

**T.C.**  
**AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**TİP 1 DİYABETİK DENEKLERDE LENTİVİRUS ARACILI  
VAZOAKTİF İNTESTİNAL PEPTİT GEN NAKLİNİN  
TERAPÖTİK ETKİNLİĞİNİN BELİRLENMESİ**

**FULYA ERENDOR**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**2019-ANTALYA**

**T.C.**  
**AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**TİP 1 DİYABETİK DENEKLERDE LENTİVİRUS ARACILI  
VAZOAKTİF İNTESTİNAL PEPTİT GEN NAKLİNİN  
TERAPÖTİK ETKİNLİĞİNİN BELİRLENMESİ**

**Fulya ERENDOR**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN**  
**Prof. Dr. Salih ŞANLIOĞLU**

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TYL-2018-3488 proje numarası ile ve TÜBİTAK tarafından 215S820 proje numarası ile desteklenmiştir.

“Kaynakça gösterilerek tezinden yararlanılabilir”

2019-ANTALYA

**Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;**

Bu çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Tıbbi Biyoloji Programında yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir. 18/06/2019

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Salih ŞANLIOĞLU  
Akdeniz Üniversitesi

İmza



Üye : Prof. Dr. M. Kemal BALCI  
Akdeniz Üniversitesi



Üye : Doç. Dr. Atıl BIŞGIN  
Çukurova Üniversitesi



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

Prof. Dr. Narin DERİN

Enstitü Müdürü

## ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı beyan ederim.

*Fulya F*

Fulya ERENDOR

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Salih ŞANLIOĞLU

İmza

*Şanlioğlu*

## TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim boyunca daimi destekçim olan değerli danışmanım ve çalışmalarımı yürüttüğüm Gen ve Hücre Tedavi Merkezi'nin yöneticisi Prof. Dr. Salih Şanlıoğlu'na, hep daha iyisini yapabileceğime inandığı ve sunduğu tüm imkanlar için; ayrıca Gen ve Hücre Tedavi Merkezi asistanları M. Hale Taşyürek, Yunus Emre Ekşi, Özlem Yılmaz ve özellikle Elif Özgecan Şahin ve Gizem Şeker'e bana bir ekipten önce yoldaş oldukları için teşekkür ederim. Sizinle eğlenmek de öğrenmek de çok güzel.

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'ndaki sevgili hocalarım ve asistan arkadaşlarıma; Yıldız Teknik Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'ndeki tüm lisans hocalarıma mesleki kariyerimde tam da bulunduğum noktada olmamı sağladıkları için teşekkür ederim. Sizleri öncelikle ülkem ve sonra tüm insanlık için yapacağım işlerle gururlandırmak en büyük dileğim.

H. Sevgi Varlı ve Funda Alkan'a fiziksel mesafelere rağmen her anımda yanımda oldukları için; kuzenim N. Büşra Erendor'a bana her halimle katlandığı, kız kardeşim Aybüke Erendor'a bana sabrı öğrettiği ve içimi huzur ve mutlulukla dolduran küçük kardeşim M. Eren Erendor'a varlığı için teşekkür ederim.

Ve teşekkürlerin en büyüğü elbette beni yetiştiren, bu günlere gelmemi sağlayan fedakar ve sevgi dolu ailem Hasan & Benan Erendor'a, maddi/manevi her türlü destekleri için.

İyi ki varsınız.

## ÖZET

**Amaç:** Tip 1 diyabet (T1DM) pankreatik beta hücrelerinin spesifik T hücre aracılı dejenerasyonu ile karakterize insülin yetmezliğine sebep olan bir hastalıktır. Vazoaktif İntestinal Peptit (VİP), hem insülinotropik hem de antiinflamatuvar etkileri sayesinde güçlü bir antidiyabetiktir. Ancak peptidazlara karşı (Dipeptidil Peptidaz 4-DPP-4) aşırı hassasiyet sergileyen VİP'den herhangi bir terapötik etki gözlemleyebilmek için peptidin sürekli veya bir çok kez hastaya enjeksiyonu gerekmektedir. Tek doz enjeksiyonla uzun süreli gen sentezi sağlayabilmek için VİP geni taşıyan lentiviral vektörler (LentiVİP) ürettik. Üretilen vektörlerin T1DM üzerindeki terapötik etkinliğini araştırdık.

**Yöntem:** Uzun süreli stabil gen ekspresyonu sağlamak amacıyla güvenilirliği ve etkinliği klinik denemelerde kanıtlanmış 3. jenerasyon HIV tabanlı lentiviral vektörlere VİP kodlayan gen klonlandı. Ayrıca projemizde kullanmak üzere çoklu-düşük doz STZ indüklü T1DM deney hayvan modeli geliştirildi. Üretilen LentiVİP gen nakil vektörünün terapötik etkinliğini projede geliştirilen T1DM deney hayvan modelinde test edildi.

**Bulgular:** LentiVİP gen nakli yapılan diyabetik deneklerde; kan şekerinin düştüğü, pankreas beta hücre fonksiyonunun arttığı ve deneklerin kilo kaybının önlendiği tespit edildi. Ayrıca diyabet kaynaklı artan serum CRP seviyesinde düşüş, serum oksidan kapasitesinde normalizasyon ve antioksidan kapasitesinde ise iyileşme belirlendi.

**Sonuç:** Elde edilen bulgular LentiVİP gen naklinin ileride T1DM hastalarının tedavisinde yeni bir terapötik yaklaşım olarak değerlendirilebileceğini göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** tip 1 diyabet, gen tedavisi, lentivirus, vazoaktif intestinal peptit

## ABSTRACT

**Objective:** Type 1 diabetes (T1DM) is characterized by autoimmune destruction of pancreatic beta cells leading to insulin deficiency. Because vasoactive intestinal peptide (VIP) displayed insulinotropic and anti-inflammatory properties, it has been regarded as a novel therapeutic agent for the treatment of diabetes. Despite all these beneficial properties, VIP is extremely sensitive to peptidases (DPP-4) requiring constant infusions or multiple injections to observe any therapeutic effect. Thus, an HIV-based lentiviral vector encoding human VIP (LentiVIP) was constructed to test the therapeutic efficacy of VIP in multiple-low dose STZ induced animal model of T1DM.

**Method:** 3rd generation of HIV-based lentiviral vectors carrying vasoactive intestinal peptide (LentiVIP) gene was generated to provide a stable VIP gene expression. In addition, a multi-low dose STZ-induced T1DM experimental animal model was developed to test the potential therapeutic efficacy of LentiVIP.

**Results:** LentiVIP delivery into animal model of T1DM resulted in reduced hyperglycemia, improved glucose tolerance, and prevented weight loss. Decrease in serum CRP levels, and serum oxidant capacity, in addition to improvement in antioxidant capacity were also observed in treated animals.

**Conclusion:** All these beneficial results suggested that LentiVIP delivery should be evaluated as a novel therapeutic approach for the treatment of patients with T1DM.

**Key words:** type 1 diabetes, gene therapy, lentivirus, vasoactive intestinal peptide

## İÇİNDEKİLER

<b>ÖZET</b>	i
<b>ABSTRACT</b>	ii
<b>İÇİNDEKİLER</b>	iii
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b>	v
<b>SİMGELER ve KISALTMALAR</b>	ix
<b>1. GİRİŞ</b>	1
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	3
2.1. Diyabet	3
2.2. Tip 1 Diyabet	4
2.3. T1DM Gelişiminde VIP ve PACAP'ın Potansiyel Etkileri	7
2.4. VIP Aracılı Gen Transfer Çalışmaları	8
<b>3. GEREÇ ve YÖNTEM</b>	11
3.1. İnsan VIP Geni Kodlayan Lentiviral Vektörlerin Oluşturulması	11
3.1.1. Giriş Vektörlerinin Hazırlanması	11
3.1.2. Lentiviral Ekspresyon Vektörünün Oluşturulması	11
3.1.3. Lentivirus Üretimi	12
3.1.4. Lentiviral Vektörlerin Q-PCR'la Fonksiyonel Titrasyonu	13
3.2. Lentivirusların İn Vitro Fonksiyonellik Analizleri	14
3.3. Deney Hayvanı Çalışmaları	15
3.3.1. Kan Glukoz Tayini	15
3.3.2. İntraperitoneal Glukoz Tolerans Testi	16
3.3.3. İmmünohistokimyasal Çalışmalar	16
3.4. Üretilen Vektörlerin Oluşturulan Modellerde İn Vivo Terapötik Etkinliğinin Test Edilmesi	17
3.4.1. Serum VIP ELISA	18



3.4.2. Serum CRP, TOS ve TAS Analizleri	19
3.5. İstatistiksel Analiz	19
<b>4. BULGULAR</b>	<b>20</b>
4.1. Tip 1 Diyabet Deneş Hayvan Modeli Oluşturma	20
4.2. Vip Geni Kodlayan 3.Nesil Lentiviral Vektörlerin Oluşturulması	24
4.3. Lentiviral Vektörlerin In Vitro Fonksiyonellik Analizleri	27
4.4. Lentiviral Vektörlerin İn Vivo Terapötik Etkinlikleri	28
4.5. Gen Nakil Vektörlerinin Diyabet Kökenli İnflamasyon Üzerinde Etkisi	33
4.6. Gen Nakli Yapılan Deneklerde İmmünohistokimyasal Analizler	37
<b>5. TARTIşMA</b>	<b>39</b>
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	<b>44</b>
<b>KAYNAKLAR</b>	<b>45</b>
<b>ÖZGEÇMİş</b>	<b>51</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

- Şekil 4.1** Deneysel Tip 1 Diyabet modeli. 5 ardışık gün 30 mg/kg STZ 21  
enjeksiyonu yapılan Wistar (n=8) ve Sprague Dawley (n=5) sıçanların  
uygulama öncesi ve sonrasında kaydedilen kan glukoz değerleri  
grafığı (İstatistiksel analiz; One-Way ANOVA: Tukey'in çoklu  
karşılaştırma testi; Kontrol vs. Sprague Dawley p=0,0014; Kontrol vs.  
Wistar, p=0,0011; Sprague Dawley vs. Wistar, p=0,9958)
- Şekil 4.2** 5 ardışık gün 30 mg/kg STZ enjeksiyonu yapılan Wistar (n=8) 22  
sıçanların uygulama öncesi ve sonrasında kaydedilen ağırlık değerleri  
grafığı (İstatistiksel analiz; Two-Way ANOVA: Tukey'in çoklu  
karşılaştırma testi; Kontrol vs. Wistar, p=0,0045)
- Şekil 4.3** T1DM modelinle adacık kayıp oranları. 5 ardışık gün 30 mg/kg STZ 23  
uygulamasını takiben 10., 15. ve 20. günlerde sakrifiye edilen Wistar  
sıçanların pankreatik kesitleri. B. STZ uygulaması alan diyabetik  
sıçanlarda uygulamayı takiben 10. 15. ve 20. günlerde kontrol  
gruplarına göre adacık alan kaybı. (Two-way ANOVA, p<0.0001)
- Şekil 4.4** LxR rekombinasyon reaksiyonu. LR rekombinasyon reaksiyonu, LR 25  
Rekombinaz II enzim karışımı (Invitrogen) yardımıyla, destinasyon  
vektörü üzerindeki attR1/attR2 bölgeleri ve VIP plazmidindeki  
attL1/attL2 bölgeleri arasında parça değişimini amaçlar. Klonaz  
enzim karışımının varlığında giriş VİP klonuyla destinasyon  
vektörünün LxR rekombinasyon reaksiyonu VİP transgenini taşıyan  
ekspresyon vektörünün (pLentiVİP) oluşumuna sebebiyet verir.
- Şekil 4.5** pLentiVİP ekspresyon klonunun (pLentiVİP) vektör haritası. Giriş 25  
VİP klonu ve destinasyon vektörünün LxR rekombinasyonu sonucu

oluşan pLentiVIP vektörü üzerinde VIP geninin pozisyonu, HIV tabanlı 3. nesil lentiviral vektör genleriyle birlikte gösterilmiştir.

- Şekil 4.6** Oluşturulan ve üretilen plazmidlerin restriksiyon enzim analizleri. 26  
Sırasıyla pLentiVIP ekspresyon klonunun (EcoRI ve XhoI) ve lentiviral vektör üretiminde kullanılan paketleme vektörlerinin (gag/pol (pMDLg/pRRE-EcoRI), pRSV/Rev (Eco RI, Afl II), VSV-G (pMD2G-Eco RI)) restriksiyon enzim agaroz jel görüntüsü. M: Gene Ruler 1kb Plus.
- Şekil 4.7** LentiVIP ile transdükte HepG2 hücrelerinde gözlemlenen VIP 27  
sekresyonu (İstatistiksel Analiz One-way Anova, Dunnett Çoklu Karşılaştırma Testi; n=6 (\*\*\*\* p=0.0001))
- Şekil 4.8** LentiVIP pankreatik beta hücrelerinden insülin sekresyonunu artırır. 28  
(İstatistiksel analiz, Two Way Anova p<0.001). LentiLacZ vektörü 100 MOI dozunda kullanılmıştır.
- Şekil 4.9** LentiVIP enjeksiyonu Tip 1 diyabetik deneklerde (n=8) kan şekerini 29  
düşürür. LacZ vektörü alan denekler ise (n=8) takip süresi boyunca hiperglisemik tablo sergiledi (Mann-Whitney U Test p= 0.0138)
- Şekil 4.10** LentiVIP enjeksiyonu STZ almış deneklerde kilo kazancına sebebiyet 30  
verdi. 2 way ANOVA testi (Sidak çoklu karşılaştırma testi) gruplar arasında 24 gün ve sonrasında (gen naklinden 2 hafta sonra) istatistiksel bir farkın olduğunu göstermektedir (İstatistiksel analiz, Two way ANOVA, p<0.0054)
- Şekil 4.11** LentiVIP (n=8) veya LentiLacZ (n=8) gen nakli sonrası Tip 1 31  
diyabetik deneklerde glukoz tolerans eğrileri (One-Way Anova ve Tukey's Çoklu Karşılaştırma Testi p<0.0001)
- Şekil 4.12** İntraperitoneal yolla LentiVIP (n=8) vektör uygulaması alan 32  
sıçanların intraabdominal dokularında lentiviral vektör dağılım profili. Kontrol sıçanlar (n=5) herhangi bir uygulama yapılmayan hayvanları temsil etmektedir. İntraabdominal dokulardan genomik

DNA izolasyonu sonrasında qPCR analizi yapılmış ve lentiviral vektörlerin genome entegre kopya sayıları belirlenmiştir. ( $p<0.05$ ; Two-way ANOVA)

**Şekil 4.13** Gen naklinin serum VIP seviyesi üzerine etkisi. LentiVIP (n=8), 33  
LentiLacZ (n=8) vektör enjeksiyonu ve PBS verilen Kontrol (n=5)  
sıçanlarda kan serumlarındaki VIP seviyeleri. (İstatistiksel analiz  
One-way ANOVA,  $p<0.0001$ ). \*\*\* $P<0.0001$

**Şekil 4.14** VIP gen nakli diyabetik deneklerde artmış serum C-reaktif protein 34  
seviyesini düşürür. Kontrol grubu (n=6), STZ ve vektör uygulaması  
almayan, PBS enjeksiyonu yapılan sıçanları ifade etmektedir.  
LentiLacZ grubu (n=8), LentiLacZ kontrol vektörü almış diyabetik  
sıçanları; LentiVIP grubu VIP vektörü almış diyabetik sıçanları ifade  
etmektedir. (One-way ANOVA testi) (\*\*\*\*  $p<0.0001$ )

**Şekil 4.15** VIP gen nakli diyabetik deneklerin artmış serum total oksidan 35  
kapasitesini normal sınırlara geriletir. Kontrol grubu (n=6), STZ ve  
vektör uygulaması almayan, PBS enjeksiyonu yapılan sıçanları ifade  
etmektedir. LentiLacZ grubu (n=6), kontrol vektörü almış diyabetik  
sıçanları; LentiVIP grubu VIP vektörü almış sıçanları ifade  
etmektedir. İstatistiksel analizlere göre; LentiLacZ grubunun serum  
total oksidan seviyesinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede  
arttığı belirlenirken, terapötik vektör uygulaması yapılan sıçanların  
serum total oksidan seviyelerinin LentiLacZ grubuna kıyasla anlamlı  
derecede düştüğünü ve kontrol grubu ile benzer seviyelere geldiği  
gözlemlenmiştir (One-way ANOVA,  $p****<0,0001$ ).

**Şekil 4.16** VIP gen nakli diyabetik deneklerin düşen serum total antioksidan 36  
kapasitesini normalize eder. Yapılan istatistiksel analizlere göre;  
LentiLacZ grubunun serum total antioksidan seviyesinin kontrol  
grubuna göre anlamlı derecede azaldığı belirlenirken, terapötik vektör  
uygulanan hayvanlarda serum total antioksidan seviyelerinin  
LentiLacZ grubuna kıyasla anlamlı derecede arttığını hatta kontrol

grubu ile benzer seviyelere geldiği gözlemlenmiştir (One-way ANOVA,  $p^{****}<0,0001$ ).

**Şekil 4.17** İntraperitoneal gen nakli sonrası intraabdominal dokularda insülin boyama (n=6) 37

**Şekil 4.18** Gen nakil sonrası intraabdominal organlarda VIP boyama. 38



## SİMGELELER ve KISALTMALAR

<b>AAV</b>	: Adeno-associated virus
<b>cAMP</b>	: Cyclic adenosine monophosphate
<b>CMV</b>	: Sitomegalovirus
<b>CRP</b>	: C-reaktif protein
<b>CYD</b>	: Siklofosfamid
<b>DPP4</b>	: Dipeptidil Peptidaz-4
<b>GSIS</b>	: Glukoz İndüklü İnsülin Salınım
<b>H&amp;E</b>	: Hematoksilen&Eosin
<b>HBSS</b>	: Hank's Buffered Salt Solution
<b>HRP</b>	: Horse radish peroksidaz
<b>IDT</b>	: İnsülin duyarlılık testi
<b>IMDM</b>	: Iscove's Modified Dulbecco's Medium
<b>IPGTT</b>	: İntraperitoneal Glukoz Tolerans Testi
<b>iPSCs</b>	: İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücreler
<b>KRB</b>	: Krebs Ringer Buffer
<b>LentiVİP</b>	: Vazoaktif intestinal peptidi kodlayan lentiviral vector
<b>NOD</b>	: Non-obez Diyabetik
<b>PACAP</b>	: Pituitary adenilat siklaz-aktifleştiren peptid
<b>PAH</b>	: Pulmener Arteryel Hipertansiyon
<b>PC</b>	: Prohormon konvertaz
<b>PC1/3</b>	: Prohormon konvertaz 1/3
<b>RA</b>	: Romatoid Artrit
<b>rAAV</b>	: Rekombinant AAV
<b>SD</b>	: Sprague Dawley
<b>STZ</b>	: Streptozotosin
<b>T1DM</b>	: Tip 1 Diyabet
<b>T2DM</b>	: Tip 2 Diyabet

<b>TAS</b>	: Total Antioksidan Seviye
<b>TOS</b>	: Total Oksidan Seviye
<b>VIP</b>	: Vazoaktif intestinal peptid
<b>VSV-G</b>	: Veziküler stomatit virus G protein
<b>WPRE</b>	: Woodchuck Posttranscriptional Regulatory Element



## 1. GİRİŞ

Günümüzde T1DM hastalığına karşı geliştirilen gen tedavi stratejilerinden bir tanesi beta hücrelerinin bağışıklık sistemi tarafından yıkımının önlenmeye çalışıldığı vücutta beta hücrelerine karşı immün-tolerans geliştirilmesine yönelik bir yaklaşımdır. Yapılan ilk çalışmalar adacıkların testis, beyin ya da timüs gibi immün olarak ayrıcalıklı bölgelere transplantasyonunu araştırmaktadır. Kısa sürede bu bölgelerin adacıkları sahiplenip korumadıkları ancak Fas ligandı ile indüklenen apoptozis gibi apoptotik yolların aktivasyonuna dirençli oldukları gösterildi. Bu gözlem, beta hücrelerine reaktif sitotoksik T hücrelerinin yıkımını amaçlamak için gen tedavi ile pankreas adacıklarındaki ölüm ligand ekspresyonuna bağlı immünite düzenleme stratejilerinin uygulanabilirliğini ortaya koydu. Böylece gen tedavisi tip 1 diyabetli hastaların tedavisi için alternatif bir tedavi yöntemi haline geldi (Chellappan ve ark., 2018).

Bağışıklık hücreleri tarafından üretilen bir peptit olan vazoaktif bağırsak peptidi (VIP), immün sistemin homeostazını kontrol eden geniş bir immünolojik fonksiyon spektrumuna sahiptir. Son on yılda, VIP'nin doğuştan gelen ve adaptif bağışıklıkta güçlü bir anti-inflamatuar faktör olduğu açık bir şekilde tespit edilmiştir. Doğal bağışıklıkta bu peptit, makrofajlar, mikroglia ve dendritik hücrelerden inflamatuvar sitokinler ve kemokinlerin üretimini engeller. Buna ek olarak VIP, antijen sunan hücreler üzerindeki birlikte uyarıcı moleküllerin ifadesini azaltır ve bu nedenle antijene özgü CD4+ T hücrelerinin uyarılmasını azaltır. Adaptif bağışıklık açısından, VIP T yardımcı Th2-tipi yanıtları teşvik eder ve inflamatuvar Th1 tipi yanıtları azaltır. Sitokin ve kemokin ekspresyonunun inhibisyonunda ve Th2 efektörlerinin tercihli gelişimi ve/veya hayatta kalmasına katılan moleküler mekanizmaların birçoğu bilinmemektedir. Bu nedenle, VIP ve analogları akut ve kronik inflamatuvar ve otoimmün hastalıkların tedavisinde mevcut tedavilere umut verici alternatif adaylar olarak önerilmiştir. Tüm bu etkilerine rağmen önceki çalışmalarda VIP tabanlı tedavi stratejilerinin klinik uygulamalara geçmesinde birtakım sorunlarla karşılaşıldığından terapötik bir etki oluşturabilmek için peptidin yüksek dozlarda birkaç kez verilmesi gerekmektedir. Bir peptidin vücutta uzun süreli, stabil ekspresyonunun sağlanmasının tek yolu gen naklidir.



