

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

**LENTİVİRUS ARACILI GLP-1 GEN NAKLİNİN
PANKREASIN BETA HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ
POTANSİYEL PROLİFERATİF VE
FARKLILAŞTIRICI ETKİSİ**

Mükerrem Hale TAŞYÜREK

DOKTORA TEZİ

2018-ANTALYA

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

LENTİVİRUS ARACILI GLP-1 GEN NAKLİNİN
PANKREASIN BETA HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ
POTANSİYEL PROLİFERATİF VE
FARKLILAŞTIRICI ETKİSİ

Mükerrem Hale TAŞYÜREK

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Salih ŞANLIOĞLU

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi TDK-2016-1697 proje numarası ile ve TÜBİTAK (SBAG-112S114) tarafından desteklenmiştir.

“Kaynakça gösterilerek tezinden yararlanılabilir”

2018-ANTALYA

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Tıbbi Biyoloji Programında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir. 24/10/2018

İmza

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Salih ŞANLIOĞLU
Akdeniz Üniversitesi



Üye : Prof. Dr. Özgül ALPER
Akdeniz Üniversitesi



Üye : Prof. Dr. Sadi KÖKSOY
Akdeniz Üniversitesi



Üye : Dr. Öğr. Üyesi Hande KOÇAK
İstanbul Bilim Üniversitesi



Üye : Dr. Öğr. Üyesi Tolga SÜTLÜ
Sabancı 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 tezdaki 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.



Mükerrerem Hale TAŞYÜREK



Tez Danışmanı

Prof. Dr. Salih ŞANLIOĞLU

TEŞEKKÜR

Öncelikle bugün bu bilimsel çalışmayı yapabilme özgürlüğüne sahip olma sebebim olan ulu önder Mustafa Kemal ATATÜRK'e ilim ve akıl yolunda bıraktığı fikir mirası için teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Bu tez çalışmasının her aşamasında ve doktora eğitimim süresince; mentorluğunu benden esirgemeyen, bilimsel etkinlik açısından çok verimli ve çok yönlü bir eğitim süreci geçirmemi sağlayan, eğitime başladığım günden bugüne çok önemli bir yol kat ettiğime beni inandıran ve başarılarımı destekleyen sayın danışmanım Prof. Dr. Salih ŞANLIOĞLU'na, tüm katkısı, emeği ve inancı için,

Akademik hayatımın bu başlangıç evresinde gerek bilimsel, gerek manevi yönden desteklerini esirgemeyen, başta Prof. Dr. Ahter ŞANLIOĞLU ve Prof. Dr. Özgül ALPER olmak üzere, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nın tüm öğretim üyelerine katkıları ve destekleri için,

Başta meslektaşım Hazal Banu OLGUN olmak üzere, Gen ve Hücre Tedavi Merkezi ekibine ve eğitimim süresince beraber çalıştığımız tüm Araştırma Görevlisi ve asistan arkadaşlarıma destekleri için,

Doktora eğitimimin başlangıcından itibaren tüm yorgunluklarımın ve zorlandığım zamanların üstesinden gelmemde manevi desteklerini hiç bir zaman esirgemeyen, sevinç ve başarılarımı benimle paylaşan arkadaşlarım Özlem AKDENİZ ve Caner TÜRK'e samimiyet ve özverileri için, sonsuz teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Hayata gözlerimi açtığım günden itibaren her daim bana destek olan, sahip olduğum tüm özdeğerleri bana öğreten, başarılarımın görünmez kahramanları, annem Hacer TAŞYÜREK, babam Erol TAŞYÜREK ve kardeşim Zübeyde Simge TAŞYÜREK'e; eğitim hayatıma sayesinde başladığım ve doktora mezuniyetimi heyecanla bekleyen dedem Süleyman OKATAN ve ananem Mükerrerem OKATAN'a karşılıksız ve bitmek tükenmek bilmeyen sevgi, destek ve fedakarlıkları için sonsuz teşekkürler.

ÖZET

Amaç: Glukagon-benzeri-peptid-1(GLP-1), glukoz indüklü insülin sekresyonunu arttırıcı özellikleri ve beta hücre kitlesini arttırabilme potansiyeliyle Tip 2 Diyabet (T2DM) tedavisinde potansiyel bir terapötik ajan olarak değerlendirilmektedir. GLP-1 etkisiyle gastrik boşaltımın yavaşlaması ve gıda alımının azalması uzun vadede kilo kaybına sebep olur. Pankreatik alfa hücrelerinden glukagon salınımının baskılanması GLP-1'in diyabet tedavisine ilişkin yararlı etkilerinden bir diğeridir. T2DM hastalarında ise glukoz verilen inkretin yanıtı azalmış olup, hastalık düşük GLP-1 sekresyonuyla birlikte seyreder.

Yöntem: Stabil GLP-1 sentez ve sekresyonu sağlamak amacıyla GLP-1 kodlayan 3. jenerasyon HIV tabanlı lenviral vektörler (LentiGLP-1) üretildi. Bu vektörlerin terapötik etkinliği, yüksek yağlı diyet/düşük doz STZ uygulamalı deneysel T2DM sıçan modelinde test edildi. Beta hücre gelişim mekanizmasını açığa çıkarmak amacıyla sıçanların pankreatik doku kesitlerinde immünohistokimyasal analizler gerçekleştirildi.

Bulgular: Elde edilen bulgular, diyabetik SD sıçanlara intraperitoneal (ip) LentiGLP-1 vektör uygulamasının, insülin direncini kırdığını, glukoz toleransını geliştirdiğini ve kan şeker seviyesini düşürdüğünü gösterdi. LentiGLP-1 enjekte diyabetik deneklerde kolesterol düzeyi değişmeksizin serum trigliserid seviyesinde bir azalma gözlemlendi. Artan pankreatik beta hücre kitlesi, azalan kan şeker seviyeleriyle korelasyon gösterdi. Pankreatik kesitlerde gözlenen insülin pozitif hücre kümeleriyle birlikte, pankreatik dokunun asiner bölgelerinde Ki67 pozitif hücreler gözlemlendi.

Sonuç: Bu çalışmayla, LentiGLP-1 vektörünün T2DM hastalarında yeni bir gen tedavi metodu olarak değerlendirilebileceği ve GLP-1 gen naklinin pankreatik hücrelerde proliferasyonu indükleyerek beta hücre geri kazanımına etki ettiği belirlendi.

Anahtar Kelimeler: gen tedavi, glukagon benzer peptid-1, tip 2 diyabet, beta hücreleri

ABSTRACT

Objective: Glucagon-like peptide-1 (GLP-1), which has been evaluated as a therapeutic agent for Type 2 Diabetes, stimulates glucose-induced insulin secretion (GSIS), and suspected to increase beta-cell mass through proliferation, neogenesis, and trans-differentiation. Additionally, reduced gastric emptying and food intake result in weight loss in the long run. Inhibition of glucagon release from the pancreatic alpha cells is another beneficial effect of GLP-1 relevant to diabetes therapy. Unfortunately, the incretin response to glucose is reduced in type 2 diabetes which is accompanied by a moderate degree of GLP-1 hypo-secretion.

Method: In order to produce stable GLP-1 synthesis and secretion, a GLP-1 encoding lentiviral vector (LentiGLP-1) was generated and its therapeutic efficacy was tested in experimental animal models of Type 2 Diabetes. Immunohistochemical analyses were performed on pancreatic sections dissected from LentiGLP-1 administrated rats to reveal the mechanism of beta cell expansion.

Results: Intraperitoneal injection of LentiGLP-1 into obese diabetic rats broke-down insulin resistance, improved glucose tolerance, and reduced plasma glucose levels without altering plasma lipid profile. Reduced plasma glucose level was correlated with increased pancreatic beta cell mass. In addition to appearance of small insulin positive cell clusters on pancreatic sections, Ki67 (+) cells were also observed in the acinar regions of pancreatic tissue.

Conclusion: Based on these findings, it is safe to claim that LentiGLP-1 vector should be assessed as a novel gene therapy modality for the treatment of patients with T2DM. Our findings also suggest that GLP-1 gene delivery promotes cellular proliferation and differentiation of pancreatic cells.

Key words: gene therapy, glucagon like peptide-1, type 2 diabetes, beta cells

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
TABLolar DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR	x
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. İnkretin etkisi ve GLP-1	3
2.2. İnkretin Hormonların Pankreatik Beta Hücreleri Üzerindeki Rollerini	8
2.3. Prenatal Süreçte Pankreas Oluşumu ve Pankreatik Beta Hücrelerinin Gelişimi	10
2.4. Postnatal süreçte Pankreatik Beta Hücre Gelişimi	14
2.4.1. Beta Hücre Replikasyonu	15
2.4.2. Beta Hücre Farklılaşması ve Neogenez	17
2.5. Diyabette İnkretin Tabanlı gen tedavi stratejileri	23
2.6. Viral Olmayan Gen Transfer Yaklaşımları	25
2.7. Viral Gen Transfer Yaklaşımları	27
2.7.1. Adenoviruslar	27
2.7.2. Adeno Asosiye Virus (AAV)	29
2.8. GLP-1 aracılı gen terapi yaklaşımlarında stratejik noktalar	31
2.8.1. Vektör Seçimi	31
2.8.2. Promotor Seçimi	34
2.8.3. Hayvan Modelleri	35
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	38
3.1. İnsan GLP-1 Kodlayan Lentiviral Vektörlerin Yapımı	38

3.1.1. İnsan GLP-1 gen dizisinin tasarımı	38
3.1.2. İnsan GLP-1 geninin giriş vektörüne klonlanması	38
3.1.3. İnsan GLP-1 geni kodlayan lentiviral ekspresyon plazmidlerinin oluşturulması	39
3.1.4. Lentivirus Üretimi	41
3.2. İnsan GLP-1 geni kodlayan Lentiviral Vektörlerin Titrasyonu ve Fonksiyonellik Analizi	42
3.2.1. Lentiviral Vektörlerin Q-PCR'la Fonksiyonel Titrasyonu	42
3.2.2. İmmünohistokimyasal Analizler	43
3.2.3. GLP-1 Enzim Bağımlı İmmünoanalizi (ELISA) ile transdükte hücrelerde GLP-1 sentezinin gösterilmesi	44
3.2.4. cAMP Sentez Miktar Analizi	44
3.2.5. Glukoz İndüklü İnsülin Salınım Testi	45
3.3. Deney Hayvan Modelinin oluşturulması	46
3.4. Kan Glukoz Ölçümü	46
3.5. İntraperitoneal Glukoz Tolerans Testi	47
3.6. İnsülin Duyarlılık Testi	47
3.7. Trigliserit Analizi	47
3.8. Kolesterol Tayini	47
3.9. GLP-1 Enzim Bağımlı İmmünoanalizi (ELISA) ile sıçanların kan örneklerindeki GLP-1 miktarının tayini	48
3.10. Abdominal dokularda genoma entegre kopya sayılarının analizi	48
3.11. Histolojik Çalışmalar	49
3.11.1. Beta hücre yıkımını belirlemek için yapılan immünohistokimyasal analizler	49
3.11.2. Pankreatik Adacık GLP-1 Ligand ve Reseptör Kompozisyonunun belirlenmesi	49
3.11.3. LentiGLP-1 uygulamasını takiben abdominal organlarda GLP-1 dağılımının immünohistokimyasal analizi	50
3.11.4. İnsülin Pozitif hücrelerin immünoflorasan ile detaylı analizi	50
3.12. İstatistiksel analizler	51

4.BULGULAR	52
4.1. GLP-1 Kodlayan 3. Nesil Lentiviral Vektörlerin Oluşturulması	52
4.2. LentiGLP-1 Vektörünün İn Vitro Fonksiyonellik Analizi	59
4.3. Obez Tip2 Diyabet Deney Hayvan Modeli Oluşturma	63
4.4. LentiGLP-1 Vektörünün T2DM Modelinde Terapötik Etkinliğinin Belirlenmesi	68
4.5. Pankreas Dokusunda yapılan Histolojik Analizler	74
4.5.1. Tip 2 Diyabet Modelinde Oluşturulan beta hücre yıkımı ve LentiGLP-1 aktarımının beta hücre kitlesi üzerine etkisinin belirlenmesi	74
4.5.2. GLP-1 Ligand ve Resptör Sentez Profili	77
4.5.3. GLP-1 gen nakli sonrası abdominal dokularda genoma entegre kopya sayıları ve GLP-1 profili	80
4.5.4. GLP-1 gen nakli sonrası pankreas dokusunda görülen insülin pozitif hücrelerin detaylı analizi	81
5.TARTIŞMA	84
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	88
KAYNAKLAR	89
ÖZGEÇMİŞ	115

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 4.1. Lentiviral vektörlerin intraabdominal doku dağılım profilleri

80



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. GLP-1 peptidinin majör antidiyabetik özellikleri	4
Şekil 2.2. Bağırsak L hücrelerinde proglukagon işleme süreci	5
Şekil 2.3. Yeni beta hücrelerine kaynak olarak pankreas	15
Şekil 2.4. Beta hücre replikasyonunda etkili yollar	17
Şekil 2.5. GLP-1 kodlayan gen terapi vektör tasarımı	24
Şekil 4.1. TOPO teknolojisi ile oluşturulan GLP-1 kodlayan giriş vektörlerinin agaroz jel elektroforezi ile doğrulanması	
a. EcoRI enzim kesimine ait agaroz jel görüntüsü	53
b. EcoRI&AflII ikili enzim kesimine ait agaroz jel görüntüsü	53
Şekil 4.2. Doğrulama sonrasında 3 farklı plazmid için M13 primerleri ile kurulan PCR reaksiyonunun agaroz jel görüntüsü	54
Şekil 4.3. DNA dizi analizi ile doğrulanmış kolonilerin midi ölçekte üretim ve izolasyonu sonrası agaroz jel elektroforezi ile doğrulanması	
a. Kesim reaksiyonu yapılmamış plazmidlerin agaroz jel görüntüsü	54
b. EcoRI ve AflII ikili enzim kesimine ait agaroz jel görüntüsü	54
Şekil 4.4. LxR rekombinasyon reaksiyonu	55
Şekil 4.5. pLentiGLP-1 ekspresyon klonunun vektör haritası	56
Şekil 4.6. LR rekombinasyon reaksiyonu ile oluşturulan CMV promotörü altında GLP-1_INSSP kodlayan ekspresyon vektörlerinin	
a. Plazmid DNA agaroz jel görüntüsü	57
b. EcoRI restriksiyon enzim kesimine ait agaroz jel görüntüsü	57
Şekil 4.7. Oluşturulan ekspresyon vektörlerinden 3 farklı Koloniden elde edilen plazmidlerden CMV Forward ve V5 Reverse Primerleri ile kurulan PZR reaksiyon ürünlerinin agaroz jel görüntüsü	58
Şekil 4.8. Plazmid tabanlı geçici transfeksiyonla lentiviral vektör üretimi	59
Şekil 4.9.a. LentiGLP-1 transdükte HT1080 hücrelerinde GLP-1 sentez ve sekresyonunu	60
b. HT1080 hücrelerine yapılan transdüksiyon sonrası GLP-1 sekresyonunun immünohistokimya analizi ile gösterimi	60

Şekil 4.10. LentiGLP-1 transdükte pankreatik beta hücrelerinde hücre içi cAMP miktar artışı	61
Şekil 4.11. LentiGLP-1 transdükte pankreatik beta hücrelerinde yüksek glukoz konsantrasyonunda insülin sekresyonunun artışı	61
Şekil 4.12. LentiGLP-1 transdükte pankreatik beta hücrelerinde yüksek glukoz konsantrasyonunda insülin sentezinin artışı	62
Şekil 4.13. NYY ile (n=14) veya YYY ile (n=15) beslenen sıçanların zamana bağlı ağırlık kazanç grafiği	63
Şekil 4.14. NYY ile (n=14) veya YYY ile (n=15) beslenen sıçanların zamana bağlı kan glukoz seviye farklılıkları	64
Şekil 4.15. Kontrole kıyasla obez sıçanlarda abdominal yağlanma düzeyi	65
Şekil 4.16. YYY ile beslenen sıçanlar (n=15) ve NYY (n=14) ile beslenen sıçanların insülin dirençlilik grafiği	65
Şekil 4.17. YYY ile beslenen sıçanlar (n=15) ve NYY ile beslenen sıçanların (n=14) glukoz tolerans grafiği	66
Şekil 4.18. Farklı doz STZ uygulamaları ve diyabet gelişimi	67
Şekil 4.19. 30 (n=10), 40 (n= 11) ve 50 (n=13) mg/kg STZ uygulaması almış obez sıçanların sağ kalım oranları	68
Şekil 4.20. STZ indüklü diyabetik obez sıçanlara LentiGLP-1 enjeksiyonu sonrasında kan glukoz seviyelerini gösteren grafik	69
Şekil 4.21. STZ indüklü diyabetik obez sıçanlara LentiGLP-1 enjeksiyonu sonrasında insülin dirençlilik eğrilerini gösteren grafik	70
Şekil 4.22. STZ indüklü diyabetik obez sıçanlara LentiGLP-1 enjeksiyonu sonrasında glukoz tolerans eğrilerini gösteren grafik	71
Şekil 4.23. Gen nakli sonrası IPGTT testinde gruplar-arası eğri altında kalan alan (AUC) profillerindeki değişimler	71
Şekil 4.24. STZ indüklü diyabetik obez sıçanlara LentiGLP-1 enjeksiyonu sonrasında serum GLP-1 seviyelerini gösteren grafik	72
Şekil 4.25. Gen nakli sonrasında sıçanların plazma trigliserid seviyelerini gösteren grafik	73

Şekil 4.26. Gen nakli sonrasında sıçanların plazma kolesterol seviyelerini gösteren grafik	74
Şekil 4.27. STZ indüklü diyabetik obez sıçanlara LentiGLP-1 enjeksiyonu sonrasında beta hücre kitlesinin immünohistokimyasal analizi	75
Şekil 4.28. STZ indüklü diyabetik obez sıçanlara gen nakli sonrası beta hücre alan skorları	75
Şekil 4.29. STZ indüklü diyabetik obez sıçanlara gen nakli sonrası beta hücre kitlesi kaybının % oranları	76
Şekil 4.30. STZ indüklü diyabetik obez sıçanlara gen nakli sonrasında pankreas beta hücresi insülin sentez skorlarındaki değişim	77
Şekil 4.31. STZ indüklü diyabetik obez sıçanlara gen nakli sonrasında pankreas beta hücresi GLP-1 sentez oranları	78
Şekil 4.32. STZ indüklü diyabetik obez sıçanlara gen nakli sonrasında pankreas beta hücresi GLP-1 sentez skorlarındaki değişim	78
Şekil 4.33. STZ indüklü diyabetik obez sıçanlara gen nakli sonrasında pankreas beta hücresi GLP-1 reseptörü sentez profili	79
Şekil 4.34. STZ indüklü diyabetik obez sıçanlara gen nakli sonrasında pankreas beta hücresi GLP-1R adacık ekspresyon skorlaması	79
Şekil 4.35. GLP-1 gen nakli yapılmış sıçanların abdominal organlarının doku kesitlerinde GLP-1 profili.	81
Şekil 4.36. GLP-1 gen nakli yapılmış sıçanların pankreatik doku kesitlerinde gözlenen insülin pozitif hücre kümeleri	81
Şekil 4.37. Terapötik grup ve diyabetik gruplarda Ki67 proliferasyon belirteci ile yapılan immünohistokimyasal analiz sonuçları	82
Şekil 4.38. GLP-1 gen nakli uygulaması alan ve almayan sıçanlarda pankreas dokularında insülin ve Ki67 antikoru ile yapılan immünofloresan analiz sonucu	83

