7, miR-124, miR-124a, miR-15b, miR-134, miR-187 ve miR433-3p kaydedildi ($p > 0,05$).



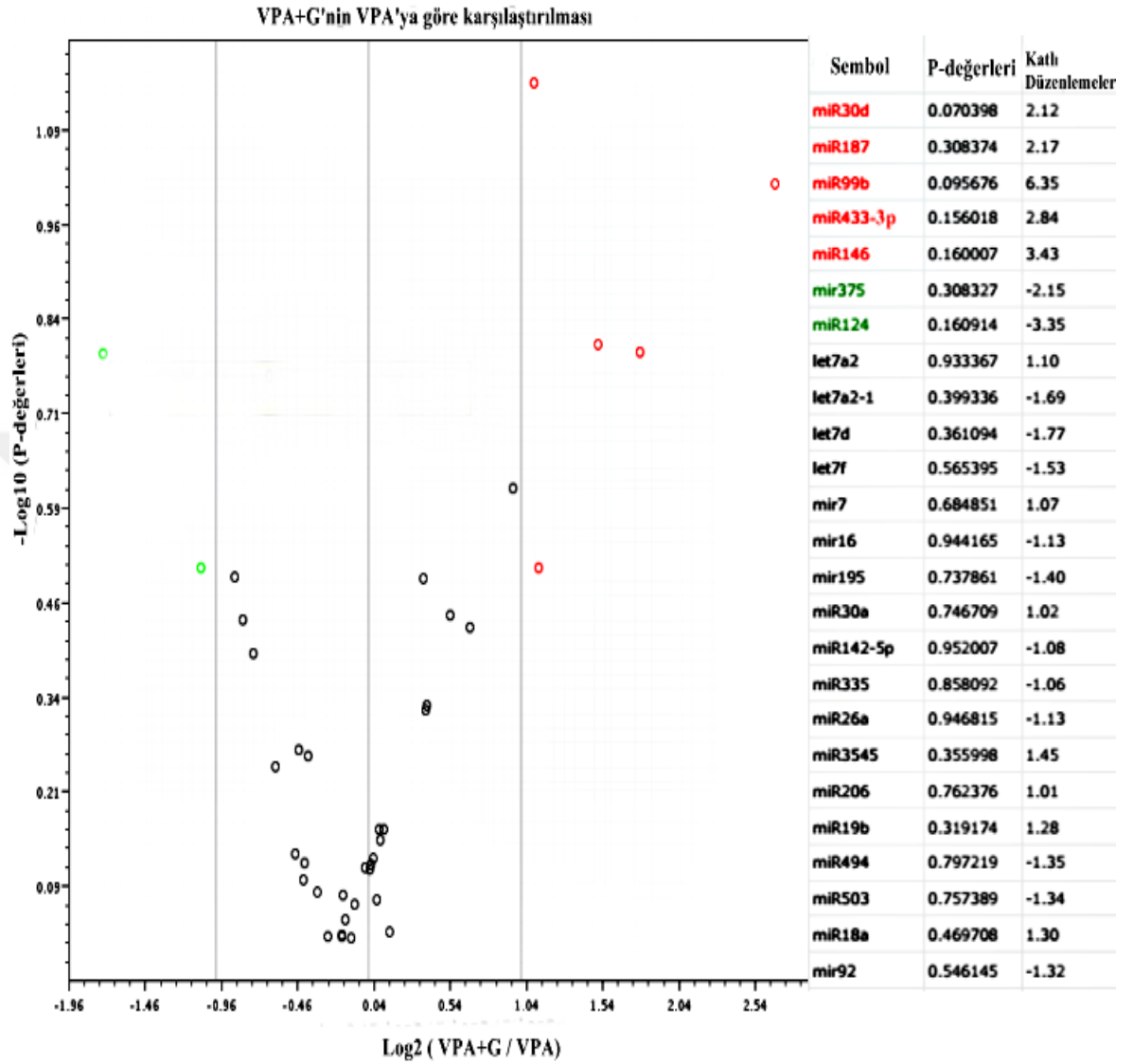
Şekil 4.13: VPA+glukoz uygulanan grup ile kontrol grubunda bazı miRNA'ların ekspresyon seviyelerinde meydana gelen değişiklikleri göstermektedir. Kırmızı içi boş yuvarlaklar gen ekspresyon seviyelerinde artış meydana gelen miRNA'ları gösterirken, yeşil içi boş yuvarlaklar ekspresyon seviyeleri azalan miRNA'ları göstermektedir. Yalnızca mavi çizginin üzerinde kalan miRNA'larda istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edilmiştir ($p < 0,05$).

Sonuçlar karşılaştırıldığında, VPA+G grubunda kontrol grubuna kıyasla, miR-30d ve miR-19b ekspresyonlarında anlamlı bir artış gözlemlendi ($p < 0,05$). Göze çarpan bir şekilde artan fakat anlamlı olmayan artışlar olarak, miR-7, miR-335, miR-3545, miR-18a, miR-184, miR-124a, miR-15b, miR-134, miR-187, miR-449, miR-99b, miR-433-3p, miR433-5p, miR-146a kaydedildi ($p > 0,05$). MiR-503'ün ekspresyonunun ise belirgin bir şekilde azaldığı fakat bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edildi.



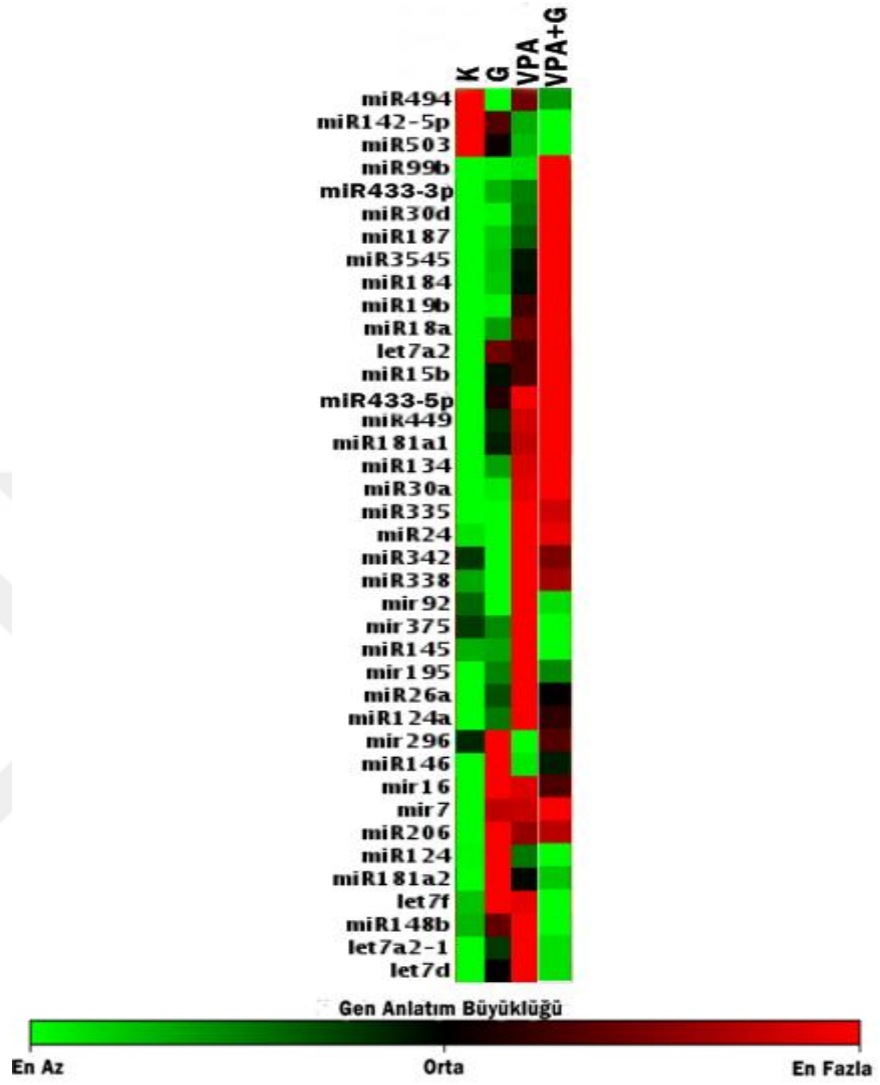
Şekil 4.14: VPA+glukoz uygulanan grup ile glukoz uygulanan grupta bazı miRNA'ların ekspresyon seviyelerinde meydana gelen değişiklikleri göstermektedir. Kırmızı içi boş yuvarlaklar gen ekspresyon seviyelerinde artış meydana gelen miRNA'ları gösterirken, yeşil içi boş yuvarlaklar ekspresyon seviyeleri azalan miRNA'ları göstermektedir. Yalnızca mavi çizginin üzerinde kalan miRNA'larda istatistiksel olarak anlamlı bir artış veya azalma tespit edilmiştir ($p < 0,05$).

Sonuçlar karşılaştırıldığında, VPA+G'de G grubuna kıyasla, miR-30d'nin ekspresyonunda anlamlı bir artma; miR124'te ise anlamlı bir azalma gözlemlendi ($p < 0,05$). Göze çarpan bir şekilde artan fakat anlamlı olmayan artışlar olarak, miR-335, miR-3545, miR-19b, miR-18a, miR-184, miR-338, miR-187, miR-99b, miR-433-5p gözlemlendi. MiR-503'ün ekspresyonunda anlamlı bir düşüş gözlemlendi ($p < 0,05$).



Şekil 4.15: VPA+glukoz uygulanan grupta VPA grubuna göre bazı miRNA'ların ekspresyon seviyelerinde meydana gelen değişiklikleri göstermektedir. Kırmızı içi boş yuvarlaklar gen ekspresyon seviyelerinde artış meydana gelen miRNA'ları gösterirken, yeşil içi boş yuvarlaklar ekspresyon seviyeleri azalan miRNA'ları göstermektedir.

Sonuçlar kıyaslandığında, VPA+glukoz uygulanan grupta VPA grubuna kıyasla, herhangi bir anlamlı miRNA ürünü değişikliği tespit edilemedi ($p > 0.05$). Fakat, göze çarpan bir şekilde artan, anlamlı olmayan artışlar olarak, miR-30d, miR-187, miR-99b, miR-433-3p, miR-146 kaydedildi. Ayrıca, göze çarpan bir şekilde azalan fakat anlamlı olmayan düşüşler olarak miR-375 ve miR-124 belirlendi.



Şekil 4.16: : Her bir grupta miRNA'ların gen anlatım düzeyi derecelendirilmiştir. Gen ekspresyon düzeyleri yeşilden kırmızıya doğru artmaktadır.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'nün verilerine göre, dünya çapında yaklaşık 150 milyon kişinin diyabet hastası olduğu ve bu sayının yaklaşık %90'nını tip 2 diyabet oluştururken, %10'u tip 1 diyabetiktir. WHO, diyabetten kaynaklanan ölüm oranının 2025 yılında ikiye katlanacağını tahmin etmektedir (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs138/en/>). Tip 2 diyabetin, birçok ölümcül patofizyolojik sonuçları nedeniyle, morbidite ve mortalite oranları gün geçtikçe artmaktadır. Bu hastalık kardiyovasküler sistem, böbrek, retina ve periferik sinir sistemini de kapsayan geniş etkili komplikasyonlara yol açar.

Diyabet, kan glukoz seviyesinin yükselmesi ile karakterizedir. Kan glukozunun belirli bir seviyede tutulması pankreasın endokrin kısmını oluşturan Langerhans adacığında konumlanan hücreler tarafından kontrol edilir. Besin alımını takiben kan glukozu yükseldiğinde adacıktaki β -hücreleri insülin salgılayarak kan glukoz seviyesini düşürür. İnsülin, vücuttaki insüline duyarlı hücreler tarafından kandaki glukozun alınmasını uyarır ve glukoz karaciğerde glikojene çevrilir. Kan glikoz seviyelerinin optimal kontrolü pankreatik β -hücrelerinde meydana gelen insülin sentezi ve salınımının hızla değişmesiyle sağlanır (Kahn, 1996). Bu da hiç kuşkusuz doğrudan β -hücre kütlesi ile ilişkilidir. Glukoz ve hormonal etkilerle düzenlenen β -hücre replikasyonu, apoptotik eliminasyonu ve özel şartlarda progenitör hücrelerden kaynaklanan farklılaşma β -hücre kütlesini etkileyen faktörlerdir. β -hücre kütlesindeki farklılıklar, gebelik, periferik dokuların insüline olan duyarlılığı veya doku hasarı gibi değişimler kan glukozunun kronik olarak yükselmesi ve ileri seviyelerde diyabete yol açabilir (Kahn, 1996; Mathis et al., 2001; Saltiel ve Kahn, 2001).

Diyabet gelişiminin birbirini izleyen 5 basamakta meydana geldiği belirlenmiştir. Her bir basamak β -hücre kütlesi, fenotipi ve fonksiyonunda meydana gelen önemli değişikliklerle karakterize edilir. En iyi tanımlanmış olan basamak ilk aşama olan ve kompenzasyon olarak adlandırılan basamaktır. Bu aşamada normal glukoz seviyelerinin

korunabilmesi için insülin sekresyonu artar ki bu tip değişiklik obezite, fiziksel inaktivite ve genetik yatkınlığa bağlı gelişen insülin direncinin bir bulgusudur. İkinci basamakta açlık glukoz seviyeleri 5-6.5 mmol/L (89-116 mg/dL) değerlerine yükselir ki bu kararlı bir β -hücre adaptasyonunun göstergesidir. Üçüncü basamak erken dekompenzasyonun değişken bir periyodudur ve bu aşamadan sonra gelen 4. basamakta yükselmiş olan glukoz seviyeleri karardır (dekompenzasyon). Son aşama olan 5. basamak ise ileri derecede dekompenzasyon, β -hücre yetmezliği ve ketoz gelişimi ile karakterizedir (Weir ve Bonner-Weir, 2004).

Diyabet gelişiminin ilk basamağı olan kompenzasyonun en önemli bulgusu glikoz ile uyarılan insülin salınımındaki belirgin artıştır. İnsülin salınımındaki bu artışın nedeni şüphesiz ki pankreatik β -hücre sayısında meydana gelen artıştır. Normalde pankreatik β -hücre sayısı hücre bölünmesi veya farklılaşma sonucunda meydana gelen ve apoptotik hücre ölümü yoluyla kaybedilen β -hücre sayısı arasındaki dengenin değişmesi ile artar veya azalır. Diyabet gelişiminin ilk basamağında meydana gelen pankreatik β -hücre sayısındaki artışın nedeni ve bu hücrelerin kaynağı henüz tam olarak aydınlatılmamıştır. Bu sorunun yanıtı diyabetin gelişmesinde merkezi rol oynadığı ileri sürülen pankreatik β -hücrelerinin sayıca artırılarak hipergliseminin engellenmesi açısından çok önemlidir. Pankreasta β -hücrelerini verebilecek dört farklı hücre kaynağı belirlenmiştir: kanal hücreleri, ekzokrin hücreler, mezenkimal kök hücreler ve β -hücreleri. Uygun bir uyarı olmaksızın β -hücrelerinin rejenerasyon kapasitelerinin çok düşük olduğu bilinmektedir. Bu durum muhtemelen β -hücrelerinin kısıtlı replikasyon kapasitelerinin ve prekürsör hücrelerden neogenez ile β -hücre oluşumunun sürekli aktif olmamasının bir sonucudur. Ancak, uygun kuvvetli bir dış uyarı varlığında çok etkin olmamakla birlikte belirli bir rejeneratif hücre artışı söz konusu olabilmektedir. Bu tip rejeneratif büyüme var olan progenitör veya kök hücre kaynaklı olabilir.

β -hücresi araştırmalarındaki en önemli sorulardan birisi yetişkin pankreasında bu hücrelerin yenilenmesinin ne oranda gerçekleştiği ve bunun kaynağının hangi hücre olduğudur. Yeni hücreler oluşuyorsa bunlar kök/öncül hücrelerden mi kaynaklanmaktadır, yoksa mevcut hücrelerin bölünmesiyle mi ortaya çıkmaktadır? Literatürde birbiriyle çelişen bulgulara rastlanmaktadır. Gebelikte, obezitede ve kısmi

pankreatektomiden sonra β -hücrelerinin kendini yenilediği görülür. Bu bulgu pankreatik kök hücreleri kavramının doğmasına yol açmıştır (Bonner Weir ve Sharma, 2002).