Tüm bu gerçekler göz önüne alındığında projedeki amaçlarımızı aşağıdaki gibi kısaca sıralayabiliriz:

1- Düşük doz STZ indüklü diyabet oluşturulmuş sıçanlara VIP sentezi sağlayacak güvenli bir gen tedavi vektörünün geliştirilmesi ve bu vektörlerin fonksiyonel etkinliklerinin önce *in vitro* olarak belirlenmesi.

2- Düşük doz STZ indüklü diyabet oluşturulmuş sıçanlarda LentiVIP gen tedavisinin *in vivo* koruyuculuğunun araştırılması.

Sonuçta, çalışmamızda insan VIP geninin sitomegalovirus (CMV) promotörü eşliğinde aktarımı ile tip 1 diyabetik deney hayvanlarındaki otoimmün yanıtı baskılayabilmek ve immün toleransı indüklemek üzere deneklere vazoaaktif intestinal peptid kodlayan geni bulunduran lentivirusları (LentiVIP) aktarmayı planlıyoruz. Böylelikle VIP sentezi sağlamanın çoklu-düşük doz STZ indüklemeli diyabet modelinde beta hücre fonksiyon ve adacık kitle kaybına karşı koruyuculuk sağlayıp sağlayamayacağı, hiperglisemiye karşı etkin bir tedavi yöntemi olup olmayacağı belirlenebilecektir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Diyabet

Normal bir insan pankreasında yaklaşık 1 milyon adacık vardır. İnsülin sekresyonu yapan beta hücreleri adacıklardaki endokrin hücrelerin çoğunluğunu oluşturur (%60-80). Glukagon içeren alfa hücreleri (%20-30) ve somatostatin barındıran delta hücreleri de (%5-15) pankreas adacıklarında lokalize diğer endokrin hücrelerdir. Beta hücre (adacık) kitle miktarını; programlı hücre ölümü (apoptozis), hipoplazi/hiperplazi, beta hücrelerinin proliferasyonu ve prekürsör hücrelerin gelişimiyle (neogenez) karakterize dört farklı mekanizma belirler. Beklendiği gibi adacık hücre replikasyonu, hacim artışı ve neogenez; net beta hücre kitle miktarını arttırırken, apoptozis adacık kitle miktarını azaltır. İnsan pankreasında doğumdan hemen sonra geçici bir beta hücre replikasyonu ve devamında kısa süreli bir neogenez söz konusudur. Bu safhada apoptotik hücre oranı oldukça düşük olduğu için, hayatın ilk döneminde beta hücre kitlesinde net bir kazanım söz konusudur. Çocukluk ve ergenlik çağlarında ise bireyi erişkin döneme taşıyabilecek miktarda; beta hücre replikasyonu, neogenez ve apoptozis oranlarında kendiliğinden bir denge oluşur. Ancak yaşlılıkta apoptozis hem replikasyon hem de neogenez oranlarının önüne geçtiği için beta hücre kitlesinde net bir azalma olur. Değişik nedenlerden ötürü adacık kitle kaybı vücudun fizyolojik ihtiyacını karşılayabilecek düzeyde bir insülin üretimine sebebiyet veremezse; genç olsun yaşlı olsun bu kişilerde şeker hastalığı (diyabet) ortaya çıkar. Şeker hastalığı; genetik veya sonradan kazanılan faktörlerin etkisiyle ortaya çıkan, beta hücre fonksiyonu ve organların insülin duyarlılıklarının etkilendiği metabolik bir hastalıktır. Bilindiği gibi son yıllarda diyabetin hem yaygınlığı hem de görülme sıklığı bariz bir şekilde artış göstermiştir. Bu bağlamda hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkeleri ilgilendiren diyabet hastalığı günümüzde epidemik bir hal almıştır. Bugün için diyabette kullanımı onay almış pek çok ilaç bulunmasına rağmen bu hastalığın hem ekonomik hem de sağlık açısından toplumlara halen büyük bir yük getirebiliyor olması oldukça dikkat çekicidir. İnsülin sekresyonu veya insülinin etki mekanizmasında gözlemlenen bozukluklar, hastalarda kan şekerinin sürekli olarak yüksek kalmasına (hiperglisemi) yol açar. Bugün için yeryüzünde yaklaşık 500 milyon, ülkemizde ise yaklaşık 10 milyon kişiyi

etkileyen diyabetin genel olarak iki farklı formu vardır. Dramatik insülin yetmezliğiyle baş gösteren pankreasın beta hücrelerinin oto-immün yıkımıyla sonuçlanan formuna tip 1 diyabet (T1DM) denir. İnsülin dirençliliği ve insülin sekresyonunda bozukluklarla seyreden formu ise tip 2 diyabettir (T2DM). Tip 1 Diyabet özellikle çocukluk çağında ortaya çıkan bir hastalıktır. Hastalarda mevcut adacıkların %80-90'ının kaybı sonucu yüksek kan glukoz seviyeleri ile kendilerini gösterir.

## **2.2. Tip 1 Diyabet**

Tip 1 Diyabet (T1DM) langerhans adacıklarındaki beta hücrelerinin otoimmün yıkımı sonucu kronik gelişen bir hastalıktır. T1DM hastalığına sebep olan otoimmüniteyi tetikleyen mekanizma henüz bilinmemektedir. T1DM hastaları genellikle otoimmün atak başlangıcından aylar veya yıllar sonra, ancak semptomların başlamasıyla tanılabilmektedirler. T1DM gelişimini temelde 3 evreye ayırabilmekteyiz. İlk evre otoimmün saldırının başladığı ve beta hücrelerinin azaldığı evredir. Zamanla azalan beta hücreleri bir süre sonra artan kan glukoz seviyesinin (hiperglisemi) düzenlenmesi için gerekli insülini üretmede yetersiz kalmaktadır. Hiperglisemik durumun yaşandığı ve beta hücrelerinin yıkımının devam ettiği aşama prediyabetik evresinin ikinci fazını oluşturmaktadır. Hipergliseminin uzun süre devam etmesi sonucu oluşan nefropati, nöropati ve retinopati gibi kronik semptomların da görülmesiyle diyabet hastalığı meydana gelmektedir (Katsarou ve ark., 2017).

Günümüzde insülin enjeksiyonu T1DM hastalığının temel tedavi yöntemini oluşturmaktadır. Ancak bu tedavi T1DM hastalığını iyileştirmek veya tedavi etmekten uzaktır, yalnızca akut ve kronik, makro ve mikro komplikasyonların görülmesini geciktirmekte ya da hafifletmektedir. Ayrıca enjekte insülinler zamanla artan fizyolojik insülin miktarındaki azalmayı telafi etmekte yetersiz kalmaktadır. Diğer yandan pankreas nakli T1DM hastalarında yaşam kalitesini ve süresini arttırmaktadır. Fakat uygun donör bulma zorluğu, büyük bir ameliyat gerektirmesi bu yöntemin klinikte uygulanabilirliğini kısıtlamaktadır. Dahası ameliyat sonrasında beta hücrelerine karşı gelişen hızlı ve şiddetli bir immün yanıtın önlenmesi için kullanılan immün baskılayıcı ilaçların da sebep olduğu olumsuzluklar dolayısıyla tartışmalı bir yaklaşımdır. Pankreas adacık

transplantasyonu, pankreas naklinin gerektirdiği büyük bir ameliyat ve insülin enjeksiyonu ile ilişkili komplikasyonlardan sakınması açısından uygun bir alternatiftir. Bu alternatif T1DM hastaları için ümit verici olsa da, fonksiyonsuz greftlerin görülme sıklığı ve nakledilen greftlerin de yeniden bozulması sonucu alıcıların çoğunun 5 yılın sonunda yeniden insülin tedavisine başlaması uygulamanın başarısını sorgulatmaktadır. Beta hücrelerini immün aracılı yıkımdan korumak için yapılan çalışmalara rağmen, sonuçta hücrelerin bozulmaları geciktirilebilmekte ancak önlenememektedir. Şu anda adacık transplantasyonunda ulaşılması hedeflenen amaç diyabetik sendromların hiçbir immün baskılayıcı ilaç tedavisine ihtiyaç duyulmaksızın tedavi edilmesini mümkün kılmaktır. Uzun dönem organ işlevselliğini sürdürmek için öncelikle alloimmün ve otoimmün engeller aşılanmalıdır. Ancak bu şekilde adacık nakli anlamlı olabilecektir.

Tip 1 diyabet histopatolojisi, langerhans adacıklarıyla sınırlı karakteristik bir lenfositik insülit (insülit) ile ilişkili olarak azalmış beta hücre kitlesi ile tanımlanmaktadır. İnsülin üreten beta hücrelerinin sitotoksik T hücre aracılı yıkımı, bilinmeyen bir antijen tarafından başlatılır ve klinik tanıda beta hücresi kütesinin %75'inden fazlasının tahrip edilmesine yol açtığı düşünülmektedir. İnfiltrasyon baskın olarak CD8+ lenfositleri içerir fakat CD4+ lenfositleri, B lenfositleri ve makrofajları da içerebilirler. Hücresele yanıtta, geniş bir dizi beta hücresi antijenine karşı otoantikör içeren bir humoral yanıt eşlik eder. Ancak bu antijenler tanımlanmamış olmakla birlikte insülitisin T1DM hastalığının sebebi veya sonucu olup olmadığı da saptanmamıştır. Otoantikör-pozitif hastalarda beta hücrelerine karşı hücresele bağışıklık cevabının anlaşılması, mevcut kan örnekleri ve çalışılacak pankreas dokusu eksikliği nedeniyle sınırlıdır. Obez olmayan diyabetik (NOD) fare ve BioBreeding sıçan modelleri gibi spontan hayvanlara özgü diyabetik hayvan modelleri, immünogenetik ve patogeneze açısından insanlardan büyük farklılık gösterdiğinden bilgilendirici değildir (A. D. Sanlioglu, Griffith, ve ark., 2008).

Günümüzde T1DM hastalığına karşı 3 farklı gen tedavi stratejisi gündemdedir. Bunlardan ilki, otoimmün tahribat sonucu kaybedilen beta hücrelerinin yerine yenisinin konması için geliştirilen, beta hücresi olmayan hücrelerin gen nakli yoluyla tekrar programlanarak temsili beta hücrelerine dönüşümünü sağlayan yaklaşımları içerir. Kaybolan veya yıkılan

doku ve organlardaki hücreler transplantasyon aracılığıyla terapötik olarak etkin hücrelerle yer değiştirebilirler. Bu yaklaşım, nakil için yeterli sayıda istenen hücre türünü üretmek üzere hücre kimlikleri ve özellikleri etkin bir şekilde düzenleyen yöntemleri gerektirir. Bu hücreler, fibroblastlar gibi kolaylıkla erişilebilen somatik hücrelerin yeniden programlanmasıyla, süresiz çoğaltılabilen ve herhangi bir somatik hücre türüne dönüşebilen indüklenmiş pluripotent kök hücrelerin (iPSC'ler) oluşturulmasıyla elde edilebilirler. Bu alanda devam etmekte olan çalışmalar gerçekleştirilse bile immünite baskılanmadığı sürece T1DM hastaları için kesin çözüm olmayacağı açıktır. İkincisi, beta hücrelerinin tahribatı sonucu ortaya çıkan T1DM hastalığının en önemli eksikliğin giderilmesi amacıyla gerçekleştirilen insülin gen replasman tedavi metodudur. İnsülin gen naklinin T1DM'de başarılı olabilmesi için gen naklinin glukoz duyarlı bir organa yapılması, anlık değişebilen kan glukoz seviyelerine cevap verebilmesi ve insülin sentezinin uzun süreli olması gerekmektedir. Bunlara ek olarak az insülin gen ekspresyonu kan şekerini düşürmede etkisiz kalırken, gereğinden fazlası ise hastaların hipoglisemik komaya girmelerine sebebiyet verdiği için hücrede üretilen insülin miktarının mutlaka kontrol altına alınması gerekmektedir. Sonucunu da beta hücrelerinin bağışıklık sistemi tarafından yıkımının önlenmeye çalışıldığı vücutta beta hücrelerine karşı immün-tolerans geliştirilmesine yönelik bir yaklaşımdır. Yapılan ilk çalışmalar adacıkların testis, beyin ya da timüs gibi immün olarak ayrıcalıklı bölgelere transplantasyonunu araştırmaktadır. Kısa sürede bu bölgelerin, adacıkları sahiplenip korumadıkları ancak Fas ligandı ile indüklenen apoptozis gibi apoptotik yolların aktivasyonuna dirençli oldukları gösterildi. Bu gözlem, beta hücrelerine reaktif sitotoksik T hücrelerinin yıkımını amaçlamak için gen tedavi ile pankreas adacıklarındaki ölüm ligand ekspresyonuna bağlı immünite düzenleme stratejilerinin uygulanabilirliğini ortaya koydu. Böylece gen nakli tip 1 diyabetli hastaların tedavisi için alternatif bir yöntem haline geldi (Chellappan ve ark., 2018).

Diyabet hastalarının tedavisi için gen aktarımları ex vivo ve in vivo olmak üzere iki farklı yolla yapılabilir. Ex vivo yöntemde hastadan alınan hücreler vücudun dışında laboratuvar ortamında modifiye edilir ve tekrar hastalara nakledilir. İn vivo yöntemde ise, gen transfer vektörlerinin farklı yollarla hastalara direkt enjeksiyonu söz konusudur (intravenöz,

subkutan, vb.). Basit ve daha uygun olması sebebiyle, in vivo gen terapisi, gen aktarımlarında oldukça tercih edilen bir metottur. Kan glukozunun düşürülmesini hedefleyen gen tedavi yaklaşımları genel olarak glukoz kullanımını kolaylaştırırken, eş zamanlı olarak, karaciğer gibi organlarda beta hücresi oluşturma potansiyeline sahip olan transkripsiyon faktörlerini kodlayan genlerin aktarımı da denenmiş çalışmalar arasındadır. Lipofeksiyon ve elektroporasyon gibi viral olmayan vektör aktarım sistemleri yerine, virusların hedef hücreleri enfekte edebilme özellikleri, onların gen aktarım çalışmalarında tercih sebebidir. Kullanılacak virusların konak hücrede replikasyonunun engellenmesi çeşitli genetik modifikasyonlar ile sağlanır. Terapötik özellikteki geni taşıyan viral vektör, konak hücreyi enfekte ettikten sonra hücre nükleusuna girer ve entegrasyon sonrası aktarılan genin ekspresyonu gerçekleşir. Vektör olarak kullanılan viruslardan bazıları retroviruslar, adenoviruslar, adeno-assosiyasyon virusları (AAV) ve lentiviruslar olarak sıralanabilir. Lentiviral vektörler konak hücre genomuna entegre olduklarından, aktarım yapılan genin diğer vektörlere oranla daha uzun süreli ekspresyonunu sağlarlar. Hem bölünen hem de bölünmeyen hücreleri transdükte etmeleri, konak hücrede immünojeniteye neden olmamaları ve AAV'lere oranla daha yüksek transgen taşıma kapasiteleri dolayısıyla bu vektörlerin gen tedavi çalışmalarında kullanımları son zamanlarda artış göstermiştir (M. H. Tasyurek ve ark., 2014; H. M. Tasyurek, Altunbas, ve ark., 2018).

### **2.3. T1DM Gelişiminde VIP ve PACAP'ın Potansiyel Etkileri**

İdeal bir beta hücre koruyucusunun glukoz indüklü insülin sentezini arttırması, beta hücre replikasyonu ve adacık neogenezi sağlaması, onları yangısal ajanlardan ve apoptozisten koruyabilmesi gibi özelliklere sahip olması beklenir. Bu bağlamda pitüiter adenilat siklaz aktivasyon polipeptidi (PACAP) ve vazoaaktif intestinal peptidi (VIP) beta hücrelerinden oldukça etkin bir insülin sekresyonu yaptırma potansiyeline sahip, T1DM tedavisinde umut vaat eden iki ajandır. Ancak PACAP'ın insülin sekresyonunu arttırmasına rağmen dolaşımdaki glukoz seviyesini arttıran glukagon ve epinefrin salınımını uyarması, klinik açıdan önemli bir sorun olarak görülmektedir. Dahası PACAP'ın klinik uygulanmasında vazodilasyona sebebiyet vererek kan basıncını aşırı düşürmek gibi ciddi yan etkileri de belirlenmiştir. DPP-4 tarafından da hızlıca parçalanması onu etkin bir tedavi aracı

olmaktan uzaklaştırmaktadır. Bunun yanında VIP'ler Th1 bağışıklık tepkisinin baskılanması ve düzenleyici T hücreleri yoluyla bağışıklık toleransının indüklenmesi yoluyla etkili bir anti-enflamatuar faktör gibi davranması ve yemek sonrası insülin salınımını güçlü bir şekilde uyarması gibi geniş biyolojik fonksiyon spektrumundan ötürü, diyabet dahil olmak üzere birçok otoimmün hastalıkların tedavisinde umut verici bir terapötik madde olarak bilinmektedir. Bağışıklık hücreleri tarafından üretilen bir peptit olan vazoaktif bağırsak peptidi (VIP), immün sistemin homeostazını kontrol eden geniş bir immünolojik fonksiyon spektrumu uygular. Son on yılda, VIP'nin doğuştan gelen ve adaptif bağışıklıkta güçlü bir antiinflamatuar faktör olduğu açık bir şekilde tespit edilmiştir. Doğal bağışıklıkta bu peptit, makrofajlar, mikroglia ve dendritik hücrelerden inflammatuar sitokinler ve kemokinlerin üretimini engeller. Buna ek olarak VIP, antijen sunan hücreler üzerindeki birlikte uyarıcı moleküllerin ifadesini azaltır ve bu nedenle antijene özgü CD4+ T hücrelerinin uyarılmasını azaltır. Adaptif bağışıklık açısından, VIP T yardımcı Th2-tipi yanıtları teşvik eder ve inflammatuar Th1 tipi yanıtları azaltır. Sitokin ve kemokin ekspresyonunun inhibisyonunda ve Th2 efektörlerinin tercihli gelişimi ve / veya hayatta kalmasına katılan moleküler mekanizmaların birçoğu bilinmektedir. Bu nedenle, VIP ve analogları akut ve kronik inflammatuar ve otoimmün hastalıkların tedavisinde mevcut tedavilere umut verici alternatif adaylar olarak önerilmiştir. Tüm bu etkilerine rağmen önceki çalışmalarda VIP tabanlı tedavi stratejilerinin klinik uygulamalara geçmesinde birtakım sorunlarla karşılaşıldığından terapötik bir etki oluşturabilmek için peptidin yüksek dozlarda birkaç kez verilmesi gerekliliğini aşmak için de etkinliği, güvenilirliği ve uzun süre ekspresyon sağlamalarından dolayı lentiviral tabanlı gen tedavi uygulamaları ile başarı sağlama hedefindeyiz.