SİMGELER ve KISALTMALAR

AAV	:	Adeno-associated virus
AAVS1	:	İnsan genomunda 19. kromozomun spesifik bir bölgesi
ABP	:	Arjinin-cyctaminebisacrylamide-siaminohexane polimer graftı
Ad-ILGLP-1	:	GLP-17–37 kodlayan yeni bir rekombinant adenovirus
AUC	:	Grafikte eğriler altında kalan alan
BSA	:	Bovine Serum Albumin
cAMP	:	Cyclic adenosine monophosphate
CDK4	:	Siklin D bağımlı kinaz-4
CK-19	:	Sitokeratin-19
CK20	:	Sitokeratin-20
CK7	:	Sitokeratin-7
CREB	:	cAMP cevap elementine bağlanan transkripsiyon faktörü
CVB	:	B grubu koksakivirus
DIO	:	Diyet indüklü obez
DM	:	Diabetes Mellitus
DPP4	:	Dipeptidil Peptidaz-4
dsAAV8	:	dsAAV vektör serotip 8
dsDNA	:	Çift iplikli DNA
Erk 1	:	Ekstraselüler kontrollü kinaz 1
Erk 2	:	Ekstraselüler kontrollü kinaz 2
FGF	:	Fibroblast büyüme faktörü
GIP	:	Glukoz bağımlı insülinotropik peptid
GLP-1/Fc	:	Aktif insan GLP-1'i ve fare IgG1 ağır zincir sabit bölgesi
GLP-1	:	Glukagon benzeri peptid-1
GLP-1R	:	G protein kenetli reseptör
GLP-2	:	Glukagon Benzeri Peptid 2
GSIS	:	Glukoz İndüklü İnsülin Salınım
H&E	:	Hematoksilen&Eosin

HBSS	:	Hank's Buffered Salt Solution
HDAd	:	Yardımcı-bağımlı adenoviral vektör
HFD	:	Yüksek Yağlı Diyet
HFGF	:	Hepatosit büyüme faktörü
HGF/NK1	:	HGF reseptörünün sadece kısmi aktivasyon potansiyeline sahip N ve K1 bölgeleri
HGF	:	Hepatosit büyüme faktörü
HI	:	Yüksek
Hnf3β	:	Hepatosit nükleer faktör 3 beta
HRP	:	Horse radish peroksidaz
IDT	:	İnsülin duyarlılık testi
IGF-1	:	İnsülin benzeri büyüme faktörü-1
IMDM	:	Iscoe's Modified Dulbecco's Medium
IP-2	:	Ara Peptid 2
IPGTT	:	İntraperitoneal Glukoz Tolerans Testi
Isl-1	:	İslet-1
i.m.	:	İntramuskular
İDT	:	Integrated DNA Technologies
İNS_SP	:	İnsülin sinyal peptid
KRB	:	Krebs Ringer Buffer
LentiGLP-1	:	Glucagon-benzeri peptid-1 kodlayan lentiviral vector
mGH	:	Fare büyüme hormonu
MIP	:	Fare insülin II promotor
MMP2	:	Matrix metalloproteinase-2
NGF	:	Sinir büyüme faktörü
NK1	:	Neurokinin 1
NYN	:	Normal yağlı yem
PACAP	:	Pituitary adenilat siklaz-aktifleştiren peptid
PC	:	Prohormon konvertaz
PC1/3	:	Prohormon konvertaz 1/3
Pdx-1	:	Pankreatik duedonal homeobox faktör-1

PGP9.5	:	Protein gen ürünü 9.5
PI3K	:	Fosfatidil inozitol 3 kinaz
PKA	:	Protein kinaz A
PKC	:	Protein kinaz C
PP	:	Pankreatik polipeptid
rAAV	:	Rekombinant AAV
rAd-GLP-1	:	GLP-1 üreten bir rekombinant adenovirus
s.c	:	Subkutan
SD	:	Sprague Dawley
SPD	:	Surfaktan protein D
ssDNA	:	Tek iplikli DNA
STZ	:	Streptozotosin
SUR	:	Sülfanilüre reseptör
T2DM	:	Tip 2 diyabet
TMB	:	Tetramethylbenzidine
vCVB(dm)	:	Zayıflatılmış CVB aşısı
vCVB(dm)GLP-1	:	GLP-1 eksprese eden vCVB(dm)
VIP	:	Vazoaktif intestinal peptid
VSV-G	:	Veziküler stomatit virus G protein
WPRE	:	Woodchuck Posttranscriptional Regulatory Element
YYY	:	Yüksek yağlı yem
α	:	Alfa
β	:	Beta
Δ	:	Delta

1. GİRİŞ

Tip 2 diyabet (T2DM) beta hücre fonksiyonlarının zamanla azalması ve insülin dirençliliğiyle birlikte gelişen bir hastalıktır. Henüz diyabet tanısı konmamış obez prediyabetik bireylerde, ilk olarak insülin salınımı ve beta hücre kitlesi artar ve insülin dirençliliğinin kompensasyonuna yönelik mekanizmalar devreye girer. Zamanla beta hücre oluşum yolağını bozan faktörler nedeniyle, bu kompensasyon mekanizması yetersiz kalır ve ciddi oranda beta hücre kitle kaybı oluşur. Son yapılan çalışmalarda, T2DM hastalarında beta hücre kitle kaybının, beta hücrelerindeki apoptozis artışına bağlı olduğu gösterilmiştir. Hastalığın seyri incelendiğinde, bireylerin glukoz toleransının bozulmasını takiben, fonksiyon kaybeden beta hücreler dolayısıyla insülin dirençliliği gelişir ve hiperglisemi ortaya çıkar. T2DM tanısı aşamasında dahi hastaların pankreatik beta hücre fonksiyonunda %50 oranında azalma belirlenmiştir. Yapılan otopsi çalışmalarında ise, T2DM hastalarının beta hücre kitlesi kaybının %40 oranında olduğu saptanmıştır. Bu hastalarda, kan glukoz seviyesini kontrol altına almaya yönelik ilaç tedavileri uygulansa da, bu bireylerin glisemik kontrolünün sağlanması gün geçtikçe zorlaşmaktadır.

T2DM'in insidansı hızla artmaktadır ve bu hastalığın kesin tedavisine yönelik yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesi büyük önem arz etmektedir. Diyabetin tedavisinde, hastaların fiziksel aktivite ve beslenme gibi temel yaşam koşullarında değişiklik yapılması önerilse de bu durum ancak prediyabetik dönemde hastaların beta hücre fonksiyonunu korumada az da olsa olumlu etki yaratmaktadır. Ancak diyabetin gelişimini durdurma veya geriletme potansiyeline sahip bir tedavi yöntemi henüz geliştirilmemiştir. Diyabet bireylerin tedavisinde, prediyabetik bulguların iyileştirilmesi ile birlikte normogliseminin de sağlanması gerekmektedir. Bu durum ancak terapötik etkileri ile birlikte beta hücre kitlesini de arttırıcı yönde etki edecek tedavi stratejileri ile mümkün olabilir.

Progresif beta hücre fonksiyon bozukluğu ve beta hücre kitlesinde azalmayla karakterize bir hastalık olan T2DM'de pankreatik adacıklar; insülin dirençliliği, hiperglisemi, proinflamatuvar sitokinler ve serbest yağ asitleri gibi tetikleyiciler sebebiyle apoptoza

uğramaktadır. Beta hücre kitlesi glukoz regülasyonunu sağlayabilecek düzeyde değilse; glukoz düşürücü ajanlar kullanmadan normoglisemi sağlamanın tek yolu, beta hücre kitlesinin tekrar arttırılmasıdır. İdeal bir beta hücre koruyucusunun glukoz indüklü insülin sentezini arttırması, beta hücre replikasyonu ve adacık neogenezini sağlaması, onları yangısal ajanlardan ve apoptozisten koruyabilmesi gibi özelliklere sahip olması beklenir.

Yeni beta hücrelerinin oluşumu, replikasyon, neogenez ve beta hücresi olmayan diğer hücrelerin farklılaşması (transdiferasyon) gibi farklı mekanizmaların katkıda bulunduğu kompleks bir olgudur. Bu mekanizmaların bir veya birkaçının indüklenmesi ile beta hücre kitlesinin artışına yol açtığı belirlenen moleküller ile geliştirilen tedavi stratejileri vardır. Bu stratejiler arasında inkretin tabanlı gen tedavi stratejileri ön plana çıkmaktadır. Glukagon-benzeri peptid-1 (GLP-1) pankreas beta hücrelerinden glukoz indüklü insülin sekresyonunu tetikleyerek insülinotropik etki gösteren bir inkretin hormonudur. T2DM hastalarında görülen en temel bozukluklardan birinin inkretin yanıt yetmezliği (%60 oranında bir düşüş) olduğu düşünüldüğünde, GLP-1 gen nakli yoluyla bu yetmezliğin giderilmesi cazip bir deneysel gen tedavi metodu olarak değerlendirilmektedir. GLP-1'in beta hücre kitlesinde artışa yol açması ve hipoglisemi riski yaratmaksızın antidiyabetik etkisi ile ilgili, bu peptidin farklı formları ile yapılmış in vitro veya geçici ekspresyonunun sağlandığı in vivo çalışmalar yapılmıştır. Yine de, GLP-1'in beta hücreleri üzerindeki kitle artış mekanizmaları yeterli düzeyde aydınlatılamamıştır. Dolayısıyla, T2DM tedavisinde yeni geliştirilen stratejilerde kullanılacak ajanların glisemik kontrol sağlamanın yanı sıra beta hücreleri üzerindeki koruyucu ve iyileştirici etkisinin de araştırılması gerekmektedir.

Bu bağlamda gerçekleştirilen tez projesi ile, YYY diyet ve STZ indüklü diyabet deney hayvan modelinde, GLP-1 kodlayan 3. Nesil HIV tabanlı lentiviral vektörlerin in vivo aktarımıyla GLP-1 peptidinin uzun süreli kalıcı ekspresyonunun sağlanması hedeflenmiştir. Geliştirilen bu stratejiyle yapılan GLP-1 gen naklinin, T2DM hastalığındaki potansiyel terapötik etkileri ile birlikte, pankreasta beta hücreleri üzerinde proliferatif, rejeneratif ve koruyucu etki mekanizmalarının açığa çıkarılması amaçlanmıştır.

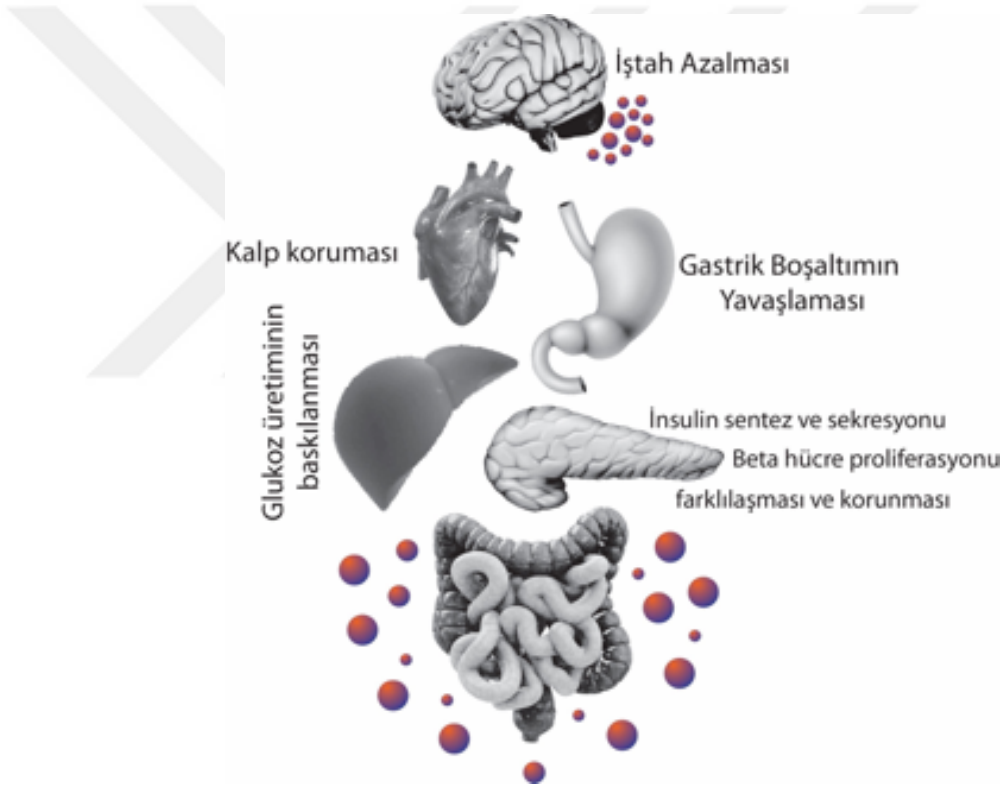
2. GENEL BİLGİLER

2.1. İnkretin etkisi ve GLP-1

Oral glukoz alınımının intravenöz glukoz uygulamasına oranla daha fazla insülin salgılanmasına sebep olduğu “*inkretin etkisi*” Tip 2 diyabet tedavisinde oldukça ümit vaat eden yeni bir tedavi stratejisidir (VilSBoll ve Holst, 2004). İnkretin etkisi barsaklardan gıda sindirimi sonrasında salınarak pankreatik beta hücrelerini uyaran, glukoz bağımlı insülinotropik peptid (GIP) ve GLP-1 isimli iki hormon aracılığıyla organize edilir. Bu hormonlar, pankreatik beta hücrelerinden glukoz indüklü insülin sekresyonunu (insülinotropik etki) tetiklemek üzere intestinal mukozadan salınırlar. Dolayısıyla, inkretin hormonlar periferel dokulara glukoz transferine yardımcı olarak postprandiyal glukoz seviyelerinin belirli düzeylerde tutulmasında önemli rol oynarlar (S. Russell, 2013). Öğünlerden sonra kana salınan insülinin %70’inin; GLP-1 ve GIP peptidlerinin beta hücreleri üzerindeki kombine etkileri dolayısıyla gerçekleştiği belirtilmektedir (T. J. Kieffer ve Habener, 1999b; H. M. Tasyurek, Altunbas, Balci, ve ark., 2014). İnsülinotropik aktivitenin kalanı ise kısmen, vazoaktif intestinal peptid (VIP) ve Pituitary adenilat siklaz-aktifleştiren peptid (PACAP) gibi nörotransmitterlere dayandırılabilir (Roberge ve Brubaker, 1993; A. Sanlioglu, Karacay, ve ark., 2012). T2D hastalarında inkretin etkisinde belirgin bir yetmezlik söz konusudur (M. Nauck ve ark., 1986). Özellikle GLP-1’in birçok farklı açıdan glukoz düşürücü etkilerinden dolayı diyabet tedavisinde kullanımı üzerinde oldukça yoğun bir klinik ilgi vardır (Ahren, 2009). GLP-1’in insülinotropik aktivitesi birçok prelinik ve klinik çalışmalarla kanıtlanmıştır (D. Drucker ve ark., 1987a; Kreyman ve ark., 1987; H. M. Tasyurek, Altunbas, ve ark., 2018). GLP-1R antagonisti ekzentin(9-39); farelerde, sıçanlarda ve insanlarda endojen GLP-1’in glukoz metabolizması üzerindeki fizyolojik etki mekanizmasını açığa çıkarmada etkili olmuştur (Şekil 2.1).

Bu çalışmalarda GLP-1R antagonisti ekzentin (9-39)’in hem açlık hem de postprandiyal (yemek sonrası) kan şeker düzeyini arttırdığı buna karşın insülin seviyelerini düşürdüğü belirlenmiştir (Kolligs ve ark., 1995; D’Alessio ve ark., 1996; Edwards ve ark., 1999; L. Baggio ve ark., 2000). Ekzentin(9-39)’in insanlarda gerek normoglisemi, gerekse hiperglisemi durumlarında plazma glukagon seviyesini arttırması, endojen GLP-1’in

fonksiyonel önemini ortaya koymuştur (Schirra ve ark., 1998). Ekzentin(9-39)'in oral glukoz uygulamasından sonra gastrik boşaltımı hızlandırması, endojen GLP-1'in aynı zamanda gastrik boşaltımın kontrolünde de bir rolü olduğunu göstermiştir (Imeryuz ve ark., 1997; Schirra ve ark., 2006). Nihayetinde GLP-1R geninin inaktivasyonu hem oral hem de intraperitoneal glukoz uygulamasından sonra defektif insülin sekresyonuyla beraber hafif açlık hiperglisemisi ve bozuk glukoz toleransı oluşturmuştur (Scrocchi ve ark., 1996; Scrocchi ve ark., 1998).

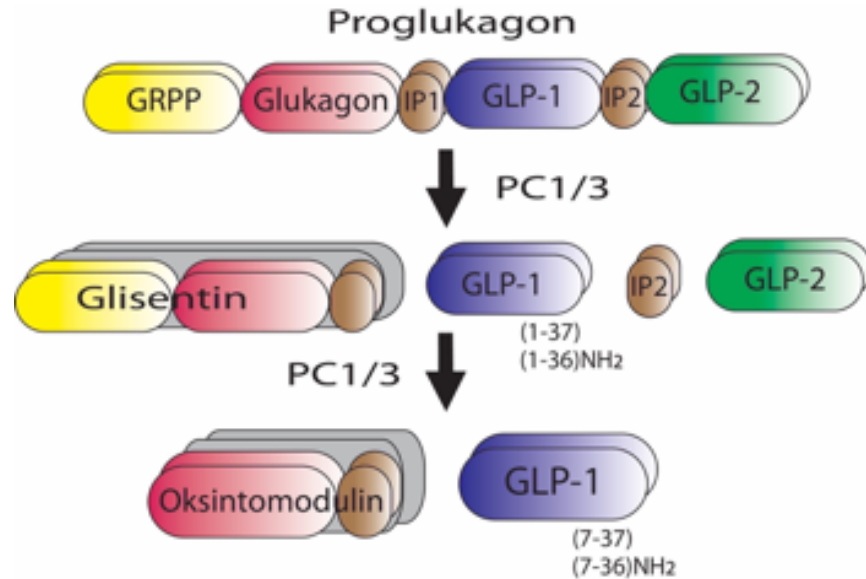


Şekil 2.1. GLP-1 peptidinin majör antidiyabetik özellikleri (M. H. Tasyurek, Altunbas, Canatan, ve ark., 2014). GLP-1 (resimdeki sferik moleküller), hem kalın bağırsakta (ileum) yerleşmiş intestinal L hücrelerinden salınır, ve hem de arka beyinde primer olarak soliter traktın nükleusunda üretilir. GLP-1'in ana hedef organları, pankreas, karaciğer, mide, kas, adipoz doku ve beyindir. GLP-1 ayrıca, pankreasda delta hücrelerinden somatostatin sekresyonunu uyarırken alfa hücrelerinden glukagon sekresyonunu baskılar. Bunun dışında, GLP-1 gastrik asit sekresyonunu azaltır. Adipoz ve kas dokusunda GLP-1'in etkisi görsellik açısından yığılma yaratmaması için şekile dahil edilmemiştir.

GLP-1, glukoz homeostazisinin düzenlenmesinde görev alan iki önemli bağırsak-kökenli inkretin hormondan birisidir. Öğünlerden sonra, GLP-1 kan dolaşımına salınarak, G protein kenetli reseptör (GLP-1R) aracılığıyla, glukoz-bağımlı insülin salınımını ve pankreatik beta hücrelerinde insülin biyosentezini stimüle eder (Thorens ve ark., 1993).