Pankreatik kök hücrelerin var olduğunu ileri süren görüşler nakillerden sonra adacıkların işlev görmeyi sürdürmesinden de destek almaktadır. β -hücrelerinin uzun süre yaşam sürmedikleri bilinir (Bonner-Weir et al., 2000). Bu nedenle nakledilen adacıkların işlevlerini sürdürmesi, adacık içinde pankreatik kök hücrelerin veya en azından kendini yenileyebilen işlevsel β -hücrelerinin varlığıyla açıklanabilir (Can, 2014).

Ekzokrin kanalların (Bonner-Weir et al., 2000) ve adaların (Guz et al., 2001) postnatal pankreasta progenitör hücrelerinin kaynağı olabileceği ileri sürülmüştür (Bouwens ve Kloppel, 1996). Bu olasılık çok uzun zaman önce ortaya atılmış olsa da sadece bir kaç makale yetişkin pankreasta bulunan kök hücrelerin veya gerçek progenitör hücrelerin varlığını tam olarak ortaya koyar niteliktedir. Yayınlanan çalışmalarda bu hücrelerin normal kemirgen pankreasından izole edilebildiği ve uzun süreler boyunca alt kültürlerinin yapılabildiği ileri sürülmektedir. Ayrıca, *in vitro* farklılaştırma şartlarında kendini yenileyebilen bu hücrelerin insülin üretebilen hücelere değişebildiği ve transplante edildiklerinde diyabeti iyileştirebildiğine dikkat çekilmektedir (Ramiya ve diğ., 2000; Karaoz et al., 2010). Bu progenitör veya kök hücrelerin *in vivo* β -hücrelerinin yenilenmesi, sayıca artması veya rejenerasyonunda rol alıyor olması muhtemeldir. Zulewski ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada (2001) sıçanlara 48 saat süreyle adacık trofik faktörleri olarak bilinen glukoz ve glukagon benzeri peptid-1 (GLP-1) uygulamışlar ve sonuç olarak adacıkların kütlelerinin yaklaşık iki kat arttığını göstermişlerdir. Bu bulgudan yola çıkarak pankreatik adacıkların içinde progenitör hücrelerin var olabileceğini düşünmüşler ve insan pankreatik adacıklarında mezenkimal kök hücre belirteci olarak bilinen nestin pozitif hücrelerin yer aldığını göstermişlerdir. Bu tip progenitör hücrelerin pankreasta yer aldığı ve bu hücrelerin endojen aktivasyonu yoluyla β -hücrelerine farklılaştırarak ileri seviyede diyabet tedavisi için göz ardı edilmemelidir.

Karaoz ve arkadaşları (2010) PAK-MKH'lerin CD29 (Integrin- β 1 zinciri Ha2/5), CD54, CD90 (Thy-1/Thy-1.1) ve CD106 taşıırken, CD45 üretmediklerini göstermişlerdir. Ayrıca, bu hücrelerin nestin, fibronektin, endoglin ve vimentin gibi mezenkimal kök hücre belirteçlerini taşıdığını da belirtmişlerdir. PAK-MKH'ler uygun uyaran varlığında kültür ortamında insülin üreten β -hücrelerine, adipositlere ve osteositlere farklılaşabilmişlerdir.

Çalışmamızda ekibimizin önceki çalışmaları kapsamında erişkin (2.5-3 aylık) erkek *Wistar Albino* sıçanların pankreatik adacıklarından izole edilip karakterize edilen PAK-MKH'ler kullanılmıştır. 3. Pasajda, PAK-MKH'lerin karakterizasyonu için i.) mezenkimal kök hücrelerin karakterizasyonunda varlık veya yoklukları anahtar veri olarak kabul edilen yüzey antijenleri özgün antikolarıyla işaretlenmiş ve flow sitometrik analiz ile bu antijenleri taşıyan hücrelerin yoğunluğu belirlenmiştir. Bu belirteçler: CD29 (Integrin- β 1 zinciri Ha2/5), CD45, CD54, CD90 (Thy-1/Thy-1.1), CD106'dır. Negatif kontrol olan CD45'i taşıyan hücreler $<0.5\%$ iken, pozitif belirteçler $>99\%$ olan hücre popülasyonları deneye alınmıştır. ii.) Mezenkimal kök hücrelerin en sık kullanılan sitoplazmik belirteçleri olan Vimentin, CD105/Endoglin, Fibronektin ve Nestin proteinlerinin varlığı Western blotlama tekniğiyle gösterilmiştir. iii.) Kök hücrelerin en önemli özelliği olan farklılaşma yeteneğinin gösterilmesi için PAK-MKH'lerin pankreatik β -hücrelerine, adipositlere ve osteositlere farklılaşma kapasiteleri uygun protokoller kullanılarak ölçülmüştür. iv.) Mezenkimal kök hücrelerin karakteristik özelliği olarak bilinen yüksek proliferasyon kapasiteleri 1., 4., 7., 11., 14. ve 17. günlerde WST-1 (4-3-4-Iodophenyl-2-4-nitrophenyl-2H-5-tetrazolio-1,3-benzene disulfonate) uygulamasıyla ölçülmüştür. Bu bulgular bir başka çalışma kapsamında elde edildiğinden teze dahil edilememiştir. Laboratuvarımızda gerçekleştirilen tüm bu testler sonucunda izole edilen PAK-MKH'lerin yüksek saflıkta, sağlıklı ve fonksiyonel olduğuna karar verilmiştir ve bu hücreler ile çalışmalar sürdürülmektedir.

Çalışmamızda oluşturduğumuz gruplar arasında tam medyumdan oluşan kontrol grubu ile glukoz, VPA veya VPA+glukoz uygulanan deney gruplarından oluşan toplam 4 farklı uygulama yer almaktadır. Burada yüksek konsantrasyonda glukoz *in vivo* diyabetik bireylerde bulunan hücrelerin mikroçevresini taklit edebilmek amacıyla

kullanılmıştır. Şüphesiz ki tip 2 diyabetin oluşmasında en önemli basamak olan kompenzasyon sırasında artan β -hücre kütesinin en önemli uyarıcısı uzun süreli yüksek glukoz konsantrasyonudur. Bu anlamda uzun süreli yüksek konsantrasyonda glukoz uygulaması PAK-MKH'lerin β -hücrelerine farklılaşması için uygun bir model olabilecek niteliktedir. VPA ise sınıf I HDAC'ların inhibitörü olarak bilinmektedir ve bu gruptaki enzimlerin PAK-MKH'lerin β -hücre farklılaşmasındaki rollerinin araştırılabilmesi amacıyla kullanılmıştır. Ayrıca, uzun süre VPA kullanan küçük yaştaki epilepsi hastalarında insülin direnci ve tip 2 diyabet gelişimi ile ilgili belirtilerin tespit edilmiş olması (Luef ve diğ., 2002; Verotti ve diğ., 2002) bize VPA'nın PAK-MKH'leri β -hücre farklılaşmasına yönlendirebileceğini düşündürmüştür.

Erişkin pankreas, asinar hücrelerden oluşan ve dallı bir kanal aracılığıyla üretilen sindirim enzimlerini bağırsağa salgılayan ekzokrin doku ile insülin üreten β -hücreleri, glukagon üreten α -hücreleri, somatostatin üreten δ -hücreleri ve pankreatik polipeptid üreten PP-hücrelerinden oluşan endokrin dokuyu içeren karmaşık bir organdır. Pankreas, midenin arkasında konumlanan ön bağırsak endoderminin dorsal ve ventral bölgelerinden köken alır. Genetik olarak değiştirilmiş farelerle yapılan çalışmalar pankreatik özgünleşme, büyüme ve farklılaşmayı düzenleyen hiyerarşik bir transkripsiyon faktör ilişkisinin varlığını göstermiştir (Collombat ve diğ., 2006; Jorgensen ve diğ., 2007). Pankreas oluşumuna katılan endodermal bölge homeodomain faktör PDX1 ifade eder (Offield ve diğ., 1996). Gelişimin takip eden basamağında heliks-loop-heliks faktör neurogenin3 (**NGN3**), epitelyal pankreatik progenitör hücrelerde endokrin farklılaşma programını başlatır. Gerçekten de *NGN3* geni hasarlı farelerde endokrin hücre oluşumu söz konusu değildir (Gradwohl ve diğ., 2000) ve çalışmalar NGN3 ifade eden hücrelerin adacık hücrelerinin progenitörü olduğunu göstermektedir (Gu ve diğ., 2002). Gelişimin ilerleyen basamaklarında ilave transkripsiyon faktörleri özgün endokrin hücre kaderini belirler. Pax4 ve Arx'in antagonistik role sahip olduğu ve endokrin alt türlerin (Pax4 β/δ , Arx α/PP -hücre farklılaşmasında etkindir) özelleştirilmesinde rol aldığı gösterilmiştir. *Pax-4* geni hasarlı olan farelerde seçici olarak β ve δ -hücreleri azalırken, α -hücreleri artmakta; *Arx* geni hasarlı olan farelerde ise zıt fenotip gözlenmektedir (Collombat ve diğ., 2003).

Çalışmamızda PAK-MKH'lere 20 gün süreyle glukoz ve/veya VPA uygulanmasını takiben β -hücre farklılaşmasının tespiti için insülin üretiminde rol alan transkripsiyon faktörleri ve β -hücrelerinin fonksiyonunu sürdürmesinde önemli olan diğer bazı moleküller olan *Pdx-1*, *Pax4-6*, *Nkx6.1*, *NRG3*, *ins2* ve *Glut2*'nin gen ekspresyon seviyeleri qRT-PCR yöntemiyle ölçülmüştür.

20 gün boyunca yüksek konsantrasyonda glukoz uygulanan hücrelerin β -hücre farklılaşması ve fonksiyonlarının devamlılığında rol alan bazı moleküllerin gen ekspresyon düzeyleri açısından tam medtum uygulanan kontrol PAK-MKH'lere benzer bir profil çizdiği gözlenmiştir. Literatürde bu bulguyu destekleyecek çalışmalar mevcuttur. Örneğin, sıçanların kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerinde yüksek konsantrasyonda glukozun kök hücre koloni oluşumuna ve farklılaşmaya negatif yönde etki ettiği gösterilmiştir (Stolzing ve diğ., 2012). İnsan erişkin vasküler kök hücrelerde de benzer şekilde yüksek glukoz konsantrasyonunda büyümenin durduğu ve farklılaşma potansiyelinin azaldığı gösterilmiştir (Keats ve Khan, 2012). PAK-MKH'lere yalnızca yüksek glukoz uygulamasının gen ekspresyon seviyesinde β -hücre farklılaşması ve fonksiyonu ile ilişkili faktörler üzerinde etkili olmadığını söylemek mümkündür.

VPA uygulanan hücrelerde gen ekspresyon düzeylerinde meydana gelen en belirgin artışın *Nkx6.1*'de olduğu tespit edilmiştir. Bu transkripsiyon faktörünün β -hücre farklılaşmasında önemli rol oynadığı bilinmektedir. Örneğin, Sander ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada farelerde *Nkx6.1* geninde hasar oluşturulduğunda β -hücre öncülerinin azaldığını ve β -hücre neogenezinin özellikle ikinci geçiş aşamasında durduğunu göstermişlerdir. Bu bilgiden yola çıkarak *Nkx6.1*'in β -hücre farklılaşmasının erken dönemlerinde fonksiyonel olduğu söylenebilir. VPA uygulanan hücrelerde daha düşük oranda, ancak kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edilen diğer β -hücre farklılaşmasıyla ilişkili genler *ins2* ve *pdx1*'dir. Bu bulgu VPA uygulanan hücreler arasında erken farklılaşma evresindeki hücrelerden daha az sayıda olmakla birlikte ileri derecede farklılaşan β -hücrelerinin varlığını ortaya koymaktadır. Ayrıca, bu grupta *Pax6* ve *Glut2* mRNA seviyelerinde anlamlı bir azalmanın olduğu tespit edilmiştir. Bilindiği üzere her iki molekül de β -hücrelerinin fonksiyonlarının

devamlılığı ile ilişkilidir (Gosmain ve diğ., 2012). VPA uygulanan hücrelerin Pax6 mRNA seviyelerinde gözlenen azalma farklılaşan β -hücrelerinin henüz fonksiyonel olmadığını düşündürmektedir.

Gen ekspresyon seviyelerinde en belirgin farklılığın VPA+G grubunda meydana geldiği, özellikle ins2, pdx-1 ve ngn3 mRNA seviyelerinde kontrol grubuna göre belirgin bir artış olduğu dikkatimizi çekmiştir. B-hücre farklılaşmasıyla ilgili diğer genler arasında yer alan *Nkx6.1*, *Pax4* ve *Glut2* genlerinin ekspresyon seviyelerinde de kayda değer ve istatistiksel olarak anlamlı artışlar olduğu tespit edilirken, yalnızca Pax6 mRNA seviyesinde azalma olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen bulgular 20 gün boyunca VPA+glukoz uygulanmasının PAK-MKH'leri olgun β -hücrelerine farklılaştırdığını, ancak farklılaşan bu hücrelerin henüz fonksiyonel olmadığını düşündürmektedir. Tüm gen ekspresyon bulguları bir araya getirildiğinde, VPA'nın PAK-MKH'lerde β -hücre farklılaşmasını başlattığı glukozun ise kök hücre havuzunu destekleyerek bu farklılaşmayı artırdığı düşünülebilir.

Diğer taraftan, 10, 20 ve 30 günlük deney süreleri sonunda gerçekleştirilen akım sitometrik analizler insülin⁺ hücre sayısının glukoz ve/veya VPA uygulanan gruplardan kontrole göre anlamlı bir artış gösterdiğini, en yüksek insülin⁺ hücre oranının ise yalnızca VPA uygulanan grupta olduğunu ve özellikle 20 günlük deney sürecinde meydana geldiğini göstermiştir. Bu bulgu deneyin sonraki aşamalarında 20 günlük deney süresinin kullanılmasına karar vermemizi sağlamıştır. İlginç bir nokta, glukoz uygulanan deney grubunda yüksek oranda insülin üreten hücre bulunmasına karşın, insülin üretiminde rol oynayan transkripsiyon faktörlerinin ekspresyon seviyelerinde kontrol grubuna göre herhangi bir farklılığın olmamasıdır. Bu durum, ilgili moleküllere ait yeni mRNA üretilmeksizin, hücrede var olan mRNA'ların kullanılarak proteine dönüştürülmüş olma olasılığını düşündürmektedir.

Kök hücre ile diyabet tedavisi embriyonik/iPS hücreler veya kemik iliği/adipoz doku kaynaklı kök hücrelere ardışık büyüme faktörleri uygulanarak gerçekleştirilen çok basamaklı β -hücre farklılaştırma protokollerinin geliştirilmesine odaklanmıştır. Son olarak Milman ve arkadaşları tarafından yayınlanıp (2016) en çok dikkat çeken ve

gelecek yıllarda Tip1 diyabet tedavisinde uygulamaya geçmesi beklenen protokol toplam 6 basamaktan oluşup 14 gün sürmektedir. Bu protokole göre Tip1 diyabetik hastalardan elde edilen iPS hücrelere 13 farklı madde çeşitli kombinasyon ve sürelerde uygulanmaktadır. Sonuç olarak olgun ve fonksiyonel β -hücrelerinin elde edilmesinin mümkün olduğu gösterilmiştir. Çalışmamızda, özellikle VPA+glukozun tespit edilen doz ve sürelerde MKH'lere uygulanması ile olgun β -hücrelerinin elde edilebileceği literatürde ilk defa tespit edilmiştir. Bu hücreler diyabetik bireylere transplante edilerek bu hastalığın hücresel tedavisinde kullanılabilir. Çalışmamız bu yönüyle yeni bir β -hücre farklılaştırma protokolü önerir niteliktedir.