#### **2.4. VIP Aracılı Gen Transfer Çalışmaları**

İnsülin bağımlı şeker hastalığı olarak bilinen tip 1 diyabet (T1D) pankreasın insülin üreten beta hücrelerinin bağışıklık sistemi hücreleri tarafından parçalanmasıyla ortaya çıkan metabolik bir hastalıktır (A. D. Sanlioglu, Griffith, ve ark., 2008; Dirice ve ark., 2009). Şeker hastalığının erken döneminde pankreasta gözlemlenen harabiyet (A. D. Sanlioglu, Dirice, ve ark., 2008), doğal bağışıklık hücrelerinin ve Th1 tipi sitokinlerin anahtar rol oynadığı yangısal bir reaksiyon sonucu oluşur (Raz ve ark., 2005; A. D. Sanlioglu ve ark.,

2009). Bilindiği gibi NOD fareler insan T1D hastalığına çok benzer bir otoimmün sendrom tablosu sergiler. VIP'nin proinflamatuvar etkiyi antiinflamatuvar yanıtı çevirebildiği önceden bilindiğinden, otoimmün diyabet modelinde VIP'nin terapötik etkisinin olup olmayacağı uzunca bir süredir merak edilen bir konuydu. Önce VIP'nin peptid formunun NOD farelerde Tip 1 diyabet gelişimini önlediği saptandı (Beyan ve ark., 2003). Bu çalışmada; diyabetten korunmanın dolaşımdaki Th1 sitokinlerin baskılanması, regülatör T hücre aktivasyonu ve artan İL-10 sentezi ile sağlanabileceği gösterildi (Kukreja ve ark., 2002). NOD farelerde diyabet kendiliğinden oluşabildiği gibi siklofosfamid (CYD) kullanılarak da hızlandırılıp, hastalık sinkronize edilebilir. CYD bu etkiyi; bağışıklık sistem hücrelerini etkileyerek Th1/Th2 sitokin dengesini değiştirerek gerçekleştirir (Rosignoli ve ark., 2006; Larocca ve ark., 2007). Nihayetinde plazmid DNA aracılı VIP gen naklinin de CYD indüklü diyabet insidansını düşürdüğü gösterildi (Atkinson ve Leiter, 1999). Gözlemlenen bu etkinin moleküler mekanizması henüz tam olarak aydınlatılmamış olsa da VIP'nin immün regülatör bir molekül olarak regülatör T hücrelerini etkilediği ve sitokin profilini inflamatuvar tipten (Th1) antiinflamatuvar tipe (Th2) dönüştürdüğü düşünülmektedir. Bunun dışında NOD farelerde insan şögren sendromundaki gibi salgı sekresyonunda azalma ve ekzokrin bezlerde bir infiltrasyon vardır (Cha ve ark., 2002; Gallegos ve Bevan, 2004; Herrera ve ark., 2006). İnsan VIP geni taşıyan rAAV-2 gen tedavi vektörünün (rAAV2hVIP) submandibular bezlere lokal uygulanması, immün baskılayıcı bir etki göstererek ilgili sendromunun ana belirtilerinde düzelmeye sebebiyet verdi (Kok, Yamano, ve ark., 2003). VIP uygulamasının etkili olduğu inflamatuvar hastalık grubundan bir diğeri de romatoid artritdir (RA). Romatoid Artrit (RA) sinovyal hücrelerin kontrolsüz üremesiyle karakterize yangısal bir hastalıktır (Kok, Baum, ve ark., 2003). Bu bağlamda kontrolsüz çoğalan sinovyositleri ortadan kaldırmaya yönelik deneysel gen tedavisi metodları geliştirilmeye çalışılmaktadır (Lodde ve ark., 2006). Bugün için klinik RA tedavisinde denenmiş TNF alfa inhibitörlerinin, sistemik immün baskılama gibi ciddi yan etkileri mevcuttur. Bunun yerine antiinflamatuvar özelliklerinden yararlanmak üzere deneysel RA modeli olan kolajen indüklemeli artrit modelinde (CIA) VIP'nin terapötik etkileri araştırıldı. VIP peptidi uygulamasının CD4+, CD25+ regülatör T hücreleri yoluyla CIA modelinde yararlı etkilerinin olduğu gösterildi (Bisgin ve ark., 2010). Sonrasında, peptid yerine VIP kodlayan lentiviral vektörler



(LentiVİP) intraperitoneal verilerek lenf nodları ve eklemlerde CD4+, CD25+, FoxP3+ regülatör T hücrelerinin indüklendiği, IL-10 ve TGF beta senteziyle karakterize antiinflamatuvar bir Treg cevabının oluştuğu belirlendi. Böylelikle, LentiVİP vektörler antijen spesifik otoreaktif efektör Th1/Th17 hücrelerin aktivasyonu sonrasında gelişen CIA'ın yangısal fazını inhibe ederek terapötik bir etkinlik göstermiş oldu (Terzioglu ve ark., 2007). VİP'nin yararlı koraner vazodilatatif etkisinin yanında, hem vasküler (Gonzalez-Rey, Fernandez-Martin, ve ark., 2006), hem de akciğer (Delgado ve ark., 2008) düz kas hücrelerinde antiproliferatif etkisi de vardır. Nitekim VİP yoksun fareler bariz bir pulmener arteryel hipertansiyon (PAH) tablosu sergiler (Hultgardh-Nilsson ve ark., 1988). PAH hastalarının kan serumunda ve akciğerlerinde yetersiz VİP bulunması ve VİP inhalasyonunun hastalarda yararlı etkilerinin gözlemlenmesi üzerine, VİP'nin PAH tedavisinde kullanılabilir bir ajan olabileceği ortaya atıldı (Maruno ve ark., 1995). VİP'nin vasküler hücre proliferasyonunu inhibe edici etkisi ve PAH hastalarında bir yararının görülmesi üzerine; adenoviral vektörler kullanarak sürekli VİP sentezi sağlamanın (Said ve ark., 2007), peptidi kendi başına kullanmaya oranla daha etkin bir tedavi stratejisi olabileceği hipotezi ortaya atıldı. Nitekim adenovirus aracılı VİP gen transferiyle, sıçan aortik ve pulmener arteryel düz kas hücre proliferasyonunu inhibe ederek PAH tedavisinde yeni ve etkin bir tedavi stratejisi olabileceği gösterildi (Ohno ve ark., 1994). Ayrıca lentivirus aracılı VİP gen naklinin de DIO deney hayvan modelinde serum trigliserid ve kolesterol seviyelerini düşürmenin yanı sıra, insülin duyarlılığı ve glukoz toleransını geliştirerek STZ indüklü diyabete karşı bir koruma sağladığı gösterildi (H. M. Tasyurek, Eksi, ve ark., 2018).

Neticede biz de bu amaçla VİP genini lentiviral vektörler içerisine klonladık. Sonrasında bu vektörlerin çoklu-düşük doz STZ indüklemeli diyabetik deney hayvan modelinde etkilerini test ettik.

### 3. GEREÇ ve YÖNTEM

#### 3.1. İnsan VİP Geni Kodlayan Lentiviral Vektörlerin Oluşturulması

##### 3.1.1. Giriş Vektörlerinin Hazırlanması

İnsan vazoaktif intestinal peptit (VİP) geninin açık okuma çerçevesini içeren plazmid Invitrogen ORF Klon kütüphanesinden seçildi (Invitrogen, IOH80326). VİP kodlayan sekans 513 bp uzunluğunda olup, Kanamisin dirençlilik geni içeren bir pENTR(tm)221 giriş vektörüne klonlanmış olarak, *E.coli* bakterisi içerisinde agara gömülmüş olarak tedarik edildi. İlk olarak bakteri, kanamisin içeren LB Agar petrilere çizgi ekim yöntemi ile ekildi. Bir gece 37°C'de inkübe edilen petrilere üreyen bakterilerden tek düşen koloniler seçildi ve sıvı mini kültürler (50 µg/ml konsantrasyonda Kanamisin içeren LB Broth) inoküle edildi. Mini kültürler 12-16 saat süreyle 37°C'de çalkalamalı inkübatörde bırakıldıktan sonra her bir koloniden gliserol stoklar oluşturuldu ve -80°C'de saklandı. Kalan mini kültürler daha büyük ölçekte üretim amacıyla yine kanamisin içeren 100 ml sıvı besiyerine inoküle edildi. Gece boyu inkübe edilen bakteriyel hücre kültürlerinden Invitrogen Purelink HiPure Plasmid Midiprep Kit (Cat No. K2100-05) kullanılarak plazmid izolasyonu gerçekleştirildi.

##### 3.1.2. Lentiviral Ekspresyon Vektörünün Oluşturulması

VİP ORF plazmidlerinin izole edilmesinden sonra, pLentiVİP lentiviral ekspresyon klonunun oluşturulması amacıyla Gateway Teknolojisi kullanıldı. Bu amaçla, Virapower Hiperform Lentiviral Gateway Expression Kit (Invitrogen, K5330-00) kullanılarak pLenti6.3/V5-DEST Gateway vektörüne VİP transgeni klonlandı. Bu destinasyon vektörü taşıdığı bazı özellikler dolayısıyla, kullanışlı bir gen aktarım aracı olarak belirlendi. Örneğin, ilgilenilen genin hemen ardına yerleştirilen Woodchuck Hepatitis Virusundan elde edilmiş Woodchuck Posttranscriptional Regulatory Element (WPRE), transgen ekspresyonunun artmasına olanak sağlamaktadır. Ek olarak HİV-1 integras geninden elde edilmiş Polypurine Tract (cPPT), konakçı hücre genomuna entegre olan lentivirus kopya sayısını arttırarak protein ekspresyonunda iki kat artış sağlamaktadır. Ayrıca, destinasyon vektöründe yer alan CMV promotörü memeli hücrelerinde ilgilenilen genin yüksek miktarda ve belirgin düzeyde ekspresyonunu sağlamaktadır. Ekspresyon

klonunu oluşturmak amacıyla (transfer plazmidi), Gateway LR Clonase II Enzyme Mix aracılığıyla, kitin önerdiği protokole bağlı kalınarak LR rekombinasyon reaksiyonu kuruldu. Reaksiyon karışımı OneShot Stbl3 Chemically Competent *E.coli* bakterilerine transforme edildi. Ampisilin içeren LB agar petrilere yapılan ekim sonrası transformantlar seçildi. pENTR gus vektörü pozitif kontrol olarak kullanıldı. Seçilen kolonilerden kurulan mini kültürlerden mini prep plazmid izolasyonu Qiagen Plasmid Mini Kit (Cat No. 12125) ile gerçekleştirildi. EcoRI ve XhoI ile yapılan ikili restriksiyon enzim kesimi ile doğru boyutta kesilmiş fragment taşıyan koloniler tanımlandı.

Paketleme için gerekli olan gag/pol (pMDLg/pRRE (HIV-1 pGag-Pol 12251), rev (pRSV-Rev 12253) ve VSV-G (pMD2.G (pVSV-G 12259)) kodlayan farklı plazmidler Addgene firmasından bakteri kültürü içerisinde tedarik edildi. Bunlarla birlikte beta galaktosidaz kodlayan LentiLacZ vektörünün oluşturulması amacıyla da LV-LacZ Plazmidi (Plasmid 12108) addgene firmasından tedarik edildi. Tüm plazmidler lentiviral vektör üretiminde kullanılmak üzere yüksek miktarda bakteri kültüründe çoğaltıldıktan sonra, Qiagen MegaPrep kiti (Cat No:12183) kullanılarak izole edildi.

### **3.1.3. Lentivirus Üretimi**

Lentiviral vektörlerin üretimi için, ilk olarak 293T hücreleri %10 FBS, %1 Pen+Strep içeren DMEM (4.5 g/L D-glucose, 4 mM L-glutamine, sodyum pirüvat) besiyerinde, CellStar® T-175 cm<sup>2</sup> flasklarda (Cat No: 660175, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Germany) çoğaltıldı. Daha sonra hücreler, 1700 cm<sup>2</sup> yüzey alanına sahip tırtıklı dönen şişelere (Cell Master™ roller bottles Cat No: 681 062, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Germany), her birine 80x10<sup>6</sup> 293T hücre olacak şekilde pasajlandı. 24 saat süreyle 0.3 rpm hızda döndürülerek şişe iç yüzeyine yapışması sağlanan 293T hücreleri, ek olarak 12-16 saat süreyle 1 rpm hızda HERAcell 240i CO<sub>2</sub> inkübatörde (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) inkübasyona bırakıldı. LentiVİP plazmidi, paketleme plazmidleriyle belirli oranlarda karıştırıldıktan sonra dönen şişelerde üreyen 293T hücrelerine kalsiyum fosfat yöntemiyle transfekte edildi. Transfeksiyondan 8 saat sonra besiyeri aspire edilerek, 200 ml %10 FBS, %1 Pen+Strep içeren hasat besiyeri (OPTI-MEM, Invitrogen) hücrelere eklenerek 2.5 gün süreyle 1 rpm hızda, 37°C, %5

CO<sub>2</sub>'li inkübatörde lentiviral vektör üretiminin gerçekleşmesi sağlandı. Viral süpernatant, 2,000G'de 15 dakika süreyle yapılan santrifüj yardımıyla ve ardından 0.45 um filtreden geçirilerek hücre debrisinden arındırıldı. Konsantre edilmemiş virus solüsyonu 6 farklı ultrasantrifüj tüpüne (polyallomer ultracentrifuge tubes, Beckman Coulter, Cat No.326823) her birine 30 ml olacak şekilde dağıtılarak sükröz cushion yöntemi ile 25,000 rpm hızda +4°C'de 2 saat 30 dakika süreyle Beckman Coulter Optima L- 90 K ultrasantrifüj cihazında ultrasantrifüje tabi tutuldu. Süpernatantların aspire edilmesinin ardından her bir tüpe 100 ul HBSS eklenerek tüplerin ağzı parafilmlelenerek bir gece süreyle +4°C'de beklemeye bırakıldı. Ertesi gün pelletler pipetaj yardımıyla yeniden süspanse edilip ve mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı. Viral stoklar 50-100 ul olarak alikotlandıktan sonra titrasyon öncesinde -80°C'de saklandı. LentiLacZ vektörü de açıklanan protokollerin uygulanmasıyla üretildi.

#### **3.1.4. Lentiviral Vektörlerin Q-PCR'la Fonksiyonel Titrasyonu**

Lentivirus ile transdükte edilmiş HT1080 hücrelerinde (ATCC® CCL-121TM) genoma entegre kopya sayısını belirlemek üzere qPCR reaksiyonu kuruldu. Transfer vektöründe bulunan WPRE (woodchuck hepatit virus posttranskripsiyel regülatör element) transgen mRNA'sının posttranskripsiyonel düzenlenmesinde görev alarak transgen ekspresyonunu 2 ile 5 kat kadar arttıran bir dizidir. Dolayısıyla lentiviral vektörlerle transfekte hücrelerde WPRE primerleri ile yapılacak bir PCR'da sadece genoma entegre kopyalar çoğaltıldı. Böylece üretilen lentivirusların hücreleri transdükte etme yeteneği bu kopya sayıları baz alınarak değerlendirilir. qPCR reaksiyonları için, WPRE primerleri (Fwd: 5'-CCGTTGTCAGGCAACGTG-3'; Rev: 5'-AGCTGACAGGTGGTGGCAAT -3') viral genomun miktar tayini için kullanılırken, Albümin primerleri (Fwd: 5'-GCTGTCATCTCTTGTGGGCTGT- 3'; Rev: 5'-ACTCATGGGAGCTGCTGGTTC -3') internal kontrol olarak kullanıldı. Standart eğrinin eldesi için, daha önce Addgene şirketinden alınmış olan albümin plazmidinin farklı konsantrasyonları kullanılmıştır. qPCR reaksiyonu Quantitect SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Cat No: 204143) kullanılarak ABI 7500 Fast Real-Time PCR cihazında gerçekleştirildi.

### 3.2. Lentivirusların İn Vitro Fonksiyonellik Analizleri

İn vitro VİP miktarının ölçümü için HepG2 hüclerine transdüksiyon gerçekleştirildi ve VİP EIA kiti kullanıldı. HepG2 hüclerleri 24 kuyulu petrilere her bir kuyuya 50.000 hücre olacak şekilde ekildi ve 24 saat 37°C’de inkübe edildi. Hüclerler artan dozlarda (Multiplicity of İnfection-MOI) lentivirus ile polybrene varlığında enfekte edildi ve besiyeri değiştirilmeden önce 24 saat süreyle inkübe edildi. LentiVİP ile transdükte edilmiş HepG2 hüclerlerinin süpernatantları ELISA için toplandı ve dipeptidyl peptidaz IV inhibitörü eklenerek saklandı. Süpernatantlar önceden anti-VİP monoklonal antikoruna ile kaplanmış kuyucuklara yüklendi. İnkübasyon sonrası kit içeriğinde verilen bağlanma reaksiyonunu tanıyacak konjugat solüsyonu ve florokrom substrat eklenmesi sonrasında oluşan reaksiyonun florometrik analizi ile transdükte hücre örneklerindeki aktif VİP miktarı saptandı.

Üretilen vektörünün in vitro koşullarda pankreatik hüclerlerinden glukoz duyarlı insülin salınımını arttırıp arttırmadığını test etmek için LentiVİP ile transdükte edilmiş Min6 hüclerleri artan glukoz konsantrasyonlarına maruz bırakıldıktan sonra hücre süpernatantları toplanarak salınan insülin miktarı insülin ELISA testi ile tespit edildi. Min6 hüclerleri (Prof. Dr. Jun-ichi Miyazaki’nin hediyesi, Japonya) 96 kuyulu petrilere her bir kuyuda  $1 \times 10^5$  Min6 hüclresi olacak şekilde ekildi ve bir gece hücre kültür inkübatöründe bekletildi. Daha sonra Min6 hüclerleri artan MOI oranlarında (5, 25 ve 100) LentiVİP veya LentiLacZ (100 MOI) ile polybrene varlığında transdükte edildi. Glukoz indüklü insülin salınım testini gerçekleştirmek için, lentivirus ile transdükte edilmiş Min6 hüclerleri PBS ile yıkandıktan sonra glukozsuz Krebs Ringer Buffer (KRB) da bekletildi. Tüm kuyular bazal glukoz eşitlemesi için, 2.8 mM glukoz içeren KRB tamponunda 30 dakika 37°C’de preinkübasyona bırakıldıktan sonra hüclerler üzerindeki sıvılar uzaklaştırıldı ve hüclerler glukozsuz KRB ile yıkandı. Daha sonra hüclerlere 0, 2.8 veya 25 mM glukoz içeren farklı KRB tamponlarından 250 ul eklenerek hüclerler 1 saat süreyle 37°C’de inkübe edildi. Süre sonunda süpernatantlarda salınan insülin miktarının tespiti için Ultra Sensitive Mouse insülin ELISA kit (CrystalChem, Cat No: 90080) kullanarak ELISA deneyi gerçekleştirildi. Deney sonuçları kontrol olarak kullanılan LentiLacZ sonuçları ile kıyaslanarak yorumlandı.

### **3.3. Deney Hayvanı Çalışmaları**

Akdeniz Üniversitesi Deney Hayvanları Ünitesi'nden tedarik edilen iki farklı sıçan modelinde Tip 1 Diyabet modeli oluşturma çalışmaları gerçekleştirildi. 4 haftalık erkek Sprague Dawley ve Wistar sıçanlar herhangi bir besin kısıtlaması olmadan ad libitum standart yem ve su ile beslendi. İki farklı sıçan türünde kontrol ve deney grupları ayrıldı. Tip 1 diyabet oluşturmak için adacık hücrelerinin tahribatıyla birlikte otoimmüniteyi indüklemeyi de hedeflediğimizden, deney grubu sıçanlara 5 gün art arda 30 mg/kg Streptozotosin (STZ) uygulandı. Yarı ömrü oldukça kısa olan STZ kimyasalı enjeksiyondan hemen önce 0.01 M, pH 4.5 sitrat tamponunda çözündürülerek, ağırlık ve kan glukoz değerleri kaydedilen 5 haftalık Sprague Dawley ve Wistar sıçanlara intraperitoneal yolla enjekte edildi. Sıçanların periyodik kan glukoz değerlerinin ölçümü Abbott FreeStyle glukoz stripleri ve Abbott glukometre ile gerçekleştirildi. Deneysel çalışmalar Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Bakım ve Kullanım Komitesinin düzenlemelerine uygun olarak gerçekleştirildi. Deney süresi sonunda sıçanların sakrifikasyonu anestezi altında gerçekleştirildi ve intrakardiyak enjeksiyon yoluyla alınan kan örneklerinin serumları ayrıştırıldıktan sonra analizlerde kullanılmak üzere saklandı. İntraduktal yolla PBS verilerek sıçanların pankreas dokularının kandan arındırılması ve şişirilmesi sağlandı. İzole edilen pankreaslar; fiksatif ve alkol solüsyonlarından geçirilerek doku takibi işlemlerine tabi tutuldu ve immünohistokimyasal analizlerde kullanılmak üzere parafine gömülerek saklandı.

#### **3.3.1. Kan Glukoz Tayini**

STZ indüklü T1DM modeli oluştururken takip edilmesi gereken en önemli etkenlerden biri kan glukoz seviyeleridir. Bunun için kan glukoz seviyeleri sıçanların kuyruk veninden alınan kanda AccuCheck Kompakt Glukometre (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) yardımıyla ölçüldü. AccuCheck Kompakt cihazının ölçüm aralığı 10-500 mg/dL olup, 500 mg/dL'den büyük olan her ölçüm HI göstergesi vermektedir. Bu sebeple HI olarak okunan değerler 500 mg/dL olarak kaydedildi. STZ enjeksiyonunu takiben, kan glukoz seviyeleri ve olası ağırlık kayıpları periyodik olarak ölçülerek, iki defa üst üste 250 mg/dL değerinin üzerinde kan glukoz ölçümü veren sıçanlar diyabetik olarak değerlendirildi. Tokluk glukoz ölçümleri, sıçanların farklı saatlerde farklı beslenme

alışkanlıkları nedeniyle gerçekleşebilecek değişikliklerin elimine edilmesi amacıyla, öğleden sonra ilk saatlerde, sıçanların tamamen tok oldukları zamanlarda yapıldı.

### **3.3.2. İntraperitoneal Glukoz Tolerans Testi**

Diyabet gelişiminde değişen parametrelerden birisi de glukoz toleransıdır. Besinlerle alınan glukozun regülasyonu sırasında glukoz miktarına bağlı olarak insülin salınımının düzgün gerçekleşmesi ile kandaki glukozun belirli bir süre içerisinde temizlenmesi gerekmektedir. Ancak glukoz toleransının bozulmaya başladığı durumlarda yüksek miktarda alınan glukoz kandan beklenen süre içerisinde yeteri kadar temizlenemez. Bu değerlerin ne şekilde değiştiğinin belirlenmesi amacıyla, sıçanların gece boyu aç bırakıldıktan sonra (12-16 saat) %40 glukoz içeren solüsyon (2mg/g vücut ağırlığı) intraperitoneal yolla (IP) enjekte edildikten sonra 0, 30, 60, 90 ve 120. dakikalarda kuyruk venasından alınan kan örneklerinde glukoz (Accu-Check Go, Roche) ölçümleri yapıldı. Elde edilen değerlerin zamana bağlı değişimi kontrol grubundaki sıçanlarla karşılaştırılarak diyabet indüklenen sıçanların glukoz toleransındaki değişim değerlendirildi.