GLP-1 sekresyonuna neden olan en etkili ajanlar karbonhidratlardır ancak proteinler ve yağlar da GLP-1 sekresyonuna katkı sağlarlar (Gribble, 2012; Tolhurst ve ark., 2012). İnsülinotropik faaliyetin dışında, GLP-1 glukagon salınımını baskılar ve yaşa bağlı gelişen glukoz intoleransında iyileştirici etki gösterir (Y. Wang ve ark., 1997). Buna ek olarak, GLP-1 hücre farklılaşmasına (Abraham ve ark., 2002) ve beta hücre kitlesinde artışa (C Tourrel ve ark., 2002) yol açan mitojenik etkilere sahiptir. Gastrointestinal hareketliliğin azalması ve merkezi sinir sistemi üzerinden etki göstererek iştah ve gıda alımının azalmasına bağlı olarak ağırlık kaybına da sebebiyet verir (Wettergren ve ark., 1993). Son olarak, miyokardial iskemi ve kalp yetmezliği hastalarında GLP-1'in faydalı etkilerinin olduğu gösterilmiştir (T. Zhao, 2013).

GLP-1; intestinal epitel boyunca yayılmış olan enteroendokrin hücreler tarafından üretilir. Bu tipik hücreler barsağın lümeni ile direkt bağlantı kuran epitel hücreleri arasında yerleşmiştir (T. J. Kieffer ve Habener, 1999b). GLP-1, Glukagon Benzeri Peptid 2 (GLP-2), oksintomodulin ve glisentinle beraber; 180 aminoasitten oluşan bir proglukagon prekürsöründen (GCG gene (Gene ID: 2641) prohormon konvertaz (PC)1/3 aracılı enzimatik işlemle üretilir (Şekil 2.2) (Bell ve ark., 1983).



Şekil 2.2. Bağırsak L hücrelerinde proglukagon işleme süreci. Bağırsakta prohormon konvertaz 1/3 (PC1/3) aktivitesi ile işlem sürecine giren proglukagondan; glisentin, GLP-11-37 ve/veya GLP-11-36 amide, Ara Peptid 2 (IP-2) ve GLP-2 üretilir. Daha sonra yine PC1/3 enzim aktivitesiyle glisentin ve GLP-1'den oksintomodulin ve GLP-17-37 ve/veya GLP-17-36 amide oluşturulur. (M. H. Tasyurek, Altunbas, Canatan, ve ark., 2014)

Preglukagonun, farklı posttranslasyonel işlem sürecine girmesiyle, bağırsak ve pankreasta sırasıyla, GLP-1 ve glukagon üretilir (Novak ve ark., 1987). Posttranslasyonel süreç, iki farklı dokuda spesifik olarak eksprese edilen iki prohormon konvertaz aracılığıyla gerçekleşir. Bu prohormon konvertazlar, pankreasta PC2 (Holst ve ark., 1994) ve bağırsak L hücrelerinde PC3'tür (Ugleholdt ve ark., 2004). Ek olarak, GLP-1, arka beyinde, primer olarak soliter traktın nükleusunda üretilir ve gıda alım mekanizmasını düzenler (Skibicka, 2013). Gıda alımının azalması, öğün sıklığı, gıda isteği gibi, GLP-1'in gıda alımı ile ilişkili faydalarından sorumlu olan üretim esas olarak beyinsapı nöronlarında gerçekleşen GLP-1 üretimidir (Huo ve ark., 2007; Hayes ve ark., 2009; S. Zhao ve ark., 2012).

PC1/3 yoksun farelerin plazmasında GLP-1 saptanamaması, GLP-1 üretiminde PC1/3 enziminin sorumlu olduğunu gösterir (Ugleholdt ve ark., 2004). GLP-1 önce karboksic ucu glisin ile sonlanan 37 aminoasit uzunluğunda inaktif bir peptid olarak (GLP-1(1–37)) sentezlenir. GLP-1'in aktif formu posttranslasyonel olarak amino ucundan 6 aminoasit kırılarak oluşturulur. Biyoaktif GLP-1 dolaşımında, GLP-1(1–37)'den türeyen GLP-1(7–37) ve GLP-1(7–36) amid olarak eşdeğer etkinlikte iki moleküler formda bulunur. GLP-1(7–36) amid, insan plazmasında en yaygın bulunan aktif GLP-1 formudur (Orskov ve ark., 1994). Barsaklardaki L hücrelerinden salınan 30 aminoasit uzunluğundaki GLP-1'in ikinci aminoasidi alanin olduğundan DPP-4 tarafından hızlıca parçalanarak GLP-1(9–36)amid ve GLP-1(9–37)'ye dönüştürülür (T. J. Kieffer ve Habener, 1999b). DPP-4 aracılı GLP-1 yıkılımı o kadar hızlıdır ki portal ve sistemik dolaşımdaki saptanabilen immün reaktif GLP-1'in çoğunluğu zaten yıkıma uğramış durumdadır. Buna rağmen amino ucu kısaltılmış GLP peptidleri; GLP-1(9–36)amid ve GLP-1(9–37)'nin kardiyak fonksiyonu ve hücre canlılığı üzerinde koruyucu etkilerinin olduğu rapor edilmiştir (Nikolaidis ve ark., 2005; Ban ve ark., 2008; Sonne ve ark., 2008).

PC2 enziminin en yoğun sentez edildiği pankreatik adacık alfa hücrelerinde proglukagon sentez edilmesine rağmen, proglukagondan GLP-1 yerine glukagon meydana gelir. Ancak bazı özel durumlarda adacık alfa hücrelerinde ancak PC1/3 sentez edildiğinde proglukagondan glukagon yerine GLP-1 oluşturulur (Masur ve ark., 2005). Farelerde

erken pankreatik projenitör hücrelerin proglukagon, PC2 ve PC1/3 sentezlemeleri, bu hücrelerin oluşum evrelerinin bir basamağında GLP-1 ürettiklerine işaretir (Wilson ve ark., 2002). Bunun yanında pankreatik hasar oluşturulan bazı deneysel modellerde de adacıklardan GLP-1 üretimi olduğu saptanmıştır. Yeni doğan sıçanlara beta hücre toksini streptozotosin (STZ) injeksiyonu, pankreatik GLP-1 miktarını arttırmıştır (Thyssen ve ark., 2006). Erişkin sıçanlara STZ injeksiyonunun glukagon immun reaktif hücrelerde PC1/3 sentezini arttırarak adacık ekstraktlarında ve plazmada GLP-1 seviyesini yükselttiği belirlenmiştir (Nie ve ark., 2000). Bu bulgular bazı şartlar altında adacık alfa hücrelerinin, yakınlardaki beta hücrelerinin canlılığını ve fonksiyonunu korumak maksadıyla GLP-1 üretimi yaparak, sanki barsağın dışında GLP üretimi yapabilen ek bir bölge gibi hareket ettiğini gösterir. İzole edilmiş fare adacıklarına PC1/3 taşıyan adenovirusların infeksiyonu; alfa hücrelerinden GLP-1 salınımı yaparak ve adacık canlılığını arttırarak glukoz stimule insülin sekresyonuna sebebiyet verir (Wideman ve ark., 2006). Bunun yanında PC1/3 sentezleyen alfa hücrelerinin transplantasyonu plazma GLP-1 seviyesini yükselterek Tip 1 ve Tip 2 diyabet modelinde glukoz homeostazisini sağlar (Wideman ve ark., 2007; Wideman ve ark., 2009). Bu sebeple, GLP-1 sentez etmek için proglukagon sentezleyen alfa hücrelerinin manipülasyonu adacık canlılığı ve fonksiyonunu arttırmanın bir yolu gibi görünmektedir.

İnsan GLP-1 reseptörü (GLP-1R) 463 aminoasit uzunluğunda bir G protein interaktif reseptör olup pankreas adacıklarında, böbrekte, akciğerde, kalpte, periferel ve merkezi sinir sisteminde sentezlenir. GLP-1R'ü pankreas adacıklarındaki alfa ve delta hücrelerinde de sentezlenebilmesine rağmen bu reseptörün en yoğun sentezlendiği hücre grubunun pankreatik beta hücreleri olduğu belirlenmiştir. GLP-1R aktivasyonu cAMP formasyonunu tetikleyerek protein kinaz A (PKA) ve cAMP bağımlı guanin nükleotid değişim faktörleri aracılığıyla hücre içi sinyal yollarının aktivasyonuna sebebiyet verir (Holz, 2004). GLP-1R agonistleri cAMP cevap elementine bağlanan transkripsiyon faktörünün (CREB) fosforilasyonunu ve bir koaktivatör protein olan TORC2'nun nükleer translokasyonunu sağlar. GLP-1 aktivasyonu voltaj bağımlı K⁺ kanallarının inhibisyonuyla hücre içi Ca²⁺ artışına, ekstraselüler kontrollü kinaz 1 ve 2 (Erk 1, Erk2), protein kinaz C (PKC) ve fosfatidil inozitol 3 kinaz (PI3K) gibi proteinler aracılığıyla da

hücre içi erken genlerin sentezini tetikler. GLP-1 pankreas adacıklarındaki beta hücreleri üzerindeki G protein interaktif reseptörleri aktive ederek glukoz bağımlı insülin sekresyonunu uyarır. Ancak etki mekanizması bilinmese de sadece plazma glukoz seviyesi yüksek olduğunda GLP-1 insülin salınımını stimüle edebilir. GLP-1R bağımlı K_{ATP} kanallarının kapanması sülfanilüre reseptör (SUR) alt üniteleri tarafından sağlanır (Nakazaki ve ark., 2002; Shiota ve ark., 2002; Ahren, 2009).

GLP-1 proinsülin gen sentezini de stimüle ederek hücre içi insülin depolarını tazeler (D. J. Drucker ve ark., 1987b). Bu etkiler, cAMP indüklü proinsülin gen transkripsiyonunun artması ve mRNA stabilitesinin sağlanmasıyla gerçekleşir.

Bunun yanında GLP-1, adacık alfa hücrelerinden glukagon sekresyonunu inhibe ederek dolaşımdaki glukoz miktarını azaltır. Glukagon sekresyonunun inhibe edilmesi direkt olarak alfa hücreleri üzerindeki GLP-1 reseptörlerinin etkisiyle olabildiği gibi, indirekt olarak da insülin ve somatostatin sekresyonunun stimüle edilmesiyle de gerçekleşebilir.

2.2. İncretin Hormonların Pankreatik Beta Hücreleri Üzerindeki Rollerini

Diabetes Mellitus (DM) tedavisinde, insülin, glukagon-benzeri peptid-1 agonistleri, sülfonilüreler, metformin, tiyazolidindion, α -glukosidaz inhibitörleri ve dipeptidilpeptidaz-4 inhibitörleri, kullanılan en önemli ilaçlardır. Bu tür tedavi stratejilerinin fizyolojik etkileri ve antidiyabetik özellikleri araştırılsa da, bu stratejilerin yanı sıra beta hücre kitlesini arttırmak için beta hücrelerinin proliferasyonunun indüksiyonu ve bu hücrelerin farklılaşmasını uyarmak, ayrıca beta hücrelerinin apoptotik yollarını inhibe etmek gibi stratejiler de gündeme gelmiştir.

İncretin tabanlı tedavi stratejilerinin en heyecan verici yanı beta hücreleri üzerindeki koruyucu ve proliferatif etkilerinden dolayı konvansiyonel yöntemlerle hastalığın idamesi mümkün olmadığı durumlarda bile hastalığın gidişatını durdurma potansiyellerinin olmasıdır. Bu potansiyelin ortaya çıkartılması için farklı incretin tabanlı tedavi stratejileri geliştirilse de, bu tedavilerin beta hücre kitlesi üzerindeki etki mekanizmaları üzerinde henüz tam olarak kesinleşmemiş birçok senaryo öne sürülmektedir. Örneğin, GLP-1'in insan adacık progenitor hücrelerinin fonksiyonel beta hücrelerine dönüşümünü indükleyen bir hormon olduğu belirtilmektedir. Beta hücre

hatları ve normal adacıklar üzerinde yapılan in vitro çalışmalarla GLP-1R agonistlerinin beta hücre proliferasyonunu stimüle ettikleri de gösterilmiştir. Hatta normoglisemik deney hayvanlarında dahi GLP-1R agonistlerinin beta hücre proliferasyonu ve beta hücre kitlesini arttırdıkları saptanmıştır (Edvell ve Lindstrom, 1999; Xu ve ark., 1999; J. G. Kim ve ark., 2003). GLP-1'in, pdx-1 ve ngn-3 gibi transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonlarını uyararak beta-hücre rejenerasyonunda etkili olduğu gösterilmiştir. Rejenerasyon modellerinde beta hücre kitlesinin geri kazanılmasına odaklanılmıştır. Bu bağlamda, endokrin ve ekzokrin pankreasta hücrelerin korunması ve farklılaşmasında birçok transkripsiyon faktörü, büyüme faktörü ve çeşitli peptidlerin rol aldığı da ileri sürülmektedir (Risbud ve Bhonde, 2002).

Adacık hücrelerinde bazı durumlarda GLP-1 sentezlenebildiğinden dolayı bu hormonların adacık hormon sekresyonu üzerindeki etkilerinin araştırılması da gerekmektedir. İlk olarak Unger ve Eisentraut tarafından tarif edilen enteroinsular aksis, gıda alımından sonra barsaktan kaynaklanan sinirsel ve endokrin sinyallerin pankreatik endokrin hücrelerden hormon sekresyon mekanizmasını kısmen açıklamakla beraber (Unger ve Eisentraut, 1969), adacıklarda gerçekleşen GLP-1 sentezinin adacık hormon sentezi ve adacık hücre canlılığı üzerinde etkili olabileceğini öngören çalışma sayısı gün geçtikçe artmaktadır. Adacık kaynaklı GLP-1 sentezinin adacık canlılığı ve fonksiyonu üzerinde olumlu etkisi olduğu belirlenmiştir.

Beta hücre spesifik Pdx-1 geni inaktive edilmiş farelerde GLP-1R agonisti (ekzentin-4) uygulaması sonrasında glukagon sekresyonunun baskılanamaması beta hücredeki hücre içi bir mekanizmanın alfa hücrelerinin glukagon sekresyon özelliği üzerinde etkili olduğunu gösterir. GLP-1R aracılı glukagon sekresyonunun baskılanması glukoz bağımlı gerçekleşir, bu şekilde glukoz normal değerlerine geri dönerken alfa hücresi üzerindeki inhibitör etki kaldırılır ve hipoglisemi gelişimi bu şekilde önlenir (M. A. Nauck ve ark., 2002; Degn ve ark., 2004; Wideman ve Kieffer, 2009).

GLP-1, Pdx-1 gen sentezini stimüle ederek insülin promotoruna daha fazla Pdx-1 transkripsiyon faktörünün bağlanmasını sağlar (X. Wang ve ark., 1999). Pdx-1 sentezinin azalması veya kaybı; beta hücreleri üzerindeki GLP-1 etkisinin azalması veya kaybıyla sonuçlanır (Li ve ark., 2005; H. Wang ve ark., 2005).

Bu bilgiler doğrultusunda, GLP-1 tabanlı gen tedavi stratejilerinin pankreasta hücresel düzeyde beta hücre kitlesini ne şekilde etkilediğinin belirlenebilmesi için pankreas organ gelişim sürecinin ve beta hücre oluşum mekanizmasının iyi bilinmesi gerekmektedir.

2.3. Prenatal Süreçte Pankreas Oluşumu ve Pankreatik Beta Hücrelerinin Gelişimi

Erişkin insanda, ağırlıkları pankreas ağırlığının %2'si civarında olan yaklaşık 2 milyon adacık bulunmaktadır. Adacıklardaki hücreler morfoloji ve boyanma özelliklerine göre ayrılırlar. Alfa (α) hücreleri glukagon, beta (β) hücreleri insülin, delta (Δ) hücreleri somatostatin ve F hücreleri poli-peptid (PP) salgılar. Kemirgenlerde ise, dorsal pankreatik tomurcuk ya da duodenal pankreastan köken alan her bir adacığın %70-80'si beta hücreleri, %5 somatostatin salgılayan delta hücreleri ve %20 civarında da glukagon salgılayan alfa hücrelerinden ya da pankreasın splenik kısımlarında lokalize (insanda vücut ve kuyruk kısmında) olan polipeptit üreten PP hücrelerinden oluşmaktadır (Dahlquist ve ark., 1985).

Embriyogenez sürecinde pankreas, başlangıçta duodenumun iç yüzünü döşeyen endodermden ayrılan ventral ve dorsal tomurcuklar olarak adlandırılan iki şişkinlikten gelişir (Slack, 1995). Duodenumun sağa dönüşü ile birlikte ventral tomurcuk arkaya doğru hareket eder ve dorsal tomurcuğun arka alt bölümüne yerleşir. Bu süreçte iki tomurcuğun parankim dokusu ve kanalları birleşir. Ventral tomurcuktan processus uncinatus ve pankreas başının alt bölümü gelişirken dorsal tomurcuk diğer bölümleri oluşturur. Dorsal tomurcuk kanalının distali ve ventral tomurcuk kanalının tamamı ana pankreas kanalını (Wirsung) yapar. Ana pankreas kanalı koledok kanalı ile birlikte duodenuma açılır. Dorsal tomurcuk kanalının proksimal kısmı bazen tümüyle kaybolur ya da aksesuar pankreas kanalı (Santorini) olarak ana kanaldan ayrı duodenuma açılır. Bazı durumlarda ise her iki tomurcuk kanalı kaynaşmadan ayrı ayrı duodenuma açılabilir.

Farelerde embriyonik sürecin 8,5 günde, notokord (dorsal) ve kardiak (ventral) mezodermden gelen sinyaller ile primitif bağırsak endoderminden pankreas oluşumunu başlatmak için Shh (Sonic encoding) ve Ihh (Indian Hedgehog) genleri salınır (Hebrok, 2003). Dorsal pankreasın farklılaşması pankreas spesifik heterotrimerik transkripsiyon faktör Ptf-1'in 48kDa helix-loop-helix DNA bağlayıcı alt ünitesince kodlanan Ptf1a'nın

(Kawaguchi ve ark., 2002) ve homeobox transkripsiyon faktör Hb9'un (Hlxb9 geni tarafından kodlanan) salınımına bağımlıdır (Deutsch ve ark., 2001). Bu genlerin salınımını ise pankreatik duodenal homeobox faktör-1 (Pdx-1) salınımı izler.

Pankreasın ventral bölgesinin endoderminin şekillenmesi ise muhtemel 3 faktör ile belirlenir. Fibroblast büyüme faktörü (FGF) kardiyak mezodermin proksimal endoderm hücrelerinde karaciğerin farklılaşması sinyallerini verir (Wilson ve ark., 2003). Kardiyak mezodermin distal kısmındaki endodermde ise FGF sinyali yoktur, Ptf1a salınımı başlar ve eş zamanlı olarak Hb9 ile Pdx-1 aktif hale gelir, böylece ventral pankreas tomurcuğu şekillenmeye başlar. FGF sinyalinin yokluğu ve Ptf1a salınımı ventral ön bağırsak endoderminin bu bölgesindeki Pdx-1 progenitörlerinin bağırsak farklılaşmasını sağladığı da düşünülebilir (Kawaguchi ve ark., 2002).

Helix-forkhead transkripsiyon faktör Foxa2 ise, in vitro olarak Pdx-1 sentezini düzenler ve sırasıyla, Foxa2 sentezi Hnf6 genine ilişkin faktörler tarafından düzenlenir. Embriyoid cisimler Foxa2 eksikliğinde Pdx-1 eksprese edemezler (Wilson ve ark., 2003). Bu bilgiler göstermektedir ki ek transkripsiyon faktörleri Pdx-1'in artışına etki edebilir (Gerrish ve ark., 2000). Bu durumda pankreas gelişimi etkilenebilir çünkü pankreas tomurcuklarının gelişimi Pdx-1'e bağımlıdır.