Ayrıca, 20 gün boyunca glukoz ve/veya VPA uygulanmış olan deney gruplarına düşük ve yüksek konsantrasyonda glukozun uygulanması sonucu medyuma salınan insülin miktarları ELISA yöntemiyle ölçülmüştür. Bu testin amacı PAK-MKH'lerin farklılaşmasıyla oluşan yeni β -hücrelerinin glukozu duyarlı insülin sekresyonu yapma kapasitelerinin ölçülerek fonksiyonel olup olmadıklarının araştırılmasıdır. Elde edilen sonuçlar β -hücre farklılaşması sonuçlarıyla paralel olarak VPA uygulanan gruplarda daha fazla olmak üzere bazal glukoz uyarısına karşı insülin sekresyonu yapıldığını göstermektedir. Ancak belirtilen deney şartlarında PAK-MKH'lerden farklılaşmış olan β -hücrelerinin yüksek glukoz uyarısına karşı duyarlı olmadığı yani bu hücrelerin fonksiyonel olmadığı tespit edilmiştir. Literatüre bakıldığında tip 1 diyabetin hücresel tedavisinde kullanılmak üzere yeni oluşturulmaya çalışılan β -hücrelerinin özellikle embriyonik kök hücreler (Pagliuca ve Melton, 2013) veya benzer karakterli iPS hücrelerden (Pellegrini ve diğ., 2015) farklılaştırıldığı dikkati çekmektedir. Pluripotent karakterli embriyonik kök hücre veya benzeri kök hücrelerden türetilmiş insülin ifade eden hücrelerin yükselen konsantrasyonlarda glikoza yanıt olarak artan seviyelerde insülin salgılamasında başarısız olmaları bu tip hücrelerin tedavide kullanılmasını kısıtlamaktadır (D'Amour ve diğ., 2006). Embriyonik kök hücrelerden veya iPS hücrelerden türetilen endodermal progenitör hücre hatlarından oluşturulan insülin⁺ hücrelerin insülin salgıladıkları belirtilmiştir (Cheng ve diğ., 2012). Ancak, bahsedilen insülin salgılanmasının kullanılan protokollerdeki farklılaşmadan mı kaynaklandığı, yoksa bu hücrelerin *in vivo* transplantasyon sonrasında mı fonksiyonel oldukları henüz tam açıklanamamıştır. Farklı yaşlardaki genç fare adacıklarında yapılan

analizler insülin salgılanması ile ilişkili olabilecek *ürokortin 3 (Ucn3)* dahil olmak üzere bazı genlerin regülasyonunun kök hücrelerden yeni türetilmiş β -hücrelerinde fonksiyon edinimi ile ilgili ilerlemeler kaydedilebilmesi açısından önemli olabileceğini düşündürmektedir (Blum ve diğ., 2012; Van der Meulen ve diğ., 2012). Kök/progenitör hücrelerden *in vitro* şartlar altında farklılaştırılan β -hücrelerinin *in vivo* transplantasyonu takiben yerleştikleri mikro çevrelerde bulunan diğer tip hücreler ile veya salınan bazı faktörler ile olgunlaşmalarını tamamlayarak fonksiyon kazanma ihtimali yüksek görünmektedir. Millman ve arkadaşlarının son olarak yayınladığı (2016) çalışmalarından yola çıkılarak pluripotent karakterli embriyonik kök hücre veya iPS hücrelerinden türetilen β -hücrelerinin *in vitro* koşullarda fonksiyon kazanabilmesinin çalışılan kök hücrenin kaynağına bağlı olduğu da düşünülmesi gereken önemli noktalardan birisi olarak karşımıza çıkmaktadır. Bahsi geçen çalışmada diyabetik olmayan ve tip 1 diyabetik hastaların fibroblastlarının yeniden programlanmasıyla elde edilen iPS hücrelerinden türetilen β -hücrelerinin *in vitro* şartlarda yükselen glukoz seviyelerine duyarlı olarak artan seviyelerde insülin salgılayabildiği gösterilmiştir.

Metabolik regülasyonun merkezi yollarından birisi olan glikolizin erişkin kök hücre karakterinin korunmasındaki rolü dikkat çekmektedir. Çoğu memeli hücresi glukozu enerji kaynağı olarak kullanır. Glukoz, glikoliz adı verilen çok basamaklı reaksiyonların sonucunda piruvat üretilen bir yolak aracılığıyla metabolize edilir. Farklılaşmış hücrelerde normal oksijen seviyelerinde üretilen piruvatın çoğu mitokondriye geçer, Krebs çevrimi ile okside edilerek ATP üretilir ve böylelikle enerji sağlanır. Ancak, kök hücrelerde, glikoliz ile üretilen piruvatın çoğu laktat dehidrogenaz ile laktata çevrilir. Bu durum genel olarak düşük oksijen varlığında gerçekleşip anaerobik glikoliz veya Warburg etkisi olarak adlandırılır. Kök hücrelerin besin algılama yolları aracılığıyla oksidatif fosforilasyonu baskılayıp, glikolizi artırarak karakterlerini koruduğu bilinmektedir. Bu durumda, enerji kaynaklarının artması veya değişmesi kök hücrelerin karakterini etkileyerek farklılaşmasına neden olabilmektedir (Ochocki ve Simon, 2013). Farklılaşan hücrelerde süregelen mitokodriyal elektron taşıma sistemi, reaktif oksijen türleri (ROS)'nin üretilmesine neden olur. Dolayısıyla yükselen ROS seviyeleri kök hücrelerin farklılaşmasıyla ilişkilendirilmektedir (Ryu ve diğ., 2015). Çalışmamızda

ROS üretimi seviyeleri PAK-MKH farklılaşma düzeylerinin bir belirteci olarak kullanılmıştır. B-hücre farklılaşması bulgularına paralel olarak 20 gün boyunca glukoz ve/veya VPA uygulanan gruplarda ROS üretiminin kontrole göre anlamlı bir artış gösterdiği tespit edilmiştir.

Deney süresi sonunda hücrelerde meydana gelen morfolojik değişiklikler de farklılaşma bulgularını desteklemektedir. Yalnızca glukoz uygulanan PAK-MKH'lerin tam medyum uygulanan hücrelere morfolojik yönden benzerliği dikkatimizi çekti. Her iki grubun ortak özelliği çok sayıda değişen büyüklüklerde kök hücre kolonileri oluşturması idi. Bu görüntü pluripotent hücre karakterine uymaktadır. Tüm bulgular, yalnızca glukoz uygulanan gruptaki hücrelerin farklılaşmanın erken evrelerinde olduğunu düşündürmektedir. Buna karşın, VPA ve VPA+glukoz uygulanan PAK-MKH'lerde koloni benzeri yapılarda yoğunlaşmış yuvarlak hücreler çok sayıdaydı. Bu tip hücrelerden oluşan kolonilerin etrafındaki PAK-MKH'lerin sayıca azalarak kolonilerin etrafının boşaldığı ve genel olarak bu kolonilerden ayrılan yuvarlak hücrelerin bu boşluklara yayıldığı gözlenmiştir. Ayrılan yuvarlak görünümlü hücrelerin adherent formdan süspansiyon formuna geçişi dikkat çekicidir. Bu bakımdan VPA ve VPA+glukoz uygulanan gruplardaki kolonileri oluşturan hücrelerin pankreatik adacık hücrelerine benzer şekilde yuvarlak oldukları tespit edilmiştir.

Pankreatik gelişim ile ilgili çalışmalar genel olarak özgün transkripsiyon faktörlerinin düzenleyici rollerini araştırmaya odaklanmış, HDAC'lar gibi epigenetik mekanizmada önemli roller üstlenen diğer eş düzenleyicilerin rolü tam olarak açıklanamamıştır. Haumaitre ve arkadaşları (2008) nukleozomal histonların asetilasyon durumunun kromatin yapısını değiştirdiğini ve gen ekspresyonunun epigenetik olarak düzenlendiğini göz önünde bulundurarak bu mekanizmanın pankreatik farklılaşma ve embriyonik pankreastaki hücrelerin kaderini kontrol edebileceğini öne sürmüşlerdir. Bu hipotez ile ilgili yaptıkları ilk çalışmalarda sıçanların embriyonik pankreasında I. sınıfa dahil olan HDAC1-3 ile II. sınıfa dahil olan HDAC4-7'nin üretildiğini göstermişlerdir. Pankreatik gelişim sürecinin ilerlemesi ve bu sırada gerçekleşen farklılaşma ile birlikte her iki sınıfa ait HDAC'ların seviyelerinde belirgin bir azalmanın olduğu ve buna total HDAC aktivitesindeki azalmanın eşlik ettiğini tespit etmişlerdir. Diğer çalışmalarda

benzer bir değişikliğin osteogenez (Lee ve diğ., 2006) ve adipogenez (Yoo ve diğ., 2006) sırasında da meydana geldiği gösterilmiştir.

Haumaitre ve arkadaşları (2008) embriyonik pankreaslara *in vitro* kültür şartlarında HDAC inhibitörleri uygulayarak bu enzimlerin pankreatik gelişimdeki rolünü araştırmışlardır. Bu uygulama hücre proliferasyonunu etkilemezken, asinar hücre farklılaşmasını baskılayarak duktal hücre farklılaşmasını artırmıştır. nemli bir nokta, HDAC inhibitörü uygulamasının NGN3⁺ endokrin progenitörlerinin gelişimini artırdığı ve endokrin alt tip hücre hatlarının modifikasyonuna yol atığının belirlenmiş olmasıdır. NGN3⁺ progenitör hücreler α , β , δ ve PP-hücrelerine farklılaşma potansiyeline sahiptir (Gradwohl ve diğ., 2000). α /PP ve β / δ hatlarına farklılaşma NGN3⁺’n iki farklı hedefi olan Arx ve Pax4 aracılığıyla meydana gelir (Collombat ve diğ., 2006). Haumaitre ve arkadaşları (2008) uyguladıkları çoğu HDAC inhibitörlerinin Arx ekspresyonunu artırdığını ve α /PP hattına farklılaşmayı ilerlettiğini tespit etmişlerdir. VPA veya MS275 uygulamasının insülin ve somatostatin üreten hücrelerin indirgenmesine ve buna paralel olarak Pax4 gen ekspresyonunda azalmaya sebep olduğunu bildirmişlerdir. Buna karşın TSA veya sodyum butirat uygulamasının β / δ hatlarına farklılaşmayı pozitif yönde etkilediği ve Pax4 gen ekspresyonunda artışa neden olduğu belirtilmiştir. Bu bulgulardan yola çıkarak özellikle TSA veya sodyum butirat uygulaması ile elde edilen NGN3⁺ progenitör hücrelerin diğer HDAC inhibitörlerine göre daha yüksek oranda endokrin hücre havuzunu artırdığı sonucuna varılmıştır.

Çalışmamızda literatürde ilk kez PAK-MKH’lerin sitoplazmik ve nüklear fraksiyonlarda 1.sınıf HDAC yeleri olarak bilinen HDAC1 ve 3 proteinlerinin varlığı gösterilmiştir. Genel olarak 1. sınıfa dahil olan HDAC’ların nukleusta konumlandığı HDAC3’n hem sitoplazmada, hem de nukleusta konumlandığı bilinmektedir (de Rujiter ve diğ., 2003). Bu bilgiye paralel olarak alışmamızda HDAC1’in PAK-MKH’lerde nukleusta daha fazla bulunduğu, ancak düşük oranda sitoplazmada da konumlandığı belirlenmiştir. HDAC3’n ise PAK-MKH’lerin nukleus ve sitoplazmik fraksiyonlarında birbirine yakın seviyelerde bulunduğu tespit edilmiştir. HDAC’ın substratı olan asetilenmiş histonların da nukleusta yer aldığı düşünüldüğünde bu bulgu beklenen bir durumdur ve PAK-MKH’lerin karakterinin korunmasında HDAC1 ve 3’n

rol oynayabileceğine işaret etmektedir. Farklılaşmanın tespit edildiği glukoz ve/veya VPA uygulanan gruplarda HDAC1 ve 3'ün seviyelerinde farklılaşma ile orantılı olarak belirgin bir azalmanın tespit edilmiş olması bu hipotezin doğruluğunu onamaktadır.

PAK-MKH'lerin β -hücrelerine farklılaşmasında histon asetilasyonunun rolünü tanımlamak amacıyla çalışmamızda *in vitro* bir kültür modeli kullanıldı. Pankreas gelişimi sırasında bütün HDAC'ler ifade edildiğinden, spesifik bir HDAC inaktivasyonu yerine spesifik bir HDAC sınıfı inhibisyonu stratejisi tercih edildi. Deneyle başlamadan önce bize rehberlik edebilecek tek çalışma olarak gördüğümüz Haumaitre ve arkadaşlarının (2008) gerçekleştirdiği kapsamlı araştırmaların sonuçlarına göre esasen sınıf I ve II HDAC'ların NGN3⁺ progenitör hücre havuzunu artırarak endokrin hücre farklılaşmasına katkıda bulunduğu tespit edildi. Buradan yola çıkarak PAK-MKH'lerde sınıf I ve II HDAC'ların inhibe ederek çalışmaya başlamaya karar verildi. Bu amaçla PAK-MKH'lere yalnızca sınıf I HDAC'ları ihibe eden VPA veya sınıf I ve II HDAC'ları inhibe eden trichostatin A (TSA) farklı dozlarda ve uzun süreli uygulanarak β -hücre farklılaşmaları test edildi. Sonuç olarak TSA'nın PAK-MKH'lerin β -hücrelerine farklılaşmasında bir etkisi olmadığı belirlenerek (yayınlanmamış bulgu) çalışmamıza sınıf I HDAC'ların araştırılmasına karar verildi.

Sürpriz bir şekilde, adı geçen çalışma ile zıt bulgular elde etmiş olmamız esasen deney modellerindeki farklılıklardan ileri geliyor olabilir. Humaitre ve arkadaşlarının (2008) yapmış oldukları çalışma *in vitro* embriyonik pankreasta yapılan araştırmaları kapsıyor iken, bizim çalışmamızda erişkin PAK-MKH'ler kullanılmıştır. İki çalışma arasındaki en önemli farklılıklardan biri hücrelerin gelişim basamaklarının farklı olması; diğeri ise çok sayıda farklı hücrenin birbiriyle etkileşimlerinin sonuçlarını yansıtan organ kültürüne karşılık tek hücre kültüründe yapılan çalışmaları kapsıyor olmasıdır. Organ kültüründe pankreasta yer alan çok çeşitli hücrelerin neogenez yoluyla diğer tip hücrelere farklılaşarak veya proliferasyon yoluyla kendi sayılarını artırarak hücre havuzunu genişletebileceği unutulmamalıdır. Bu noktada yeni oluşan hücrelerin kaynağının net bir şekilde belirlenebilmesi için tekli hücre kültüründe yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar oldukça önemlidir.

Histon asetilasyonu genel olarak kromatin yapısını gevşeterek transkripsiyon faktörlerinin hedef DNA bölgesine ulaşımını kolaylaştırır (Grunstein, 1997). Histon deasetilasyonu ise aksine kromatini sıkılaştırarak transkripsiyonel baskılanmaya neden olur (Kuo ve Allis, 1998). Bu sebeple, pankreas gelişimi sırasında artan histon asetilasyonu gen ekspresyonunu artırabilir. Bu bilgidен yola çıkarak HDAC'ların baskılanması kök/öncül hücrelerin spesifik hücre tiplerine farklılaşması için ön koşul olarak düşünülebilir. Çalışmamızda VPA ile sınıf I HDAC'ların inhibisyonu sonucu asetillenmiş H3-K9 ve H4-K12 seviyelerinde belirgin bir artış gözlenirken, metillenmiş H3K9 seviyelerinin azaldığı tespit edilmiştir. Bu sonuca paralel olarak aynı gruplarda belirlediğimiz β -hücre farklılaşmasındaki artış bu hipotezi doğrular niteliktedir.

Çalışmamızda esas olarak histon asetilasyonunun PAK-MKH'lerin β -hücrelerine farklılaşmasındaki etkileri üzerine yoğunlaşmış, DNA metilasyonu ele alınmamıştır. Diğer çalışmalarda genom ölçeğinde yapılan analizlerde DNA metilasyonunun pluripotensinin önemli bileşeni olmadığı sonucuna varılmıştır. Bu çalışmalardan bir tanesine göre DNA metilasyonu olmayan farelerde embriyonik kök hücrelerin kendilerini yeniledikleri ve çoğaldıkları görülür, ancak bu hücreler farklılaşmaya girdiklerinde ölürler (Tsumura ve diğ., 2006). Ancak, genel bilgiler kısmında ayrıntılı olarak ele alındığı üzere histon metilasyonunun kök hücre karakterlerinin korunması ve farklılaşma arasındaki ilişkinin sağlanmasında oldukça önemli olduğuna dair bilgiler mevcut olduğundan, çalışmamızda metillenmiş H3-K9 seviyeleri ölçülmüştür. Farklılaşma ile paralel olarak asetillenmiş histonların seviyesinde meydana gelen artışın aksine, H3-K9 metilasyonunda belirgin bir azalma meydana gelmiştir.