### **3.3.3. İmmünohistokimyasal Çalışmalar**

T1DM modelin oluşturulmasına yönelik yapılan çalışmalar sonucunda adacıklardaki pankreatik beta hücrelerinin tahribatının analizi için sıçanlar STZ enjeksiyonundan 30 gün sonra sakrifiye edildi. Pankreas dokularının formalin ile fiksasyonunu takiben, parafine gömülü dokulardan alınan kesitlerde hematoksilin & eosin (H&E) boyaması ve poliklonal tavşan anti-insülin antikoru (Abcam, Cat No. Ab63820) ile insülin boyaması gerçekleştirildi. Beta hücre alan ölçümü ise preperatların Olympus IX81 motorize inverted floresan mikroskopu kullanılarak, insülin pozitif ve total pankreas alanların Image J yazılımı (National Institutes of Health, Bethesda, MD; <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) ile hesaplanarak ölçüldü. İnsülin pozitif alanların tüm pankreasa oranı hesaplandıktan sonra kontrol grubu sıçanların insülin pozitif alanları ile kıyaslanarak STZ sonrası kaybolan adacık miktarı belirlendi.

### 3.4. Üretilen Vektörlerin Oluşturulan Modellerde *In Vivo* Terapötik Etkinliğinin Test Edilmesi

Yapılan denemeler sonucunda optimize edilen dozlarda STZ uygulaması sonucu diyabetik hale getirilen sıçanlardan 10 tanesi, diyabetik kontrol grubu olarak ayrıldı. LentiVİP ve LentiLacZ vektörlerinin her biri için 10'ar hayvan olmak üzere 20 diyabetik sıçan 2 gruba ayrıldı. Her bir sıçana, ait olduğu grubu ifade eden vektörler (LentiVİP veya LentiLacZ), STZ enjeksiyonunu takip eden 5. günde intraperitoneal yolla  $10^{10}$  TU enjekte edildi. Tüm deney planının kontrolü olarak da 10 sıçan sağlıklı kontrol grubu olarak değerlendirildi.

STZ uygulamasının ardından 3. ve 5. günlerde gerçekleştirilen kan glukoz takiplerinde 250 mg/dl ve üzeri değerlere sahip sıçanlar diyabetik olarak değerlendirildi. Nitekim diyabetik gruplara enjeksiyon sonrası 5. günde LentiVİP ve LentiLacZ uygulamaları gerçekleştirildi. Kan glukoz seviyeleri, ağırlıkları, sağ kalım oranları ve glukoz tolerans değerleri ölçülerek LentiVİP uygulamasının bu parametrelerdeki etkileri takip edildi.

Sakrifiye edilen sıçanlardan izole edilen dokular fikse edildikten sonra parafin kasetlere gömüldü. Parafine gömülü dokulardan 4 um kalınlığında alınan kesitlerde, deparafinizasyon işleminin ardından TRIS-EDTA pH 9.0 solüsyonu ile antijen retrieval işlemi gerçekleştirildi. Peroksit bloklama ve protein bloklama işlemleri EXPOSE Rabbit spesifik HRP/DAB detection IHC kit (Abcam, ab80437) kullanılarak gerçekleştirildi. Kesitlere Tavşan poliklonal primer antikoları uygulandıktan sonra  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 1 saat süreyle bekletildi. İnkübasyon süresi sonunda kit içeriğinde bulunan HRP (Horse Radish Peroxidase) konjuge edilmiş keçi anti-tavşan sekonder antikoru uygulandı. 15 dk süreyle sekonder antikora muamele edilen preparatlara DAB Kromojenik Substratı uygulandıktan sonra Hematoksilen ile karşıt boyama yapıldı. İmmünohistokimyasal boyama işlemlerini takiben dehidratasyon işlemleri gerçekleştirilen preparatlarda insülin ve VIP primer antikoları kullanılarak immünohistokimyasal analizler yapıldı. Bu analizler anti-tavşan Expose kit ile gerçekleştirildiğinden tüm primer antikolar poliklonal tavşan kökenli olarak seçildi. Bu antikolar sırasıyla, anti-insülin antikoru (Abcam, Cat No. ab63820) 1/2000 ve anti-VIP antikoru (Abcam, Cat No. ab101959) 1/100 dilüsyon oranlarında kullanıldı. İmmünohistokimyasal boyama yapılan her bir kesit Olympus IX81 motorize inverted florasan mikroskopu kullanılarak görüntülendi ve kaydedildi.



Roller Bottle üretimi ile gerçekleştirilen virus üretimi sonrasında, lentiviral vektörler Wistar sıçanların her birine aynı hacimde enjeksiyon yapılacak şekilde PBS içerisinde sulandırılıp, intraperitoneal olarak enjekte edildi. Enjeksiyonu takiben kan glukoz, glukoz tolerans ve insulin duyarlılık üzerindeki terapötik incelemelerin gerçekleştirilmesinden sonra sıçanlar sakrifiye edildi. Sakrifiye edilen sıçanların, pankreas, karaciğer, dalak, böbrek ve kalp dokusundan 10-25 mg olacak şekilde örnekler toplanarak -80°C'de saklandı. Bu dokuların toplanmasından sonra, -80°C'den çıkarılan dokulardan DNeasy Blood&Tissue Kit (Qiagen, 69506) ile DNA izolasyonu gerçekleştirildi. İzolasyon sonrasında elde edilen DNA örneklerinden, lentiviral kantitasyon amacıyla kantitatif PCR reaksiyonları WPRE primerleri (Fwd: 5'- CCGTTGTCAGGCAACGTG-3' ; Rev: 5'- AGCTGACAGGTGGTGGCAAT -3') ile Quantitect SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Cat No: 204143) kullanılarak hazırlandı. Reaksiyonlar ABI 7500 Fast Real-Time PCR cihazında yürütüldü. Standart eğrisi elde etmek için Albümin plazmidlerinin bilinen konsantrasyonlarında örnekler hazırlanıp, Albümin primerleriyle (Fwd: 5'- GCTGTCATCTCTTGTGGGCTGT- 3' ; Rev: 5'- ACTCATGGGAGCTGCTGGTTC - 3') kurulan reaksiyonların Ct değerleri hesaplanarak standart eğri grafiği oluşturuldu. Tüm örneklerin WPRE Ct değerleri, vektör almamış kontrol hayvanların dokularından elde edilen Ct değerleri ile karşılaştırılarak, verilen vektörün dokulara dağılım yüzdeleri belirlendi.

#### **3.4.1. Serum VIP ELISA**

LentiVIP uygulaması yapılan hayvanların diyabetik durumlarına bağlı olarak devam ettirilen takip süresinin ardından sakrifiye edilen sıçanlardan elde edilen kan serumlarında mevcut VIP seviyeleri VIP ELISA Kit (Sunred, Cat.No. 201-02-0400) kullanılarak belirlendi. Bu kit çift-antikorlu sandviç enzim-bağlı immünosorbent analizi (ELISA) olup kan serumundaki VIP miktarını belirlemede kullanıldı. Kan serum örnekleri, biyotin ile işaretlenmiş VIP antikorları ve Streptavidin-HRP konjugat ajanlarının hepsi daha önceden VIP monoklonal antikoru ile kaplanmış kuyulara eklendi. Örnekler 1 saat 37°C'de inkübe edildikten sonra 5 kez yıkanan kuyulara Kromojen A ve B solüsyonları eklenerek karanlıkta 10 dk süreyle inkübe edildi. Reaksiyonun durdurulmasından sonra 450 nm'de absorbans ölçümleri gerçekleştirildi. Standart konsantrasyona göre alınan OD

değerlerinden elde edilen standart eğrinin denklemi kullanılarak serum VIP seviyeleri hesaplandı. Böylece lentiviral VIP gen nakli ile kontrol gruba kıyasla kandaki VIP peptit seviyelerinin karşılaştırılması mümkün olabildi.

### **3.4.2. Serum CRP, TOS ve TAS Analizleri**

Yüksek duyarlılıkta C-reaktif protein seviyesinin belirlenmesi için CUSABIO ELISA kit kullanıldı (CSB-E07922r, Wuhan, Hubei, China). Deneklerin TOS ve TAS seviyeleri daha önce literatürde açıklandığı şekliyle ölçüldü (Malik vd., 2018; Yaribeygi vd., 2019). Total Oksidan Seviye (TOS) analizi kolorimetrik bir yöntem olup Ferröz (Fe+2) demir kompleksinin Ferrik (Fe+3) demir kompleksine okside olması temeline dayanır. Asidik ortamda ferrik demir renkli bir bileşik oluşturur. Oluşan bu renkli bileşiğin şiddeti spektrofotometre cihazında 600 nm'de ölçüldü. Ölçümün kalibrasyonu için hidrojen peroksit kullandı ve sonuçların birimi  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Equiv./L}$  olarak verildi. Yöntemin varyasyon katsayısı (%CV)  $<5\%$ 'dir. Total Antioksidan Seviye (TAS) kolorimetrik yönteminde ise örnekte bulunan antioksidanların kuvvetli bir oksidan olan koyu mavi-yeşil renkli ABTS ile reaksiyona girerek bu bileşiğin renginde açılmaya neden olur. Bu renkteki açılma spektrofotometre cihazında 660 nm'de ölçüldü. Ölçümün kalibrasyonu vitamin E ile yapıldı ve sonuçların birimi  $\mu\text{mol.Trolox/L}$ 'dir. Yöntemin varyasyon katsayısı (%CV)  $<3\%$ 'dür.

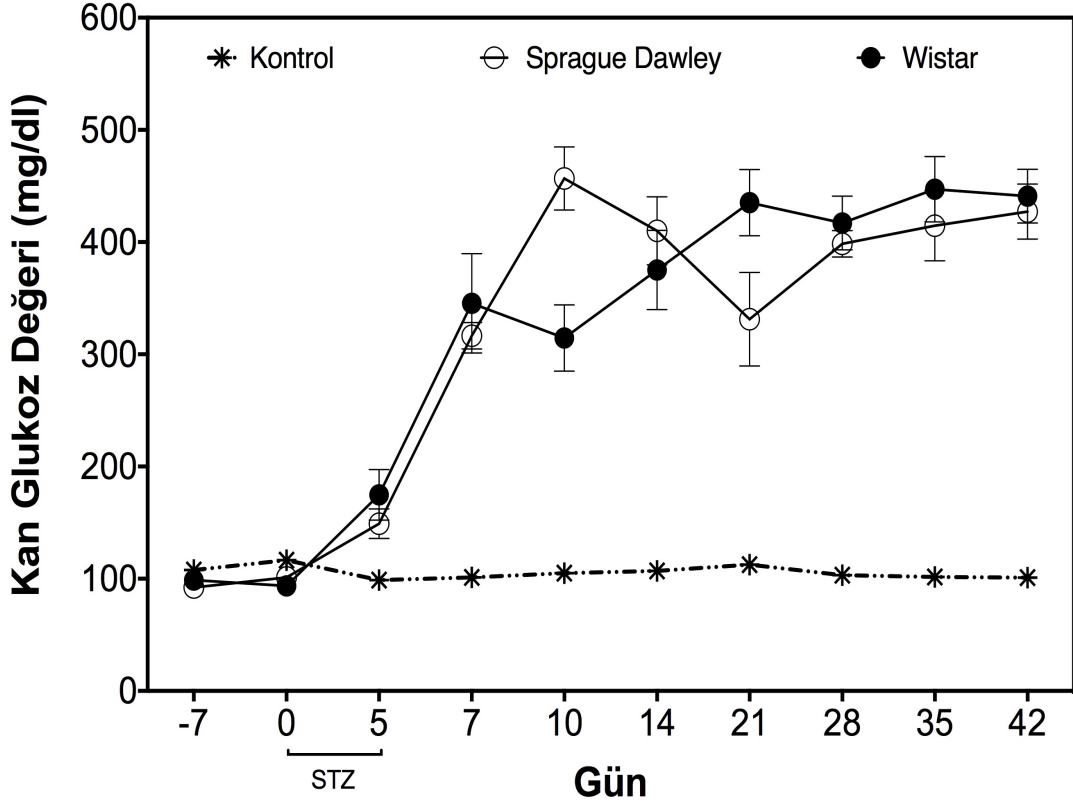
### **3.5. İstatistiksel Analiz**

Sonuçların grafik ifadeleri GraphPad Prism programı kullanılarak gerçekleştirildi. İstatistiksel analizler GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) kullanılarak gerçekleştirildi. Datalar  $\pm$  SEM olarak sunulacak ve P değeri 0.05 olarak değerlendirildi.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Tip 1 Diyabet Deney Hayvan Modeli Oluşturma

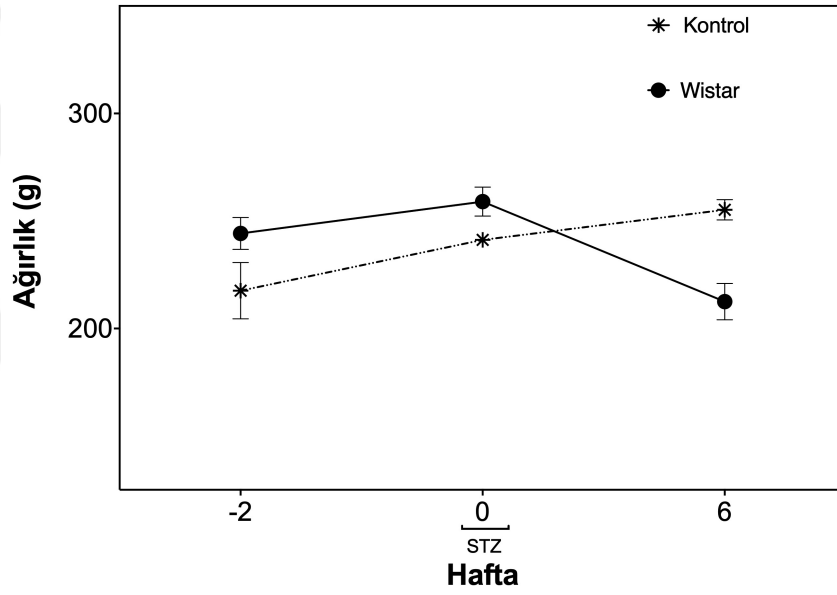
T1DM tedavisinde insülin gen aktarımının terapötik etkinliğinin araştırılması üzerine planlanmış projemizde ilk aşamada T1DM hayvan modelinin oluşturulması amaçlandı. Bu doğrultuda kan şekerini yükseltmek için gerekli adacık hasarı Streptozotosin (STZ) (Sigma-Aldrich (St Louis MO, USA) enjeksiyonu ile sağlandı. Ancak Tip 1 Diyabette adacık hasarı ile birlikte beta hücrelerine T hücre infiltrasyonunun da indüklenmesi gerektiğinden ve tek doz STZ uygulaması ile adacık tahribatı bunu başaramadığından, bunun yerine çoklu doz STZ uygulamaları ile beta hücre hasarının yanı sıra oto-immün hasarın aktivasyonu da hedeflendi. Bu amaca yönelik olarak deney hayvanlarına 5 gün art arda olacak şekilde düşük doz STZ uygulanarak sonuçlar değerlendirildi. Bu amaçla öncelikle iki farklı sıçan türünde 5 doz STZ uygulamasının etkileri incelendi. Wistar ve Spraque Dawley sıçanlarda 5 ardışık gün 30 mg/kg STZ uygulamasının ardından kan glukoz değerlerinin takibi sonucunda, enjeksiyondan bir hafta sonra sıçanlarda hiperglisemi saptandı. 7. gün itibariyle 300 mg/dl'nin üzerine çıkan kan glukoz değerleri, yapılan 6 haftalık takip süresince bu değerin üzerinde kaldı ve uygulamanın her iki sıçan türünde de diyabeti başarıyla indüklediği görüldü. Spraque Dawley sıçanların kan glukoz değerlerinde Wistar sıçanlara göre dalgalanmalar olduğu saptansa da, sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildiğinde Spraque Dawley veya Wistar sıçanların uygulanan STZ enjeksiyonlarına verdikleri yanıtta belirgin bir farklılık olmadığı belirlendi (Şekil 4.1).



**Şekil 4.1** Deneysel Tip 1 Diyabet modeli. 5 ardışık gün 30 mg/kg STZ enjeksiyonu yapılan Wistar (n=8) ve Sprague Dawley (n=5) sıçanların uygulama öncesi ve sonrasında kaydedilen kan glukoz değerleri grafiği (İstatistiksel analiz; One-Way ANOVA: Tukey'in çoklu karşılaştırma testi; Kontrol vs. Sprague Dawley p=0,0014; Kontrol vs. Wistar, p=0,0011; Sprague Dawley vs. Wistar, p=0,9958)

Analizler doğrultusunda, Wistar sıçanların hiperglisemik kan değerlerinin Sprague Dawley sıçanlara göre daha stabil bir seyir izlemesi nedeniyle projeye Wistar sıçanlarla devam edildi.

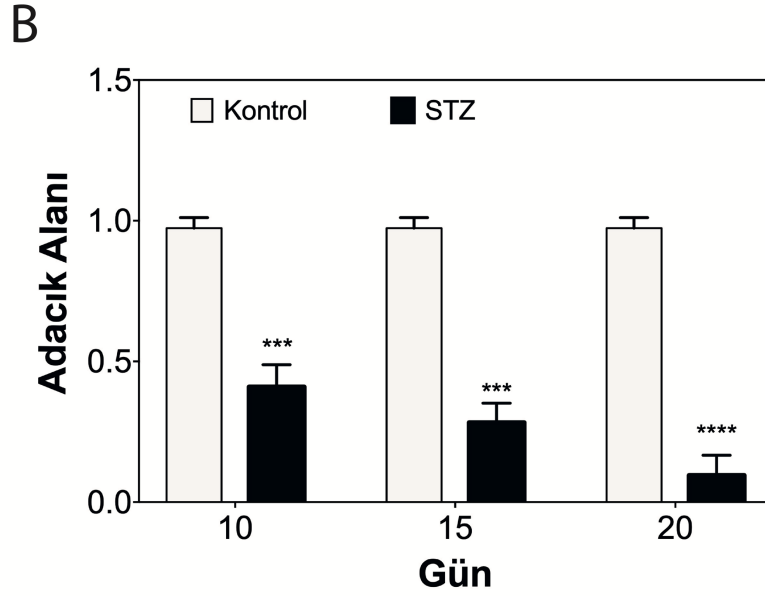
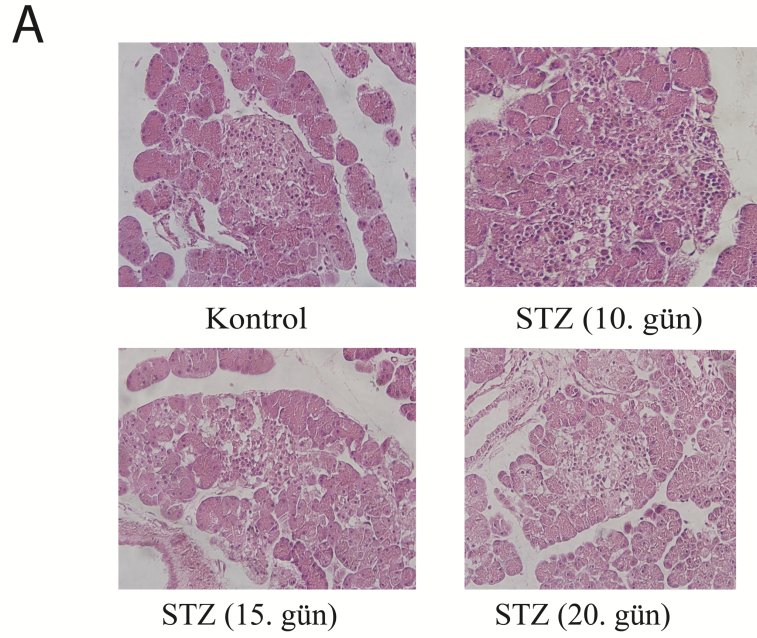
Kan glukoz değerlerinin takip edilmesinin yanı sıra uygulamanın sıçanlarda bir ağırlık kaybına yol açıp açmadığını belirlemek amacıyla uygulamadan 2 hafta önce kaydedilen ağırlıklar, 6 hafta sonunda kaydedilen ağırlıklarla karşılaştırıldı. Bu karşılaştırma sonucunda kontrol grubu sıçanlarında yaşa bağlı ağırlık artışının normal düzeyde devam ettiği gözlenirken, 5 ardışık gün boyunca yapılan 30 mg/kg STZ enjeksiyonuyla, Wistar sıçanlarda ağırlık artışının belirgin düzeyde azaldığı saptandı (**Şekil 4.2**).



**Şekil 4.2** 5 ardışık gün boyunca 30 mg/kg STZ enjeksiyonu yapılan Wistar (n=8) sıçanların uygulama öncesi ve sonrasında kaydedilen ağırlık değerleri grafiği (İstatistiksel analiz; Two-Way ANOVA: Tukey'in çoklu karşılaştırma testi; Kontrol vs. Wistar, p=0,0045)

Ardından diyabetik sıçanlar STZ sonrası 10. 15. ve 20. günlerde sakrifiye edilerek pankreas adacık kaybı ve olası lenfosit infiltrasyonu hematoksilin/eozin boyamayla belirlendi. Yapılan histolojik analizler ardışık düşük doz STZ uygulamasından 10 gün sonrasında beta hücre kitlesinin yarısından fazlasının (%60), 20 gün sonrasında ise büyük bir çoğunluğunun (%90) azaldığını göstermiştir (**Şekil 4.3**).