Fetal yaşamın 3. ayında pankreas parankiminden, endokrin adacık hücreleri gelişir ve bu hücreler Langerhans adacıkları olarak bilinen hücre kümeleri halinde organize olurlar. Bu endokrin hücrelerin sonraki devamlılığından fetusun pankreas kanalında yerleştikleri düşünülen kök hücrelerin sorumlu olduğu düşünülmektedir (Githens, 1988). Adacık gelişimi erken postnatal periyotta durmasına rağmen; büyümesi ve adacık kitlesinin devamlılığının bazı düzenleyicilerin kontrolü altında olduğu bilinmektedir. Bu bilgiler normal yetişkin pankreasında çok az da olsa kök hücre aktivitesi olduğunu düşündürmektedir.

Pankreas duodenal homeobox geni, Pdx-1, pankreas gelişiminde en erken eksprese olan genlerden biridir. Pdx-1 ilk olarak embriyonik dönemin 8.5 gününde dorsalde 3 endodermal bölgede ve 2 ventrolateral bölgede keşfedilmiştir (Guz ve ark., 1995; Offield ve ark., 1996). Organogenezin devamında Pdx-1 ekspresyonu pankreası

oluşturan bölgelerde devam etmektedir. Pdx-1 ekspresyonu, her ne kadar midenin dorsal bölgesindeki bazı epitel hücrelerinde ve duodenumdaki mukoza hücrelerinde eksprese olsa da, doğumdan sonra pankreasın endokrin adacıklarında beta hücreleriyle sınırlanır (Offield ve ark., 1996).

Genetik olarak Pdx-1 eksik farelerde pankreas gelişmediği gözlenmiştir (Ohlsson ve ark., 1993; Jonsson ve ark., 1994; Offield ve ark., 1996). Hepatosit nükleer faktör 3 beta (Hnf3 β), pankreasta Pdx-1'in gen transkripsiyonunda önemli bir düzenleyicidir ve endodermal hücre topluluklarının gelişimi için gereklidir (Zaret, 1996; Wu ve ark., 1997). Bu faktörün eksik olduğu farelerde erken embriyogeneze ölüme gözlenmiştir (Ang ve ark., 1993; Weinstein ve ark., 1994). Hnf6, Pdx-1 geninin pankreas gelişimi için uygun zamanda salınmasını sağlayan diğer bir transkripsiyon faktörüdür (Jacquemin ve ark., 2003). Bu faktörlerin salınımı ile pankreas ve duodenumda progenitör hücrelerin belirlenmesi sağlanır (Jonsson ve ark., 1994; Offield ve ark., 1996; Ahlgren ve ark., 1997; Gu ve ark., 2002).

Pankreatik kök hücreyle ilişkili bazı proteinler tanımlanmıştır ve çalışmalarda çok sayıda transkripsiyon faktörünün pankreatik kök hücre farklılaşmasında önemli rolü olduğu düşünülmektedir. İnsülin gen salınımının düzenlenmesinde çok önemli olan Pdx-1 proteininin pankreasın endokrin ve ekzokrin bileşenlerinin gelişiminde ve insülin geninin transkripsiyonunda kritik bir rol oynadığı bilinmektedir (Leonard ve ark., 1993; Jonsson ve ark., 1994; Miller ve ark., 1994). Pdx-1 geni aynı zamanda progenitör hücrelerden insülin üreten hücrelerin farklılaşması ve adacık neogeneziyle de yakından ilişkilidir (Bonner-Weir ve ark., 2000; Ferber ve ark., 2000).

Knockout fareler kullanılarak yapılan çalışmalarda islet-1 (Isl-1) transkripsiyon faktörünün de adacık farklılaşmasında önemli olduğu gösterilmiştir (Ahlgren ve ark., 1997). Isl-1, yetişkin pankreas adacık hücrelerinde bir nöral kök hücre işaretleyicisi olarak tanımlansa da endokrin hücrelerin ve nestin oluşturulması için gerekli bir transkripsiyon faktörüdür (Bonner-Weir ve ark., 2000; Jacquemin ve ark., 2003). Yapılan çalışmalarda, Isl-1 eksik farelerde ventral tomurcuk geliştiği halde dorsal tomurcuğun gelişmediği gözlenmiştir. Bununla birlikte ventral tomurcukta ekzokrin hücreler varken endokrin hücrelerin olmadığı gözlenmiştir.

Ngn3 geni knockout edilmiş farelerde yapılan çalışmalarda ekzokrin doku ve pankreatik kanal hücrelerinin normale yakın fenotipte olduğu ancak farklılaşmış endokrin hücrelerin oluşmadığı gözlenmiştir (Gradwohl ve ark., 2000). Bu fenotipin gözlenmesi ve Ngn3'ün bazı hücrelere, olgunlaşmamış endokrin hücrelerde eksprese olan Pax6, Nkx6.1 ve NeuroD1 ile birlikte koekspresyonunun gözlenmesi, embriyonik Ngn3 pozitif hücrelerin endokrin progenitörleri olduğu sonucuna varılmasına sebep olmuştur (Jensen ve ark., 2000; Schwitzgebel ve ark., 2000). Yine de bu yaklaşımın tamamen doğru olduğu söylenememektedir. Ngn3'ün, adacık gelişiminde etki göstermesi için Ngn3 pozitif hücrelerin Ngn3 negatif diğer hücreleri indükleyerek adacık hücre oluşumuna katkı sağladıkları düşünülmektedir.

Isl-1, Hnf3 β gibi transkripsiyon faktörlerinin yanısıra Pax4 ve Pax6 gibi iki homeodomain protein, yetişkin pankreası kadar embriyonik bağırsak gelişiminde de salınmaktadır. Pax-4 molekülünün hem dorsal hem de ventral tomurcuk gelişiminde salındığı bilinmektedir, yetişkinlerde salınımı ise beta hücreleri ile sınırlıdır (Sosa-Pineda ve ark., 1997). Buna karşın Pax-6 molekülü, fetal ve erişkin pankreasta her dört tip endokrin hücrede de salınmaktadır (Sander ve German, 1997). Yapılan gen delesyon çalışmalarında bu genlerin yokluğunda olgun endokrin hücrelerin gelişmediği ve Pax-4'ün somatostatin üreten Δ hücreleri ve insülin üreten β hücrelerinin rejenerasyonu için gerekli olduğu gözlenmiştir. Pax-6 ise glukagon üreten α hücrelerinin farklanmasında gereklidir (Sosa-Pineda ve ark., 1997).

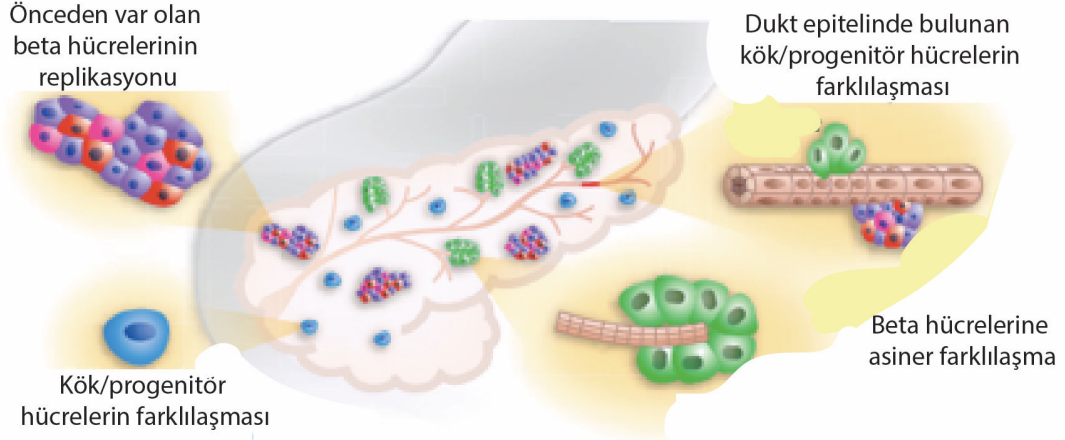
Glukoz, insülin salınımının başlıca düzenleyicisidir. Ancak insülin salınımına ilişkin kesin mekanizma ve etkileyen faktörler tam olarak anlaşılamamıştır (Rutter, 2001). Fare beta hücreleri insülin ve insülin büyüme faktörü (IGF) reseptörlerinin her ikisine de sahiptir ve bunlar sinyal yolunun en önemli bileşenleridir (Kulkarni ve ark., 2002). IGF-1 reseptörü beta hücrelerinin büyümeleri için gereklidir. IGF-1 ya da insülin reseptörünün beta hücrelerinde spesifik dağılımı olan farelerde beta hücrelerinin erken büyüme/gelişimlerinde değişiklik göstermezler. Cre rekombinaz salındığında embriyonun 9,5. gününden sonra beta hücrelerinin büyümesi için bu reseptörlerin olması gerektiği gösterilmiştir (Kulkarni ve ark., 1999; Kulkarni ve ark., 2002; Xuan ve ark., 2002). Bununla birlikte farelerde glukoz stimuluslu insülin sekresyonunda defektler

gözlendiği düşünülmesine rağmen, henüz bu durumu baskılayan ve indükleyen mekanizmalar aydınlatılamamıştır ve daha ileri çalışmalara gerek vardır (Gu ve ark., 2002; Gu ve ark., 2003).

2.4. Postnatal süreçte Pankreatik Beta Hücre Gelişimi

Pankreasta, oluşacak yeni beta hücreleri için farklı kaynaklar mevcuttur. Yeni beta hücrelerinin oluşumu, hazırda var olan insülin üreten beta hücrelerinin replikasyonu ile olabileceği gibi, asiner ve duktal hücrelerden beta hücrelerinin rejenerasyonu ile de olabilir. Bu rejenerasyon, duktal epitelde bulunan progenitor hücrelerden veya asiner hücrelerden farklılaşma ile gerçekleşebilir. Ayrıca beta, duktal veya asiner orijinli olmayan pankreatik kök/progenitor hücrelerden de beta hücrelerine farklılaşma gerçekleşebilir (Şekil 2.3) (Patti ve ark., 2005).

Yeni β hücre oluşumunun, adacık içerisindeki mevcut beta hücrelerinin replikasyonu ile, ekzokrin dokudaki asiner hücrelerin ya da farklılaşmış kanal epitel hücrelerinin β hücrelerine dönüşümü ile gerçekleştiğini gösteren çalışmalar vardır. Son yıllardaki araştırmalar ile beta hücrelerin bir takım öncül hücrelerden de gelişebileceği ileri sürülmüştür (Bouwens ve ark., 1994; R. N. Wang ve ark., 1994; Bouwens, 1998; K. H. Song ve ark., 2004).



Şekil 2.3. Yeni beta hücrelerine kaynak olarak pankreas (Bonner-Weir ve Weir, 2005).

Bu bilgiler doğrultusunda, postnatal beta hücre büyümesi, replikasyon, neogenez ve beta hücresi olmayan diğer hücrelerin farklılaşması (transdiferasyon) gibi farklı mekanizmaların katkıda bulunduğu kompleks bir olgu olarak tanımlanabilir.

2.4.1. Beta Hücre Replikasyonu

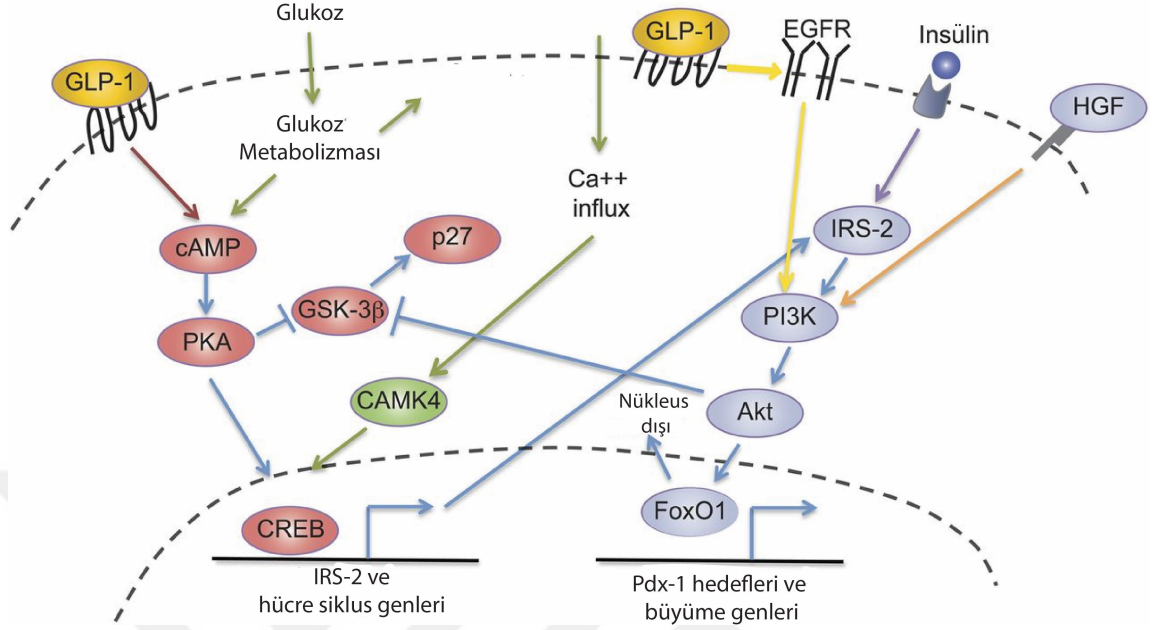
Beta hücrelerinin replikasyon mekanizması beta hücre popülasyonunun artışı için birincil önem taşımaktadır. Peptid tabanlı bazı büyüme faktörleri ve başlıca glukoz olmak üzere bazı besinler ile beta hücre replikasyon hızının arttığı gösterilmiştir (Lingohr ve ark., 2002). Fakat bu gözlemler daha çok in vitro çalışmalara dayanmaktadır ve in vivo olarak beta hücrelerinin mitogenezindeki değişimleri açıklayan mekanizmalar net olarak açığa çıkarılmamıştır. Bununla birlikte, özellikle Siklin-D2 (Georgia ve Bhushan, 2004; Kushner ve ark., 2005) ve Siklin D bağımlı kinaz-4(CDK4) (Rane ve ark., 1999) gibi hücre döngüsünde görevli regülatör bileşenlerin normal beta hücre replikasyonu için önemli olduğu bilinmektedir. Siklin D2 genleri susturulmuş farelerin beta hücre kitlelerinde, henüz 2 haftalıkken glukoz intoleransına sebep olacak ölçüde hasar olduğu ve göreceli olarak daha küçük adacıklara sahip oldukları belirlenmiştir (Georgia ve Bhushan, 2004; Kushner ve ark., 2005). CDK-4 genleri susturulmuş farelerin, doğumda normal fenotip göstermelerine rağmen beta hücre kitlesini arttırmakta zorluk çektikleri ve ilerleyen dönemde insülin bağımlı diyabet geliştirdikleri belirlenmiştir. Buna karşın, CDK-4'ün hasarlı formu ile transgenik ekspresyonunun sağlandığı farelerde, beta hücre hiperplazisi ve hipoglisemi gözlenmiştir (Rane ve ark., 1999). Bu çalışmalar, yenidoğan

sürecinde meydana gelen beta hücre replikasyonunun, yeterli miktarda beta hücre kitlesinin oluşumundaki önemini ortaya çıkartmaktadır.

Birçok faktörün ve besinlerin beta hücre replikasyonunu indüklediği in vitro çalışmalarda gösterilmiştir (Lingohr ve ark., 2002). Beta hücre replikasyonunu arttıran en belirgin faktörler, glukoz, insülin-benzeri büyüme faktörü (IGF-1), büyüme hormonu, hepatosit büyüme faktörü (HFGF), prolaktin ve plasental laktojenidir. Ancak fizyolojik faktörlerinin hangisinin spesifik olarak in vivo beta hücre replikasyonunu indüklediği belirsizdir. Özellikle de neonatal süreçte gerçekleşen beta hücre replikasyonunu kontrol eden majör faktörün tanımlanması erişkin dönemdeki beta hücre kitlesinin de tanımlanmasında önemli katkı sağlayacaktır.

Daha önce de belirtildiği gibi, GLP-1'in beta hücre proliferasyonu üzerine etki eden faktörlerden biri olduğu öne sürülmüştür. In vitro çalışmalarla GLP-1R agonistlerinin beta hücre proliferasyonunu stimüle ettikleri de gösterilmiştir. Hatta normoglisemik deney hayvanlarında dahi GLP-1R agonistlerinin beta hücre proliferasyonu ve beta hücre kitlesini arttırdıkları saptanmıştır (Edvell ve Lindstrom, 1999; Xu ve ark., 1999; J. G. Kim ve ark., 2003). GLP-1 sinyalleşmesinin beta hücre proliferasyonunu indüklemesi ile ilgili mekanizma net olarak aydınlatılamamış olsa da, olası mekanizma şu şekilde açıklanmaktadır.

Glukoz varlığında ve GLPR'üne ligand bağlanması ile G proteininin alfa stimüle edici alt üniteleri G protein kompleksinden ayrılarak adenilat siklazı aktive eder. Böylece cAMP oluşur (J Buteau, 2008). cAMP, PKA'yı aktive eder ve PKA da CREB transkripsiyon faktörünü stimüle eder. CREB; proliferasyon inhibitörü olan p27'yi inhibe ederken, A2 ve D1 siklinlerini aktive eder ve böylece proliferasyon stimülasyonu gerçekleşir (W. J. Song ve ark., 2008). CREB ayrıca IRS-2/PI3K/Akt yoluyla aracılığıyla IRS-2 transkripsiyonunu arttırır (Persaud ve ark., 2011). GLP-1 sinyalleşmesi ayrıca Epitelyal büyüme faktörü reseptörünün (EGFR) transaktivasyonuna neden olur. EGFR PI3K'ı ve ardından Akt'yi aktive eder. Bu yolak aracılığıyla FoxO1 nükleer translokasyonu GLP-1 sinyalleşmesi aracılığıyla inhibe olur. Dolayısıyla FoxO1'in inhibisyonu ortadan kalktığında Pdx-1 ve hücre büyümesinde görevli diğer genlerin ekspresyonu artar (Şekil 2.4) (J. Buteau ve ark., 2006).



Şekil 2.4. Beta hücre replikasyonunda etkili yollar (Linnemann ve ark., 2014).

2.4.2. Beta Hücre Farklılaşması ve Neogenez

Bir pankreatik ekzokrin asiner hücrenin pankreatik endokrin beta hücreye dönüşümü beta hücre farklılaşması olarak tanımlanmaktadır (Atkinson ve Rhodes, 2005). Bu tanımlı destekleyen (Zhou ve ark., 1999; Hui ve ark., 2001; Gershengorn ve ark., 2004; Yew ve ark., 2004) ve desteklemeyen (Palgi ve ark., 2000) in vitro çalışmalar olsa da, bu çalışmalarda in vivo kanıtların eksikliği söz konusudur. Ayrıca bu çalışmaların çoğu poliklonal transforme edilmiş ekzokrin hücre hatlarında gerçekleştirildiğinden bu hücreler aynı zamanda çok az miktarda insülin pozitif beta hücreleri içermektedir. Dolayısıyla beta hücre replikasyonu ile farklılaşma mekanizmasını birbirinden ayırmak oldukça zordur.