Kendini yenileme kapasitesi ve farklılaşma potansiyeli kök hücrelerin ayırıcı özelliklerindedir ve bu iki hücresel olay arasındaki değişim, gen ekspresyonunda geniş kapsamlı değişiklikler gerektirmektedir. miRNA'lar kök hücrelerin özelliklerinin korunmasında ve farklılaşma süreçlerinde önemli rol oynayarak kök hücre gelişimini düzenlerler (Yi ve diğ., 2011). OCT4, Sox2, Nanog ve Klf4 gibi transkripsiyon faktörleri, stemness olarak bilinen pluripotent karakterin korunması için gereklidir. Bu pluripotensi faktörleri kök hücrenin farklılaşmamış aşamada kalmasını sağlarlar. Farklılaşmaya giden hücrelerde bu faktörler etkilerini kaybederler (Yu ve diğ., 2012).

PAK-MKH'lerin OCT4 ve Sox2'yi gen ekspresyon seviyesinde ifade ettikleri gösterilmiş olmakla birlikte (Karaoz ve diğ., 2010), PAK-MKH'lerde protein seviyesinde bu faktörlerin varlığını gösteren bir çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmamızda, PAK-MKH'lerin sitoplazmik ve nuklear fraksiyonlarında pluripotensi faktörleri olarak bilinen OCT3/4, c-myc ve Nanog proteinlerinin varlığı ve uygulanan deney şartlarında bu transkripsiyon faktörlerinin seviyelerinde meydana gelen değişiklikler araştırılmıştır. Beklenen bir sonuç olarak kontrol grubundaki farklılaşmamış PAK-MKH'lerde her üç transkripsiyon faktörünün de farklılaşan gruplara göre çok daha yüksek oranda bulunduğu ve farklılaşma ile orantılı olarak bu faktörlerin seviyelerinde belirgin bir azalmanın meydana geldiği tespit edilmiştir. OCT3/4 ve Nanog'un sitoplazmik ve nuklear protein oranlarının birbirine yakın olduğu, ancak, c-myc'in nuklear fraksiyonda daha fazla bulunduğu tespit edilmiştir. Bu bulgu PAK-MKH'lerin pluripotent karakterinin korunmasında OCT3/4 ve Nanog'un c-myc'e göre daha etkin rol oynadığını düşündürmektedir. Genel olarak bu üç pluripotensi faktörünün sitoplazmik ve nuklear fraksiyonlardaki seviyelerinde meydana gelen değişimler paralel olmakla birlikte, tek istisna olarak c-myc'in glukoz uygulanan grubun nuklear fraksiyonundaki artış dikkat çekicidir. C-myc büyüme faktörü reseptörü sinyalinde aldığı uyarıyla glikoz alımı ve glikoliz ile ilgili genlerin ekspresyonunu düzenler ve genel olarak hücre proliferasyonu ile dolayısıyla kök hücre karakterlerinin devamlılığıyla ilişkilendirilir (Vadlakonda ve diğ., 2013). Glukoz uygulanan PAK-MKH'lerdeki ROS seviyelerinin VPA uygulanan gruplardakine oranla daha düşük olması bu grupta glikolizin artmış olabileceğini ve c-myc'in bu noktada fonksiyonel olabileceğini düşündürmektedir.

Diğer taraftan c-myc, OCT4, Nanog ve Klf4 ile birlikte somatik hücrelerin yeniden programlanarak uyarılmış pluripotent kök hücreler (iPS)'e dönüşmesinde anahtar rol oynamaktadır. Söz konusu yeniden programlama DNA metilasyonunda ve histon örüntüsünde, yani kromatin yapısında bir takım epigenetik değişimleri gerektirir. C-myc temelde diğer üç faktörün bağlanamadığı bazı gen bölgelerine bağlanır ve üçüyle dengeli bir biçimde özgün DNA bölgelerindeki metilasyonu azaltır ve kromatin değişimlerine neden olur (Scheper ve Copray, 2009). Bu durum hücrenin daha ileri bir programlanma düzeyine geçişini sağlar ve hücre artık kendi programlama faktörlerini

kullanarak otomatik olarak programlamayı sürdürür; dışarıdan verilen genler ise baskılanır. Bu açıdan bakıldığında glukoz uygulanan PAK-MKH'lerin nuklear fraksiyonunda c-myc seviyesinin artmış olması gen ekspresyonunun artmasına ve dolayısıyla farklılaşmaya zemin hazırlanmasına neden olmuş olabilir. Yeniden programlama çalışmalarında fare fibroblastlarında VPA'nın c-myc yokluğunda bu pluripotensi faktörünün yerini alarak etkin bir programlama yapmaya yardımcı olduğu gösterilmiştir (Huangfu ve diğ., 2008). Bu bulgu VPA uygulanan PAK-MKH'lerin nuklear fraksiyonundaki c-myc seviyelerinin daha düşük olma sebebini açıklar niteliktedir. VPA uygulanan hücrelerde histon asetilasyonu sağlanarak kromatin açılması gerçekleşebildiğinden hücreler c-myc'ten bağımsız olarak farklılaşmaya gidebilmektedir.

Kök hücre biyolojisinde oldukça dikkat çeken ve nispeten yeni bir çalışma alanı olarak karşımıza çıkan miRNA'ların kök hücrelerin kendini yenileme, özelleşmiş hücre hatlarına farklılaşma ve somatik hücrelerin yeniden programlanması da dahil olmak üzere, hücre kaderinin belirlenmesinde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir (Choi ve diğ., 2013). Bu işlevler miRNA'lar ve transkripsiyon faktörlerini içeren belirli bir gen ekspresyon programı tarafından sıkı bir şekilde düzenlenir. Kök hücrelerin pluripotent karakterinin korunabilmesi için, belirli miRNA'lar farklılaşmayı ilerleten transkripsiyon faktörlerini baskımlarken, bazı miRNA'lar ise kendini yenilemeyi sağlayan transkripsiyon faktörlerinin uyarılmasını sağlar. Kök hücre kaderinin yönlendirilebilmesi için doğal miRNA'lar benzer bir şekilde küçük moleküller üretilip kullanılabilir. Bu anlamda doğal ve sentetik bazı küçük moleküller izole edilmiş veya sentezlenmiştir.

Çalışmamızda dört adet miRNA grubu oluşturulmuş ve uzun süreli glukoz ve/veya VPA uygulanarak β -hücrelerine farklılaşmaları sağlanan PAK-MKH örneklerinde bu miRNA'ların ekspresyon seviyelerindeki değişimler araştırılmıştır. Bu dört grup miRNA aşağıda listelenmiştir.

1-HDAC'lar ile ilişkili miRNA'lar: miR-19b (Lepore ve diğ., 2013), miR-146a (Wang ve diğ., 2013), miR-206 (Smirnova ve diğ., 2014), miR-449a (Poddar ve diğ., 2016).

2- Pluripotensi faktörleri ile ilişkili miRNA'lar: miR-134 (Zhang ve diğ., 2016), miR-181a1/2 (Judson ve diğ., 2013), miR -296 (Wang ve diğ., 2015), miR-433 (Guo ve diğ., 2014).

3- Pankreas gelişimi ve kompenzasyon ile ilişkili miRNA'lar: miR-7 (Rosero ve diğ., 2010), miR-15b, miR-16 (Joglekar ve diğ., 2007), miR-18a (Yang ve diğ., 2012), miR-30d (Tang ve diğ., 2009), miR-92b, miR-99b (Rosero ve diğ., 2010), miR-124 (Zou ve diğ., 2014), miR-142-5p (Sladitschek ve diğ., 2015), miR-184 (Nesca ve diğ., 2013), miR-187 (Rosero ve diğ., 2010), miR-195 (Joglekar ve diğ., 2007), miR-338, miR-342, miR-494, miR-503-5p, miR-3545 (miR-203b), let-7a2, let-7a2-1, let-7d, let-7f (Rosero ve diğ., 2010).

4- β -hücre fonksiyonu ile ilişkili miRNA'lar: miR-24 (Melkman-Zehavi ve diğ., 2011), miR-26a (Walker, 2014), miR-30a (Kim ve diğ., 2013), miR-124a (Joglekar ve diğ., 2007), miR-145 (Kang ve diğ., 2013), miR-148b (Melkman-Zehavi ve diğ., 2011), miR-335 (Vienberg ve diğ., 2016), miR-375'tir (Kang ve diğ., 2013).

Kısmi pankreatektomi sonrası rejenere olan pankreas dokusunda yapılan global miRNA profillemeye sonuçları miR-15a, miR-15b, miR-16 ve miR-195 olmak üzere 4 miRNA'nın ekspresyon seviyelerinin bu süreçte yükseldiğini göstermiştir. Bu dört miRNA'nın da Nrg3 mRNA'sını hedeflediği tahmin edilmektedir, buradan yola çıkılarak bu miRNA'ların Nrg3 transkripsiyon faktörünün posttranslasyonel düzenlenmesine katkıda bulunabileceği düşünülebilir (Joglekar ve diğ., 2007). Aslında, hastada Nrg3'ün geçici ifadesi adacıklar içindeki endokrin hücre alt tiplerinin farklılaşması için gerekli olan progenitör hücrelerin yönlendirilmesini sağlayacak olan transkripsiyon faktörlerinin fonksiyonuna izin verilmesi açısından çok önemlidir. "Genel Bilgiler" alt başlığında detaylı bir şekilde bahsedildiği gibi progenitör hücrelerde Nrg3'ün geçici ekspresyonu adacıkların içinde konumlanan endokrin hücre alt tiplerine farklılaşma için gereken transkripsiyon faktörlerinin işlevine izin verilmesi açısından çok önemlidir. Çalışmamızda literatürde ilk defa PAK-MKH'lere 20 gün süreyle VPA ve VPA+glukoz uygulanması sonucu miR-15b'nin gen ekspresyon seviyelerinde bir artış olduğu, ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığını tespit ettik. Bu gruplarda aynı zamanda

yüksek oranda β -hücre farklılaşması olduğunu kaydettik. Bulgularımız *in vivo* koşullarda gerçekleştirilen pankreas rejenerasyonu bulgularına paralellik göstermektedir.

En yüksek oranda β -hücre farklılaşması tespit edilen deney grubumuz olan 20 gün süreyle VPA uygulanan hücrelerde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artış gösteren 4 adet miRNA olduğu kaydedilmiştir. Bu miRNA'lar miR-18a, miR-184, miR-335 ve miR-433-5p'dir. Bu miRNA'lardan miR-18a ve miR-184 pankreas gelişimi ile; miR-335 β -hücre fonksiyonu ile; miR-433-5p ise kök hücre potansisi ile ilişkilidir.

Bazik helix-loop-helix (bHLH) transkripsiyon faktörü Ptf1a pankreatik gelişim aşamasında rol oynar. Erken pankreas gelişimi sırasında, Ptf1a düşük seviyelerde, tercihen, endokrin hücrelerine pankreatik progenitör hücrelerinin farklılaşmasını teşvik ederken, yüksek düzeyde pankreas progenitörlerin ekzokrin hücrelere yönelmesine neden olmaktadır. Yetişkinlerde ise Ptf1a pankreas asinar hücreleri tarafından ekzokrin enzimlerin üretimi için gereklidir. Pankreatik progenitörlerde ve asinar hücrelerde Ptf1a ifadesinin miR-18a tarafından Ptf1a mRNA'sının 3'UTR bölgesinden bağlanarak bastırıldığı gösterilmiştir (Yang ve diğ., 2012).

MiR-184 insülin direnci durumunda β -hücre kütlesi artışı yani kompenzasyonun düzenlenmesi için önemlidir (Tattikota ve diğ., 2014). Pankreatik adacıklarda miR-184'ün hedefi olan Ago2, mRNA'ların hedeflenmesi için gerekli olan RNA kaynaklı susturma kompleksinin bir parçasıdır. Ago2'nin kaybı miR-375'in hedeflerinin ifadesini artırarak insülin direncine yanıt olarak gelişen β -hücrelerinin kompenzatuvar artışını engeller (Tattikota ve diğ., 2013 ve 2014). İlginç bir şekilde, miR-184 insüline dirençli fare ve insanların adacıklarında baskılanmıştır, bu durum Ago2'nin artan ekspresyonu ile sonuçlanır ve kompenzatuvar β -hücre artışı baskılanır (Tattikota ve diğ., 2014). Ob/ob diyabetik farelerde miR-184'ün fazlaca ifade ettirilmesi sonucu Ago2 düzeyleri azalır ve kompenzatuvar β -hücre artışı baskılanır. Bununla birlikte, normal veya insüline dirençli durumlarında miR-184 seviyelerini düzenleyen tam mekanizma bilinmemektedir. Çalışmamızda elde edilen bulgular yukarıda bahsi geçen sonuçlar ile ters düşmektedir. Bulgularımıza göre VPA uygulanan gruplarda yüksek düzeyde β -

hücre farklılaşmasının varlığı öne çıkmaktadır ve miR-184'ün ekspresyonundaki artış hücre farklılaşması ile paraleldir. Bu farklılığa sebep olabilecek ilk akla gelen farklılık şüphesiz ki deney modellerindeki farklılıktan kaynaklanmaktadır. İnsülin dirençli adacıkların totali ile yapılan çalışmalar adacıklardaki değişik tip hücrelerin miR-184 seviyelerini gösterirken, çalışmamızda olduğu gibi tek hücre kültüründe yalnızca PAK-MKH türevli hücrelerdeki miR-184 seviyeleri gözlenebilmektedir. Farklı sonuç doğurabilecek diğer nokta epigenetik regülasyonunun değişmesine neden olan bir maddenin uygulanmış olmasıdır. Ancak, yalnızca glukoz uygulanan grupta da kayda değer bir β -hücre farklılaşmasının olduğu ve buna istatistiksel olarak anlamlı olmayan fakat belirgin bir miR-184 artışının eşlik ettiği göz ardı edilmemelidir. VPA+G uygulanan grupta belirlenen β -hücre farklılaşması düzeyi yalnızca VPA uygulanan gruptakinden düşük olmakla birlikte yalnızca glukoz uygulanan gruba göre yüksektir. Bu noktada VPA varlığında glukozun miR-184 ekspresyon seviyelerini baskılayıcı etkisinin olma olasılığı ortaya çıkmaktadır. Oysa ki yalnızca VPA uygulanan grupta miR-184 seviyelerindeki artış istatistiksel olarak anlamlılık gösterirken en yüksek β -hücre farklılaşması da bu grupta gözlenmiştir. Sonuç olarak, miR184'ün düşük seviyelerde β -hücre farklılaşmasını nispeten baskılayıcı, daha yüksek seviyelerde bu süreci ilerletmesi olasıdır.

MiR-335, β -hücre farklılaşmasından ziyade β -hücre fonksiyonu ile ilişkilidir. Bir çalışmada β -hücre fonksiyon bozukluğu olan bir tip 2 diyabet modeli olarak kullanılan Goto Kakizaki (GK) sıçanlardan adacıklar izole edilmiştir. Bu adacıklarda miR-335 ekspresyonunun arttığı ve hedeflerinin insülin ekzositozu ile ilişkili moleküllerin olan *Stxbp1*, *Syt11* ve *Snap25*'in mRNA'ları olduğu tespit edilmiştir (Esguerra ve diğ., 2011). Ayrıca, miR-335'in fazla ekspresyonu glukoz ile uyarılan insülin sekresyonunda azalmaya ve depolarizasyon ile uyarılan insülin ekzositozunun azalmasına yol açar (Salunkhe ve diğ., 2015). β -hücre farklılaşması tespit ettiğimiz VPA uygulanan gruplarda glukoz ile uyarılan insülin sekresyonuna yanıtızsızlık miR-335 ekspresyonundaki artış ile paraleldir. Literatürde var olan bulgular göz önüne alındığında PAK-MKH'lere VPA uygulanmasıyla farklılaşan β -hücrelerindeki fonksiyon kaybının artan miR-335 ifadesinden kaynaklanabileceği düşünülebilir.