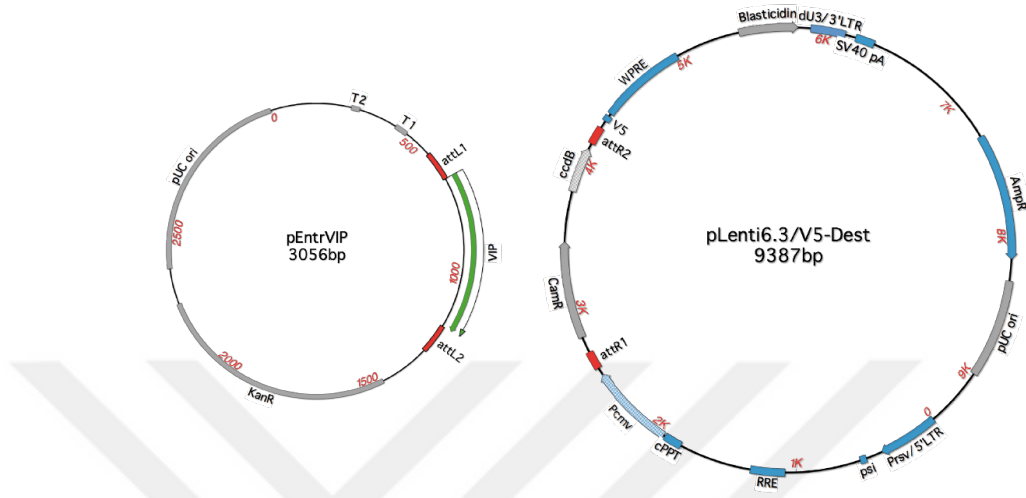
Elde edilen bulgular; düşük doz ardışık STZ uygulamalarının beta hücrelerinin tahribatına sebebiyet vererek, hiperglisemiyi indüklediği ve bu sayede T1DM hayvan modellemesinin başarıyla oluşturulduğunu göstermektedir.



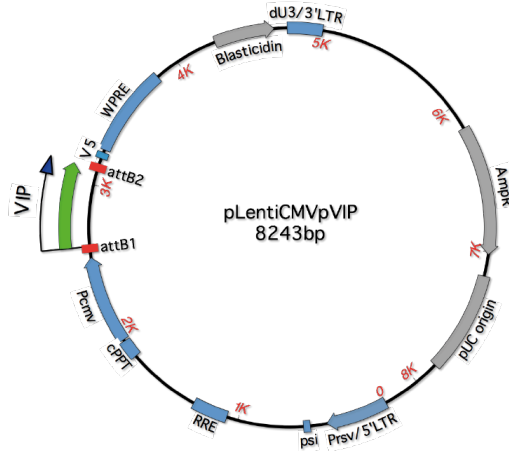
**Şekil 4.3** T1DM modelinde adacık kayıp oranları. 5 ardışık gün 30 mg/kg STZ uygulamasını takiben 10., 15. ve 20. günlerde sakrifiye edilen Wistar sıçanların pankreatik kesitleri. B. STZ uygulaması alan diyabetik sıçanlarda uygulamayı takiben 10. 15. ve 20. günlerde kontrol gruplarına göre adacık alan kaybı. (Two-way ANOVA,  $p < 0.0001$ )

#### **4.2. VİP Geni Kodlayan 3. Nesil Lentiviral Vektörlerin Oluşturulması**

Gereç ve yöntemde anlatıldığı üzere VİP kodlayan HİV tabanlı 3. Nesil lentiviral vektörlerin oluşturulması amacıyla öncelikle Virapower Hiperform Lentiviral Gateway Expression Kit (Invitrogen, K5330-00) kullanılarak pLEnti6.3/V5-DEST Gateway vektörüne VİP transgeni klonlandı. Daha sonra ekspresyon klonunun oluşturulması için (transfer plazmidi), Gateway LR Clonase II Enzyme Mix aracılığıyla, kitin önerdiği protokole bağlı kalınarak LR rekombinasyon reaksiyonu kuruldu (**Şekil 4.4, Şekil 4.5**). Ekspresyon plazmidinin üretilmesinde bakteriyofaj lambdanın bölgeye özgü rekombinasyon özelliği olan (att sites= bağlanma bölgeleri) klonlama stratejisinden faydalanıldı.



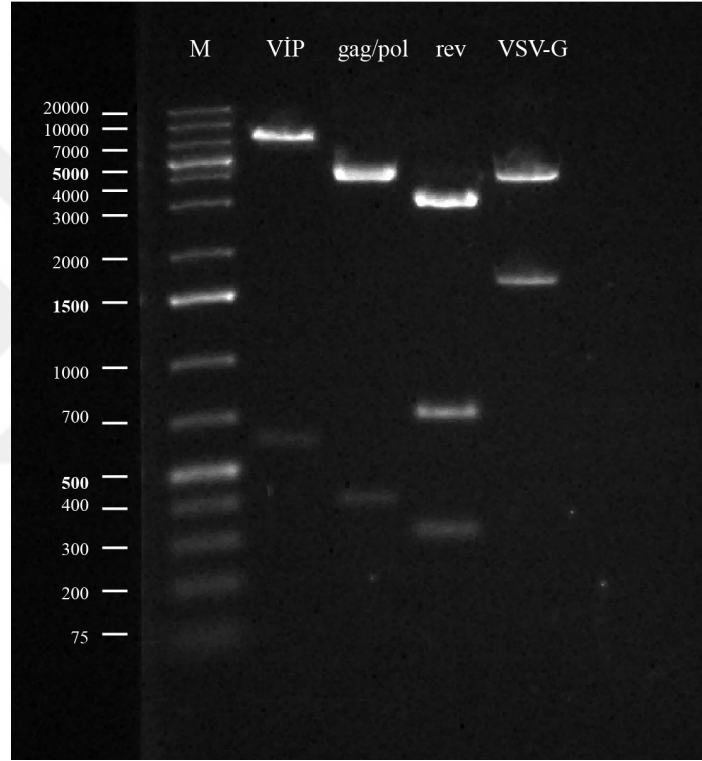
**Şekil 4.4** LxR rekombinasyon reaksiyonu. LR rekombinasyon reaksiyonu, LR Rekombinaz II enzim karışımı (Invitrogen) yardımıyla, destinasyon vektörü üzerindeki attR1/attR2 bölgeleri ve VIP plazmidindeki attL1/attL2 bölgeleri arasında parça değişimini amaçlar. Klonaz enzim karışımının varlığında giriş VIP klonuyla destinasyon vektörünün LxR rekombinasyon reaksiyonu VIP transgenini taşıyan ekspresyon vektörünün (pLentiVIP) oluşumuna sebebiyet verir.



**Şekil 4.5** pLentiVIP ekspresyon klonunun (pLentiVIP) vektör haritası. Giriş VIP klonu ve destinasyon vektörünün LxR rekombinasyonu sonucu oluşan pLentiVIP vektörü üzerinde VIP geninin pozisyonu, HIV tabanlı 3. nesil lentiviral vektör genleriyle birlikte gösterilmiştir.



Tanımlayıcı restriksiyon enzim kesimleri yapılarak (EcoRI ve XhoI) doğru klonlar seçildi. Lentiviral vektör üretiminde kullanılacak diğer 3 adet plazmid vektörünün de benzer şekilde ilgili restriksiyon enzimleriyle kesimi sonrasında %1'lik agaroz jel elektroforezde doğrulaması yapıldı (Şekil 4.6).



**Şekil 4.6** Oluşturulan ve üretilen plazmidlerin restriksiyon enzim analizleri. Sırasıyla pLentiVIP ekspresyon klonunun (EcoRI ve XhoI) ve lentiviral vektör üretiminde kullanılan paketleme vektörlerinin (gag/pol (pMDLg/pRRE-EcoRI), pRSV/Rev (Eco RI, Afl II), VSV-G (pMD2G-Eco RI)) restriksiyon enzim agaroz jel görüntüsü. M: Gene Ruler 1kb Plus.

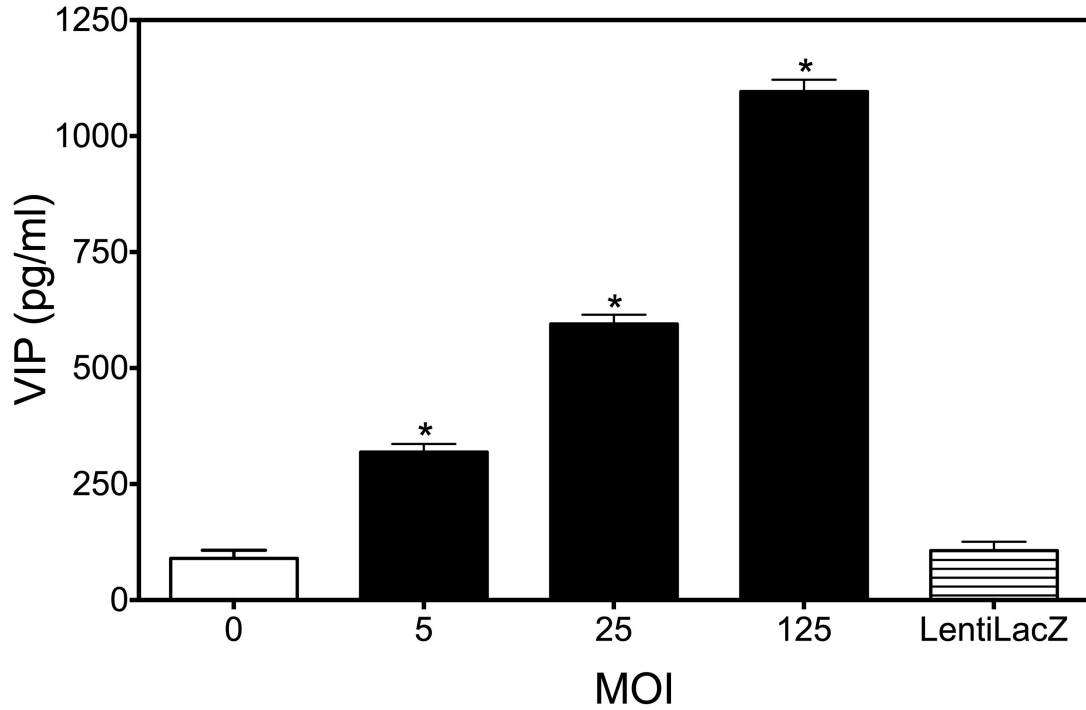
Lentiviral vektör üretimleri, transfer plazmid dahil 4 farklı plazmidin 293T hücrelerine kalsiyum fosfatla naklini esas alan geçici transfeksiyon yöntemiyle gerçekleştirildi. Üretilen lentivirusların sukroz cushion yöntemi yardımıyla saflaştırılarak ultrasantrifüjü sonrasında konsantre viruslar elde edildi (Olgun ve ark., 2019).

Real-Time PCR reaksiyonu Quantitect SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Cat No: 204143) kullanılarak ABI 7500 Fast Real-Time PCR cihazında gerçekleştirildi.

VİP kodlayan lentiviral transfer plazmidin oluşturulmasından sonra (LentiVİP), deneylerimizde kontrol vektörü olarak kullanılmak üzere beta galaktosidaz sentezleyen lentiviral transfer plazmid (LentiLacZ) benzer şekilde inşa edildi.

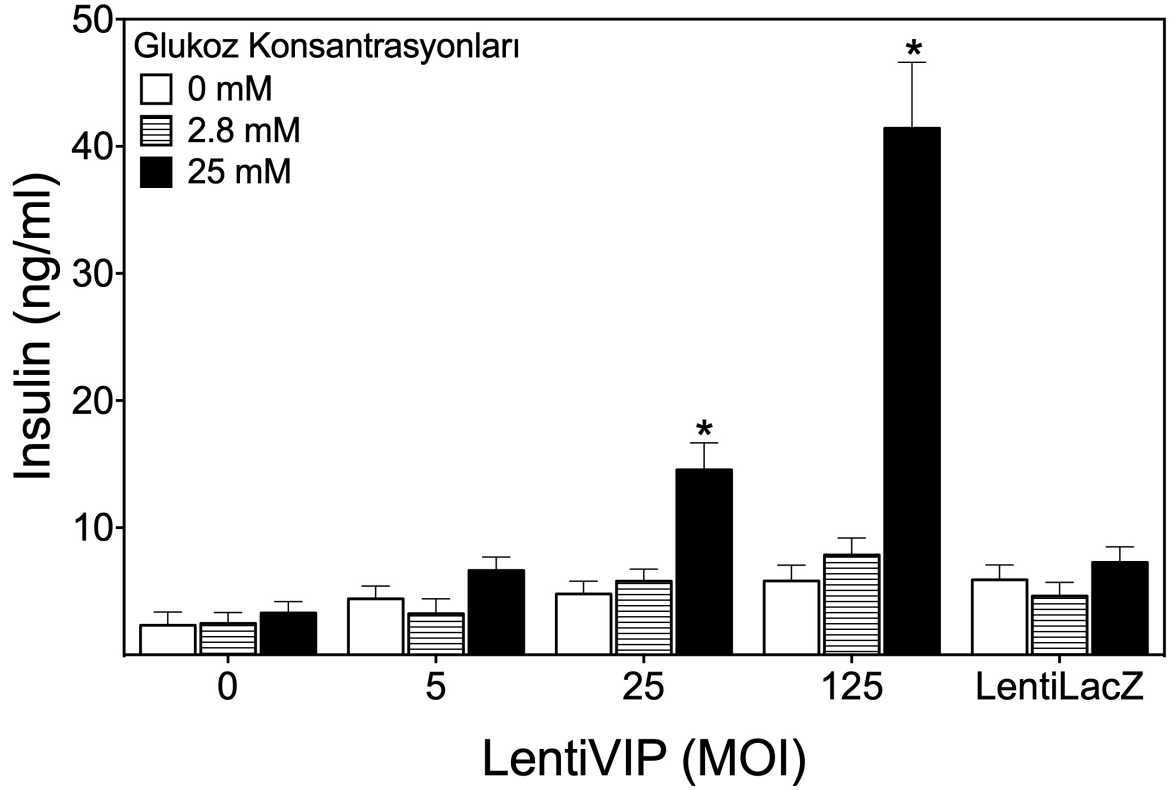
#### 4.3. Lentiviral Vektörlerin İn Vitro Ekspresyon ve Fonksiyon Analizleri

HİV tabanlı 3. Nesil lentiviral vektörlere VİP gen aktarımı sonrasında bu gen nakil vektöründen VİP sentezi yapılabildiğini gösterebilmek için, HepG2 hücrelerine LentiVİP ile transdüksiyonu gerçekleştirildi. VİP ELİSA sonucuna göre HepG2 hücrelerinin artan dozlarda (MOI) LentiVİP ile transdüksiyonu artan miktarlarda VİP sekresyonuna yol açtı (Şekil 4.7).



Şekil 4.7 LentiVİP ile transdükte HepG2 hücrelerinde gözlemlenen VİP sekresyonu (İstatistiksel Analiz One-way Anova, Dunnett Çoklu Karşılaştırma Testi; n=6 (\*\*\*\* p=0.0001))

VİP pankreas beta hücrelerinden glukoz indüklü insülin salınımını tetiklediğinden, yani insülinotropik etkili bir peptit olduğundan, LentiVİP vektöründen sentezlenen VİP'in de aynı etkiyi yapıp yapamayacağını test etmek için glukoz indüklü insülin salınım testi (GSİS) uygulandı. Bu amaçla pankreatik beta hücreleri LentiVİP ve LentiLacZ ile transdükte edildi. LentiVİP enfeksiyonunun LentiLacZ verilmesine oranla Min6 hücrelerinden ancak yüksek glukoz konsantrasyonlarında bariz ölçüde insülin salınımını tetikledikleri açığa çıktı (Şekil 30). Bu da LentiVİP vektöründen sentezlenen VİP'in insülinotropik etkisinin olduğunu gösterir (Şekil 4.8).

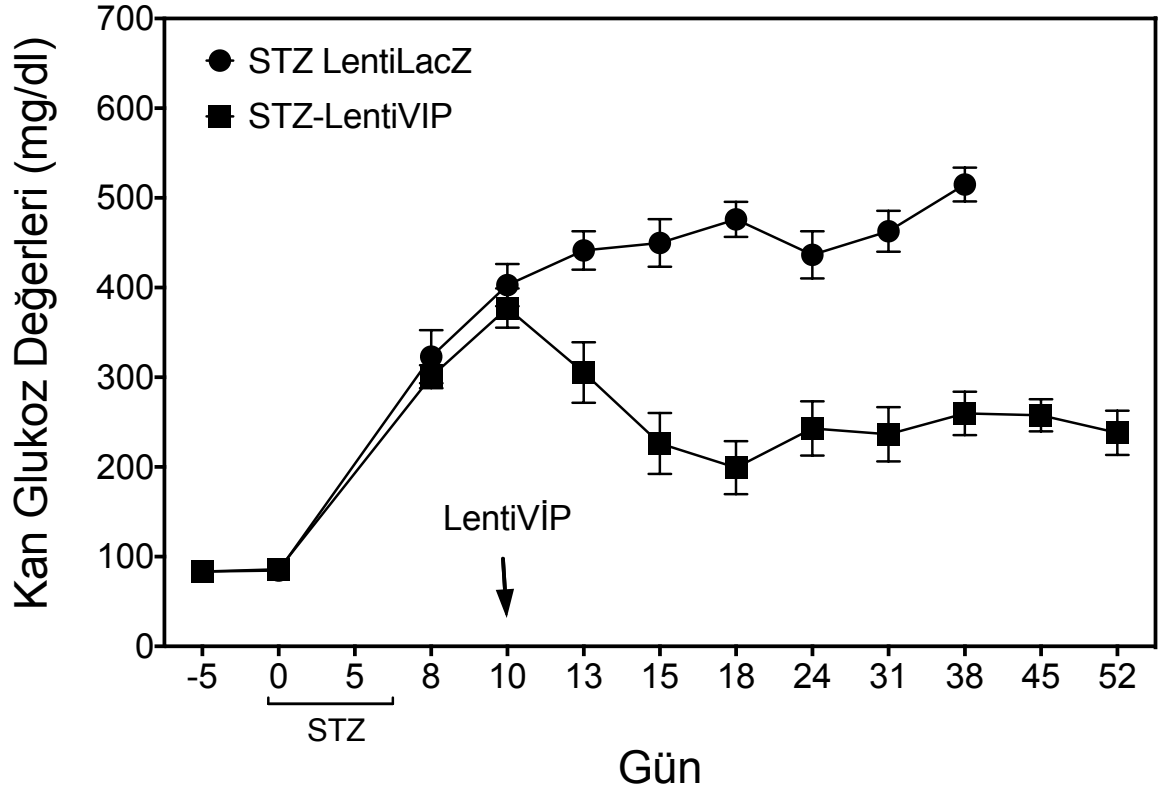


Şekil 4.8 LentiVİP pankreatik beta hücrelerinden insülin sekresyonunu artırır. (İstatistiksel analiz, Two Way Anova  $p < 0.001$ ). LentiLacZ vektörü 100 MOI dozunda kullanılmıştır.

#### 4.4. Lentiviral Vektörlerin *In Vivo* Terapötik Etkinlikleri

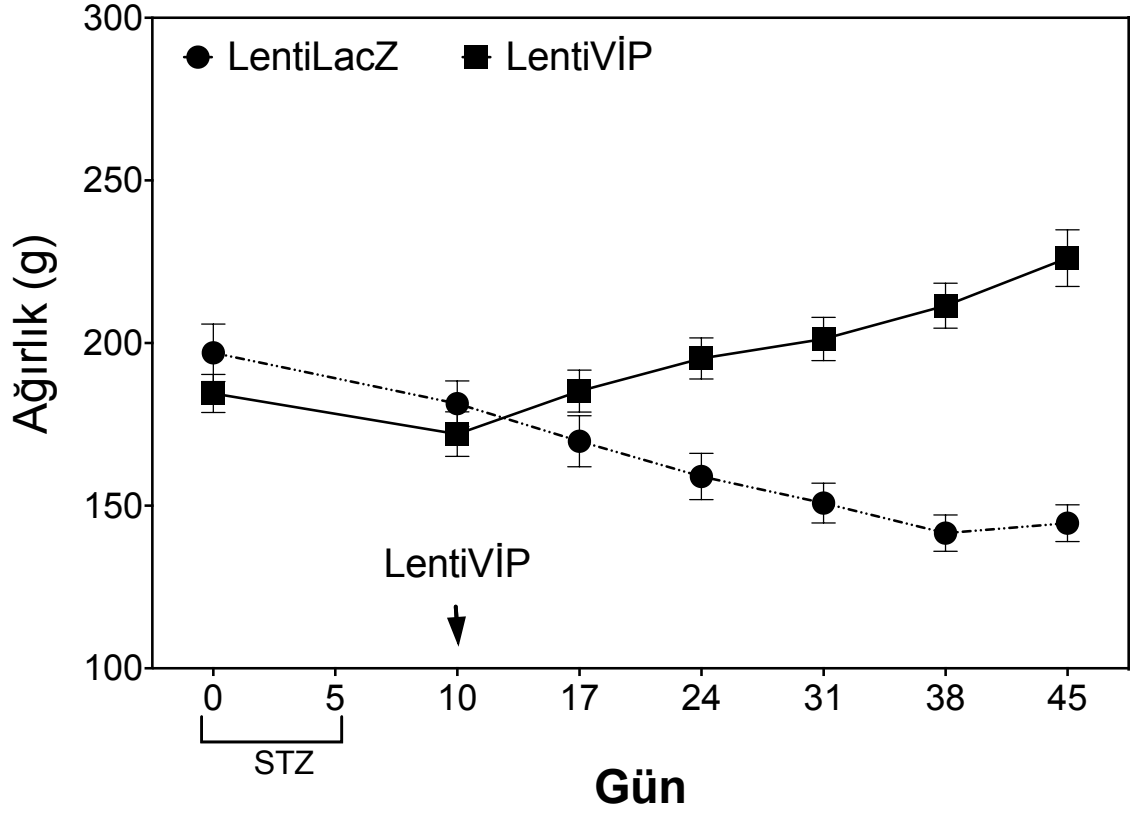
LentiVİP vektörünün in vitro fonksiyonel etkinlikleri belirlendikten sonra ilgili gen nakil vektörünün antidiyabetik terapötik etkinliğinin belirlenebilmesi için deney hayvanları çalışmalarına geçildi.