Yapılan çeşitli çalışmalarda transkripsiyon faktörlerinden birisi olan pankreatik duodenal homeobox-1 (pdx-1)'in beta hücre farklılaşmasında rol oynadığı ileri sürülmektedir (Zangen ve ark., 1997). Pdx-1, esas olarak embriyonal dönemde pankreas gelişiminde rol oynayan çok önemli bir transkripsiyon faktörüdür. Pdx-1'in erişkin dönemdeki ekspresyonu özellikle β hücresinde ve çok az sayıdaki somatostatin hücrelerinde tespit edilmiştir (Fernandes ve ark., 1997; McKinnon ve Docherty, 2001; Petropavlovskaya ve Rosenberg, 2002)

Movassat ve ark'ları, yenidoğan sıçanlara STZ enjeksiyonu sonrasında 5 gün insülin tedavisi yaptıklarında tedavi uygulanan ve uygulanmayan STZ gruplarında yeni oluşan beta hücrelerinin ya da hücre kümelerinin kanal epitelleri ile ilişkili olduklarını gözlemişler ve bunun da kanal epiteli içinde bulunduğu varsayılan öncül hücrelerin beta hücrelerine farklılaşması ile ilişkili olduğu sonucuna varmışlardır (Movassat ve ark., 1997). Suzuki ve ark., pankreatektomi uyguladıkları sıçanlarda 7. günden sonra, ekzokrin doku içerisinde bulunan sentroasiner hücrelerini incelediklerinde, büyük sentroasiner hücrelerde insülin immünpozitif ve küçük sentroasiner hücrelerde glukagon immün pozitifliği veren hücreleri ya da hücre kümelerini saptamışlardır. Ayrıca büyük sentroasiner hücrelerin bazılarında insülin ve glukagon proteinlerinin birlikte eksprese edildiğini tespit etmişlerdir. Bu bulgular doğrultusunda sentroasiner hücrelerin beta hücrelerine dönüştüğünü ileri sürmüşlerdir (Suzuki ve ark., 2003).

Neogenez, pankreasın duktal epitelinden yeni beta hücrelerinin oluşumu olarak tanımlanmaktadır (Bonner-Weir, 2000). Genel olarak beta hücre neogenezinin gerçekleştiği kabul edilmekte ise de mekanizması aydınlatılamamıştır. Beta hücre neogenezinin, embriyolojik beta hücre gelişim sürecine benzer şekilde gerçekleştiği, prekürsör hücreler aracılığı ile erişkin pankreatik kök hücrelerden olgun beta hücrelerinin geliştiği düşünülmektedir. Bununla birlikte, erişkin beta hücre neogenezi ile embriyolojik beta hücre gelişimi arasında mekanizma açısından ve her bir hücresel farklılaşma aşamasını yöneten faktörler açısından önemli farklılıklar olması muhtemeldir. Bununla birlikte, pankreatik kök hücreleri veya aracı prekürsör hücreleri tanımlayacak kesin bir hücresel belirteç belirlenemediğinden, beta hücre neogenez sürecini tanımlayabilmek oldukça zordur. Yakın zamanda, karbonik anhidraz II olası duktal prekürsör hücre belirteci olarak öne sürülmüşse de, henüz bu hipotez doğrulanmamıştır (Inada ve ark., 2006). Ek olarak, normal ve neoplastik nöroendokrin hücrelerde eksprese edildiği tespit edilen sinaptofisin, nöron ve endokrin hücre vezikülerinin önemli bir integral membran glikoproteinidir (Wiedenmann ve ark., 1986; Lukinius ve ark., 2003). Normal koşullarda pankreasın tüm endokrin hücrelerinde eksprese edilirlerken, kanal epitel hücrelerinde ve asiner hücrelerde eksprese edilmezler. Bu hücrelerdeki ekspresyonları hücrelerin nöroendokrin hücre özellikleri kazandıklarını gösteren bir belirteç olarak kabul edilir.

Yeni oluşmakta olan beta hücrelerine özgü belirteç araştırmalarında, gen ekspresyon profillemesi kullanarak, genç ve olgun beta hücrelerinin fenotipi ile duktal hücrelerden dönüşen yeni beta hücrelerinin fenotipi ve olgun beta hücrelerinin fenotipi arasında belirgin farklılıklar olduğu belirtilmiştir(Aye ve ark., 2010).

Kısmi pankreatektomi yapılmış sıçanlarda yeni oluşan adacıkların beta hücrelerinde eksprese olan, fakat olgun adacıklarda eksprese olmayan sitokeratin-19 (CK-19), matrix metalloproteinase-2 (MMP2), frizzled-2, surfaktan protein D (SPD) ve CD24 proteinleri belirlenmiştir. Bunların yeni oluşan beta hücreleri için spesifik belirteç olabileceğine dair yapılan çalışmalar doğrultusunda MMP-2, CK-19 ve SPD'nin aday belirteçler olabileceğini öne sürmüşlerdir. Bununla birlikte, bu aday belirteçlerin ekspresyonlarının geçici olduğu ve hücrede aynı anda senkronize halde gerçekleşmeyebileceği de belirtilmiştir (Aye ve ark., 2010). Bu genlerin pankreas gelişiminde rol aldığı daha önceki çalışmalarda gösterilmiş olsa da, fonksiyonları tam olarak açığa çıkarılamamıştır. CK-19, epitel hücrelerde ara filamentlere özgü bir belirteç olup farklılaşma aşamalarının değişken safhalarında olan hücrelere karakterize olduğu öne sürülmüştür (Stasiak ve ark., 1989). Progenitör hücrelerin yer aldığı, epidermin bazal tabakasında eksprese olurken farklılaşmasını tamamlamış hücrelerde CK-19 ekspresyonuna rastlanmamıştır. Aye ve ark. ayrıca; doğum sırasında pankreasta yeni tomurcuklanan adacıklarda ve duktal epitelden bir iki hücre uzaklıktaki hücrelerde, insülin ile birlikte CK-19 koekspresyonu saptamışlardır. Araştırmacılar bu bulguların beta hücrelerinin duktal epitel hücrelerden köken alarak geliştiği fikrini desteklediğini, ancak doğumdan kısa bir süre sonra CK-19 ekspresyonunun asiner dokuyla sınırlandığını bildirmişlerdir(Aye ve ark., 2010). MMP-2, çinko gerektiren nötral endopeptidazlar ailesinin bir üyesi olup ekstraselüler matriks proteinlerinin birçoğuna bağlanma özelliğine sahiptir (Pirila ve ark., 2003). Adacık morfogenezinin gerçekleştiği dönem olan embriyonik gelişimin 17. gününden 19. gününe kadar olan süreçte en yüksek aktivite gösterir (Kaung, 1994). MMP-2'nin ayrıca adacık morfogenezinde rolü olduğunu gösteren çalışmalar da vardır (Miralles ve ark., 1998). SPD, C tipi lektin ailesinin bir üyesi olup, fetal ve erişkin insan ekzokrin pankreası da dahil olmak üzere birkaç dokuda eksprese olmaktadır (Stahlman ve ark., 2002). SPD; gelişimin erken dönemlerinde eksprese olur, doğumdan doğumun 2. gününe kadar insülin ile kolokalize olduğu belirlenmiştir. Doğumu takip eden 7. gün

itibariyle SPD ekspresyonu yok olmaktadır. SPD'nin bu geçici ekspresyonunun saptanması, bu protein yeni oluşan beta hücreleri için aday belirteç olma özelliği kazandırmaktadır. Sonuç olarak, Aye ve ark., bu belirteç genlerin hem neonatal beta hücreleri hem de kanal hücrelerinde görülmesi ile postnatal pankreatik progenitor hücrelerinin in vivo kaynağının kanal hücreleri olduğu görüşünü destekleyen bulgulara ulaşmışlardır. Ek olarak bu aday belirteçlerin tek biriyle yapılan analizler doğrultusunda yeni oluşan beta hücrelerini belirlemenin mümkün olmayabileceğini ancak bu belirteçlerin kombine kullanımıyla yeni oluşan beta hücrelerinin belirlenebileceğini öne sürmüşlerdir (Aye ve ark., 2010).

Erişkin pankreatik kök hücreleri birçok araştırmacı tarafından kadavralardan elde edilmektedir. Elde edilen hücrelerin kültüre edilmeleri ve proliferasyonlarının sağlanması bu hücreler ile çalışmanın en büyük zorlukları arasındadır. Fred Levine ve arkadaşları California üniversitesinde insan kadavralarından izole ettikleri hücrelerden insülin salınımını sağlayabilmek için, bu hücreleri insülin salınımını stimüle eden Pdx-1 genini salgılayacak şekilde düzenlemişlerdir. Ancak bu hücreler diyabetik farelere nakledildiklerinde normal adacık hücreleri kadar insülin salgılamadıkları gözlenmiştir (Levine ve Mercola, 2004). Buradaki önemli konu hücrelerin büyüme ve farklılaşmaları arasındaki hassas dengenin devam etmesidir. Yani hücrelerin çoğalmaları sağlansa da insülin üretmeye devam etmeleri sağlanabilmelidir.

Bonner ve ark, erişkin pankreas dokusundan pankreas kanalı hücrelerini izole ederek kültürde çoğaltarak, kanal hücrelerini ve endokrin hücrelerini içeren hücre kümelerinin farklılaşmaya başladıklarını göstermişlerdir. Elde ettikleri primer kültürler ile hücreleri çoğaltmışlar ancak bu hücrelerin sınırlı büyüme kapasitesine sahip olduklarını düşünmüşlerdir (Bonner-Weir ve ark., 2000). Bunun yanı sıra, son dönemlerde yetişkin farelerde, pankreas kanalı epitel hücrelerinden uzun süreli hücre kültürleri hazırlanmış ve çok sayıda adacık hücrelerinin insülin üretebildiği gözlenmiştir (Ramiya ve ark., 2000). Gershengorn ve ark tarafından olgunlaşmış beta hücrelerinin kendilerini yenileyebilme potansiyellerinin olduğu gösterilmiştir (Gershengorn ve ark., 2004; Gershengorn ve ark., 2005). Ancak bu hücrelerin önce nestin pozitif mezenkimal kök hücrelere dönüştüğü

daha sonra ileri yönde farklılaşarak yeni beta hücrelerini oluşturdukları düşünülmektedir (Lechner ve ark., 2005; Ouziel-Yahalom ve ark., 2006).

Kemirgenlerde yapılan pankreas rejenerasyon modellerinde, erişkin pankreasında β hücre neogenezinin kanal epitelinden başladığı gösterilmiştir (Rosenberg ve ark., 1983; Rosenberg, 1995; R. N. Wang ve ark., 1995). İn vitro koşullarda da pankreas adacık hücrelerin farklılaşmasında pankreasın kanal hücrelerinin rol oynadığı bildirilmiştir (Bouwens ve ark., 1994; Cornelius ve ark., 1997). Ayrıca pankreas asiner hücrelerinin kanal hücrelerine değiştiği birçok insan ve kemirgen çalışmalarıyla ispatlanmıştır (Rooman ve ark., 2000; K. H. Song ve ark., 2004). Roman ve ark., kültürde sıçan pankreas asiner hücrelerinin kanal hücrelerine farklılaşarak sitokeratin-7 (CK7), sitokeratin-20 (CK20) ve fetal karaciğer kinaz-1 eksprese ettiklerini göstermişlerdir (Rooman ve ark., 2000). Hücrenel dönüşüm tamamlandığında yeni oluşan hücrelerin nörendokrin bir belirteç kabul edilen “protein gen ürünü 9.5” (PGP9.5)’u eksprese etmeye başladıklarını bildirmişlerdir (Mashima ve ark., 1996). Song ve ark. erişkin Sprague-Dawley sıçanların pankreasından izole edilerek hazırlanan asiner hücre kültüründe bir hafta içinde çok sayıdaki asiner hücrenin amilaz ekspresyonunu kaybederek kanal hücre fenotipine dönüştüklerini göstermişlerdir. Daha sonra kültürde insülin pozitif hücreler gözlenmiş, mevcut bulunan az sayıdaki insülin pozitif hücrenin sitokeratinleri de birlikte eksprese ettiği gösterilmiştir. Bu sonuçlara dayanarak kanal hücrelerine değişim gösteren asiner hücrelerin ilerleyen dönemde insülin üreten hücrelere farklılaşabileceği sonucuna varılmıştır. (K. H. Song ve ark., 2004)

Beta hücre neogenez mekanizmasının kendisi kadar, bu süreci tetikleyen faktörler konusunda da net olmayan bilgiler vardır. Her ne kadar IGF-1 (Bonner-Weir ve ark., 1993), GLP-1 ve GIP inkretinleri (Betsholtz ve ark., 1989; De Leon ve ark., 2003; L. L. Baggio ve Drucker, 2006; Xu ve ark., 2006), gastrin ve EGF kombinasyonlarının (Suarez-Pinzon ve ark., 2005) in vivo beta hücre kitlesini arttırdığı gösterilmişse de, bu artışta neogenez mekanizmasının rolü olup olmadığı bilinmemektedir.

GLP-1’in beta hücreleri üzerinde net olmamakla birlikte öne sürülen proliferatif mekanizmasının dışında farklılaşma ve neogenez mekanizmalarına olan etkisi ile de ilgili bazı çalışmalar yapılmıştır. Her ne kadar bu çalışmaların büyük çoğunluğunu GLP-

1'in doğal olmayan mimetikleri ile yapılan in vitro araştırmalar oluştursa da, bu araştırmalar sonucunda GLP-1 sinyalleşmesinin beta hücresinin gelişim ve oluşum mekanizmaları üzerindeki etkilerinin aydınlatılması açısından önemli bulgular elde edilmiştir.

İnsan pankreatik ekzokrin hücre hatlarında; GLP-1R sinyal aktivasyonunun Pdx-1, glukokinaz, ve GLUT2 genlerinin sentezini arttırdığı ve beraberinde hücre farklılaşmasını indükleyerek ekzokrin orijinli hücreleri endokrin hücre fenotipine dönüştürdüğü öne sürülmüştür (Zhou ve ark., 2002). GLP-1R agonistlerinin Foksa2 gibi transkripsiyon faktörleri aracılığıyla Pdx-1 gen transkripsiyonunu aktive ederek farklılaşmayı indüklediği belirtilmiştir. PANC-1 hücrelerinin Pdx-1 sentezi yokluğunda farklılaşamaması ekzokrin hücre farklılaşmasında GLP-1R agonistlerin etkilerini Pdx-1'e borçlu olduğunu göstermiştir (Hui ve ark., 2001). Aynı zamanda GLP-1'in, insan adacık progenitör hücrelerinin fonksiyonel beta hücrelerine dönüşümünü sağladığı öne sürülmüştür. Beta hücre hatları ve normal adacıklar üzerinde yapılan çalışmalarda GLP-1R agonistlerinin beta hücre proliferasyonunu stimüle ettikleri de gösterilmiştir. Normoglisemik deney hayvanlarında dahi GLP-1R agonistlerinin beta hücre proliferasyonu ve beta hücre kitlesini arttırdıkları saptanmıştır (Edvell ve Lindstrom, 1999; Xu ve ark., 1999; J. G. Kim ve ark., 2003).

Doğumla birlikte tek doz streptozotosin (STZ) uygulanmış Wistar sıçanlarda 5 gün geçici GLP-1 veya GLP-1R agonisti ekzentin-4 tedavisinin beta hücre kitlesinde bir artışa sebebiyet verdiği bulunmuştur (C. Tourrel ve ark., 2001). GLP-1R agonistlerinin kısmi pankreatektomi yapılan sıçanlarda beta hücre kitlesinde artışa yol açtığı belirtilmiştir (Xu ve ark., 1999). Diyabetik farelerde de GLP-1R agonistlerinin Pdx-1 sentezini uyararak beta hücre kitlesini arttırdığı yönünde çalışmalar vardır (Stoffers ve ark., 2000). Sıçanlarda geçici ekzentin-4 uygulamasının beta hücre kitlesinde bir artış sağlayarak diyabet gelişimini önlediği de bildirilmiştir (Stoffers ve ark., 2003).

GLP-1R agonistlerinin beta hücreleri üzerindeki antiapoptotik etkileri olduğu ve bu etkilerin de Pdx-1 geni sentezine bağlanabileceği bildirilmiştir. Genelde hücrelerde GLP-1 reseptör yetmezliği veya ekzentin-4 cevabının düşüklüğü Pdx-1 gen sentezindeki bozuklukla birlikte seyretmektedir (H. Wang ve ark., 2005). Beta hücre spesifik Pdx-1

inaktivasyonu olan farelerde, beta hücrelerinin apoptozunda bir artış gözlenirken; ekzentin-4 uygulaması ile bu farelerde beta hücre proliferasyonunun indüklenemediği gösterilmiştir (Li ve ark., 2005). GLP-1R agonistleri apoptotik sinyal yollarının inhibisyonu yoluyla beta hücre kitle artışına ve korunmasına aracılık ederler. GLP-1 Zucker diyabetik sıçanlarda kaspaz 3 sentezini ve nükleer fragmentasyonunu azaltırken, ekzentin-4 uygulaması ise db/db farelerde (Q. Wang ve Brubaker, 2002) ve STZ uygulanmış farelerde (Ehses ve ark., 2003) beta hücre apoptozisini azaltır. Bilindiği gibi beta hücre toksisitesinde reaktif oksijen ürünleri önemli roller oynar. GLP-1R aktivasyonunun hidrojen perokside maruz kalmış MIN6 hücrelerinde cAMP ve PI3K bağımlı bir biçimde Bcl-2 ve Bcl-xL sentezini arttırırken poli-ADP riboz polimeraz enzim yıkımını azaltarak apoptozisi engellediği belirtilmiştir (Hui ve ark., 2003). GLP-1'in proliferatif ve antiapoptotik etkilerinin açığa çıkartılması, adacık transplantasyonu olgularında GLP-1 uygulamasının yararlı olabileceğini düşündürmüştür. Adacık nakli sonrasında farelere ekzentin-4 uygulaması etkin glukoz kontrolü sağlamadığı halde, transplantasyon öncesi kültüre edilen adacıklara ekzentin-4 verilmesinin transplantasyon sonrasında deneklerde hiperglisemiye düzelttiği belirlenmiştir (King ve ark., 2005).

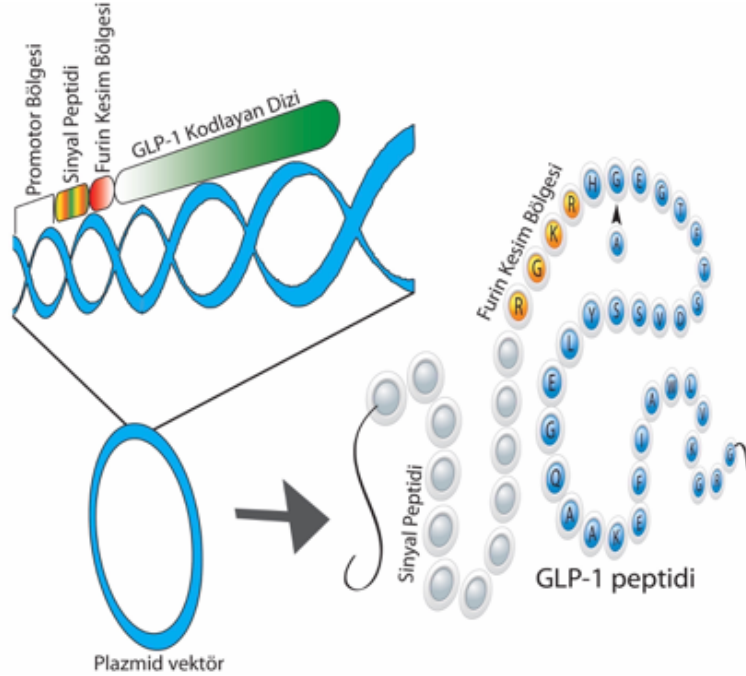
Tüm bu bilgilerden yola çıkarak, diyabet tedavisinde geliştirilen GLP-1 tabanlı stratejilerin beta hücre oluşumundaki etkilerinin incelenmesi için tedavi sonrasında oluşan insülin pozitif hücrelerin kökeninin incelenmesi gerekmektedir. Bu doğrultuda, beta hücre kitlesini arttırdığı gösterilen GLP-1 aracılığıyla bu hücrelerin hangi mekanizmayla ve hangi hücre kökeninden beta hücrelerine dönüştüğü belirlenirse, diyabet tedavisi için birçok yeni tedavi stratejisinin geliştirilmesine katkı sağlayacak bilgilere ulaşılabilir.