Mir-433-5p ve β -hücre farklılaşması ilişkisi henüz bilinmemektedir. Guo ve arkadaşları (2014) insan plasentası kaynaklı mezenkimal kök hücreleri tek tabakalı ve üç boyulu sferoid kültür şartlarında epigenetik değişiklikler ve özellikle pluripotensi genlerini hedefleyen miRNA değişimleri açısından kıyaslayan bir çalışma yapmışlardır. Sonuç olarak üç boyutlu sferoid hücrelerin pluripotent özelliklerinin ve nöronal hücrelere farklılaşma kapasitelerinin çok daha yüksek olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca, bu değişikliklere uygun olarak, kök hücre potansisinin devamlılığında rol alan içinde miR-433'ün de yer aldığı bazı miRNA'ların sentezleme seviyelerinin yükseldiğini ve Oct4, Sox2 ve Nanog'un promotör bölgelerinde H3-K9 asetilasyon düzeylerinin de arttığını tespit etmişlerdir. Bu sonuçlardan yola çıkarak sferoid kültürün insan mezenkimal kök hücrelerinin potansisini artırdığını ve pluripotent genlerin epigenetik durumunu değiştirdiğini belirtmişlerdir. miR-433'ün potensiyi pozitif yönde etkilediği fikrini destekleyen bir başka çalışma Kim ve arkadaşları (2013) tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada C3H10T1/2 mezenkimal hücre hattında miR-433'ün östrojen reseptörü ile ilişkili reseptör gama ile baskılanmış farklılaşmaya aracılık ettiği tespit edilmiştir. İlginç olarak bizim çalışmamızda β -hücre farklılaşması tespit edilen tüm gruplarda miR-433-5p'nin ekspresyonunda artış gözlenirken, bu artış yalnızca farklılaşmanın en yüksek olduğu VPA uygulanan grupta istatistiksel olarak anlamlıdır. VPA'nın epigenetik regülasyonda çok önemli bir rol oynadığı bilinen sınıf I HDAC'ları inhibe ettiği göz önünde bulundurulduğunda miR-433-5p'nin histon asetilasyonu ile ilişkili bir mekanizma üzerinden β -hücre farklılaşmasına neden olabileceği düşünülebilir.

Yalnızca VPA uygulanan deney grubundan sonra yüksek derecede β -hücre farklılaşması tespit edilen deney grubu olan 20 gün süreyle VPA+glukoz uygulanan hücrelerde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösteren 2 adet miRNA olduğu tespit edilmiştir. Bu miRNA'lar miR-30d ve miR-19b'dir. MiR-30d pankreas gelişimi ile ilişkilendirilirken, miR-19b HDAC'lar ile ilişkilidir. Ayrıca bu grupta pankreas gelişimi ile ilişkili olduğu düşünülen miR-503 seviyelerinde anlamlı bir azalma meydana gelmiştir.

MiR-30 ailesinin üyeleri, insan fetal pankreasında yüksek oranda üretilip epitelyal-mezenkimal geçiş ile ilişkilidirler (Joglekar ve diğ., 2009; Ozcan, 2009). Bu miRNA'lar

vimentin ve Snail1 gibi mezenkimal mRNA'ları inhibe edip pankreatik mezenkimal kök hücrelerin insülin üreten hücrelere değişmesine olanak tanır (Joglekar ve diğ., 2009). Bu aileden miR-30d'nin, β -hücre transkripsiyon faktörü olan MafA'yı düzenlediği fakat Pdx-1 ve NeuroD1'e etki etmediği gösterilmiştir (Tang ve diğ., 2009; Zhao ve diğ., 2012). MiR-30d, MafA seviyesini ve insülin geninin transkripsiyonunu artırmıştır. İnsan pluripotent kök hücrelerden (hPSCs) insülin üreten β -hücrelerine farklılaşma aşamalarında da miR-30d'nin seviyesinin arttığı gösterilmiştir. Çalışmamızda, yalnızca VPA veya glukoz uygulanan gruptan farklı olarak VPA+G uygulanan hücrelerde miR-30d ekspresyonunun anlamlı olarak arttığı tespit edildi. Bu grupta β -hücre farklılaşmasının yalnızca VPA uygulanan gruba göre nispeten düşük olması bahsi geçen çalışmaların aksine miR-30d'nin PAK-MKH'lerin β -hücre farklılaşması üzerinde baskılayıcı bir etki gösterebileceğini düşündürmektedir.

miR-19b'nin sınıf I ve II HDAC inhibitörü Vorinostat uygulanan akut myeloid lösemi hücrelerinde artış gösterdiği bildirilmiştir (Lepore ve diğerleri, 2013). Ancak, bu çalışmadan başka miR-19b'nin HDAC ile ilişkisini gösteren bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ayrıca, miR-19b'nin pankreatik progenitor hücrelerde yüksek seviyede ifade edildiğini ve bu miRNA'nın NeuroD1 mRNA'sının 3' UTR bölgesini hedefleyerek bu transkripsiyon faktörünün protein ve mRNA düzeylerini azalttığını göstermişlerdir. MiR-19b'nin MIN6 hücrelerinde ins1 ekspresyonunu inhibe ederken, ins2'yi etkilemediği ve pankreas progenitor hücrelerinin proliferasyonu üzerinde çok az etkisi olduğu da gösterilmiştir. Bu sonuçlar, miR-19b'nin transkripsiyon faktörü NeuroD1'i hedefleyerek Ins1 ifadesini azaltarak β -hücre farklılaşmasını ve fonksiyonunu düzenleyebildiğini göstermektedir (Zhang ve diğ., 2011). Çalışmamızda, PAK-MKH'lere VPA ile birlikte glukoz uygulanmasının yalnızca VPA veya glukoz uygulanmasından farklı olarak β -hücre farklılaşmasına neden olduğu tespit edilmiştir. Bu grupta β -hücre farklılaşmasının yalnızca VPA uygulanan gruba göre nispeten düşük olması bahsi geçen çalışmaların sonuçlarına benzer olarak miR-19b'nin PAK-MKH'lerin β -hücre farklılaşması üzerinde baskılayıcı bir etki gösterdiğini düşündürmektedir.

MiR-503'ün hem diyabetik, hem de obez bireylerin serumunda kontrollere göre anlamlı derecede düşük olduğu tespit edilmiştir (Pescador ve diğ., 2013). Diğer taraftan, HDAC ve NF- κ B sinyalinin epitel hücrelerinde mikrobiyal uygulamaya cevaben miR-424 ve miR-503'ün baskılanması yoluyla CX3CL1 ekspresyonunun düzenlendiği bildirilmiştir (Zhou ve diğ., 2013). Çalışmamızda, miR-503 ekspresyonunda VPA+glukoz grubunda istatistiksel olarak anlamlı, yalnızca VPA uygulanan hücrelerde ise anlamlı olmayan bir düşme tespit edilmiştir. Bu grupta β -hücre farklılaşmasının yalnızca VPA uygulanan gruba göre nispeten düşük olması bahsi geçen çalışmaların sonuçlarına benzer olarak miR-503'ün PAK-MKH'lerin β -hücre farklılaşması üzerinde uyarıcı bir etkisi olabileceğini düşündürmektedir.

Son olarak, yalnızca glukoz uygulanan deney grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösteren 2 adet miRNA olduğu kaydedilmiştir. Bu miRNA'lar miR-124 ve miR-146a'dır. Bu miRNA'lardan miR-124 hücre farklılaşması ile ilişkilendirilirken, miR-146a HDAC'lar ile ilişkilidir.

MiR-124 en iyi karakterize edilmiş olan ve en bol eksprese edilen nöronal miRNA'lardan biridir (Kim ve diğ., 2004). MiR-124'ün aşırı ekspresyonu nöronal belirteçlerin ifadesinin artışı ile sonuçlanır ve buna paralel olarak nöron farklılaşmasının göstergesi olan nörit büyümesinin de morfolojik değişiklikler olarak kendini gösterdiği belirtilmiştir (Yoo ve diğ., 2011). Omurgalılarda gerçekleştirilen bazı çalışmalarda miR-124 nöronal farklılaşmanın uyarıcı ve progenitör hücrelerde meydana gelen kendini yenilemenin inhibitörü olarak belirlenmiştir (Weng ve Cohen, 2012;. Xia ve diğ., 2012). Ancak, miR-124'ün mezenkimal kök hücrelerde nörogenezi nasıl yönlendirdiği bilinmemektedir. Çalışmamızda literatürde ilk defa miR-124'ün glukoz uygulanan PAK-MKH'lerin β -hücrelerine farklılaşmasına aracılık ettiğini düşündüren bulgular elde edilmiştir.

Araştırmalar histon deasetilaz inhibitörü trikostatın A'nın makrofajlarda NF- κ B'nin DNA'ya bağlanma aktivitesini artırarak miR-146a'nın transkripsiyonel aktivasyonunu düzenlediğini göstermiştir. Bu bulgu, miR-146a'nın sınıf I ve II HDAC'ların düzenlenmesinde rol oynadığını düşündürmektedir (Jiang ve diğ., 2012). MiR-146a'nın

β -hücre farklılaşması ile olası ilişkisine dair literatürde açık bir çalışmaya rastlanmamıştır. Yapılan bir kaç çalışmada diyabetik bireylerin kanında dolaşan miR-146'nın varlığının belirlenmesi bu miRNA'nın tip 2 diyabetin tanısı için kullanılabilir bir biyobelirteç olabileceğini düşündürmüştür (Chien ve diğ., 2015). Çalışmamızda, literatürde ilk defa miR-146a'nın glukoz uygulanan PAK-MKH'lerin β -hücrelerine farklılaşmasına aracılık ettiğini düşündüren bulgular elde edilmiştir.

VPA+G ve yalnızca VPA uygulanan gruplar miRNA ekspresyon seviyeleri bakımından kıyaslandığında anlamlı bir farklılık gözlemlenmezken, VPA+G ve yalnızca G uygulanan gruplar kıyaslandığında miR-30d seviyelerinde belirgin bir artış, buna karşın miR-124 seviyelerinde anlamlı bir azalma olduğu tespit edilmiştir. İlginç olarak her iki miRNA da pankreas gelişimi ile ilişkiliyken seviyelerindeki değişiklikler birbirleriyle zıttır. VPA+G grubunda tespit edilen β -hücre farklılaşma oranı yalnızca glukoz uygulanan gruptan daha düşük olduğundan, bu sonuç VPA+G grubunda miR-30d'nin β -hücre farklılaşmasının baskılanmasına katkıda bulunurken, miR-124'ün farklılaşmayı desteklediğini düşündürmektedir.

Sonuçlar:

Çalışmamızda 20 gün süreyle 25mM glukoz, 1mM VPA ve 1mMVPA+25mM glukoz PAK-MKH'lere uygulanmış ve bu maddelerin PAK-MKH'leri β -hücrelerine farklılaştırma potansiyelleri araştırılmıştır. Sonuç olarak,

1. İnsülin⁺ hücre sayılarına göre β -hücre farklılaşma oranlarının VPA>G>VPA+G sıralamasında olduğu belirlenmiştir.
2. ROS seviyelerinin VPA>VPA+G >G sıralamasında olduğu belirlenmiştir. Bu bulgu yalnızca VPA uygulamasının en yüksek oranda β -hücre farklılaşmasına neden olduğu bulgusunu desteklemektedir.
3. B-hücre farklılaşmasında ve fonksiyonlarının devamlılığının sağlanmasında rol oynayan faktörlerin gen ekspresyon seviyelerine göre PAK-MKH'lerin β -hücrelerine farklılaşma evrelerinin VPA+G grubunda en ileri, G grubunda ise en erken kademede olduğu düşünülmektedir.

4. VPA ve/veya glukozun PAK-MKH'lere uygulanmasıyla oluşan β -hücreleri yükselen glukoz seviyelerine yanıt vermekte yetersizdir, bir başka deyişle fonksiyonel değildirler.
5. PAK-MKH'lerin pluripotensisindeki baskılanma oranlarının VPA>VPA+G >G sıralamasında olduğu OCT3/4, c-myc ve Nanog seviyelerindeki azalmanın hem sitoplazmik hem de nuklear fraksiyonda tespit edilmesi ile belirlenmiştir. Tek istisna yalnızca glukoz uygulanan PAK-MKH'lerde tespit edilen c-myc seviyesindeki yükselmedir. Glikoz uygulanan PAK-MKH'lerdeki ROS seviyelerinin VPA uygulanan gruplardakine oranla daha düşük olması bu grupta glikolizin artmış olabileceğini ve c-myc'in bu noktada fonksiyonel olabileceğini düşündürmektedir.
6. Sitoplazmik ve nuklear HDAC1 ve 3 seviyelerinin G>VPA>VPA+G sıralamasında olduğu belirlenmiştir. Bu bulgu glukozun HDAC1 ve 3 üretimini değiştirmedeğini, ancak VPA'nın bu etkiyi baskıladığını göstermektedir.
7. H3K9-Ace ve H4K12-Ace seviyelerinin VPA>VPA+G>G sıralamasında iken; H3K9-Met seviyelerinin G>VPA+G>VPA sıralamasında olduğu belirlenmiştir. Bu bulgu beklendiği üzere PAK-MKH'lere VPA uygulamasının histon asetilasyonunu artırırken, histon metilasyonunu baskılayarak kromatinin açılmasına ve farklılaşma ile ilgili genlerin anlatımına izin verilmesi yoluyla β -hücre farklılaşmasına neden olduğunu göstermektedir.
8. Yalnızca glukoz uygulanan grupta kontrol gruba kıyasla miR-124 ve miR-146a'nın ekspresyon seviyelerinde anlamlı bir artış gözlemlenmiştir.
9. Yalnızca VPA uygulanan grupta kontrol gruba kıyasla miR-18a, miR-335, miR-184 ve miR433-5p'nin ekspresyon seviyelerinde anlamlı bir artış gözlemlenmiştir.
10. VPA+G uygulanan grupta kontrol gruba kıyasla miR-30d ve miR-19b'nin ekspresyon seviyelerinde anlamlı bir artış gözlemlenirken, miR-503'ün ekspresyon seviyelerinde anlamlı bir azalma olduğu tespit edilmiştir. VPA+G ve yalnızca VPA uygulanan gruplar miRNA ekspresyon seviyeleri bakımından kıyaslandığında anlamlı bir farklılık gözlemlenmezken, VPA+G ve yalnızca G

uygulanan gruplar kıyaslandığında miR-30d seviyelerinde belirgin bir artış, buna karşın miR-124 seviyelerinde anlamlı bir azalma olduğu tespit edilmiştir.

11. Bu çalışmada, PAK-MKH'lerin β -hücrelerine farklılaşmasını kontrol eden epigenetik mekanizmaların aydınlatılmasına önemli katkılar sağlanmıştır. Sınıf I HDAC'ların PAK-MKH'lerin β -hücrelerine farklılaşmasını düzenleyen önemli faktörler olduğu tespit edilmiştir. Bu bulgular VPA ve diğer Sınıf I HDAC inhibitörlerinin pankreatik β -hücre havuzunun artırılmasında ve pankreatik plastisitenin değiştirilmesinde kullanılabilir potansiyel ajanlar olabileceğini açıkça göstermektedir. Dolayısıyla çalışmamız, β -hücre farklılaşmasının kontrolü açısından yeni bir bakış açısı oluşturarak diyabet hastalığının teröpatik ve hücresele tedavisi için kullanılabilir yeni küçük moleküllerin keşfine zemin oluşturabilir niteliktedir.
12. Özellikle VPA+glukozun literatürde ilk defa çalışmamızda tespit edilen doz ve sürelerde MKH'lere uygulanması ile erişkin β -hücreleri elde edilip diyabetik bireylere transplante edilerek bu hastalığın hücresele tedavisinde kullanılabilir. Bu noktada, çalışmamızda yeni bir β -hücre farklılaştırma protokolü önerilmiştir.
13. Uzun süre VPA kullanımının küçük yaşta epilepsi hastalarında insülin direnci ve tip 2 diyabet gelişimine neden olduğu bilinmektedir. İnsülin direncinin doğrudan β -hücre kompenzasyonu, bir başka deyişle β -hücre kitlesinin artışı, ile ilgili olduğu tespit edilmiştir. Çalışmamızda bahsi geçen *in vivo* şartların *in vitro* taklit edilmesi yoluyla VPA ile uyarılmış β -hücre kompenzasyonunun moleküler mekanizmaları literatürde ilk kez araştırılmıştır. VPA ile uyarılan kompenzasyonun bu mekanizmada yer alan miRNA'lar gibi anahtar moleküllerin hedeflenmesi yoluyla baskılanarak bu ilacın önemli bir yan etkisi olan tip 2 diyabet gelişiminin engellenmesi mümkün olabilir.