Tip 1 diyabet oluşturmak için deney grubu sıçanlara 6 haftalıkken 5 gün art arda 30 mg/kg STZ uygulandı. STZ enjeksiyonunun 3. ve 5. gününde diyabet olduğu tespit edilen sıçanlar 2 gruba ayrıldı. Bir gruba terapötik gen taşıyan lentiviral vektörler (LentiVIP) diğer gruba ise beta galaktosidaz geni taşıyan lentiviral vektörler (LentiLacZ) intraperitoneal olarak enjekte edildi. Gen nakli yapılan deneklerin kan şekeri periyodik olarak takip edildi. LentiLacZ vektörü alan sıçanlar takip süresi boyunca diyabet tablosu sergilerken LentiVIP alan diyabetik sıçanların kan şekeri vektör enjeksiyonunu takiben 1 hafta sonra normoglisemik düzeye indi ve takip süresi boyunca normal seyretti (Şekil 4.9).



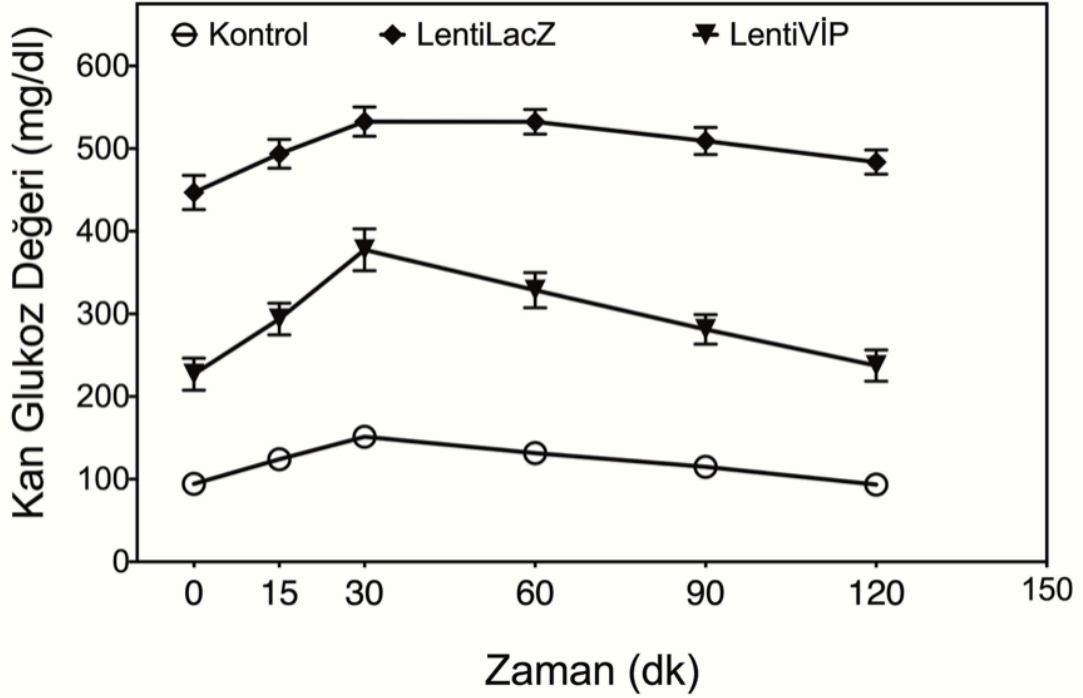
Şekil 4.9 LentiVIP enjeksiyonu Tip 1 diyabetik deneklerde (n=8) kan şekerini düşürür. LacZ vektörü alan denekler ise (n=8) takip süresi boyunca hiperglisemik tablo sergiledi (Mann-Whitney U Test p= 0.0138).

LentiVİP enjeksiyonu yapılmış deneklerle LentiLacZ enjeksiyonu yapılmış denekler ağırlık kazancı açısından karşılaştırıldığında, LentiLacZ enjeksiyonu yapılmış diyabetik deneklerde kilo kaybı söz konusuyken, LentiVİP enjeksiyonu almış deneklerde belirgin bir kilo kazancı gözlemlendi (Şekil 4.10).



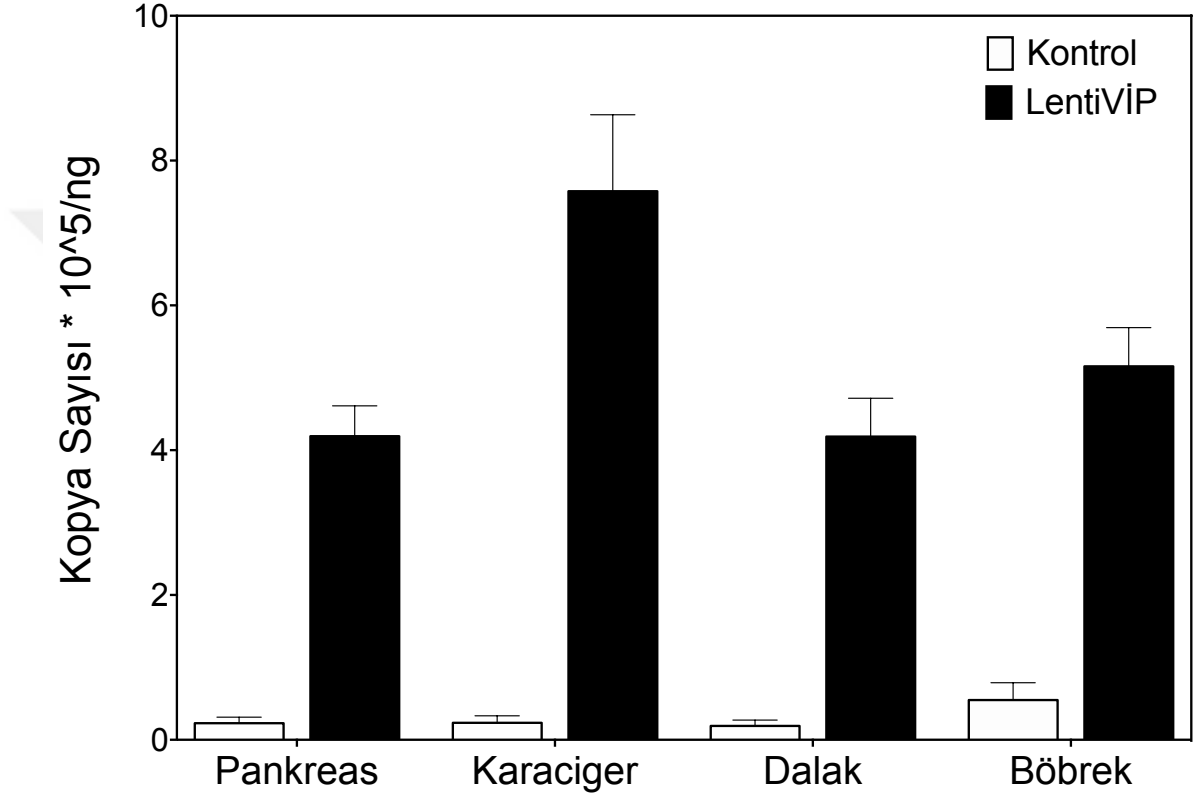
Şekil 4.10 LentiVİP enjeksiyonu STZ almış deneklerde kilo kazancına sebebiyet verdi. 2 way ANOVA testi (Sidak çoklu karşılaştırma testi) gruplar arasında 24 gün ve sonrasında (gen naklinden 2 hafta sonra) istatistiksel bir farkın olduğunu göstermektedir (İstatistiksel analiz, Two way ANOVA,  $p < 0.0054$ ).

Gen nakli yapılan deneklerin glukoz tolerans performanslarını belirlemek için gen naklinden 5 hafta sonra LentiVİP veya LentiLacZ almış her iki grup sıçana 6 saatlik açlık sonrasında İP olarak dekstrozu enjeksiyonu (2 g/kg) yapıldı. Sonrasında bu sıçanların kan glukoz ölçümleri 0., 15., 30., 60., 120. ve 150. dakikalarda kuyruk venalarından alınan kanla glukometre ile belirlendi. LentiLacZ enjeksiyonu yapılmış diyabet denekler kan şekerini temizleyemezken, LentiVİP enjeksiyonu yapılan deneklerde kan glukozunun daha etkin temizlendiği belirlendi (Şekil 4.11).



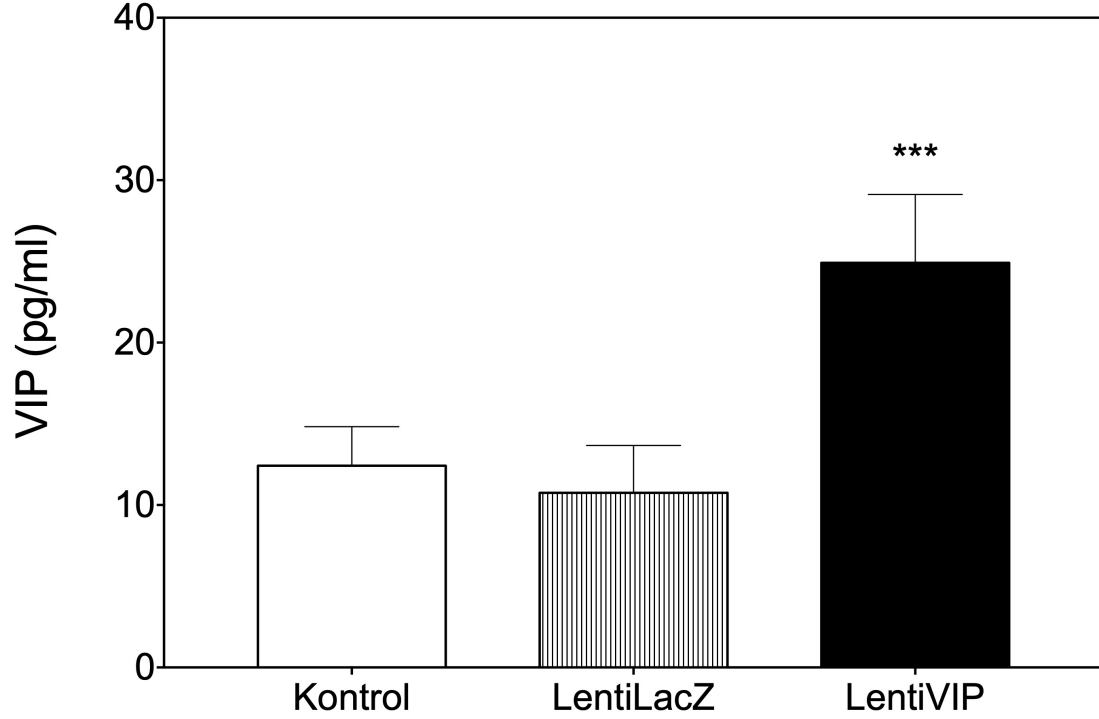
Şekil 4.11 LentiVİP (n=8) veya LentiLacZ (n=8) gen nakli sonrası Tip 1 diyabetik deneklerde glukoz tolerans eğrileri (One-Way Anova ve Tukey's Çoklu Karşılaştırma Testi  $p<0.0001$ ).

İntraperitoneal yolla LentiVIP vektör uygulaması alan sıçanların intraabdominal dokularında lentiviral vektör dağılım profilini gösterebilmek için alınan doku parçalarından DNA izole edilerek qPCR analizi yapıldı ve genomu entegre kopya sayıları belirlendi (Şekil 4.12).



**Şekil 4.12** İntraperitoneal yolla LentiVIP (n=8) vektör uygulaması alan sıçanların intraabdominal dokularında lentiviral vektör dağılım profili. Kontrol sıçanlar (n=5) herhangi bir uygulama yapılmayan hayvanları temsil etmektedir. İntraabdominal dokulardan genomik DNA izolasyonu sonrasında qPCR analizi yapılmış ve lentiviral vektörlerin genome entegre kopya sayıları belirlenmiştir. (p<0.05; Two-way ANOVA)

Gen nakli yapılan deneklerdeki serum VIP seviyesi ELİSA ile ölçülerek diyabetik olmayan kontrol deneklerle karşılaştırıldı. LentiLacZ verilen diyabetik hayvanlarda serum VIP seviyesi oldukça azalırken, LentiVIP verilen deneklerde kontrol gruba oranla yaklaşık 2 kat arttığı belirlenmiştir (Şekil 4.13).



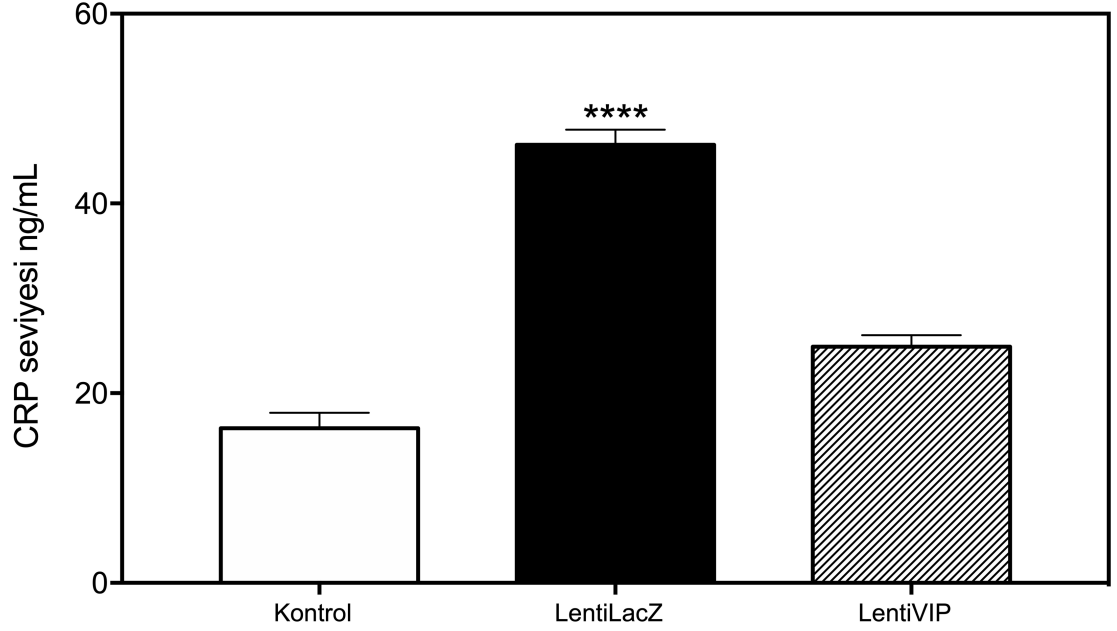
**Şekil 4.13** Gen naklinin serum VIP seviyesi üzerine etkisi. LentiVIP (n=8), LentiLacZ (n=8) vektör enjeksiyonu ve PBS verilen Kontrol (n=5) sıçanlarda kan serumlarındaki VIP seviyeleri. (İstatistiksel analiz One-way ANOVA,  $p < 0.0001$ ). \*\*\* $P < 0.0001$

#### 4.5. Gen Nakil Vektörünün Diyabet Kökenli İnflamasyon Üzerine Etkisi

Daha önceden yapılan çalışmalarda tip 1 diyabette hem glukotoksisitenin hem de adacık hücrelerine karşı gelişen otoimmün reaksiyondan dolayı inflamasyon ve oksidatif stresin arttığı ileri sürülmüştü (Pietropaolo ve ark., 2007). Bu nedenle gen nakli yapılan deneklerde gen naklinin inflamasyon üzerindeki etkilerini belirlemek için deneklerde serum CRP, serum oksidan ve serum antioksidan seviyeleri ölçülerek birbirleriyle karşılaştırıldı.

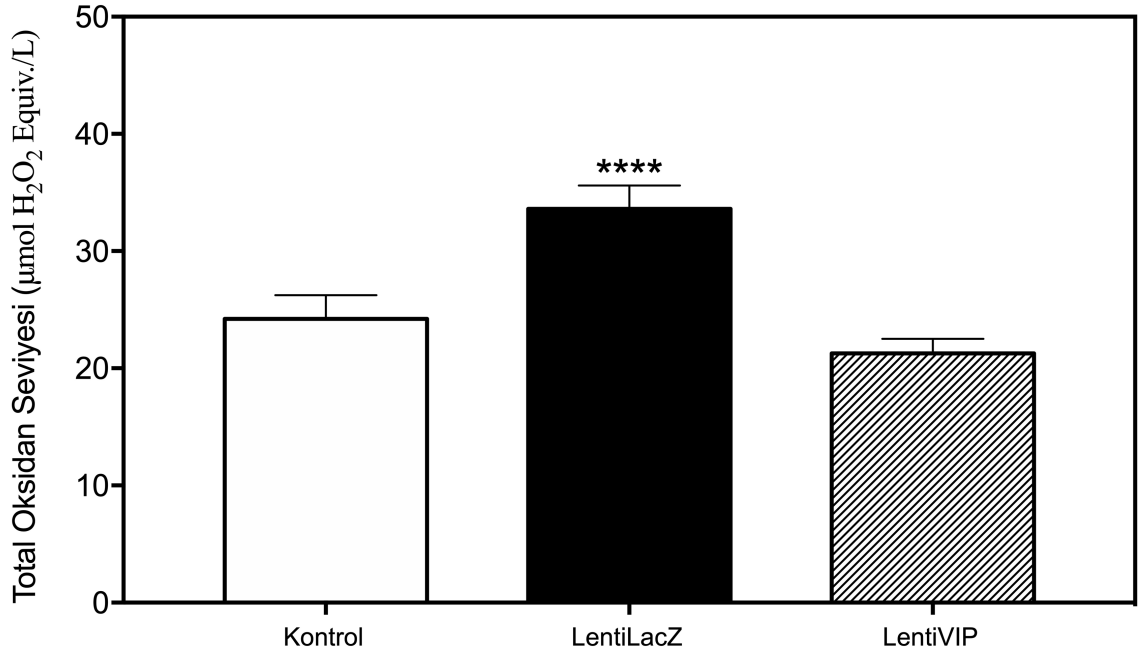


Yapılan istatistiksel analizlere göre diyabetik LentiLacZ verilmiş grubun serum CRP seviyesinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede arttığı belirlenirken, terapötik vektör uygulaması yapılan sıçanların serum CRP seviyelerinin LentiLacZ grubuna kıyasla anlamlı derecede azaldığı (One-way ANOVA,  $p < 0,0001$ ) gözlemlenmiştir (Şekil 4.14).



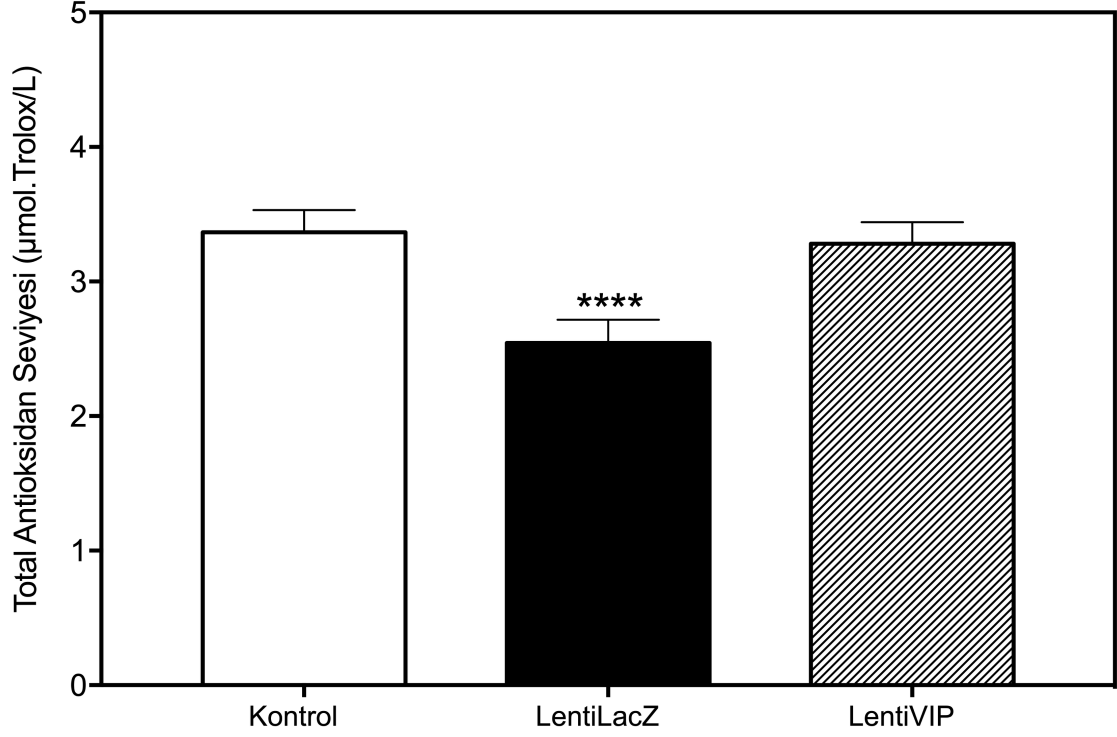
**Şekil 4.14** VIP gen nakli diyabetik deneklerde artmış serum C-reaktif protein seviyesini düşürür. Kontrol grubu (n=6), STZ ve vektör uygulaması almayan, PBS enjeksiyonu yapılan sıçanları ifade etmektedir. LentiLacZ grubu (n=8), LentiLacZ kontrol vektörü almış diyabetik sıçanları; LentiVIP grubu VIP vektörü almış diyabetik sıçanları ifade etmektedir. (One-way ANOVA testi) (\*\*\*\*  $p < 0,0001$ ).