2.5. Diyabette İnkretin Tabanlı gen tedavi stratejileri

Tip 2 Diyabet (T2DM) hastalarında yapılan izoglisemik glukoz tolerans testleri açıkça göstermektedir ki, sağlıklı kontrol bireylere göre T2DM hastalarında inkretin etkisi %50 azalmıştır (Knop ve ark., 2007). Dolayısıyla, inkretinler postprandiyal glukoz dolaşımının ana modülatörleri olduğundan, inkretin yanıtın kaybı T2DM hastalarında kesin olarak glukoz intoleransına yol açmaktadır. T2DM hastalarında, postprandiyal GLP-1 yanıtı oldukça azalmıştır (Toft-Nielsen ve ark., 2001). T2DM hastalarında,

azalmış beta hücre yanıtı GLP-1 infüzyonu ile geri kazanılabildiğinden(Kjems ve ark., 2003) GLP-1, T2DM tedavisi için terapötik bir ajan olarak değerlendirilmektedir.

GLP-1 hipoglisemiye neden olmaksızın, etkin bir şekilde glukoz indüklü insülin salınımını uyarır (Vilsboll ve ark., 2001). Ancak, GLP-1 yaygın bir serin proteaz olan Dipeptidil Peptidaz-4 (DPP-4) ile hızla kesime uğradığından, biyolojik yarı ömrü oldukça kısadır (2-3 dakika). Bu özellik, sık sık injeksiyon gerektirmesi veya daha fazla miktarlarda kullanılması gerekliliğinden dolayı, GLP-1'in terapötik kullanımını sınırlandırmaktadır (T. Kieffer ve Habener, 1999a). Biyolojik ömrü kısa olan GLP-1'in bu özelliğini telafi etmek amacıyla, biyolojik olarak aktif GLP-1 üretiminin ve sekresyonunun sağlanması için viral ve viral olmayan gen aktarım teknolojileri geliştirilmiştir (Rowzee ve ark., 2011). Preproglukagon transgeninin öngörülemez bir glukagon üretimi veya fonksiyonu tam olarak bilinmeyen diğer peptidlerin üretimine yol açabilme potansiyeli dolayısıyla, gen transfer deneylerinde tüm preproglukagon cDNA'sının aktarımı yerine, sadece GLP-1 kodlayan sekans, GLP-1 7-37'nin aktarımı tercih edilmektedir (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. GLP-1 kodlayan gen terapi vektör tasarımı(M. H. Tasyurek, Altunbas, Canatan, ve ark., 2014). Transgen ekspresyonunu hedef organa sınırlamak için hücre spesifik promotor kullanılır. GLP-1'in sekretuar yollara yönlendirilmesi için farklı sinyal peptidleri tercih edilebilir. Furin kesim bölgesi, GLP-1'in sinyal peptidinden ayrılması için gereklidir. Alanin (Ala) aminoasidinin Glisin (Gli) ile yer değiştirilmesi ile, DPP4 kesimine dirençli GLP-1 elde edilir.

2.6. Viral Olmayan Gen Transfer Yaklaşımları

Diyabetik hayvanlarda *in vivo* GLP-1 gen aktarımının sonuçlarını değerlendirmek amacıyla, plazmid tabanlı bir gen aktarım metodu geliştirilmiş (Oh ve ark., 2003), ve bu amaçla başlangıç kodonu ile GLP-1 kodlayan bölge arasına bir furin ayrılma/tanıma bölgesi yerleştirilerek modifiye bir GLP-17-37 cDNA'sı oluşturulmuştur. Zucker diabetik sıçanlara (ZDF) polietilenimin/pGLP-1 kompleksinin intravenöz tek doz enjeksiyonu sonucunda, glukoz indüklü insülin salınımında artış ve 2 hafta süreyle kan glukoz seviyelerinde düşüş gözlenmiştir. GLP-1 ekspresyonunda artış sağlamak amacıyla, furin tanıma bölgesi içeren GLP-1 7-37 cDNA'sı taşıyan plazmid, NF- κ B bağlama bölgeleri içeren bir SV40 promotor bölgesi ile birleştirilmiştir (S. Choi ve ark., 2005) Polietilenimin/pGLP-1 kompleksinin, diyet indüklü obez (DIO) farelere, sistemik tek doz enjeksiyon ile uygulanması sonucunda insülin sekresyonunda artış, ve iki haftadan daha uzun süreyle kan glukoz seviyelerinde düşüş gözlenmiştir.

GLP-1 peptidinin kısa ömrü ve aktarımının bağırsak dışı yollardan yapılma zorunluluğu dolayısıyla, GLP-1'in terapötik etkisini uzatmak ve arttırmak için, aktif insan GLP-1'i ve fare IgG1 ağır zincir sabit bölgeleriyle (GLP-1/Fc) bir füzyon proteini oluşturulmuştur (Kumar ve ark., 2007). IgG-Fc homodimerizasyonu, doğal GLP-1'e kıyasla daha uzun yarı ömre sahip, bivalent GLP-1 peptid ligandlarının formasyonuna yol açmıştır. Oluşan bu büyük moleküler ağırlığa sahip homodimerler, renal klerensi yavaşlatıp, konjuge peptidin degradasyonunu azaltmıştır. GLP-1/Fc füzyon proteinin aktarımından üç ay sonra db/db farelerde, açlık kan glukoz seviyelerinin normalizasyonu ile birlikte, glukoz indüklü insülin sekresyonunun arttığı ve glukagon salınımının azaldığı gözlenmiştir. Bu sonuçlar, GLP-1/Fc plazmid enjeksiyonunun anti-diyabetik etkilerinin gözlenmesinin zaman aldığını göstermektedir. Bununla birlikte, GLP-1/Fc füzyon proteini kan-beyin bariyerini geçemediğinden, bu uygulama vücut ağırlığı ve periferik insülin duyarlılığı üzerine herhangi bir etki göstermemiştir.

Plazmid DNA ile yoğun elektrostatik etkileşimlere girerek, plazmid DNA'sının nükleazların saldırısından korunmasını sağlayan katyonik polimerlerin bu özelliklerinden yararlanmak amacıyla, kitosan tabanlı bir gen aktarım sistemi geliştirilmiştir (Dash ve ark., 1999). Ek olarak, kitosan bazlı nanopartiküller, sıkı

intraselüler bağlantı bölgelerinden geçebilecek kadar küçük olduklarından, hücre içerisine girerek GLP-1 kodlayan plazmid DNA'sının aktarımını sağlayabilirler (Thibault ve ark., 2010). Furin tanıma bölgesi ve cytomegalovirus(CMV) promotör bölgesi içeren ve GLP-1 kodlayan bir plazmid DNA'sı ile oluşturulmuş kitosan bazlı nano-kompleksler 12 haftalık, Diyabet ZDF sıçanlara uygulanmış ve bu nano-komplekslerin terapötik etkinlikleri değerlendirilmiştir (Jean ve ark., 2011). Kitosan-GLP-1 nanopartikülleriyle yapılan 5 enjeksiyonun ardından 49 gün sonra plazma GLP-1 miktarlarında belirgin bir artış gözlenmiştir. Uygulama almış sıçanların glukoz toleransında gelişme görülmesine ve ağırlık kazançlarında azalma olmasına rağmen, dolaşımdaki insülin artışının geçici olduğu ve son enjeksiyondan sonra sadece 14 gün sürdüğü belirlenmiştir. İlginç bir şekilde, nano-komplekslerin subkutan (s.c) enjeksiyonu, intramuskular (i.m.) gen aktarımına göre daha etkili olmuştur. Bu durum, enjeksiyon bölgesinde oluşan bir inflamatuvar reaksiyonun vektör yayılımını engelleyici bir etki göstermiş olmasından kaynaklanmış olabilir. Son zamanlarda yapılan bir in vitro çalışmada, spesifik kitosan formülasyonları aracılığıyla doğal GLP-1, DPP-4 dirençli GLP-1 analogları ve DPP-4 mRNA hedefli siRNA moleküllerinin aktarımı araştırılmıştır (Jean ve ark., 2012). Kitosan formülasyonları aracılığıyla etkin bir şekilde nükleik asit aktarımı yapılan hücre hatlarında, doğal GLP-1'e kıyasla, DPP-4 dirençli GLP-1 analoglarında 5 kat daha fazla artış gözlenmiştir. Ek olarak, kitosan formülasyonları kullanılarak gerçekleştirilmesi amaçlanan DPP-4 gen susturma yaklaşımı başarılı olmuş ve ticari olarak kullanılan lipoplex DharmaFECT molekülüne göre bu yaklaşımla daha düşük toksisite gözlenmiştir.

Ekzentin-4 (Exenatid), daha uzun yarı ömürlü ve etkin bir GLP-1R agonistidir (%50 sekans homolojisi). Bu sebeple, iki farklı plazmid kullanılarak gerçekleşecek iki basamaklı bir transkripsiyon amplifikasyon metodu kullanılarak Ekzentin-4 ekspresyon sistemi tasarlanmıştır. Bu sistemde, bir plazmidde etkili bir transkripsiyon faktörü kodlayan sekans, ikinci plazmidde ise Ekzentin-4 kodlayan sekansın promotörü bulunmaktadır (P. H. Kim ve ark., 2012). Gen transfer aracı olarak, düşük toksisite ve yüksek transfeksiyon etkinliği göstermesi dolayısıyla Arjinin-cyctaminebisacrylamide-siaminohexane polimer grafiti (ABP) seçilmiş ve yüksek yağlı yemle beslenmiş

C57BL/6J farelerde artan glukoz indüklü insülin salınımı ile birlikte, düşük kan glukoz seviyeleri gözlenmiştir.

2.7. Viral Gen Transfer Yaklaşımları

2.7.1. Adenoviruslar

Gen transfer etkinliğinin artırılması amacıyla, GLP-17–37 kodlayan adenoviral ekspresyon vektörleri tasarlanarak, db/db farelere ve ZDF diyabetik sıçanlara bu vektörlerin sistemik enjeksiyonu gerçekleştirilmiştir (Parsons ve ark., 2007). Modifiye edilmiş GLP-1 kodlayan bölgeye (peptidin DPP4 dirençli hale gelmesi için A&G yerdeğişimi), bir lider sekans ve bir furin tanıma bölgesi bağlanarak, dolaşımda sürekli olarak yüksek seviyelerde aktif GLP-17–37 ekspresyonu sağlanmış ve bu sayede hiperglisemi düşürülmüştür. Adenovirus-GLP-1 vektörünün sistemik enjeksiyonu, ZDF sıçanlarda gıda alımını azaltarak ağırlık kaybına ve glukoz tolerans gelişimine yol açmıştır.

Farklı bir yaklaşımda, DPP-4 dirençli GLP-17-37, bir furin kesim bölgesi ile birlikte fare büyüme hormonunun (mGH) sekretuar sekansına bağlanmış ve farelerin çene altı bezlerinde GLP-1 ekspresyonu sağlamak amacıyla adenovirus vektörlerine klonlanmıştır (Voutetakis ve ark., 2010). Ad-GLP-1 aktarımı ile, kontrol vektör enjeksiyonu yapılmış farelere göre 3 kat daha yüksek serum GLP-1 seviyelerine ulaşılmıştır. Buna bağlı olarak, kan glukozunun daha hızlı temizlenmesi ve alloksan indüklü hipergliseminin düşürülmesi sağlanmıştır. Tükürük bezlerindeki ekzokrin hücrelerden salınan GLP-1, dolaşım sistemindeki kan glukoz seviyelerini değiştirmek amacıyla modifiye edilebilmektedir. Ancak, adenovirus aracılı GLP-1 gen aktarımının tükürük bezlerine retrodüktal infüzyonu; viral omurga kaynaklı bir inflamatuvar reaksiyon oluşmasına ve GLP-1 peptidinin terapötik etkinliğinin sınırlanmasına yol açabilir.

Kesintisiz GLP-1 ekspresyonunun beta hücre rejenerasyonuna etkisinin değerlendirilmesi amacıyla, CMV promotor ve albümin lider sekansı içeren GLP-1 cDNA'sı (rAd-GLP-1) taşıyan bir adenoviral vektör oluşturulmuş ve farelerde in vivo olarak test edilmiştir (Liu ve ark., 2007). Streptozotocin (STZ) indüklü diyabetik fareler ve obez olmayan immün yetersiz diyabetik farelerin birleşimi NOD/SCID farelere yapılan tek doz intravenöz rAd-GLP-1 enjeksiyonu, 10 gün içinde farelerin diyabetik

durumlarında düzelmeye yol açmış ve 20. günde normoglisemiye ulaşılmasını sağlamıştır. Ayrıca, rAd-GLP-1 uygulaması almış farelerde, kontrol adenovirus vektörü verilen STZ indüklü diyabetik farelere oranla, pankreasta insülin pozitif hücre sayısında artış ve dolayısıyla yüksek seviyelerde insülin sekresyonu gözlenmiştir. Bu doğrultuda, insülin üreten pankreatik beta hücrelerinin rejenerasyonu, GLP-1 aracılı gen terapisinin diyabet tedavisinde potansiyel bir terapötik strateji olabileceğini göstermiştir. CMV promotor ve insülin lider sekansı ile oluşturulan, GLP-17–37 kodlayan yeni bir rekombinant adenovirus (Ad-ILGLP-1) 12 haftalık T2DM ZDF sıçanlara intrevenöz yolla enjekte edilmiş (Y. Lee ve ark., 2008), ve dolaşımda yüksek seviyelerde GLP-1 miktarı ile birlikte, bu sıçanlarda gelişmiş glukoz toleransı ve 3 hafta süreyle normoglisemi gözlenmiştir. Ancak, hem pre-diyabetik hem de diyabetik ZDF sıçanlarda benzer şekilde, adenovirus aracılı GLP-1 gen aktarımında koruma, adenovirus vektörleri ile indüklenen gen ekspresyonunun geçici olması dolayısıyla, sadece 21 gün sürmüştür.

Obezite ve insülin direnci, düşük dereceli kronik inflamasyonla bağlantılıdır (Bastard vd., 2006). Adipoz dokunun, insülin direnci oluşumuna katkı sağlayan bir inflamasyon kaynağı olması dolayısıyla, GLP-1'in adipoz doku üzerindeki anti-inflamatuvar etkisinin değerlendirilmesi amacıyla GLP-1 üreten bir rekombinant adenovirus (rAd-GLP-1) üretilmiş ve ob/ob farelere uygulanmıştır (Y. S. Lee ve ark., 2012). rAd-GLP-1 uygulaması almış ob/ob farelerin yağ kitlesi, adiposit boyutları ve lipojenik mRNA ekspresyon seviyelerinde, uygulama almayan farelere oranla belirgin bir azalma gözlenmiştir. Subkütan yağlarda bir değişiklik olmazken abdominal yağlanmanın azalması, daha önceki gözlemleri destekleyici nitelikte olup, abdominal yağ birikiminin insülin direnci ile ilişkili olduğunu göstermiştir (Usui ve ark., 2010). Adipositlerde (makrofajlarla birlikte) inflamatuvar yolların direkt inhibisyonu, GLP-1'in insülin duyarlılığını geliştirdiğini ortaya koymaktadır.

Yüksek yağlı diyet indüklü obez fare modelinde, artmış Ekzentin-4 ekspresyonunun uzun dönemde in vivo etkilerini incelemek amacıyla, bir yardımcı-bağımlı adenoviral vektör (HDAd) üretilmiştir (Samson ve ark., 2008). Obez hastalarda meydana gelen metabolik değişimleri daha iyi taklit edeceği düşünüldüğünden, genetik olarak değiştirilmiş aşırı obez kemirgen modeller yerine bu hayvan modeli kullanılmıştır.

Yüksek yağlı diyetle beslenen farelere tek doz HDAd-Ex4 enjeksiyonu sonrasında, glukoz homeostazisinde gelişme ve glukojenik enzim aktivitesinde azalma görülmüştür. Bu etkilere rağmen, uygulama sonrasında dolaşımdaki insülin seviyelerinde herhangi bir artış gözlenmezken, uygulama almış hayvanlarda hepatik yağların azaldığı ve adipokin profillerinin geliştiği belirlenmiştir. Yüksek yağlı diyet ile beslenen farelerde gözlenen ağırlık kazancındaki düşüş, enerji tüketiminde artışa bağlı olup, gıda alımındaki bir değişim ile ilgili değildir.

2.7.2. Adeno Asosiye Virus (AAV)

Fare insülin II promotor (MIP) kontrolünde, yeşil florasan protein kodlayan, çift iplikli AAV serotip 8 vektörü, pankreatik beta hücrelerinde doku spesifik transdüksiyon sağlar (Z. Wang ve ark., 2006). Bu datalar göz önünde bulundurularak, eGFP yerine GLP-1 kodlayan DsAAV8-MIP oluşturulmuş ve çoklu düşük doz streptozotosin (STZ) uygulaması ile beta hücre hasarı yaratılmış diyabetik farelere intraperitoneal enjeksiyon yoluyla uygulanarak, GLP-1'in terapötik etkinliği değerlendirilmiştir (Riedel ve Kieffer, 2010). Hiperglisemiden korunma sağlanmış olmasına rağmen, beta hücrelerinde, dsAAV'nin yetersiz transdüksiyonuna bağlı olarak (27%), dolaşımdaki GLP-1 seviyesinde artış sağlayabilecek kadar yüksek bir GLP-1 ekspresyonu sağlanamamıştır. Bununla birlikte, adacık içinde lokalize GLP-1 üretimi gerçekleşmiş ve adacık fonsiyon ve sağkalımında gelişme gözlenmiştir.