KAYNAKLAR

- Afelik, S., Chen, Y., Pieler, T., 2006, Combined ectopic expression of Pdx1 and Ptf1a/p48 results in the stable conversion of posterior endoderm into endocrine and exocrine pancreatic tissue, *Genes Dev.*, 20, 1441.
- Ahlgren, U., Jonsson, J., Edlund, H., 1996, The morphogenesis of the pancreatic mesenchyme is uncoupled from that of the pancreatic epithelium in IPF1/PDX1-deficient mice, *Development*, 122, 1409.
- Ahnfelt-Ronne, J., Jorgensen, M.C., Klinck, R., Jensen, J.N., Fuchtbauer E.M., 2012. Ptf1a-mediated control of Dll1 reveals an alternative to the lateral inhibition mechanism, *Development* 139, 339.
- Almutawaa, W., Kang, N.H., Pan, Y., Niles, N.P., 2014, Induction of Neurotrophic and Differentiation Factors in Neural Stem Cells by Valproic Acid, *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 115, 216–221.
- Apelqvist, A., Li, H., Sommer, L., Beatus, P., Anderson, D.J., 1999, Notch signalling controls pancreatic celldifferentiation, *Nature*, 400, 877.
- Assady, S., Maor, G., Amit, M., Itskovitz-Eldor, J., Skorecki, K.L., Tzukerman, M., 2001, Insulin production by human embryonic stem cells, *Diabetes*, 50, 1691-1697.
- Baroukh, N., Ravier, M.A., Loder, M.K., 2007, MicroRNA-124a regulates Foxa2 expression and intracellular signaling in pancreatic β -cell lines. *J Biol Chem.*, 282(27), 19575–19588.
- Berezikov, E., Chung, W.J., Lai, E.C., 2007, Mammalian mirtron genes, *Moll Cell*, 28, 328-336
- Bernstein, B.E., Mikkelsen, T.S., Xie, X., Kamal, M., Huebert, D.J., 2006, A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells, *Cell*, 125, 315-326.
- Bernstein, E., Kim, S.Y., Elledge, S.J., Hannon, G.J., 2003, Dicer is essential for mouse development, *Nat Genet*, 35, 215-7.
- Beucher, A., Martin, M., Spenle, C., Poulet, M., Collin, C., Gradwohl, G., 2012. Competence of failed endocrine progenitors to give rise to acinar but not ductal cells is restricted to early pancreas development, *Dev. Biol.* 361, 2771.
- Bhushan, A., Itoh, N., Kato, S., Thiery, J.P., Czernichow, P., 2001, *Fgf10* is essential for maintaining the proliferative capacity of epithelial progenitor cells during early pancreatic organogenesis, *Development*, 128, 5109.

- Blaszczyk, J., Tropca, J.E., Waugh, D.S., Ji, X., 2001, Crystallographic and modeling studies of RNase III suggest a mechanism for double-stranded RNA cleavage, *Structure*, 9, 1225-1236.
- Blum, B., Hrvatin, S., Schuetz, C., Bonal, C., Rezaia, A., Melton, D.A., 2012, Functional beta-cell maturation is marked by an increased glucose threshold and by expression of urocortin 3, *Nat. Biotechnol.* 30, 261-264.
- Bonner-Weir, S., Orci, L., 1982, New perspectives on the microvasculature of the islets of Langerhans in the rat, *Diabetes*, 31, 883-889.
- Bonner-Weir, S., Taneja, M., Weir, G.C., Tatarkiewicz, K., Song, K.H., Sharma, A., O'Neil, J.J., 2000, In vitro cultivation of human islets from expanded ductal tissue, *Proc Natl Acad Sci USA*, 97, 7999–8004.
- Bonner-Weir, S., Sharma, A., 2002, Pancreatic stem cells, *J Pathol*, 197, 519-526.
- Bouwens, L., Kloppel, G., 1996, Islet cell neogenesis in the pancreas, *Virchows Arch.* 427, 553–560.
- Bravo-Egana, V., Rosero, S., Klein, D., 2012, Inflammation-mediated regulation of MicroRNA expression in transplanted pancreatic islets. *J Transplant.*, 723614.
- Bravo-Egana, V., Rosero, S., Molano, R.D., 2008, Quantitative differential expression analysis reveals miR-7 as major islet microRNA, *Biochem Biophys Res Commun.* 366(4), 922–926.
- Burlison, J.S., Long, Q., Fujitani, Y., Wright, C.V., Magnuson, M.A., 2008, Pdx-1 and Ptf1a concurrently determine fate specification of pancreatic multipotent progenitor cells, *Dev. Biol.*, 316, 746.
- Cai, X., Hagedorn, C.H., Cullen, B.R., 2004, Human micro-RNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs, *Rna*, 10, 1957-66
- Can, A., 2014 Kök Hücre Biyolojisi, Türleri ve Tedavide Kullanımları, *Akademisyen Tıp Kitapevi*, 145-173.
- Carey, N., 2011, Epigenetic revolutions: How modern biology is rewriting our understanding of genetics, disease and inheritance, *Icon Books*.
- Cedar, H., Bergman, Y., 2009, Genetic Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. *Nat Rev Gen*, 10(5), 295-304.
- Chen, Y., Pan, F.C., Brandes, N., Afelik, S., Sholter, M., Pieler, T., 2004, Retinoic acid signaling is essential for pancreas development and promotes endocrine at the expense of exocrine cell differentiation in *Xenopus*, *Dev. Biol*, 271, 144.

- Chendrimada, T.P., Gregory, R.I., Shiekhattar, R., 2005, TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing, *Nature*, 436, 740-4.
- Cheng, X., Ying, L., Lu, L., Galvão, A. M., Mills, J. A., Lin, H.C., Kotton, D.N., Shen S.S., Nostro, M.C., Choi, J.K., 2012, Self-renewing endodermal progenitor lines generated from human pluripotent stem cells, *Cell Stem Cell*, 10, 371-384.
- Chien, H.Y., Lee, T.P., Chen, C.Y., Chiu, Y.H., Lin, Y.C., Lee, L.S., Li, W.C., 2015, Circulating microRNA as a diagnostic marker in populations with type 2 diabetes mellitus and diabetic complications, *J Chin Med Assoc*, 2015, 78, 204-211.
- Choi, E., Hwang, K.C., 2013, MicroRNAs as novel regulators of stem cell fate. *World J Stem Cells Oct*, 26;5(4), 172-87.
- Claveria, C., Giovinazzo, G., Sierra, R., Torres, M., 2013, Myc-driven endogenous cell competition in the early mammalian embryo, *Nature*, 500, 39-44.
- Collombat, P., Hecksher-Sorensen, J., Broccoli, V., Krull, J., Ponte, I., 2005, The simultaneous loss of *Arx* and *Pax4* genes promotes a somatostatin-producing cell fate specification at the expense of the microRNA as a lineages in the mouse endocrine pancreas, *Development*, 132, 2969.
- Collombat, P.J., Hecksher-Sorensen, P., 2006, Specifying pancreatic endocrine cell fates, *Mech. Dev.* 123, 501–512.
- Collombat, P., Mansouri, A., Hecksher-Sorensen, J., Serup, P., Krull, J., Gradwohi, G., Gruss, P., 2003, Opposing actions of *Arx* and *Pax4* in endocrine pancreas development, *Genes Dev*, 17, 2591-603.
- Correa-Medina, M., Bravo-Egana, V., Rosero, S., 2009, MicroRNA miR-7 is preferentially expressed in endocrine cells of the developing and adult human pancreas, *Gene Expr Patterns*, 9(4), 193–199.
- Cotterman, R., Lemen., J.M., Knoefler, P.S., 2008, N-Myc regulates a widespread euchromatic program in the human genome partially independent of its role as a classical transcription factor, *Cancer*, 68(23), 9654-62.
- D'Amour K, A., Bang, A.G., Eliazzer, S., Kelly, O.G., Agulnick, A.D., Smart, N.G., Moorman, M.A., Kroon, E., Carpenter, M.K., Baetge, E.E., 2006, Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells, *Nat. Biotechnol*, 24, 1392-1401.
- Daschkey, S., Rottgers, S., Landgraf, P., 2013, MicroRNAs distinguish cytogenetic subgroups in pediatric AML and contribute to complex regulatory networks in AML-relevant pathways, *Plos One*. 8, 563-574.

- Davie, J.R., 2003, Inhibition of histone deacetylase activity by butyrate, *J. Nutr.* 133, 2485-2493.
- Davis, T.H., Cuellar, T.L., Ulian, E.M., 2008, Conditional loss of Dicer disrupts cellular and tissue morphogenesis in the cortex and hippocampus, *J Neurosci*, 28, 4322-30.
- Deering, T.G., Ogihara, T., Trace, A.P., 2009, Methyltransferase Set7/9 maintains transcription and euchromatin structure at islet-enriched genes, *Diabetes*, 58, 185-93.
- Deltour, L., Leduque, P., Paldi, A., Ripoche, M., Dubois, P., Jami, J., 1991, Polyclonal origin of pancreatic islets in aggregation mouse chimeras, *Development*, 112, 1115-1121.
- de Ruijter, A.J., van Gennip, A.H., Caron, H.N., Kemp, S., van Kuilenburg, A.B., 2003, Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family, *The Biochemical Journal*, 370, 737-49.
- Dichmann, D.S., Miller, C.P., Jensen, J., Heller, R.S., Serup, P., 2003, Expression and misexpression of members of the FGF and TGF β families of growth factors in the developing mouse pancreas, *Dev. Dyn.*, 226, 663.
- Docherty, K., Bernardo, A.S., Valler, L., 2007, Embryonic stem cell therapy for diabetes mellitus, *Semin. Cell Dev. Biol.*, 18, 827-838
- Erener, S., Mojibian, M., Fox, J.K., 2013, Circulating miR-375 as a biomarker of β -cell death and diabetes in mice, *Endocrinology*, 154, 603-8
- Esguerra, J.L., Bolmeson, C., Cilio, C.M. & Eliasson, L., 2011, Differential glucose-regulation of microRNAs in pancreatic islets of non-obese type 2 diabetes model Goto-Kakizaki rat, *PLoS ONE* 6, e18613.
- Eulalio, A., Huntzinger, E., Izaurralde, E., 2008, Getting to the root of miRNA-mediated gene silencing, *Cell*, 132, 9-14
- Eun-Jung, Kim., In-Hong, Kang., Jeong, Woong, Lee., Won-Gu, Jang., Jeong-Tae, Koh., 2013, MiR-433 mediates ERR-suppressed osteoblast differentiation via direct targeting to Runx2 mRNA in C3H10T1/2 cells, *Life Sci*, 92, 562-568.
- Evans-Molina, C., Robbins, R.D., Kono, T., 2009, Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation restores islet function in diabetic mice throughout reduction of endoplasmic reticulum stress and maintenance of euchromatin structure, *Mol Cell Biol*, 29, 2053-67.
- Field, H.A., Dong, P.D., Beis, D., Stainier, D.Y., 2003, Formation of the digestive system in zebrafish. II. Pancreas morphogenesis, *Dev. Biol.*, 261, 197.

- Fisher, C.L., Fisher, A.G., 2011, Chromatin states in pluripotent, differentiated, and reprogrammed cells, *Curr Opin Genet Dev*, 21, 140-146.
- Frankel, L.B., Christoffersen, N.R., Jacobsen, A., Lindow, M., Krogh, A., Lund, A.H., 2008, Programmed cell death 4 (PDCD4) is an important functional target of the microRNA miR-21 in breast cancer cells, *J Biol Chem.*, 283(2), 1026–1033.
- Fujikura, J., Hosoda, K., Iwakura, H., Tomita, T., Noguchi, M., 2006, Notch/Rbp-j signaling prevents premature endocrine and ductal cell differentiation in the pancreas, *Cell Metab.*, 3, 591l.
- Gezginci-Oktayoğlu, S., Karatuğ, A., Bolkent, Ş., Ras Signaling In Ngf Reduction and Tnf- α -Related Pancreatic β Cell Apoptosis In Hyperglycemic Rats, *APOPTOSIS*, 17, 14-24.
- Gosmain, Y., Katz, L.S., Masson, M.H., Cheyssac, C., Poisson, C., Philippe, J., 2012, Pax6 is crucial for β -cell function, insulin biosynthesis, and glucose-induced insulin secretion, *Mol Endocrinol.*, 26(4):696-709.
- Gradwohl, G., A. Dierich, M. LeMeur, F, Guillemot., 2000, neurogenin3 is required for the development of the four endocrine cell lineages of the pancreas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 1607–1611.
- Greenwood, A.L., Li, S., Jones, K., Melton, D.A., 2007, Notch signaling reveals developmental plasticity of *Pax4*⁺ pancreatic endocrine progenitors and shunts them to a duct fate, *Mech. Dev.*, 124, 974.
- Gregory, R.I., Chendrimada, T.P., Shiekhattar, R., 2005, Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing, *Cell*, 123, 631-640.
- Grunstein, M., 1997, Histone acetylation in chromatin structure and transcription, *Nature*, 389, 349-352.
- Gu, G., Dubauskaite, J., Melton, D.A., 2002, Direct evidence for the pancreatic lineage:NGN3₊ cells are islet progenitors and are distinct from duct progenitors, *Development*, 129(10), 2447–2457.
- Guo, L., Zhou, Y., Wang, S., Wu, Y., 2014, Epigenetic changes of mesenchymal stem cells in three-dimensional (3D) spheroids, *J Cell Mol Med*, 18(10), 2009-19.
- Guz, Y., Nasir, I., Teitelman, G., 2001, Regeneration of pancreatic beta cells from intra-islet precursor cells in an experimental model of diabetes, *Endocrinology*, 142, 4956–4968.
- Hale, M.A., Kagami, H., Shi, L., Holland, A.M., Elsasser, H.P., 2005, The homeodomain protein PDX1 is required at mid-pancreatic development for the formation of the exocrine pancreas, *Dev. Biol.*, 286, 225.

- Haumaitre, C., Lenoir, O., Scharfman, R.T., 2008, Histone Deacetylase Inhibitors Modify Pancreatic Cell Fate Determination and Amplify Endocrine Progenitors, *Molecular and Cellular Biology*, 2008, 28373-6383.
- Henry, T.R., 2003, The history of valproate in clinical neuroscience, *Psychopharmacol Bull*, 37, 5–16.
- Hick, A.C., van Eyll, J.M., Cordi, S., Forez, C., Passante, L., 2009, Mechanism of primitive duct formation in the pancreas and submandibular glands: a role for SDF-1, *BMC Dev. Biol.*, 9, 66.
- Holmstrom, S.R., Deering, T., Swift, G.H., Poelwijk, F.J., Mangelsdorf, D.J., 2011, LRH-1 and PTF1-L coregulate an exocrine pancreas-specific transcriptional network for digestive function, *Genes Dev.*, 25, 1674.
- Horn, S., Kobberup, S., Jorgensen, M.C., Kalisz, M., Klein, T., 2012, *Mind bomb 1* is required for pancreatic β -cell formation, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 109, 7356.
- Hsley, J., Nakashima, K., Kuwabara, T., Mejla, E., Gage, F.H., 2004, Histone deacetylase inhibition-mediated neuronal differentiation of multipotent adult neural progenitor cells, *PNAS*, 101:16659-16664
- Hu, E., Dul, E., Hoffman, G., Jaye, M., 2003, Identification of novel isoform-selective inhibitors within class I histone deacetylases, *J. Pharmacological. Exp. Ther.*, 307, 720-28
- Huangfu, D., Maehr, R., Guo, D., 2008, Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small- molecule compounds, *Nature Biotechnology*, 26, 795–797.
- Hutvagner, G., Simard M.J., 2008, Argonaute proteins: key players in RNA silencing *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9, 22-32.
- Ito, K., Barnes, P., Adcock, I.M., 2000, Glucocorticoid receptor recruitment of histone deacetylase 2 inhibits interleukin -1 β -induced histone H4 acetylation on lysine 8 and 12, *Moll. Cell Bio.*, 20, 6891-6903
- Rukstalis, J.S., Habener, J.F., 2009, Neurogenin3: a master regulator of pancreatic islet differentiation and regeneration, *Islets*, 177–184, 2009.
- Jacquemin, P., Lemaigre, F.P., Rousseau, G.G., 2003, The Onecut transcription factor HNF-6 (OC-1) is required for timely specification of the pancreas and acts upstream of Pdx-1 in the specification cascade, *Dev. Biol.*, 258, 105.
- Jeon, S.J., Kim, W.J., Kim, K.C., Han, M.S., Go, S.H., Seo, J.E., Choi, C.S., Ryu, J.H., Shin, Y.C, Song, M.R., 2013, Translational Regulation of NeuroD1 Expression by FMRP: Involvement in Glutamatergic Neuronal Differentiation of Cultured Rat Primary Neural Progenitor Cells, *Cell Mol Neurobiol.*, 34, 297-305.