Daha sonra gen nakli yapılan deneklerde oksidan ve antioksidan seviyeleri belirlenerek birbirleriyle kıyaslandı. **Şekil 4.15** ve **Şekil 4.16**'da görüldüğü üzere LentiLacZ enjekte edilmiş diyabetik deneklerin serum oksidan seviyelerinin kontrol gruplarına göre daha yüksek ve antioksidan seviyelerinin zıt olarak kontrolden daha düşük olduğu gözlemlendi. LentiVIP vektör alan gruplarda ise oksidan seviyesinin kontrol grubuna benzer seviyelere gerilediği, antioksidan seviyelerinin ise artarak normal seviyelere geldiği belirlenmiştir.



**Şekil 4.15** VIP gen nakli diyabetik deneklerin artmış serum total oksidan kapasitesini normal sınırlara getirir. Kontrol grubu (n=6), STZ ve vektör uygulaması almayan, PBS enjeksiyonu yapılan sıçanları ifade etmektedir. LentiLacZ grubu (n=6), kontrol vektörü almış diyabetik sıçanları; LentiVIP grubu VIP vektörü almış sıçanları ifade etmektedir. (One-way ANOVA, p\*\*\*\*<0,0001).

Yapılan istatistiksel analizlere göre (One-way ANOVA sonrasında Tukey'in çoklu karşılaştırma testi); LentiLacZ grubunun serum total oksidan seviyesinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede arttığı belirlenirken, terapötik vektör uygulaması yapılan sıçanların (LentiINS ve LentiVIP) serum total oksidan seviyelerinin LentiLacZ grubuna kıyasla anlamlı derecede düştüğünü ve kontrol grubu ile benzer seviyelere geldiği gözlemlenmiştir (One-way ANOVA, p\*\*\*\*<0,0001). Hatta LentiINSVIP grubunun serum total oksidan seviyesinin kontrolden bile daha düşük olduğu saptanmıştır (Tukey'in çoklu karşılaştırma testi, p=0,0042).

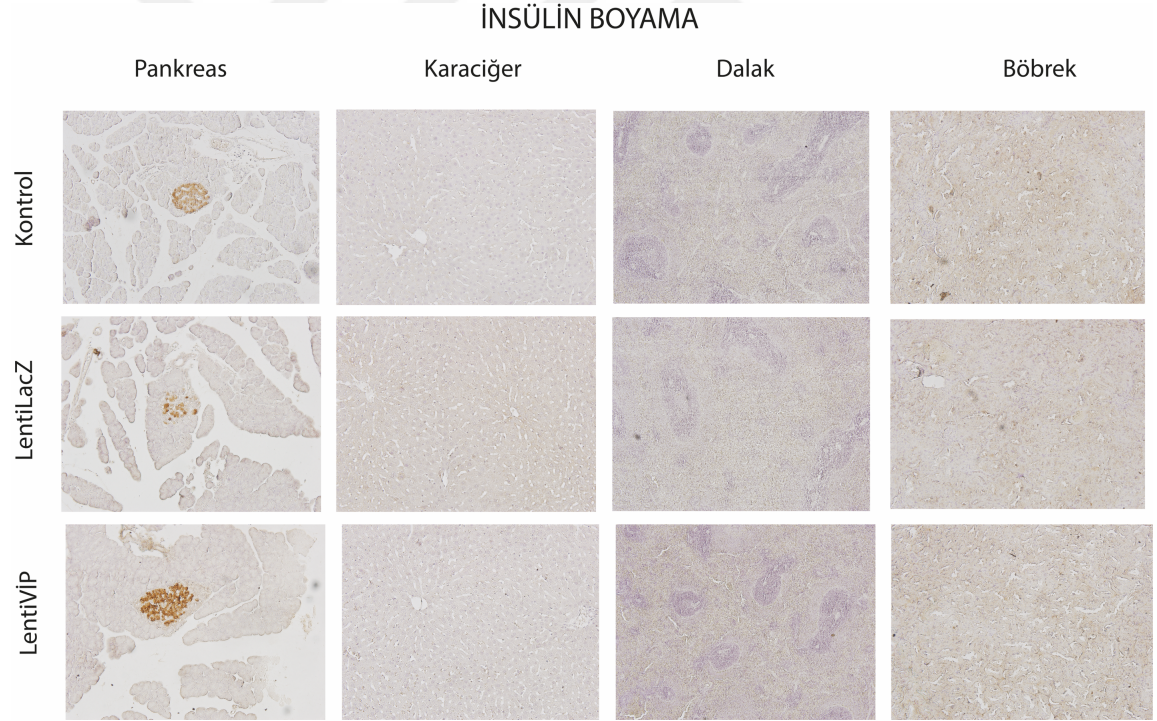


**Şekil 4.16** VIP gen nakli diyabetik deneklerin düşen serum total antioksidan kapasitesini normalize eder. Yapılan istatistiksel analizlere göre; LentiLacZ grubunun serum total antioksidan seviyesinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede azaldığı belirlenirken, terapötik vektör uygulanan hayvanlarda serum total antioksidan seviyelerinin LentiLacZ grubuna kıyasla anlamlı derecede arttığını hatta kontrol grubu ile benzer seviyelere geldiği gözlemlenmiştir (One-way ANOVA,  $p^{****}<0,0001$ ).

#### 4.6. Gen Nakli Sonrası İmmünohistokimyasal Analizler

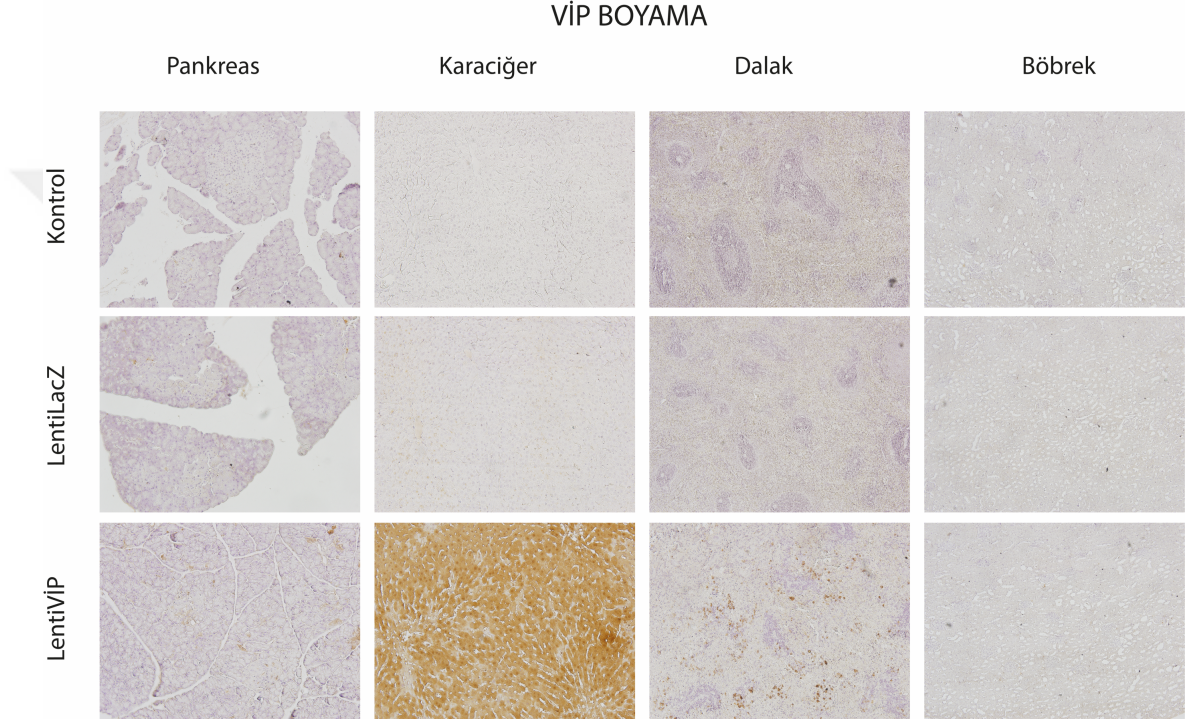
Tip 1 diyabet hayvan modelinde hem oluşturulan modeldeki beta hücre kitle kaybının gösterilmesi hem de lentiviral vektör aracılı gen aktarımının pankreatik adacıklar üzerindeki etkisinin incelenmesi amacıyla Wistar sıçanların 3 farklı grubundan izole edilen intraabdominal organ kesitleri üzerinde immünohistokimyasal analizler yapıldı.

Diyabetin indüklendiği sıçanlarda LentiVİP ve LentiLacZ vektörü uygulanan iki ayrı grupta da lentiviral gen naklinin etkileri incelendi. İnsülin antikoru (Tavşan Poliklonal Anti-insülin Antikor, Abcam ab63820) ile yapılan immünohistokimyasal boyamalarda LentiLacZ verilmiş diyabetik deneklerde pankreas beta hücrelerinin tahrip olduğu, LentiVİP gen nakli yapılan deneklerde ise pankreas adacıkların rejenere olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.17).



Şekil 4.17 İntraperitoneal gen nakli sonrası intraabdominal dokularda insülin boyama (n=6)

VİP antikoru (Abcam, Cat No. ab101959) ile yapılan immünohistokimyasal boyamalarda CMV promotörü sayesinde aktarılan gen pankreas dışı abdominal dokularda da eksprese olmuştur. Ayrıca intraperitoneal yolla gen nakli sonrasında qPCR ile belirlediğimiz doku tropizmi analiz sonuçlarımızla uyumlu olarak en yoğun boyama karaciğer dokusunda gösterilmiştir (**Şekil 4.18**).



**Şekil 4.18** Gen nakil sonrası intraabdominal organlarda VİP boyama

## 5. TARTIŞMA

T1DM hastalarının tamamı zaman içinde beta hücre kaybına bağlı olarak insüline bağımlı hale gelir (A. D. Sanlioglu ve ark., 2012, 2013). İnsülin replasman tedavilerinin diyabet açısından her ne kadar yararlı etkiler sergilemesi beklense de, T1DM hastalarında hastalığı tedavi etmediği, sadece diyabetik komplikasyonları geciktirdiği bilinir. T1DM tedavisi için hastalarda otoimmün yanıtın da baskılanması gerekmektedir. Gerek maliyeti ve gerekse yan etkileri sebebiyle bugün için T1DM hastalarına bağışıklık sistemlerini baskılayıcı ilaç kullanımı önerilmemektedir. T1DM gelişiminin daha etkili olarak engellenebilmesi amacıyla beta hücrelerine zarar veren aktif otoimmün sistem hücrelerinin de ilave gen nakli yöntemleriyle baskılanması (durdurulması) gerekebilir.

Vazoaktif İntestinal Peptid (VIP); GLP-1 ve PACAP gibi adacıklardan insülin salınımını eşdeğer etkinlikte stimüle eden bir nöropeptiddir (Bertrand ve ark., 1996; Filipsson ve ark., 1998). Endokrin pankreasın gelişiminde ve yemek sonrası fizyolojik insülin salınımında oldukça etkin olan VIP, aslında çok geniş bir biyolojik aktivite spektrumuna sahiptir (Rachdi ve ark., 2003; Winzell ve Ahren, 2007; Ahren, 2008). Th1 cevabını baskılamak, regülatör T hücreleri (Treg) aracılı immün tolerans oluşturmak gibi özelliklerinin yanında, oldukça etkili bir antiinflamatuvar ilaç olarak fonksiyon görür ((Delgado ve ark., 2004; Gonzalez-Rey ve ark., 2007). Bu nedenle, romatoid artrit, ulseratif kolit, multiple skleroz, T1DM ve uveoretinit gibi otoimmün/inflamatuvar hastalıkların tedavisinde ümit veren bir ajandır (Delgado ve ark., 2002; Gonzalez-Rey, Chorny, ve ark., 2006; Herrera ve ark., 2006; Gonzalez-Rey ve ark., 2007; Abad ve Waschek, 2011).

Vazoaktif İntestinal Peptid (VIP)'in terapötik etkinliği obstruktif pulmoner hastalık, pulmoner hipertansiyon, sepsis ve migren gibi (ClinicalTrials.gov identifiers: NCT00272896, NCT00464932, NCT00004494, ve NCT00255320) hastalıklara karşı klinik denemelerle ortaya çıkarılmaya çalışılmaktadır. Bu klinik çalışmalar VIP'nin tedavi gören hastalarda minimal yan etkisinin yanı sıra oldukça iyi tolere edildiğini gösterdi. Bu avantajlarına rağmen VIP tabanlı tedavi stratejilerinin başarılı klinik uygulamalara

girebilmesi için birtakım engellerin aşılması gerekmektedir. Örneğin VİP pek çok dokuda doğal olarak mevcut olan peptidazlara (DPP4) karşı oldukça dayanıksızdır. DPP4 hücre yüzeyinde bulunan bir serin peptidaz olup; GLP1, GİP, VİP ve PACAP gibi pek çok doğal peptidin fonksiyonel aktivitelerinin düzenlenmesini sağlar (Zhu ve ark., 2003). Bu yaygın N-terminal dipeptidaz, regülatör peptidlerin N-uçlarındaki dipeptitlerin (Xaa-Pro or Xaa-Ala) serbest kalmasını sağlar (Mentlein, 1999). VİP ve PACAP'ın amino uçları interaksiyona girdikleri reseptörlerin aktivasyonu için gerekli olduğundan, DPP4 tarafından kırılmaları onların agonistik aktivitelerini bloke eder (Lambeir ve ark., 2001). Dahası DPP4 tarafından amino uçları kırılmış peptidler antogonist peptid olarak fonksiyon görürler (Robberecht ve ark., 1992). Bu sebeble VİP'nin bir peptit olarak terapötik etkisini gösterebilmesi için çok yüksek dozlarda birden fazla enjeksiyonu gerekir.

Bilindiği gibi, VİP'nin vücut içinde daha dayanıklı ve uzun süreli sentezi ancak gen nakil vektörlerinin kullanılmasıyla sağlanabilir. Bu nedenle son yıllarda otoimmün hastalıkların tedavisi amacıyla VİP aracılı viral (Lodde ve ark., 2004; Lodde ve ark., 2006) ve viral olmayan (Herrera vd., 2006) gen nakil metodları geliştirildi. Örneğin, plazmid DNA aracılı VİP gen transferinin siklofosfamid indüklü diyabetik NOD farelerde kısmen de olsa bir koruma sağlayabildiği belirlendi. Fonksiyonel VİP kodlayan rekombinant adenovirusların düz kas hücrelerinin çoğalmasını engelleyerek, pulmoner arteriyel hipertansiyon tedavisinde kullanılabileceği gösterildi. Sonrasında, VİP taşıyan Adeno-Assosiyasyon Virus' ların (AAV) otoimmün bir hastalık olan sjögren sendromunda yararlı olduğu tespit edildi. Son olarak da VİP kodlayan lentiviral vektörlerin kolajen indüklemeli artrit modelinde hem otoimmün hem de yangısal cevabı baskıladığı rapor edildi. Yapılan bu çalışmalar gen nakil vektörlerinin kullanımlarıyla ilgili birtakım sınırlamaları da gündeme taşımıştır. Bilindiği gibi plazmid DNA transferinin klinik etkinliği oldukça düşüktür. Adenoviral vektörler vücudumuzda antijenik olarak algılanmakta ve bu nedenle terapötik etkinliği kısa sürmektedir (Doerschug ve ark., 2002). AAV hem transdüksiyon etkinliği hem de taşıma kapasitesi oldukça düşük olan bir vektör tipidir (S. Sanlioglu ve ark., 2001). Diğer gen nakil vektörlerine kıyasla lentiviral vektörler uzun süreli gen sentezi ve konakçı güvenliği düşünüldüğünde tercih edilen bir gen nakil vektörüdür (Elsner ve

ark., 2012). Ayrıca, 3. nesil lentiviral vektörler genomu integrasyon sonrasında kendi kendilerini inaktive etme yeteneğine sahip olduklarından onkogen aktivasyonuna yol açan retroviral vektörler gibi insersiyonel mutagenез riski de taşımazlar. Yapılan araştırmalarda VİP kodlayan gen nakil vektörlerinin otoimmün hastalıkların tedavisinde etkili olabileceği her ne kadar gösterilmiş olsa da, T1DM deney hayvan modellerinde test edilmemiştir.

Projemizde, toksik etki oluşturmaksızın kalıcı VİP gen ekspresyonu sağlanabilmesi ana hedeflerden biri olmuştur. Bir vektörün kalıcı gen ekspresyonu sağlaması için hedef hücre genomuna entegre olması gereklidir. Entegrasyon yeteneği olan vektörler arasında, hem bölünen hem de bölünmeyen hücreleri enfekte edebilmesi, immünolojik cevap uyandırmaksızın hedef hücreye girebilmesi ve entegrasyon sonrasında mutageneze yol açmaması nedeniyle lentiviral vektörler en cazip aday olarak öne çıkmaktadır. 3. nesil integrasyon sonrası inaktive olan (SIN) lentiviral vektörler, yabancı tip HIV-1 enfeksiyonu sonrasında bile vektör mobilizasyonunun gözlenmediği güvenilir bir gen aktarım aracı olarak görülmekte, bu nedenle *in vivo* çalışmalarda tercih edilmektedir. Ayrıca lentiviral vektörlerle yapılan çalışmalarda doz sınırlayıcı toksik etki bildirilmediğinden yüksek dozlarda tekrar tekrar alıcıya güvenle verilebilir. Bu çalışmada vektör dayanıklılığının ve tropizminin artırılması amacıyla Veziküler Somatit Virüsü G-glikoproteini ile tiplendirilmiş 3. nesil lentiviral vektörler gen nakil araçları olarak geliştirilmiştir. Dolayısıyla bu projede güvenilirliği ve etkinliği klinik denemelerde kanıtlanmış en gelişmiş gen nakil vektörleri kullanılmıştır.

Geliştirdiğimiz gen tedavi vektörünün antidiyabetik etkinliğini test etmek için sıçanlarda STZ indüklü tip 1 diyabet modeli oluşturmak gerekiyordu. Bunu yapmamızın temel sebebi literatürde T1DM oluşturabilmek için tek doz STZ uygulamalarına sıçanlarda (Akbarzadeh ve ark., 2007; Dirice ve ark., 2009) veya çoklu doz STZ uygulamalarına farelerde rastlanılmasına rağmen (O'Brien ve ark., 1996; Li ve ark., 2000; Muller ve ark., 2002), T1DM indüksiyonuna örnek teşkil edebilecek çoklu doz STZ uygulamalarının sıçanlarda yapıldığına dair literatür bilgisine rastlanılamamış olmasıydı. Bunu yapabilmek için çoklu doz STZ uygulamaları Sprague Dawley ve Wistar olmak üzere iki farklı sıçan



türünde denenmiş, her iki tür sıçan türünde de T1DM başarıyla indüklenmiştir. Kan glukoz değerlerinin daha stabil olması nedeniyle çalışmamızın sonraki kısımlarında Wistar sıçanlar kullanılmıştır. LentiVİP terapötik gen nakli yapılan sıçanlarda glukoz toleransının arttığı ve diyabetin sebebiyet verdiği kilo kayıplarının önlendiği tespit edilmiştir.

Diyabet gelişimi sürecinde dokularda meydana gelen reaktif oksijen türleri ve serbest radikaller hücrelerde çok önemli fonksiyonlara sahip protein, lipit, DNA ve RNA gibi biyolojik açıdan önemli moleküllerle reaksiyona girerek onların yapılarını bozar. Çoğunu serbest radikallerin oluşturduğu bu reaktif oksijen türleri vücut dışından gelebileceği gibi insan metabolizmasının doğal bir sonucu olarak da oluşabilmektedir. Organizmalar bu oksidan saldırılarına karşı protein ve enzimlerden oluşan antioksidan defans sistemleri geliştirmişlerdir. Fizyolojik koşullarda oksidanlar ve antioksidanlar denge halindedir ancak akut ve kronik enflamasyon durumlarında immün sistemin uyarılması ve doku harabiyeti sonucu oksidanlar artar, antioksidan defans sistemi yetersiz kalır; bunun beraberinde oksidanların artışı doku hasarını daha da arttırır (Muriach ve ark., 2014; Jha ve ark., 2018). Enflamasyon bazı proinflatuar sitokinlerin (fibrinojen, leptin, C-reaktif protein (CRP), interlökin 6 (IL-6)) seviyelerindeki artışla ilişkilendirilmiştir. Özellikle yüksek serum C-reaktif protein (CRP), günlük varyasyonlara uğramadan ve uzun süreli daha büyük stabilite ile IL-6 veya TNF-a'dan daha uzun bir yarı ömre (19-20 saat) sahiptir. Bu yüzden CRP, diğer dolaşım sitokinleriyle karşılaştırıldığında sistemik inflamasyonun daha uygun bir kriteri olarak kabul edilmektedir (Snell-Bergeon ve ark., 2010; Castelblanco ve ark., 2018). Projemizde terapötik gen nakli yapılan deneklerde diyabet kaynaklı artan serum CRP protein seviyesinde bir düşüş, serum oksidan kapasitesinde normalizasyon ve antioksidan kapasitesinde ise bir iyileşme belirlenmiştir.