Hepatosit büyüme faktörü (HGF)'nin adenoviral aktarımı, pankreatik beta hücre ölümünü engelleyici ve transplantasyon açısından önemli olan adacık hücre kitlesini minimize edici özelliği dolayısıyla (Lopez-Talavera ve ark., 2004), diyabet tedavisinde terapötik bir ajan olarak değerlendirilmektedir (Gaddy ve ark., 2012). GLP-1 ve HGF'nin ortak uygulaması ile, obez hastalarda insülin duyarlılığında gelişim ve vücut ağırlığında azalma gözlenmiştir (T. Kieffer ve Habener, 1999a). Bu durumdan yola çıkılarak, beta hücre büyüme faktörleri, GLP-1 ve HGF'nin diyabet tedavisindeki terapötik etkinliklerinin gen terapi yaklaşımıyla test edilmesi amacıyla dsAAV vektörleri oluşturulmuştur. AAV vektörlerinin transgen aktarım kapasitelerinin kısıtlı olması dolayısıyla, HGF reseptörünün sadece kısmi aktivasyon potensiyeline sahip N ve K1 bölgeleri (HGF/NK1) dsAAV vektörüne klonlanmıştır (Gaddy ve ark., 2010). GLP-1 ve

HGF/NK1 fragmentlerinin dsAAV vektör aracılı aktarımı, pankreatik adacık hücre proliferasyonunu indükleyerek db/db farelerde diyabet başlangıcının daha geç dönemde gerçekleşmesini sağlamıştır. AAV vektörlerinin kısıtlı transgen aktarım kapasiteleri dolayısıyla HGF fragmentinin (NK1) bir kısmı aktarılabildiğinden, daha önceden tahmin edildiği gibi, db/db farelerde insülin direnci ve ağırlık kazancında bir etki görülememiştir.

db/db obez farelerde GLP-1 gen transferinin uzun dönemdeki antidiyabetojenik etkilerinin incelenmesi amacıyla, fare Ig κ zinciri lider sekansı ve furin kesim bölgesi içeren, GLP-17–37 kodlayan bir dsAAV vektörü oluşturulmuştur (S. a. L. Choi, HC, 2011). Karaciğerde stabil transdüksiyon sağlamak amacıyla CMV enhansır/ tavuk β -aktin promotörü kullanılmıştır. dsAAV GLP-1 vektörünün tek doz enjeksiyonu sonucunda, dolaşımdaki GLP-1 miktarında 4-10 kat artış sağlanmış ve buna bağlı olarak dört ay süresince kan glukoz seviyelerinde düşüş gözlenmiştir. 18 hafta süreyle devamlı GLP-1 ekspresyonu sağlanmış olmasına rağmen, vücut ağırlığında herhangi bir etki gözlenmemiştir.

Yüksek düzeylerde protein üretimi ve kan dolaşımına protein sekresyonu yapan tükürük bezleri, bu özellikleri dolayısıyla gen terapisi stratejilerinde uygun bir hedef organ olarak değerlendirilmektedir (Voutetakis ve ark., 2005). AAV serotip 5 (AAV5) ile kemirgen tükürük bezlerine etkin gen transferi sağlanabildiğinden (Katano ve ark., 2006), AAV5 aracılı Ekzentin-4 gen aktarımı, iki farklı T2DM deney hayvan modelinde (Zucker fa/fa sıçanlar ve Yüksek Yağlı Diyet (HFD)) test edilmiştir (Di Pasquale vd., 2012). Ekzentin-4 kodlayan sekans, sinir büyüme faktörünün (NGF) sekretuar sinyal peptidine bağlanmış ve ayrıca bir furin kesim bölgesi eklenmiştir. Tükürük bezlerine perkütan yolla yapılan AAV5 enjeksiyonunu takiben, diyabetik hayvanların kanında ve tükürük bezlerinde, farmakolojik seviyelerde artmış Ekzentin-4 ekspresyonu gözlenmiş ve buna bağlı olarak, glisemik kontrolün ve insülin duyarlılığın geliştiği ve ağırlık kaybının gerçekleştiği gözlenmiştir.

2.8. GLP-1 aracılı gen terapi yaklaşımlarında stratejik noktalar

2.8.1. Vektör Seçimi

Polietilenimin plazmid DNA kompleksleri kullanılarak yapılan ilk plazmid tabanlı gen aktarım tekniklerinde, insülin sekresyonu ve kan glukoz seviyelerinde sadece geçici etkiler gösterilmiştir. Bu durum, esas olarak plazmid tabanlı gen aktarım metodlarının doğasında var olan kısa dönemli gen ekspresyonu sağlayabilme özelliklerine bağlı olmakla birlikte, GLP-1 kodlayan sekansın bir sekretuar sinyal içermemesi ile de ilişkilidir (Oh ve ark., 2003; S. Choi ve ark., 2005). Benzer olarak, kitosan aracılı gen transfer stratejilerinde, geçici GLP-1 gen ekspresyonu sağlandığından, insülinotropik aktivitenin kalıcılığı açısından kitosan-DNA komplekslerinin tekrarlayan uygulamalarına ihtiyaç duyulmaktadır. Tüm bunlarla birlikte, spesifik kitosan formülasyonlarının DPP-4 hedefli siRNA stratejileri ile birlikte kullanımı, çok daha etkin sonuçlara yol açabilmektedir (Jean ve ark., 2012). Son olarak, GLP-1/Fc füzyon proteini kodlayan plazmidler kullanılarak yürütülen deneyler, oluşan bu bivalent GLP-1 peptid ligandının, ileri çalışmalarda değerlendirilmesi gereken yapısal stabiliteye sahip güçlü bir GLP-1 analogu olduğunu göstermiştir (Kumar ve ark., 2007).

GLP-1 gen aktarımı için birçok viral olmayan gen aktarım sistemleri test edilmiş olsa da, şu an için gen transferi yöntemlerinde en iyi seçim viral vektörlerdir. Adenovirüsler üzerlerinde kılıfı olmayan (zarfsız) 90-100 nm çapında orta büyüklükte ikozahedral nükleokapsid içerisinde çift zincirli DNA genomu olan virüslardır. Adeno asosiyeye virus ise 20 nm çapında oldukça küçük, zarfsız ve genomları tek zincirli DNA' dan oluşan vektörlerdir. Diğer taraftan lentivirüsler; 80-100 nm çapında üzerlerinde kılıfı olan (zarflı), genom olarak her nükleokapsid içinde iki tane pozitif zincirli RNA taşıyan gen nakil araçlarıdır.

Test edilen viral vektörler arasında, adenoviral vektörler, çok sayıda farklı dokuda etkin transdüksiyon sağlaması ve hem bölünen hem de bölünmeyen hücreleri enfekte edebilmesi açısından oldukça etkili vektörler olup, yüksek titrede üretim verimi ve büyük transgen aktarımı sağlayabilmektedirler (A. D. Sanlioglu, Altunbas, ve ark., 2012). Bununla birlikte, adenovirus ile transdükte edilmiş hücreler, adenovirüsler tarafından kodlanan viral peptidlerin antijenitesi dolayısıyla immün sistem tarafından

hızla temizlenmektedir ve dolayısıyla bu özellik uzun süreli transgen ekspresyonunu ciddi bir şekilde sınırlandırmaktadır (Doerschug ve ark., 2002). Ek olarak, adenovirus vektörlerinin yüksek dozlarda sistemik transferi, ciddi olumsuz sonuçlara yol açabilmektedir (Raper ve ark., 2003), ve nötralize edici antikorların varlığı sebebiyle tekrarlayan vektör uygulaması verimli olmamaktadır. Birinci nesil adenovirus vektörlerin aksine, yardımcı-bağımlı (gutless) adenoviral (HDAd) vektörler, ITR'lar haricinde neredeyse tüm viral genlerin silinmiş olması dolayısıyla viral protein kodlamadıklarından (Vetrini ve Ng, 2010)(Vetrini ve Ng, 2010) gözardı edilebilecek seviyede düşük bir toksisiteye sahiptirler (Muhammad ve ark., 2012) ve uzun süreli (hatta yaşam boyu) transgen ekspresyonu sağlamaktadırlar (Vetrini ve Ng, 2011). Dolayısıyla, DIO farelere HDAd aracılı Ekzentin-4 gen aktarımı, ağırlık kazancında azalma gibi bazı metabolik değişimlerin araştırmacılar tarafından uzun süreli takibine olanak sağlamıştır, ki bu durum, birinci nesil adenovirus vektörler ile olası değildir (Samson ve ark., 2008). Bununla birlikte, diyabet hayvan modellerinde HDAd-aracılı GLP-1 gen aktarımının terapötik etkinliği ile ilgili çalışmalar halen sürdürülmektedir.

Adenovirus vektörlerine benzer şekilde, AAV-tabanlı vektörler hem bölünen hem bölünmeyen hücreleri enfekte edebilmektedir. AAV genomu tek iplikli DNA (ssDNA)'dan oluştuğundan, transdükte edilmiş hücrelerde çift iplikli DNA'ya (dsDNA) dönüşüm, rAAV aracılı gen aktarımında hız kısıtlayıcı bir aşama olarak görülmektedir (S. Sanlioglu ve ark., 1999; S. Sanlioglu ve Engelhardt, 1999; S. Sanlioglu ve ark., 2001). Transdüksiyon etkinliğini arttırmak amacıyla, ITR'larda oluşturulan mutasyonlar yardımıyla geliştirilen dsAAV vektörleri ile çift iplikli, hairpin benzeri DNA dimerlerinin, AAV kapsitlerine öncelikli paketlenmesi sağlanmıştır (Z. Wang ve ark., 2003). Klasik tek iplikli DNA vektör genomlarından oluşan AAV vektörlerinin pankreas içi enjeksiyonları, sınırlı sayıda adacık hücresinin transdüksiyonu ile sonuçlanmıştır (A. Y. Wang ve ark., 2004). Bu nedenle in vivo pankreatik gen transferinde geniş çaplı, dayanıklı ve stabil transgen ekspresyonu sağlamak amacıyla farklı gen aktarım yöntemleri ve farklı AAV vektör serotipleri keşfedilmiştir (Z. Wang ve ark., 2006). Sonuç olarak, dsAAV vektör serotip 8 (dsAAV8) C57BL/6 ve BALB/c farelerde, uzun süreli, stabil gen transferi ve ekspresyonu sağlamıştır. Bu bilgilere rağmen, AAV vektörleri oldukça sınırlı transgen kapasitesi, düşük transdüksiyon etkinliği ve düşük

titrede üretim kapasitesine sahiptirler (S. Sanlioglu ve Engelhardt, 1999). Bunlara ek olarak, yabancı tip AAV, insan genomunda 19. kromozomun spesifik bir bölgesine (AAVS1) entegre olduğundan (AAVS1), rekombinant AAV (rAAV) konakçı kromozomuna entegrasyon için gerekli rep proteininden yoksundur (A. D. Sanlioglu ve ark., 2004). AAV vektörleri, yavaş bölünen hücrelerde epizomal olarak kalırlar ve adenovirus vektörlerine kıyasla immünojeniteleri düşüktür (S. Sanlioglu, Benson, & Engelhardt, 2000; S. Sanlioglu, Benson, Yang, ve ark., 2000), bu şekilde pankreatik beta hücrelerinde uzun süreli stabil gen ekspresyonu sağlayabilmektedirler.

Adenoviruslar da adeno-assosiyasyon virusları da seçici olarak pankreası enfekte etmezler. Bu gen transfer vektörlerinin her ikisi de, sistemik aktarımı takiben primer hedef dokusu karaciğer olmak üzere, yaygın doku tropizmi göstermektedirler (A. Y. Wang ve ark., 2004). Dolayısıyla, pankreasta hedef alınan hücre tipine aktarım yapılabilmesi için, pankreasa (A. Y. Wang ve ark., 2004) veya çölyak arterine (Mukai ve ark., 2007) direkt enjeksiyon gerekmektedir. Sistemik enjeksiyonla beta hücre spesifik gen ekspresyonunu sağlamak amacıyla, insülin promotörleri de kullanılabilir (Riedel ve ark., 2010). Pankreasın dışındaki hücrelerin transdüksiyonu, olumsuz etki yaratacak potansiyele sahip olduğundan (D. W. Russell, 2007; Rosas ve ark., 2012)(Rosas vd., 2012; Russell, 2007) bu problemlerin çözümü amacıyla doğal pankreatotropik viruslar kullanılabilir. Örneğin, B grubu koksakivirüsleri (CVBler) pankreatik dokuda, adacık ve ekzokrin dokulara oldukça güçlü bir tropizm gösterirler (Yap ve ark., 2003). CVB'ler ayrıca kalp ve karaciğer dokularını da hedeflediğinden, zayıflatılmış CVB aşından (vCVB(dm)) elde edilmiş iki orjinal mutasyon eklenerek CVB'nin pankreasa hedeflenmesini sağlayan özgün bir pankreatotropik suş geliştirilmiştir (Dan ve Chantler, 2005) GLP-1 ekspresyon eden vCVB(dm) (vCVB(dm)GLP-1) enjeksiyonu, diyabetik Balb/c farelerde pankreatik insülin miktarını artırarak ve beta hücre neogenezini stimüle ederek, hiperglisemiyi düşürmüştür (Dan ve Chantler, 2011). Bununla birlikte; düşük transdüksiyon etkinliği, inflamatuvar yanıt oluşturma ve konakçı genomuna entegre olamama özellikleri dolayısıyla, vCVB(dm)GLP-1 sadece 4-7 gün süren geçici bir transgen ekspresyonu sağlayabilmektedir. Geçmişte T1DM ile ilişkili olması dolayısıyla bu tür vektörlerin klinik kullanımı tavsiye edilmemektedir.

İn vivo olarak uzun süreli gen ekspresyonu sağlanabilmesi için, viral vektörlerin genoma entegrasyonu gereklidir. Entegrasyon yeteneği olan vektörler arasında, bölünen ve bölünmeyen hücreleri enfekte edebilme yeteneği, yok denebilecek kadar az immünojenik özellikleri ve zararlı mutasyonlara yol açmamaları dolayısıyla, lentiviral vektörler doğru seçim gibi görünmektedir (Durand ve Cimarelli, 2011; Di Nunzio ve ark., 2012). Lentiviral vektörler, yabancıl tip HIV-1 ile enfekte olsa dahi genomdan çıkamadıklarından klinik uygulamalar için güvenli olarak kabul edilmektedirler. Lentiviral vektörlerin veziküler stomatit virus G protein (VSV-G) ile psödoplemdirilmesi de, yaygın doku tropizmi ile birlikte yüksek verimde titre sağlamak açısından önemlidir (Naldini ve Verma, 2000; Copreni ve ark., 2010; H. M. Tasyurek, Eksi, ve ark., 2018). Henüz lentiviral vektörlerle ilgili herhangi bir doz sınırlandırıcı toksisite bildirilmemiş olup, çoklu enjeksiyonlar sonrasında dahi toksisite oluşma kaygısı minimal düzeydedir. Sonuç olarak, psödopleme yöntemiyle veya doku spesifik promotorların kullanımıyla pankreatik adacıkların hedeflendiği lentivirus aracılı GLP-1 gen aktarımı, GLP-1 aracılı gen tedavi yaklaşımlarının güvenilirliğinin ve terapötik etkinliğinin geliştirilmesi açısından önemli olabilir.

2.8.2. Promotor Seçimi

Viral vektörler kullanılarak GLP-1 gen aktarımının yapıldığı bazı çalışmalarda ilk olarak kullanılan belirleyici promotorlar CMV, tavuk β -aktin veya ubikitin gibi güçlü ancak kontrolsüz GLP-17–37 ekspresyonu sağlayan promotorlardır. Bu çalışmalar, insülin duyarlılığının gelişimi ile birlikte kan glukozunun azalmasına yol açan plazma GLP-1 seviyelerindeki artışı açıkça göstermiş olsa da transgen ekspresyonunun gerçekleştiği bölge ile ilgili net bir bilgi açıklanamamıştır. Ek olarak, GLP-1 ekspresyonunun sürekliliğinin hangi noktada GLP-1 reseptörünü duyarsızlaştırarak GLP-1 dirençli bir durum yaratacağı veya ne tür yan etkilere sebep olacağı konusu da bilinmemektedir. Bu bağlamda, gen aktarımının güvenilirliği ve toksisitesi ile ilgili sorunların çözümünde doku spesifik promotorlar kullanılabilir. Bu bağlamda, promotor seçimi, transgen ekspresyonu gerçekleştirecek olan hedef dokuya göre yapılmaktadır. Örneğin, LPK promotoru kullanılarak, karaciğer spesifik GLP-1 gen ekspresyonu, başarıyla gerçekleştirilmiştir (Riedel ve ark., 2009). Bu promotor, ilgilenilen transgen üzerinde kontrollü bir etkisi olması dolayısıyla ek bir fayda sağlamaktadır. Sadece kan

glukozunun arttığı koşullarda, örneğin yemeklerden sonra, promotor aktivitesi artmakta ve bu durum, hem GLP-1'in fizyolojik salınımını birebir taklit eden bir mekanizma olması açısından hem de olası yan etkilerden kaçınmak açısından oldukça önemlidir.

Glukoregülatör aktiviteleri olan insülin promotörü, pankreatik beta hücrelerine özgü transgen ekspresyonu sağlaması açısından, oldukça etkili bir promotördür (Z. Wang ve ark., 2006). DsAAV8-MIP-GLP-1'in intraperitoneal aktarımı, pankreatik beta hücrelerine lokalize GLP-1 ekspresyonu sağlarken, aynı zamanda farelerde STZ indüklü diyabet gelişimine karşı koruyucu etki oluşturmaktadır. Buna rağmen, pankreatik beta hücrelerinde lokalize GLP-1 ekspresyonu, plazma GLP-1 seviyelerini arttıracak kadar yeterli olamadığından, GLP-1'in insülin duyarlılığına, gıda alımına ve ağırlık kaybına etkisi gibi kapsamlı terapötik etkinlikleri sınırlı kalmaktadır. Dolayısıyla, lokalize gen ekspresyonu dolaşımdaki GLP-1 miktarını arttırmada yetersizdir. Bu sebeple, insülin duyarlılığı ve ağırlık kaybının oluşmasında etkili olan, adipositler, kas ve karaciğer gibi glukoregülatör dokular ile GLP-1'in karşılıklı etkileşimi sınırlanmaktadır. GLP-1 intestinal endokrin L hücrelerinden salınır. Bağırsaklarda lokalize etki gösteren GLP-1, gastrik boşaltımı ve gastrik asit salınımını inhibe ederek merkezi sinir sistemi üzerinden gıda alımının azalmasına ve ağırlık kaybına yol açar. Dolayısıyla GLP-1 ekspresyonunun pankreatik beta hücreleri ile sınırlandırılması, GLP-1'in yararlı gastrointestinal etkilerinin kesintiye uğramasına yol açabilir (Riedel ve Kieffer, 2010).

2.8.3. Hayvan Modelleri

GLP-1 gen aktarımı ile ilgili deneysel gen terapi çalışmalarının çoğu, ob/ob, db/db ve Zucker diyabetik sıçanlar gibi, genetik olarak modifiye edilmiş kemirgen obezite modellerinde gerçekleştirilmiştir (Oh ve ark., 2003; Kumar ve ark., 2007; YS Lee ve ark., 2007; Parsons ve ark., 2007). Bu modeller, iştahı (leptin (ob/ob) veya leptin reseptörleri (db/db, Zucker diyabetik fa/fa sıçanlar)) etkileyen genlerde mutasyonlar taşıdığından, genetik olarak modifiye edilmiş diyabet hayvan modellerinin kullanımı, metabolik değişimler ile ilgili uzun dönemli çalışmalar için ideal olmayabilir (Williams ve ark., 2006). İnsan hastalıkları için en uygun deneysel hayvan modeli, ilgilenilen insan hastalığının patofizyolojisini en iyi şekilde taklit edebilecek olan modeldir. Ek olarak, model standardizasyonu, sürekliliği, maliyeti, klinik faydaları ve geniş çapta

araştırmacıların erişimi gibi faktörler, karar aşamasını etkileyen faktörlerdir. İnsanlarda T2DM, genler ve çevre ile etkileşim sonucu ortaya çıkan bir hastalık olduğundan, DIO ile birlikte düşük doz STZ enjeksiyonu uygulaması (beta hücre kaybını ve hiperglisemiye indüklemek için) ile oluşturulan model, hastalığın gerçek sürecini en iyi taklit eden model gibi görünmektedir. Dolayısıyla, GLP-1 aracılı gen terapi yaklaşımlarının gerçek antidiyabetik potansiyellerinin, üçüncü nesil HIV-tabanlı lentiviral vektörler kullanılarak; yüksek yağlı diyet, düşük doz STZ indüklü diyabet modellerine GLP-1 aktarımı ile test edilmesi ve tedavi etkinliğinin belirlenmesi gerekmektedir. Bununla birlikte, obez farelerde artmış vücut ağırlılığının kompanse edilebilmesi için, hedef dokuları transdükte etmek amacıyla ek virus dozlarına ihtiyaç duyulabilir (Gaddy ve ark., 2010).