- Jiang, M., Xiang, Y., Wang, D., Gao, J., Liu, D., Liu, Y., 2012, Dysregulated expression of miR-146a contributes to age-related dysfunction of macrophages, *Aging Cell*, 11, 129-40.
- Joffe, B., Leonhardt, H., Solovei, I., 2010, Differentiation and large scale spatial organization of the genome, *Curr Opin Genet Dev.*, 20: 562-569.
- Joglekar, M.V., Parekh, V.S., Mehta, S., Bhonde, R.R., Hardikar, A.A., 2009, MicroRNA profiling of developing and regenerating pancreas reveal post-transcriptional regulation of neurogenin3, *Dev Biol.*, 311(2), 603-12.
- Jonckheere, N., Mayes, E., Shih, H.P., Li, B., Lioubinski, O., 2008, Analysis of *mPygo2* mutant mice suggests a requirement for mesenchymal Wnt signaling in pancreatic growth and differentiation, *Dev. Biol.*, 318, 224-242
- Jorgensen, M.C., Ahnfelt-Ronne, J., Hald, J., Madsen, O.D., Serup, P., Hecksher-Sorensen, J., 2007, An illustrated review of early pancreas development in the mouse., *Endocr Rev.*, 28, 685-705.
- Judson, R.L., Greve, T.S., Parchem, R.J., Blesch, R., 2013, MicroRNA-based discovery of barriers to dedifferentiation of fibroblasts to pluripotent stem cells, *Nat Struct Mol Biol.*, 20(10), 1227-35.
- Kageyama, R., Ohtsuka, T., Kobayashi, T., 2007, The Hes gene family: repressors and oscillators that orchestrate embryogenesis, *Development*, 134, 1243.
- Kahn, S., 1996, Regulation of B-cell function in vivo, *Diabetes Rev.*, 4, 372-387.
- Kang, H.S., Kim, Y.S., ZeRuth, G., Beak, J.Y., Gerrish, K., 2009, Transcription factor Glis3, a novel critical player in the regulation of pancreatic islet development and insulin gene expression, *Mol. Cell. Biol.*, 29, 6366.
- Kang, M.H., Zhang, L.H., Wijesekara, N., 2013, Regulation of ABCA1 protein expression and function in hepatic and pancreatic islet cells by miR-145, *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 33(12), 2724-2732.
- Kanji, M.S., Martin, M.G., Bhushan A., 2013, Dicer1 is required to repress neuronal fate during endocrine cell maturation, *Diabetes*, 62, 1602-11.
- Karaoz, E., Ayhan, S., Gacar, G., Aksoy, A., Duruksu, G., Okçu, A., Demircan, P.C., Sariboyaci, A., Kaymaz, F., Kasap, M., 2010, Isolation and characterization of stem cells from pancreatic islet: pluripotency, differentiation potential and ultrastructural characteristics, *Cytotherapy*, 12, 288-302.
- Kazantsev, A.G., Thompson, L.M., 2008, Therapeutic application of histone deacetylase inhibitors for central nervous system disorders, *Nature Reviews Drug Discovery*, 7, 854-868.

- Keats, E., Khan, Z.A., 2012, Unique responses of stem cell-derived vascular endothelial and mesenchymal cells to high levels of glucose, *PLoS One.*, 2012;7(6):e38752.
- Khan, S., Jena, G., 2016, Valproic acid Improves Glucose Homeostasis by Increasing Beta-Cell Proliferation, Function, and Reducing its Apoptosis through HDAC Inhibition in Juvenile Diabetic Rat, *J Biochem Mol Toxicol.* 80, 1204-11.
- Kim, J., Krichevsky, A., Grad, Y., Hayes, G.D., Kosik, K.S., Church, G.M., Ruvkun, G., 2004, Identification of many microRNAs that copurify with polyribosomes in mammalian neurons, *Proc Natl Acad Sci USA*, 101, 360-365.
- Klinck, R., Fuchtbauer, E.M., Ahnfelt-Ronne, J., Serup, P., Jensen, J.N., Jorgensen, M.C., 2011, ABAC transgenic Hes1-EGFP reporter reveals novel expression domains in mouse embryos, *Gene Expr. Patterns*, 11, 415.
- Kloosterman, W.P., Lagendijk, A.K., Ketting, R.F., Moulton, J.D., Plasterk, R.H., 2007, Targeted inhibition of miRNA maturation with morpholinos reveals a role for miR-375 in pancreatic islet development, *PLoS Biol.*, 5(8), e203.
- Kopp, J.L., Dubois, C.L., Schaffer, A.E, Hao, E., Shih, H.P., 2011, Sox9+ ductal cells are multipotent progenitors throughout development but do not produce new endocrine cells in the normal or injured adult pancreas, *Development* 138, 653.
- Kopp, J.L., von Figura, G., Mayes, E., Liu, F.F., Dubois, C.L., 2012, Identification of Sox9-dependent acinar-to-ductal reprogramming as the principal mechanism for initiation of pancreatic ductal adenocarcinoma, *Cancer Cell*, 22, 737.
- Kredo-Russo, S., Mandelbaum, A.D., Lennox, K.A., Behlke, M.A., 2012, Pancreas enriched miRNA refines endocrine cell differentiation, *Development*, 139(16), 3021–3031.
- Kubicek, S., Gilbert, J.C., Fomina-Yadlin, D., Gitlin, A.D., Yuan, Y., 2012, Chromatin-targeting small molecules cause class-specific transcriptional changes in pancreatic endocrine cells, *Proc Natl Acad Sci USA*, 109, 5364–5369.
- Kuo, M.H., and Allis, C.D., 1998, Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation, *Bioessays*, 20, 615-626.
- Lammert, E., Cleaver, O., Melton, D., 2001, Induction of pancreatic differentiation by signals from blood vessels, *Science*, 294, 564.
- Latreille, M., Hausser, J., Stutzer, I., 2014, MicroRNA-7a regulates pancreatic β -cell function, *J Clin Invest.* 124(6), 2722–2735.
- Lee, H.W., Sulh, J.H., Kim, J.B., 2006, Histone deacetylase 1-mediated histone modification regulates osteoblast differentiation, *Mol. Endocrinol.*, 20, 2432-2443

- Lee, J.C., Smith, S.B., Watada, H., Lin, J., Scheel, D., 2001, Regulation of the pancreatic pro-endocrine gene, *Neurogenin3*. *Diabetes*, 50, 928.
- Lee, Y., Kim, M., Han, J., Back, S.H., Kim, V.N., 2004, MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II, *Embo J*, 23, 4051-60
- Lenoir, O., Flosseau, K., Ma, F.X., Blondeau, B., Mai, A., 2011, Specific control of pancreatic endocrine β - and δ -cell mass by class IIa histone deacetylases HDAC4, HDAC5, and HDAC9, *Diabetes*, 60, 2861–2871.
- Lepore, I., Dell'Aversana, C., Pilyugin, M., Conte, M., Nebbioso, A., De Bellis, F., Tambaro, F.P., Izzo, T., Garcia-Manero, G., Ferrara, F., Irminger-Finger, I., Altucci, L., 2013, HDAC inhibitors repress BARD1 isoform expression in acute myeloid leukemia cells via activation of miR-19a and/or b, *PLoS One.*, 8(12), e83018.
- Liu, J., Valencia-Sanchez, M.A., Parker, R., 2005, MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies, *Nat Cell Biol*, 7, 719-723.
- Looijenga, L.H., Stoop, H., de Leeuw, H.P., de Gouveia Brazao, C.A., Gillis, A.J., van Roozendaal, K.E., van Zoelen, E.J., Weber, R.F., Wolffenbuttel, K.P., van Dekken, H., Honecker, F., Bokemeyer, C., Perlman, E.J., Schneider, D.T., Kononen, J., Sauter, G., Oosterhuis, J.W., 2003, POU5F1 (OCT3/4) identifies cells with pluripotent potential in human germ cell tumors, *Cancer Research*, 63(9), 2244-50.
- Luef, G., Abraham, I., Hoppichler, F., Trink, E., Unterberger, I., Bauer, G., Lechleithner, M., 2002, Increase in Postprandial Serum Insulin Levels in Epileptic Patients With Valproic Acid Therapy, *Metabolism*, 51, 1274-1278.
- Maestro, M.A., Boj, S.F., Luco, R.F., Pierreux, C.E., Cabedo, J., 2003, *Hnf6* and *Tcf2* (MODY5) are linked in a gene network operating in a precursor cell domain of the embryonic pancreas, *Hum. Mol. Genet.*, 12, 3307.
- Magenheim, J., Ilovich, O., Lazarus, A., Klochendler, A., Ziv, O., 2011, Blood vessels restrain pancreas branching, differentiation and growth, *Development*, 138, 4743.
- Maniatakis, E., Mourelatos, Z., 2005, A human, ATP-independent, RISC-assembly machine fueled by pre-miRNA, *Genes Dev*, 19, 2979-90.
- Mariadason, J., Corner, G.A., Augenlicht, L.H., 2000, Genetic reprogramming in pathways of colonic cell maturation induced by short chain fatty acids: comparison with TSA, sulindac, and curcumin and implications for chemoprevention of colon cancer, *Cancer Res.*, 60, 4561- 4572.
- Marks, P.A., Richon, V. M., Kelly, W. K., 2004, Histone deacetylase inhibitors. *Adv. Cancer Res.*, 91, 137–168.

- Martin, M., Gallego-Llamas, J., Ribes, V., Kedinger, M., Niederreither, K., 2005, Dorsal pancreas agenesis in retinoic acid-deficient *Raldh2* mutant mice, *Dev. Biol.*, 284, 399.
- Martin, M., Kettmann, R., Dequiedt, F., 2007, Class IIa histone deacetylases: regulating the regulators, *Oncogene*, 26, 5450–5467.
- Mathis, D., Vence, L., Benoist, C., 2001, B-cell death during progression to diabetes. *Nature*, 414, 792–798.
- McMillen, I.C., Robinson, J., 2005, Developmental origins of the metabolic syndrome: prediction, plasticity and programming, *Physiology Rev.*, 85, 571-633.
- Melkman-Zehavi, T., Oren, R., Kredon-Russo, S., Shapira, T., Mandelbaum, A.D., Rivkin, N., Nir, T., Lennox, K.A., Behlke, M.A., Dor, Y., Hornstein, E., 2011, miRNAs control insulin content in pancreatic β -cells via downregulation of transcriptional repressors, *EMBO J.*, 30(5), 835-45.
- Millman, J.R., Xie, C., Van Dervort, A., Gürtler, M., Pagliuca, F.W., Melton, D.A., 2016, Generation of stem cell-derived β -cells from patients with type 1 diabetes, *Nat Commun.*, 7, 11463.
- Min-Hao, Kuo., Allis, D.C., 1998, Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation, *BioEssays*, 20, 615-626
- Minucci, S., 2006, Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. *Nat. Rev. Cancer.*, 6, 38–51.
- Miranda, K.C., Huynh, T., Tay, Y., 2006, A pattern-based method for the identification of MicroRNA binding sites and their corresponding heteroduplexes, *Cell*, 126(6), 1203–1217.
- Molotkov, A., Molotkova, N., Duester, G., 2005, Retinoic acid generated by *Raldh2* in mesoderm is required for mouse dorsal endodermal pancreas development, *Dev. Dyn.*, 232, 950.
- Nakhai, H., Siveke, J.T., Mendoza-Torres, L., Schmid, R.M., 2008, Conditional inactivation of *Myc* impairs development of the exocrine pancreas, *Development*, 135, 31911.
- Nesca, V., Guay, C., Jacovetti, C., Menoud, V., Peyot, M.L., Laybutt, D.R., Prentki, M., Regazzi, R., 2013, Identification of particular groups of microRNAs that positively or negatively impact on beta cell function in obese models of type 2 diabetes, *Diabetologia.*, 56(10), 2203-12.
- Ochocki, J.D., Simon, M.C., 2013, Nutrient-sensing pathways and metabolic regulation in stem cells, *J Cell Biol*, 203, 23-33.

- Offield, M.F., Jetton, T.L., Labosky, P.A., Ray, M., Stein, R.W., Magnuson, M.A., Hogan, B.L., Wright, C.V., 1996, PDX-1 is required for pancreatic outgrowth and differentiation of the rostral duodenum, *Development*, 122, 983-995.
- Ozcan, S., 2009, MiR 30 family and EMT in human fetal pancreatic islets, *Islets*, 1(3), 283-285.
- Pagliuca, F.W., Melton, D.A., 2013, How to make a functional β -cell, *Development*, 140(12), 2472-83.
- Pagliuca, F.W., Millman, J.R., Gürtler, M., Segel, M., Van Dervort, A., Ryu, J. H., Peterson, Q.P., Greiner, D., Melton, D.A., 2014, Generation of functional human pancreatic β -cells in vitro, *Cell*, 159, 428-439.
- Pan, F.C., Bankaitis, E.D., Boyer, D., Xu, X., van de Casteele, M., 2013, Spatiotemporal patterns of multipotentiality in *Ptf1a*-expressing cells during pancreas organogenesis and injury-induced facultative restoration, *Development* 140, 751.
- Pan, F.C., Wright, C., 2011, Pancreas organogenesis: from bud to plexus to gland., *Dev. Dyn.*, 240, 530.
- Paris, M., Turrel-Cuzin, C., Plachot, C., Ktorza, A., 2004, Review: Pancreatic beta-cell nogenesis revisited, *Exp. Diabesity*, 5, 111-121.
- Park, J.H., Stoffers, D.A., Nicholls, R.D., 2008, Development type2 diabetes following intrauterine growth reterdation in rats is associated with progressive epigenetic silencing of Pdx1, *J Clin Invest*, 118, 2316-24..
- Pellegrini, S., Ungaro, F., Mercalli, A., Melzi, R., Sebastiani, G., Dotta, F., Broccoli, V., Piemonti, L., Sordi, V., 2015, Human induced pluripotent stem cells differentiate into insulin-producing cells able to engraft in vivo, *Acta Diabetol.*, 52(6), 1025-35.
- Pictet, R.L., Clark, W.R., Williams, R.H., Rutter, W.J., 1972, An ultrastructural analysis of the developing embryonic pancreas, *Dev. Biol.*, 29, 436.
- Pin, C.L., Rukstalis, J.M., Johnson, C., Konieczny, S.F., 2001, The bHLH transcription factor Mist1 is required to maintain exocrine pancreas cell organization and acinar cell identity, *J. Cell Biol.*, 155, 519.
- Poddar, S., Kesharwani, D., Datta, M., 2016, Histone deacetylase inhibition regulates miR-449a levels in skeletal muscle cells, *Epigenetics*, 16, 134-139
- Poy, M.N., Eliasson, L., Krutzfeldt, J., 2004, A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion, *Nature*, 432(7014), 226-230.

- Poy, M.N., Hausser, J., Trajkovski, M., 2009, miR-375 maintains normal pancreatic α - and β -cell mass, *Proc Natl Acad Sci USA*, 106(14), 5813–5818.
- Prevot, P-P., Augereau, C., Simion, A., 2013, Let-7b and miR-495, stimulate differentiation and prevent metaplasia of pancreatic acinar cells by repressing HNF6, *Gastroenterology*, 586, 422-7.
- Qu, X., Afelik, S., Jensen, J.N., Bukys, M.A., Kobberup, S., 2013, Notch-mediated post-translational control of Ngn3 protein stability regulates pancreatic patterning and cell fate commitment, *Dev. Biol.*, 376, 154-159.
- Rachel, E. J., Andrew A.B., James, P.S., David, T.G., Neil, A.H., 2015, Human pancreas development, *Development*, 142, 3126-3137.
- Ramiya, V.K., Maraist, M., Arfors, K.E., Schatz, D.A., Peck, A.B., Cornelius, J.G., 2000, Reversal of insulin-dependent diabetes using islets generated in vitro from pancreatic stem cells, *Nat Med.*, 6(3), 278-82.
- Rezania, A., Bruin, J.E., Arora, P., Rubin, A., Batushansky, I., Asadi, A., O'Dwyer, S., Quiskamp, N., Mojibian, M., Albrecht, T., 2014, Reversal of diabetes with insulin-producing cells derived in vitro from human pluripotent stem cells, *Nat. Biotechnol.*, 32, 1121-1133.
- Rice, J.C., Briggs, S.D., Ueberheide, B., Barber, C.M., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Shinkai, Y., Allis, C.D., 2003, Histone methyltransferases direct different degrees of methylation to define distinct chromatin domains, *Cells*, 12(6), 1591-8.
- Romero-Cordoba, S., Rodriguez-Cuevas, S., Hidalgo-Miranda, A., 2012, Identification and pathway analysis of microRNAs with no previous involvement in breast cancer, *Plos One*, 7, 319-324.
- Romero-Cordoba, S.L., Salido-Guadarrama, I., Rodriguez-Dorantes, M., Hidalgo-Miranda, Alfredo., 2014, miRNA biogenesis: Biological impact in the development of cancer, *Cancer Biology & Therapy*, 15:11, 1444-1455
- Rosero, S., Bravo-Egana, V., Jiang, Z., Khuri, S., Tsinoremas, N., Klein, D., Sabates, E., Correa-Medina, M., Ricordi, C., Domínguez-Bendala, J., Diez, J., Pastori, R.L., 2010, MicroRNA signature of the human developing pancreas, *BMC Genomics.*, 11, 509.
- Ruan, Q., Wang, T., Kameswaran, V., 2011, The microRNA-21- PDCD4 axis prevents type 1 diabetes by blocking pancreatic β cell death, *Proc Natl Acad Sci USA*, 108(29), 12030–12035.
- Ryu, J.M., Lee, H.J., Jung, Y.H., Lee, K.H., Kim, D.I., Kim, J.Y., Ko, S.H., Choi, G.E., Chai, I.I., Song, E.J., Oh, J.Y., Lee, S.J., Han, H.J., 2015, Regulation of Stem Cell Fate by ROS-mediated Alteration of Metabolism, *Int J Stem Cells*, 8(1), 24-35.