Gen nakli yapılan deneklerin lentiviral intraabdominal doku dağılım profili incelendiğinde karaciğer başta olmak üzere pek çok intraabdominal organın lentiviral vektörlerle transdüksiyona uğradığı q-PCR'la belirlenmiştir. İnsülin antikoru kullanılarak yapılan immünohistokimyasal boyamalarda kontrol vektörü verilen diyabetik deneklerde pankreas adacıklarının tahrip olduğu, terapötik gen nakli yapılan grupta ise korunma

olduğu belirlenmiştir. Deneklerdeki kan şeker dűzeyi ile pankreas adacık kitlesi arasında doğru bir orantı olduğu saptanmıştır. VIP'in pankreatik hűcreleri űzerinde yapmış olduğu bu etki mekanizmasının açığa çıkarılması için daha detaylı araştırılmalar yapılması gerekmektedir.



## 6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Sonuç olarak gen nakli yapılan diyabetik deneklerde LentiVIP'in kan şekerini düşürdüğü, pankreas beta hücre fonksiyonunun arttığı ve deneklerin kilo aldığı tespit edildi. Ayrıca diyabet kaynaklı artan serum CRP seviyesinde düşüş, serum oksidan kapasitesinde normalizasyon ve antioksidan kapasitesinde iyileşme belirlenmiştir.

Çalışmamız vazoaktif intestinal peptit kodlayan geni bulunduran lentiviral vektörlerin antidiyabetik ve antiinflamatuvar etkileri sayesinde ileri çalışmalarda T1DM hastalarının tedavisinde yeni bir terapötik yaklaşım olarak değerlendirilebileceğini göstermektedir.

## KAYNAKLAR

Abad, C., & Waschek, J. A. Immunomodulatory roles of vip and pacap in models of multiple sclerosis. *Curr Pharm Des.* 2011; 17 (10): 1025-1035.

Ahren, B. Role of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in the pancreatic endocrine system. *Ann N Y Acad Sci.* 2008; 1144: 28-35.

Akbarzadeh, A., Norouziyan, D., Mehrabi, M. R., Jamshidi, S., Farhangi, A., Verdi, A. A., . . . Rad, B. L. Induction of diabetes by streptozotocin in rats. *Indian J Clin Biochem.* 2007; 22 (2): 60-64.

Atkinson, M. A., & Leiter, E. H. The nod mouse model of type 1 diabetes: As good as it gets? *Nat Med.* 1999; 5 (6): 601-604.

Bertrand, G., Puech, R., Maisonnasse, Y., Bockaert, J., & Loubatieres-Mariani, M. M. Comparative effects of pacap and vip on pancreatic endocrine secretions and vascular resistance in rat. *Br J Pharmacol.* 1996; 117 (4): 764-770.

Beyan, H., Buckley, L. R., Yousaf, N., Londei, M., & Leslie, R. D. A role for innate immunity in type 1 diabetes? *Diabetes Metab Res Rev.* 2003; 19 (2): 89-100.

Bisgin, A., Terzioglu, E., Aydin, C., Yoldas, B., Yazisiz, V., Balci, N., . . . Sanlioglu, S. Trail death receptor-4, decoy receptor-1 and decoy receptor-2 expression on cd8+ t cells correlate with the disease severity in patients with rheumatoid arthritis. *BMC Musculoskelet Disord.* 2010; 11: 192.

Castelblanco, E., Hernandez, M., Castelblanco, A., Gratacos, M., Esquerda, A., Mollo, A., . . . Mauricio, D. Low-grade inflammatory marker profile may help to differentiate patients with lada, classic adult-onset type 1 diabetes, and type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2018; 41 (4): 862-868.

Cha, S., Peck, A. B., & Humphreys-Beher, M. G. Progress in understanding autoimmune exocrinopathy using the non-obese diabetic mouse: An update. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2002; 13 (1): 5-16.

Chellappan, D. K., Sivam, N. S., Teoh, K. X., Leong, W. P., Fui, T. Z., Chooi, K., . . . Dua, K. Gene therapy and type 1 diabetes mellitus. *Biomed Pharmacother.* 2018; 108: 1188-1200.

Delgado, M., Abad, C., Martinez, C., Juarranz, M. G., Arranz, A., Gomariz, R. P., & Leceta, J. Vasoactive intestinal peptide in the immune system: Potential therapeutic role in inflammatory and autoimmune diseases. *J Mol Med (Berl).* 2002; 80 (1): 16-24.

Delgado, M., Pozo, D., & Ganea, D. The significance of vasoactive intestinal peptide in immunomodulation. *Pharmacol Rev.* 2004; 56 (2): 249-290.

Delgado, M., Toscano, M. G., Benabdellah, K., Cobo, M., O'Valle, F., Gonzalez-Rey, E., & Martin, F. In vivo delivery of lentiviral vectors expressing vasoactive intestinal peptide complementary DNA as gene therapy for collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* 2008; 58 (4): 1026-1037.

Dirice, E., Sanlioglu, A. D., Kahraman, S., Ozturk, S., Balci, M. K., Omer, A., . . . Sanlioglu, S. Adenovirus-mediated trail gene (ad5htrail) delivery into pancreatic islets prolongs normoglycemia in streptozotocin-induced diabetic rats. *Hum Gene Ther.* 2009; 20 (10): 1177-1189.

Doerschug, K., Sanlioglu, S., Flaherty, D. M., Wilson, R. L., Yarovinsky, T., Monick, M. M., . . . Hunninghake, G. W. First-generation adenovirus vectors shorten survival time in a murine model of sepsis. *J Immunol.* 2002; 169 (11): 6539-6545.

Elsner, M., Terbish, T., Jorns, A., Naujok, O., Wedekind, D., Hedrich, H. J., & Lenzen, S. Reversal of diabetes through gene therapy of diabetic rats by hepatic insulin expression via lentiviral transduction. *Mol Ther.* 2012; 20 (5): 918-926.

Filipsson, K., Sundler, F., Hannibal, J., & Ahren, B. Pacap and pacap receptors in insulin producing tissues: Localization and effects. *Regul Pept.* 1998; 74 (2-3): 167-175.  
Gallegos, A. M., & Bevan, M. J. Driven to autoimmunity: The nod mouse. *Cell.* 2004; 117 (2): 149-151.

Gonzalez-Rey, E., Anderson, P., & Delgado, M. Emerging roles of vasoactive intestinal peptide: A new approach for autoimmune therapy. *Ann Rheum Dis.* 2007; 66 Suppl 3: iii70-76.

Gonzalez-Rey, E., Chorny, A., Fernandez-Martin, A., Ganea, D., & Delgado, M. Vasoactive intestinal peptide generates human tolerogenic dendritic cells that induce cd4 and cd8 regulatory t cells. *Blood.* 2006; 107 (9): 3632-3638.

Gonzalez-Rey, E., Fernandez-Martin, A., Chorny, A., & Delgado, M. Vasoactive intestinal peptide induces cd4+,cd25+ t regulatory cells with therapeutic effect in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* 2006; 54 (3): 864-876.

Herrera, J. L., Fernandez-Montesinos, R., Gonzalez-Rey, E., Delgado, M., & Pozo, D. Protective role for plasmid DNA-mediated vip gene transfer in non-obese diabetic mice. *Ann N Y Acad Sci.* 2006; 1070: 337-341.

Hultgardh-Nilsson, A., Nilsson, J., Jonzon, B., & Dalsgaard, C. J. Growth-inhibitory properties of vasoactive intestinal polypeptide. *Regul Pept.* 1988; 22 (3): 267-274.

Jha, J. C., Ho, F., Dan, C., & Jandeleit-Dahm, K. A causal link between oxidative stress and inflammation in cardiovascular and renal complications of diabetes. *Clin Sci (Lond)*. 2018; 132 (16): 1811-1836.

Katsarou, A., Gudbjornsdottir, S., Rawshani, A., Dabelea, D., Bonifacio, E., Anderson, B. J., . . . Lernmark, A. Type 1 diabetes mellitus. *Nat Rev Dis Primers*. 2017; 3: 17016.

Kok, M. R., Baum, B. J., Tak, P. P., & Pillemer, S. R. Use of localised gene transfer to develop new treatment strategies for the salivary component of sjogren's syndrome. *Ann Rheum Dis*. 2003; 62 (11): 1038-1046.

Kok, M. R., Yamano, S., Lodde, B. M., Wang, J., Couwenhoven, R. I., Yakar, S., . . . Baum, B. J. Local adeno-associated virus-mediated interleukin 10 gene transfer has disease-modifying effects in a murine model of sjogren's syndrome. *Hum Gene Ther*. 2003; 14 (17): 1605-1618.

Kukreja, A., Cost, G., Marker, J., Zhang, C., Sun, Z., Lin-Su, K., . . . Maclaren, N. Multiple immuno-regulatory defects in type-1 diabetes. *J Clin Invest*. 2002; 109 (1): 131-140.

Lambeir, A. M., Durinx, C., Proost, P., Van Damme, J., Scharpe, S., & De Meester, I. Kinetic study of the processing by dipeptidyl-peptidase iv/cd26 of neuropeptides involved in pancreatic insulin secretion. *FEBS Lett*. 2001; 507 (3): 327-330.

Larocca, L., Calafat, M., Roca, V., Franchi, A. M., & Leiros, C. P. Vip limits lps-induced nitric oxide production through il-10 in nod mice macrophages. *Int Immunopharmacol*. 2007; 7 (10): 1343-1349.

Li, Z., Karlsson, F. A., & Sandler, S. Islet loss and alpha cell expansion in type 1 diabetes induced by multiple low-dose streptozotocin administration in mice. *J Endocrinol*. 2000; 165 (1): 93-99.

Lodde, B. M., Delporte, C., Goldsmith, C. M., Tak, P. P., & Baum, B. J. A recombinant adenoviral vector encoding functional vasoactive intestinal peptide. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004; 319 (1): 189-192.

Lodde, B. M., Mineshiba, F., Wang, J., Cotrim, A. P., Afione, S., Tak, P. P., & Baum, B. J. Effect of human vasoactive intestinal peptide gene transfer in a murine model of sjogren's syndrome. *Ann Rheum Dis*. 2006; 65 (2): 195-200.

Maruno, K., Absood, A., & Said, S. I. Vip inhibits basal and histamine-stimulated proliferation of human airway smooth muscle cells. *Am J Physiol*. 1995; 268 (6 Pt 1): L1047-1051.

Mentlein, R. Dipeptidyl-peptidase iv (cd26)--role in the inactivation of regulatory peptides. *Regul Pept*. 1999; 85 (1): 9-24.

Muller, A., Schott-Ohly, P., Dohle, C., & Gleichmann, H. Differential regulation of th1-type and th2-type cytokine profiles in pancreatic islets of c57bl/6 and balb/c mice by multiple low doses of streptozotocin. *Immunobiology*. 2002; 205 (1): 35-50.

Muriach, M., Flores-Bellver, M., Romero, F. J., & Barcia, J. M. Diabetes and the brain: Oxidative stress, inflammation, and autophagy. *Oxid Med Cell Longev*. 2014; 2014: 102158.

O'Brien, B. A., Harmon, B. V., Cameron, D. P., & Allan, D. J. Beta-cell apoptosis is responsible for the development of iddm in the multiple low-dose streptozotocin model. *J Pathol*. 1996; 178 (2): 176-181.

Ohno, T., Gordon, D., San, H., Pompili, V. J., Imperiale, M. J., Nabel, G. J., & Nabel, E. G. Gene therapy for vascular smooth muscle cell proliferation after arterial injury. *Science*. 1994; 265 (5173): 781-784.

Olgun, H. B., Tasyurek, H. M., Sanlioglu, A. D., & Sanlioglu, S. High-titer production of hiv-based lentiviral vectors in roller bottles for gene and cell therapy. *Methods Mol Biol*. 2019; 1879: 323-345.

Pietro Paolo, M., Barinas-Mitchell, E., & Kuller, L. H. The heterogeneity of diabetes: Unraveling a dispute: Is systemic inflammation related to islet autoimmunity? *Diabetes*. 2007; 56 (5): 1189-1197.

Rachdi, L., Marie, J. C., & Scharfmann, R. Role for vpc2 receptor-mediated signals in pancreas development. *Diabetes*. 2003; 52 (1): 85-92.

Raz, I., Eldor, R., & Naparstek, Y. Immune modulation for prevention of type 1 diabetes mellitus. *Trends Biotechnol*. 2005; 23 (3): 128-134.

Robberecht, P., Gourlet, P., De Neef, P., Woussen-Colle, M. C., Vandermeers-Piret, M. C., Vandermeers, A., & Christophe, J. Structural requirements for the occupancy of pituitary adenylate-cyclase-activating-peptide (pacap) receptors and adenylate cyclase activation in human neuroblastoma nb-ok-1 cell membranes. Discovery of pacap(6-38) as a potent antagonist. *Eur J Biochem*. 1992; 207 (1): 239-246.

Rosignoli, F., Torroba, M., Juarranz, Y., Garcia-Gomez, M., Martinez, C., Gomariz, R. P., . . . Leceta, J. Vip and tolerance induction in autoimmunity. *Ann N Y Acad Sci*. 2006; 1070: 525-530.

Said, S. I., Hamidi, S. A., Dickman, K. G., Szema, A. M., Lyubsky, S., Lin, R. Z., . . . Kort, S. Moderate pulmonary arterial hypertension in male mice lacking the vasoactive intestinal peptide gene. *Circulation*. 2007; 115 (10): 1260-1268.

Sanlioglu, A. D., Altunbas, H. A., Balci, M. K., Griffith, T. S., & Sanlioglu, S. Insulin gene therapy from design to beta cell generation. *Expert Rev Mol Med*. 2012; 14: e18.

Sanlioglu, A. D., Altunbas, H. A., Balci, M. K., Griffith, T. S., & Sanlioglu, S. Clinical utility of insulin and insulin analogs. *Islets*. 2013; 5 (2): 67-78.

Sanlioglu, A. D., Dirice, E., Elpek, O., Korcum, A. F., Balci, M. K., Omer, A., . . . Sanlioglu, S. High levels of endogenous tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand expression correlate with increased cell death in human pancreas. *Pancreas*. 2008; 36 (4): 385-393.

Sanlioglu, A. D., Dirice, E., Elpek, O., Korcum, A. F., Ozdogan, M., Suleymanlar, I., . . . Sanlioglu, S. High trail death receptor 4 and decoy receptor 2 expression correlates with significant cell death in pancreatic ductal adenocarcinoma patients. *Pancreas*. 2009; 38 (2): 154-160.

Sanlioglu, A. D., Griffith, T. S., Omer, A., Dirice, E., Sari, R., Altunbas, H. A., . . . Sanlioglu, S. Molecular mechanisms of death ligand-mediated immune modulation: A gene therapy model to prolong islet survival in type 1 diabetes. *J Cell Biochem*. 2008; 104 (3): 710-720.

Sanlioglu, S., Monick, M. M., Luleci, G., Hunninghake, G. W., & Engelhardt, J. F. Rate limiting steps of aav transduction and implications for human gene therapy. *Curr Gene Ther*. 2001; 1 (2): 137-147.

Snell-Bergeon, J. K., West, N. A., Mayer-Davis, E. J., Liese, A. D., Marcovina, S. M., D'Agostino, R. B., Jr., . . . Dabelea, D. Inflammatory markers are increased in youth with type 1 diabetes: The search case-control study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010; 95 (6): 2868-2876.

Tasyurek, H. M., Altunbas, H. A., Balci, M. K., Griffith, T. S., & Sanlioglu, S. Therapeutic potential of lentivirus-mediated glucagon-like peptide-1 gene therapy for diabetes. *Hum Gene Ther*. 2018; 29 (7): 802-815.

Tasyurek, H. M., Eksi, Y. E., Sanlioglu, A. D., Altunbas, H. A., Balci, M. K., Griffith, T. S., & Sanlioglu, S. Hiv-based lentivirus-mediated vasoactive intestinal peptide gene delivery protects against dio animal model of type 2 diabetes. *Gene Ther*. 2018; 25 (4): 269-283.

Tasyurek, M. H., Altunbas, H. A., Canatan, H., Griffith, T. S., & Sanlioglu, S. Glp-1-mediated gene therapy approaches for diabetes treatment. *Expert Rev Mol Med*. 2014; 16: e7.

Terzioglu, E., Bisgin, A., Sanlioglu, A. D., Ulker, M., Yazisiz, V., Tuzuner, S., & Sanlioglu, S. Concurrent gene therapy strategies effectively destroy synoviocytes of patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2007; 46 (5): 783-789.



Winzell, M. S., & Ahren, B. Role of vip and pacap in islet function. *Peptides*. 2007; 28 (9): 1805-1813.

Zhu, L., Tamvakopoulos, C., Xie, D., Dragovic, J., Shen, X., Fenyk-Melody, J. E., . . . Sinha Roy, R. The role of dipeptidyl peptidase iv in the cleavage of glucagon family peptides: In vivo metabolism of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-(1-38). *J Biol Chem*. 2003; 278 (25): 22418-22423.



## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

<b>Adı</b>	FULYA	<b>Uyruğu</b>	Türkiye Cumhuriyeti
<b>Soyadı</b>	ERENDOR	<b>Tel no</b>	+90 5399353314
<b>Doğum tarihi</b>	02/01/1993	<b>e-posta</b>	fulyaerendor@gmail.com

### Eğitim Bilgileri

Mezun olduğu kurum		Mezuniyet yılı
<b>Lise</b>	Mersin Hacı Sabancı Anadolu Lisesi	2011
<b>Lisans</b>	Yıldız Teknik Üniversitesi	2016
<b>Yüksek Lisans</b>	Akdeniz Üniversitesi	2019

Yabancı Dilleri	Sınav türü	Puanı
İngilizce	YÖKDİL	81

### Proje Deneyimi

Proje Adı	Destekleyen kurum	Süre (Yıl-Yıl)
Pankreasa Yönlendirilmiş Lentiviral Vektörlerle İnsülin Gen Naklinin Terapötik Etkinliğinin Diyabetik Deney Hayvan Modellerinde Belirlenmesi	<b>TÜBİTAK</b>	<b>2016-2019</b>
Tip 1 Diyabetik Deneklerde Lentivirus Aracılı Vazoaktif İntestinal Peptit Gen Naklinin Terapötik Etkinliğinin Belirlenmesi	<b>Akdeniz Üniversitesi - BAP</b>	<b>2018-2019</b>

### **Yayınlar ve Bildiriler:**

Şahin E.Ö., **Erendor F.**, Balci M.K., Şanlıoğlu S., "Generation of a beta cell specific insulin gene therapy vector for diabetes", ESGCT XXV Anniversary Congress, Berlin, ALMANYA, 17 Ekim - 20 Kasım 2017, pp.P341-P341

Taşyürek M.H., Ekşi Y.E., **Erendor F.**, Altunbaş H.A., Şanlıoğlu S., "Diyabet hastalığına karşı geliştirilen gen tedavi stratejilerinde kullanılmak üzere Tip 1 Diyabet hayvan modelinin oluşturulması", 53. Ulusal Diyabet Kongresi, KKTC / Girne, TÜRKİYE, 19-23 Nisan 2017, ss.11-11

**Erendor F.**, Şahin E.Ö., Balci M.K., Şanlıoğlu S., "Tip 1 diyabet için vazoaaktif intestinal peptidi kodlayan lentiviral vektörün geliştirilmesi.", 15. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, MUĞLA, TÜRKİYE, 26-29 Ekim 2017, ss.PS-014-PS-014

Şahin E.Ö., **Erendor F.**, Balci M.K., Şanlıoğlu S., "Multiple low-dose streptozotocin injections induced diabetes in Wistar rats characterised by insulinitis and hyperglycaemia useful for gene transfer studies", ESGCT XXV Anniversary Congress, Berlin, ALMANYA, 17-21 Ekim 2017, pp.P113-P113

Şahin E.Ö., **Erendor F.**, Balci M.K., Şanlıoğlu S., "Antidiyabetik gen nakil çalışmalarında kullanılmak üzere çoklu düşük doz Streptozotocin uygulamasıyla otoimmunitenin induklediği Wistar sıçan modelinin geliştirilmesi", 15. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, MUĞLA, TÜRKİYE, 26 Ekim - 29 Kasım 2017, ss.PS-007-PS-007

**Erendor F.**, Şahin E.Ö., Balci M.K., Şanlıoğlu S., "Generation of a lentiviral vector encoding vasoactive intestinal peptide for type 1 diabetes", ESGCT XXV Anniversary Congress, Berlin, ALMANYA, 17-20 Ekim 2017, pp.P152-P152

**Erendor F.**, Şahin E.Ö., Balci M.K., Şanlıoğlu S., "Diyabet hastalığına karşı kullanılmak üzere beta hücre spesifik gen tedavi vektörünün oluşturulması", 15. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, MUĞLA, TÜRKİYE, 26 Ekim - 29 Kasım 2017, ss.P-008-P-008