- Saltiel, A.R., Kahn, C.R., 2001, Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism, *Nature*, 414, 799–806.
- Salunkhe, V.A., Ofori, J., Gandasi, N.R., Salo, S.A., Hansson, S., Andersson, M.E., Wendt, A., Barg, S., Esguerra, J.L.S. & Eliasson, L., 2015, MiR-335 regulates exocytotic proteins and affects glucose-stimulated insulin secretion through decreased Ca²⁺-dependent exocytosis in beta cells, *Diabetologia*, 58, S128–S128.
- Sander, M., Neubuser, A., Kalamaras, J., Ee, H.C., Martin, G.R., German, M.S., 1997, Genetic analysis reveals that PAX6 is required for normal transcription of pancreatic hormone genes and islet development, *Genes Dev.*, 11,1662 -1673.
- Sandovici, I., Hammerle, C.M., Ozanne, S.E., Constancia, M., 2013, Developmental and environmental epigenetic programming of the endocrine pancreas: consequences for type 2 diabetes, *Springer*, 70, 1575-1595
- Santagana, S., Hornic, J.L., Ligon, K.L., 2006, Comparative analysis of germ cell transcription factors in CNS germinoma reveals diagnostic utility of NANOG, *The American Journal of Surgical Pathology*, 30(12), 1613-8.
- Schaffer, A.E., Freude, K.K., Nelson, S.B., Sander, M., 2010, Nkx6 transcription factors and Ptf1a function as antagonistic lineage determinants in multipotent pancreatic progenitors, *Dev Cell*, 18, 1022-1029.
- Schaffer, A.E., Taylor, B.L., Benthuyzen, J.R., Liu, J., Thorel, F., 2013, Nkx6.1 controls a gene regulatory network required for establishing and maintaining pancreatic beta cell identity, *PLoS Genet.*, 9, e1003274.
- Scheper, W., Copray, S., 2009, The molecular mechanism of induced pluripotency: a two-switch, *Stem Cell Rev.*, 5, 204-223.
- Schwitzgebel, V.M., Scheel, D.W., Connors, J.R., Kalamaras, J., Lee, J.E., 2000, Expression of neurogenin3 reveals an islet cell precursor population in the pancreas, *Development*, 127, 3533l.
- Seymour, P.A., Freude, K.K., Tran, M.N., Mayes, E.E., Jensen, J., 2007, SOX9 is required for maintenance of the pancreatic progenitor cell pool, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 104, 1865.
- Shen, S., Li, J., Casaccia-Bonnel, P., 2005, Histone modifications affect timing of oligodendrocyte progenitor differentiation in the developing rat brain, *J. Cell Biol.* 169, 577–589.
- Shi, X., Li, M., Cui, M., Gao, Y., Kong, W., Jin, H., 2016, Epigenetic suppression of the antitumor cytotoxicity of NK cells by histone deacetylase inhibitor valproic acid, *Am J Cancer Res.*, 15;6(3),600-14.

- Shih, H.P., Kopp, J.L., Sandhu, M., Dubois, C.L., Seymour, P.A., 2013, A Notch-dependent molecular circuitry initiates pancreatic endocrine and ductal cell differentiation, *Development*, 139, 24881.
- Slack, J.M., 1995, Developmental biology of the pancreas, *Development*, 121, 1569
- Sladitschek, H.L., Neveu, P.A., 2015, The bimodally expressed microRNA miR-142 gates exit from pluripotency, *Mol Syst Biol.*, 11(12), 850.
- Smirnova, L., Block, K., Sittka, A., Oelgeschläger, M., Seiler, A.E., Luch, A., 2014, MicroRNA profiling as tool for in vitro developmental neurotoxicity testing: the case of sodium valproate, *PLoS One*, 9(6), e98892.
- Stolzing, A., Bauer, E., Scutt, A., 2012, Suspension cultures of bone-marrow-derived mesenchymal stem cells: effects of donor age and glucose level., *Stem Cells Dev.*, 21(14), 2718–23.
- Takahashi, K., Yamanaka, S., 2006, Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors, *Cell.*, 126(4), 663-76
- Tao, R., de Zoeten, E. F., Ozkaynak, E., Hancock, W.W., 2007, Deacetylase inhibition promotes the generation and function of regulatory T cells, *Nat. Med.*, 13, 1299–1307.
- Tattikota, S.G., Sury, M.D., Rathjen, T., 2013, Argonaute2 regulates the pancreatic β -cell secretome, *Mol Cell Proteomics*, 12(5), 1214–1225.
- Tattikota, S.G., Rathjen, T., McAnulty, S.J., 2014, Argonaute2 mediates compensatory expansion of the pancreatic β cell, *Cell Metab.*, 19(1), 122–134.
- Thompson, N., Gesina, E., Scheinert, P., Bucher, P., Grapin-Botton, A., 2012, RNA profiling and chromatin immunoprecipitation-sequencing reveal that PTF1a stabilizes pancreas progenitor identity via the control of MNX1/HLXB9 and a network of other transcription factors, *Mol. Cell. Biol.*, 32, 1189.
- Tou, L., Liu, Q., Shivdasani, R. A., 2004, Regulation of mammalian epithelial differentiation and intestine development by class I histone deacetylases, *Mol. Cell. Biol.*, 24, 3132–3139.
- Tsuklyama, T., Wu, C., 1997, Chromatin remodeling and transcription. *Cun Opin Gen Genel Dev.*, 7, 182-191.
- Tsumura, A., Hayakawa, T., Kumaki, Y., Takebayashi, S., Sakaue, M., Matsuoka, C., Shimoohno, K., Ishikawa, F., Li, E., Ueda, H.R., Nakayama, J., Okano, M., 2006, Maintenance of self-renewal ability of Mouse embryonic stem cells in the absence of DNA methyltransferases Dnmt1, Dnmt3a and Dnmt3b, *Genes Cells*, 11, 805-14.

- Vadlakonda, L., Pasupuleti, M., Pallu, R., 2013, Role of PI3K-AKT-mTOR and Wnt Signaling Pathways in Transition of G1-S Phase of Cell Cycle in Cancer Cells, *Front Oncol*, 12:3, 85.
- van Arensbergen, J., García-Hurtado, J., Moran, I., Maestro, M.A., Xu, X., 2010, Derepression of Polycomb targets during pancreatic organogenesis allows insulin producing beta-cells to adopt a neural gene activity program, *Genome Res*, 20, 722–732.
- Van der Meulen, T., Xie, R., Kelly, O.G., Vale, W.W., Sander, M., Huising, M.O., 2012, Urocortin 3 marks mature human primary and embryonic stem cell-derived pancreatic alpha and beta cells, *PLoS ONE*, 7, e52181.
- Verotti, A., Basicani, F., De Simone, M., Trotta, D., Morgese, G., Chiarelli, F., 2002, Insulin Resistance in Epileptic Girls Who Gain Weight After Therapy With Valproic Acid, *J Child Neurol*, 17:265-268
- Vienberg, S., Geiger, J., Madsen, S., Dalgaard, L.T., 2016, MicroRNAs in Metabolism. *Acta Physiol*, doi: 10.1111/apha.12681.
- Vijayaraghavan, J., Maggi, E.C., Crabtree, J.S., 2014, miR-24 regulates menin in the endocrine pancreas, *Am J Physiol Endocrinol Metab.*, 307(1), 84–92.
- Walker, M., 2014, MicroRNAs and Long Non-Coding RNAs in Pancreatic Beta Cell Function, *Cellular Endocrinology Health and Disease*, Editors: Alfredo Uloa-Aguirre, P. Michael Conn, 379-388.
- Wang, J.H., Shih, K.S., Wu, Y.W., Wang, A.W., Yang, C.R., 2013, Histone deacetylase inhibitors increase microRNA-146a expression and enhance negative regulation of interleukin-1 β signaling in osteoarthritis fibroblast-like synoviocytes, *Osteoarthritis Cartilage*, 21(12), 1987-96.
- Wang, Y., Liu, J., Liu, C., Naji, A., Stoffers, D.A., 2013, MicroRNA-7 regulates the mTOR pathway and proliferation in adult pancreatic β -cells. *Diabetes*. 62(3), 887–895.
- Wang, L., Su, W., Du, W., Xu, Y., Wang, L., Kong, D., Han, Z., Zheng, G., Li, Z., 2015, Gene and MicroRNA Profiling of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Endothelial Cells, *Stem Cell Rev.*, 11(2), 219-27.
- Weir, G.C., Bonner-Weir, S., 2004, Five Stages of Evolving B-Cell Dysfunction During Progression to Diabetes, *Diabetes*, 53, 16–21.
- Weng, R., Cohen, S.M., 2012, Drosophila miR-124 regulates neuro- blast proliferation through its target anachronism, *Development*, 139, 1427-1434.
- Xia, H., Cheung, W.K., Ng, S.S., Jiang, X., Jiang, S., Sze, J., Leung, G.K., Lu, G., Chan, D.T., Bian, X.W., Kung, H.F., Poon, W.S., Lin, M.C., 2012, Loss of brain-

- enriched miR-124 microRNA enhances stem-like traits and invasiveness of glioma cells, *J Biol Chem*, 87, 9962-9971.
- Xu, C.R., Cole, P.A., Meyers, D.J., Kormish, J., Dent, S., 2011, Chromatin prepattern and histone modifiers in a fate choice for liver and pancreas, *Science*, 332, 963–966.
- Xu, W., Marks, P. A., 2007, Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action, *Oncogene*, 26, 5541–5552.
- Yang, Y.P., Thorel, F., Boyer, D.F., Herrera, P.L., Wright, C.V., 2011, Context-specific a network of other transcribed by forced Pdx1 expression, *Genes Dev.*, 25, 1680.
- Yasuda, T., Kajimoto, Y., Fujitani, Y., 2002, PAX6 mutation as a genetic factor common to aniridia and glucose intolerance. *Diabetes*, 51(1), 224–230.
- Yang, Y., Ding, L., An, Y., Zhang, Z.W., Lang, Y., Tai, S., Guo, F., Teng, C.B., 2012, MiR-18a regulates expression of the pancreatic transcription factor Ptf1a in pancreatic progenitor and acinar cells, *FEBS Lett.*, 586(4), 422-7.
- Yi, R., 2011, MicroRNAs and their roles in mammalian stem cells, *J Cell Sci.*, 124, 1775-83.
- Yi, R., Qin, Y., Macara, I.G., Cullen, B.R., 2003, Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin-RNAs, *Genes Dev*, 17, 3011-6.
- Yoo, A.S., Sun, A.X., Li, L., Shcheglovitov, A., Portmann, T., Li, Y., Lee-Messer, C., Dolmetsch, R.E., Tsien, R.W., Crabtree, G.R., 2011, MicroRNA-mediated conversion of human fibroblasts to neurons, *Nature*, 476, 228-231.
- Yoo, E. J., Chung, J. J., Choe, S. S., Kim, K. H., Kim, J. B., 2006, Down-regulation of histone deacetylases stimulates adipocyte differentiation, *J. Biol. Chem.*, 281, 6608–6615.
- Yoshida, M., Kijima, M., Beppu, T., 1990, Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A. *J. Biol. Chem.* 265, 17174–17179.
- Yoshitomi, H., Zaret, K.S., 2004, Endothelial cell interactions initiate dorsal pancreas development by selectively inducing the transcription factor Ptf1a, *Development*, 131, 807.
- Yu, K.R., Yang, S.R., Jung, J.W., Kim, H., Ko, K., Han, D.W., Park, S.B., Choi, S.W., Kang, S.K., Schöler, H., Kang, K.S., 2012, CD49 enhances multipotency and maintains stemness through the direct regulation of OCT4 and SOX2, *Stem Cells*, 30, 876-87.

- Zaehres, H., Lensch, M.W., Daley, G.Q., 2005, High-efficiency RNA interference in human embryonic stem cells, *Stem Cells*, 23(3), 299-305.
- Zeng, Y., Cullen B.R., 2003, Sequence requirements for mi RNA processing and function in human cells, *Rna*, 9, 112-123
- Zhang, Z.W., Zhang, L.Q., Ding, L., Wang, F., Sun, Y.J., An, Y., Zhao, Y., Li, Y.H., Teng, C.B., 2011, MicroRNA-19b downregulates insulin 1 through targeting transcription factor NeuroD1, *FEBS Lett.* 585(16), 2592-8.
- Zhang, L., Zheng, Y., Sun, Y., Zhang, Y., Yan, J., Chen, Z., Jiang, H., 2016, MiR-134-Mbd3 axis regulates the induction of pluripotency, *J Cell Mol Med*, 20(6), 1150-8.
- Zhao, Y., You, W., Zheng, J., Chi, Y., Tang, W., Du, R., 2012, Valproic acid inhibits the angiogenic potential of cervical cancer cells via HIF1 α /VEGF signals, *Clin Transl Oncol.*, 1494-1498
- Zhou, Q., Law, A.C., Rajagopal, J., Anderson, W.J., Gray, P.A., Melton, D.A., 2007, A multipotent progenitor domain guides pancreatic organogenesis, *Dev. Cell*, 13, 103.
- Zhou, Q., Brown, J., Kanarek, A., Rajagopal, J., Melton, D.A., 2008, *In vivo* reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to δ -cells, *Nature*, 455, 627.
- Zhou, W., Freed, C.R., 2009, Adenoviral gene delivery can reprogram human fibroblasts to induced pluripotent stem cells, *Stem Cells*, 27, 2667-2674.
- Zhu, Y., You, W., Wang, H., 2013, MicroRNA-24/MODY gene regulatory pathway mediates pancreatic β -cell dysfunction, *Diabetes.*, 62(9), 3194–3206.
- Zou, D., Chen, Y., Han, Y., Lv, C., Tu, G., 2014, Overexpression of microRNA-124 promotes the neuronal differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells, *Neural Regen Res.*, 9(12), 1241-8.
- Zulewski, H., Abraham, E.J., Gerlach, M.J., Daniel, P.B., Moritz, W., Müller, B., Vallejo, M., Thomas, M.K., Habener, J.F., 2001, Multipotential nestin-positive stem cells isolated from adult pancreatic islets differentiate ex vivo into pancreatic endocrine, exocrine, and hepatic phenotypes, *Diabetes*, 50(3), 521-33.

ÖZGEÇMİŞ



Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı	Ediz ÇOŞKUN
Uyruğu	TÜRKİYE CUMHURİYETİ
Doğum tarihi, Yeri	1992, BURSA
Telefon	+90 538 376 1855
E-mail	cskn.ediz@gmail.com
Web adres	www.iharfieksikligi.blogspot.com.tr

Eğitim

Derece	Kurum/Anabilim Dalı/Programı	Yılı
Yüksek Lisans	İ.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü/ Biyoloji Anabilim Dalı/ Moleküler Biyoloji Programı	2016
Lisans	İ.Ü Fen Fakültesi/ Biyoloji Bölümü	2014
Lise	Bursa Süleyman Çelebi Anadolu Lisesi	2010

Makaleler / Bildiriler

Coskun E., Oktayoglu S., Bolkent S., 2015, 4-methylcatechol prevents hyperglycemia-induced inflammation and acute renal failure, *FEBS*, Berlin, ALMANYA