Bu projede toksik etki oluşturmaksızın kalıcı GLP-1 ekspresyonu sağlanabilmesi ve bu gen aktarımının öncelikle terapötik etkilerinin değerlendirilmesi hedeflenmektedir. Aynı zamanda yapılacak GLP-1 gen naklinin pankreatik beta hücreleri üzerindeki replikatif, rejeneratif ve koruyucu etkilerinin araştırılması amaçlanmaktadır. Bir vektörün kalıcı gen ekspresyonu sağlaması için hedef hücre genomuna entegre olması gereklidir. Daha önce de belirtildiği üzere, 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 (Durand ve Cimarelli, 2011; Di Nunzio ve ark., 2012). Üçüncü nesil SIN lentiviral vektörler, yabancıl tip HIV-1 enfeksiyonu sonrasında bile vektör mobilizasyonunun gözlenmediği güvenilir bir gen aktarım aracı olarak görülmekte, bu nedenle in vivo çalışmalarda tercih edilmektedir (Follenzi ve Naldini, 2002). Bu çalışmada vektör dayanıklılığının ve tropizminin arttırılması amacıyla Veziküler Somatit Virüsü G-glikoproteini ile psödoplekslenmiş üçüncü nesil lentiviral vektörler kullanılacaktır. Lentiviral vektörlerle yapılan çalışmalarda doz sınırlayıcı toksik etki bildirilmediğinden yüksek dozlarda tekrarlanabilir in vivo uygulamalar için güvenlidir.

Bu doğrultuda yapılacak çalışma ile T2D modeli oluşturulmuş Sprague Dawley sıçanlarda, hem yüksek transdüksiyon etkinlikleri hem de pankreası da transdükte

edebilme yetenekleri dolayısıyla avantajlı olan Lentiviral vektörler kullanılarak doğal insan GLP-1 gen aktarımının gerçekleştirilmesi sağlanacaktır. Lentiviral vektör aracılı GLP-1 gen tedavisi ile sıçanlarda antidiyabetik parametrelerin gösterilmesi ile birlikte bu sıçanların adacıklarında yapılacak detaylı analizler doğrultusunda GLP-1 geninin beta hücreleri üzerindeki olası replikatif, proliferatif, rejeneratif mekanizmalarının farklı hücre kökenlerine özgü belirteçlerle yapılacak immünohistokimyasal analizler doğrultusunda açığa çıkarılması hedeflenmektedir.



3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1 İnsan GLP-1 Kodlayan Lentiviral Vektörlerin Yapımı

3.1.1. İnsan GLP-1 gen dizisinin tasarımı

İnsan GLP-1 geninin sekans dizisinin ekspresyon plazmidini halinde ticari olarak bulunamaması nedeniyle GLP-1 sekans dizisinin sentetik olarak elde edilmesi planlandı. Bu doğrultuda tasarlanan sekans dizi çift zincirli sentetik DNA olarak İowa'daki (ABD) Integrated DNA Technologies (İDT) firmasına sentezletirildi. Dizi tasarımı, vektör oluşumunda kullanılacak klonlama stratejisine uygun olarak, dizinin 5' ucunda CACC spesifik bazıları olacak şekilde yapıldı. Sekans dizisine, Furin Kesim bölgesi ve insülin sinyal peptid sekansı da eklendikten sonra 193 bp uzunluğunda GLP-1_INS_SP çift zincirli sentetik DNA'sı liyofilize olarak tedarik edildi.

3.1.2. İnsan GLP-1 geninin giriş vektörüne klonlanması

İnsan GLP-1 geni kodlayan DNA sekansının, lentiviral vektör üretiminde kullanılmak üzere bir giriş vektörüne klonlanması için TOPO Klonlama stratejisi kullanıldı. Bu klonlama işleminde, pENTR/D-TOPO Klonlama Kiti (Invitrogen, K2400-20) kullanılarak kanamisin dirençlilik geni içeren TOPO vektörü ve sentetik DNA dizisi ile TOPO reaksiyonu kuruldu. Bu reaksiyon dizinin başında bulunan CACC dizileri sayesinde, genin kanamisin dirençli giriş vektörlerine tek yönlü olacak şekilde klonlanmasını sağladı. Reaksiyon karışımının TOP10 bakteri hücrelerine transformasyonu sonrasında, bakterilerin Kanamisin içeren LB Agar petrilere yayılmasını takiben 24 saat süreyle 37 °C 'de inkübe edilen petrilere üreyen bakterilerden tek düşen koloniler seçildi ve bu kolonilerden Kanamisin içeren sıvı besiyerilerine (50 µg/ml konsantrasyonda Kanamisin içeren LB Broth) inokülasyon gerçekleştirildi. 8-10 saat süreyle 37 °C'de çalkalamalı inkübatörde üretimi yapılan bakteri kolonilerinin her birinden plazmid izolasyonu için gerekli miktarlar ayrıldıktan sonra, gliserol stoklar oluşturuldu ve -80 °C'de saklandı. Mini kültürü yapılan bakteri kolonilerinden Plasmid Mini Kit (Qiagen, 12125) ile plasmid izolasyonu gerçekleştirildi. İzole plasmidler agaroz jel elektroforezinde yürütülerek ve restriksiyon enzim kesimine tabi tutularak doğrulandı. Yapılan doğrulama analizlerini takiben, seçilen plasmidlerden

M13 primerleri ile PCR reaksiyonu kuruldu. PCR reaksiyonu Taq PCR Core Kit (Qiagen, L-201223) ile 35 döngü sayısı ile gerçekleştirildi. Elde edilen PCR ürünlerinin de agaroz jel elektroforezi ile görüntülenmesi sonrasında seçilen kolonilerin dizi analizi yapılarak istenilen giriş vektörünü içeren kolonilerin seçimi yapıldı. Sekans işlemi yine M13 primerleri ve BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, 4335935) ile ABI Prism 310 Genetic Analyzer cihazında gerçekleştirildi. Sekans dizi incelemeleri sonunda doğru diziyeye sahip olduğu görülen ürünlerin elde edildiği koloniler giriş vektörü stokları olarak kaydedildi.

TOPO klonlama ile oluşturulan ve doğru oryantasyonda gen dizisi içerdiği belirlenen giriş vektörlerinin (pENTR_GLP-1_INSSP) deneylerde kullanılmaya yetecek miktarlarda üretilmesi için belirlenen stoklardan yüksek hacimli bakteri kültürleri kuruldu. Bu kültürlerden, Purelink HiPure Plasmid Midiprep Kit (Invitrogen, K2100-05) ile gerçekleştirilen plasmid izolasyonu sonrasında, agaroz jel elektroforezi ve restriksiyon enzim kesimi ile kontrol edilen plazmidler ekspresyon vektörü oluşturmada kullanılmak üzere -20 °C'de saklandı.

3.1.3. İnsan GLP-1 geni kodlayan lentiviral ekspresyon plazmidlerinin oluşturulması

İnsan GLP-1 geni kodlayan lentiviral ekspresyon plazmidlerinin (pLentiGLP-1) oluşturulmasında Gateway Teknolojisi kullanıldı. Bu amaçla, Virapower Hiperform Lentiviral Gateway Expression Kit (Invitrogen, K5330-00) kullanılarak pLenti6.3/V5-DEST Gateway vektörüne GLP-1 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 (WPPE), transgen ekspresyonunun artmasına olanak sağlamaktadır. Ek olarak HIV-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 plazmidinin (transfer plazmidi) oluşturulması için, kit içeriğindeki, Gateway LR Clonase II Enzyme Mix ile, kitin önerdiği protokole bağlı kalınarak LR rekombinasyon reaksiyonu kuruldu. LR rekombinasyon reaksiyonu, giriş vektörü ve destinasyon vektörü üzerinde bulunan özel bazı sekanslar yardımıyla giriş vektörü üzerinde taşınan transgenin, ampisilin dirençli destinasyon vektöründe bulunan özel bir bölgeye çaprazlanarak klonlanmasını sağlamak üzere geliştirilmiş bir klonlama yöntemidir. Rekombinasyon reaksiyonunun tamamlanmasının ardından, OneShot Stbl3 Chemically Competent E. coli bakterilerine transformasyon sonrasında ampisilin içeren LB agar petrilere ekim yapıldı. Yapılan ekim sonrasında petrilere üreyen koloniler seçilerek transformasyon etkinliği belirlendi. Pozitif kontrol olarak pENTR gus vektörünün kullanıldığı transformasyon sonrasında seçilen kolonilerden kurulan mini kültürlerden Qiagen Plasmid Mini Kit (Cat No. 12125) ile mini prep plazmid izolasyonu gerçekleştirildi. EcoRI ile yapılan restriksiyon enzimi sonrasında tanımlanan koloniler, ekspresyon vektörü oluşturulurken LTR bölgelerinde herhangi bir değişim oluşmadığından emin olmak için kitte önerilen AflII, XhoI enzimleri ile de ikili kesim gerçekleştirilerek doğrulandı. Kolonilerin izolasyonu ve tanımlanması sonrasında, vektör sekansının ve klonlama bölgesinin oryantasyonunun doğrulanması amacıyla ABI Prism 310 Genetic Analyzer kullanılarak DNA sekans analizi gerçekleştirildi. Bu amaçla, CMV forward primer 5'-CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG-3' and V5(C-term) reverse primer 5'-ACCGAGGAGAGGGTTAGGGAT-3' primer setleri kullanılarak kurulan PCR reaksiyonu, 94°C 45 s, 65°C 45 s, 72°C 1 dk koşullarda 35 döngüde ABI 9800 Fast Thermal Cycler kullanılarak gerçekleştirildi. Bu şekilde elde edilen PCR ürünü sekans analizinde kullanılmak üzere saflaştırıldı. Sekans reaksiyonu Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Cat No. 4336917) kullanılarak hazırlandı. PCR reaksiyonları 96°C 10 s, 50°C 5 s, 60°C 4 dk koşullarda 25 döngüde ABI 9800 Fast Thermal Cycler cihazında yürütüldü. Sekans reaksiyonu karışımlarının EtOH presipitasyon yöntemi ile saflaştırılması sonrasında örnekler ABI Prism 310 Genetic Analyzer cihazına yüklenerek dizi analizi gerçekleştirildi.

3.1.4. Lentivirus Üretimi

İnsan GLP-1 geni kodlayan ekspresyon plazmidini (pLentiGLP-1) oluşturulduktan sonra bu plazmid, GLP-1 geni eksprese eden lentivirusların oluşturulmasında kullanıldı. Lentivirusların oluşturulmasında transfer plazmidine ek olarak, virus paketlenmesinde esansiyel önemi olan trans-acting faktörlerin elde edilmesi amacıyla 3 farklı plazmid (pMDLg/pRRE (HIV-1 pGag-Pol 12251), Rev-Plazmid (pRSV-Rev 12253) and pMD2.G (pVSV-G 12259)) Addgene firmasından tedarik edildi. LV-RFP plazmidini (Plazmid 26001), lentivirus üretim işleminin optimize edilmesi amacıyla kullanıldı. Ayrıca, beta galaktosidaz kodlayan LentiLac vektörünün oluşturulması amacıyla LV-Lac Plazmidini (Plazmid 12108) kullanıldı.

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, sodium pyruvate) besiyerinde, CellStar® T-175 cm² flaklarda (Cat No: 660175, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Germany) çoğaltıldı. Daha sonra hücreler, 1700 cm² yüzey alanına sahip tırtıklı roller bottle şişelerine (Cell Master™ roller bottles Cat No: 681 062, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Germany), her birine 80 x 10⁶ 293T hücre olacak şekilde pasajlandı. 24 saat süreyle 0.3 rpm hızda döndürülerek roller şişelere yapışması sağlanan 293T hücreleri, ek olarak 12-16 saat süreyle 1 rpm hızda HERAcell 240i CO₂ inkübatörde (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) inkübasyona bırakıldı.

Transfeksiyondan 1 saat önce, hücrelerin üretildiği besiyeri 180 ml transfeksiyon besiyeri (%10 FBS, %1 Pen+Strep ve 25 µM Chloroquine (Sigma, Cat No. C6628) içeren Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM), Sigma Cat No. I7633) ile değiştirildi. Roller şişeler tekrar 37 °C, 5% CO₂ inkübatöre yerleştirildi. Kısa süreli transfeksiyonun gerçekleştirilmesi için, 176 µg pGag-Pol, 68 µg pRSV-Rev, 95 µg pVSV-G ve 270 µg pLentiGLP-1 plazmidleri 50 ml'lik konik tüplerde karıştırıldı ve hacim 0,1X TE:dH₂O (2v:1v) ile 10.5 ml'ye tamamlandı. Karışıma, son konsantrasyonu 0.25 M olacak şekilde 1.5 ml 2M CaCl₂ eklendi. Farklı bir tüpe 12 ml 2X HEPES Buffered Saline (HBS, pH 7.0) eklendikten sonra içine yerleştirilen 5 ml'lik serolojik pipet yardımıyla hava verilerek kabarcık oluşturulması sağlandı. Bu sırada kabarcıkların üzerine hazırlanan DNA/CaCl₂ karışımı damla damla eklendi. 5 dk oda sıcaklığında

inkübe edilen karışım, inkübatörden çıkarılan transfeksiyon besiyeri eklenmiş roller şişelere aktarıldı. Roller şişeler tekrar inkübatöre yerleştirildi ve 6-8 saat süreyle 0.3 rpm hızda inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda transfeksiyon besiyeri aspire edildi ve 200 ml %10 FBS, %1 Pen+Strep içeren hasat besiyeri (OPTI-MEM, Gibco, 22600134) hücrelere eklendi ve 2.5 gün süreyle 1 rpm'de, 37 °C, 5% CO₂ 'li inkübatörde lentiviral vektör üretiminin gerçekleşmesi için bekletildi.

Viral süpernatantların hasatı, hücre debrisinden kurtulmak amacıyla 2,000G'de 15 dk süreyle yapılan santrifüj yardımıyla ve ardından süpernatantın 0.45 µm filtreden geçirilmesiyle gerçekleştirildi. Konsantre edilmemiş virus solüsyonu 6 farklı ultrasantrifüj tüpüne (pollyallomer ultracentrifuge tubes, Beckman Coulter, Cat No.326823) her birine 30 ml olacak şekilde dağıtıldı. Sukroz cushion yöntemi ile saflaştırma amacıyla, %10 sukroz solüsyonu (2mM EDTA), %50 sukroz solüsyonunun Hank's Buffered Salt Solution (HBSS) içinde 1:5 dilüe edilmesiyle kullanımdan hemen önce hazırlandı. %10 sukroz solüsyonu her bir tüpe 5 ml olarak, virus süpernatantının altında bir katman oluşturacak şekilde tüplerin dibine yavaşça eklendi. Viral süpernatantlar 25,000 rpm'de +4 °C'de 2 saat 30 dk süreyle Beckman SW28 rotoru kullanılarak, hızlanma ve frenleme seçeneklerinin yavaş olarak ayarlandığı Beckman Coulter Optima L-90 K ultrasantrifüj cihazında ultrasantrifüje tabi tutuldu. Süpernatantların aspire edilmesinin ardından tüpler ters olarak temiz peçeteler üzerinde bırakılarak tüm süpernatantın pelletlerden uzaklaştırılması sağlandı. Her bir tüpe 100 µl HBSS eklenerek tüplerin ağzı parafilmlemlendi ve bir gece süreyle +4 °C'de inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün pelletler pipetaj yardımıyla yeniden süspanse edildi ve mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı. Viral stoklar 50-100 µl olarak alikotlandıktan sonra titrasyon öncesinde -80 °C'de saklandı.

3.2. İnsan GLP-1 geni kodlayan Lentiviral Vektörlerin Titrasyonu ve Fonksiyonellik Analizi

3.2.1. Lentiviral Vektörlerin Q-PCR'la Fonksiyonel Titrasyonu

Konsantre edilmiş lentivirüs stokları, titrasyon öncesi -80 °C'de en az 24 saat süreyle saklandı. HT1080 hücreleri (ATCC® CCL-121™) 50,000 hücre/kuyu olacak şekilde

transdüksiyondan bir gün önce 24 kuyulu petrilere ekildi. Lentiviral stokların çözdürülmesinden sonra HT1080 hücreleri, (6µg/ml) polybrene varlığında, artan miktarlarda (10⁻⁴, 10⁻², 1, 2, 4, 8 µl) lentivirus ile transdükte edildi. Transdüksiyondan bir gün sonra besiyeri 500 µl polybrensiz DMEM ile değiştirildi. Lentivirus ile transdükte edilmiş HT1080 hücreleri 2 gün daha 37°C'de %5 CO₂ li inkübatörde inkübe edildi. Transdüksiyonun 3. gününde besiyeri uzaklaştırıldı ve 100 µl/kuyu liziz tamponu kuyulara eklendi. Lizatların 96 °C'de 2 dk inkübe edilmesinin ardından örnekler 14,000 rpm'de 2 dk süreyle santrifüjlendi. Örnekler, reaksiyon kurulana kadar buz üzerinde bekletildi veya -20°C'de saklandı.

Real-Time PCR reaksiyonları için, WPRE primerleri (Fwd: 5'-CCGTTGTCAGGCAACGTG-3' ; Rev: 5'-AGCTGACAGGTGGTGGCAAT -3') viral genomun miktar tayini için kullanılırken, Albumin primerleri (Fwd: 5'-GCTGTCATCTCTTGTGGGCTGT- 3' ; Rev: 5'-ACTCATGGGAGCTGCTGGTTC -3') internal kontrol olarak kullanıldı. Standart eğrinin eldesi için, daha önce Addgene şirketinden alınmış olan albumin plasmidinin farklı konsantrasyonları kullanıldı. Real-Time PCR reaksiyonu Quantitect SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Cat No: 204143) kullanılarak ABI 7500 Fast Real-Time PCR cihazında gerçekleştirildi.

3.2.2. İmmünohistokimyasal Analizler

İn vitro GLP-1 ekspresyon ve sekresyonunun LentiGLP-1 ile transdükte edilmiş HT1080 hücre hattında gösterilmesi amacıyla immünohistokimya analizleri gerçekleştirildi. İlk olarak LentiGLP-1 ile transdükte edilmiş HT1080 hücrelerinin süpernatantları ELISA için toplandıktan sonra hücreler PBS ile yıkandı. Hücreler %4 paraformaldehit ile fikse edildi ve PBST içinde hazırlanmış %1 Triton-X ile muamele edildi. %1 Bovine Serum Albumin (BSA) ile bloklama sonrasında hücreler tavşan poliklonal anti-GLP-1 antikoru (Abcam, ab22625) ile inkübe edildi. Bir gece + 4°C'de inkübe edilen hücreler PBS ile yıkandı ve sekonder antikor olarak HRP konjuge keçi anti-rabbit IgG (Abcam, ab97051) ile muamele edildi. Hücreler EXPOSE Rabbit Spesifik HRP/DAB IHC kit (Abcam, ab80437) kullanılarak kolorimetrik reaksiyon gerçekleştirildi. Görüntüler Olympus IX-81 inverted floresan mikroskobu ile kaydedildi.

3.2.3. GLP-1 Enzim Bağımlı İmmünoanalizi (ELISA) ile transdükte hücrelerde GLP-1 sentezinin gösterilmesi

İn vitro GLP-1 miktarının ölçümü için Glucagon-Like-Peptide-1 (Active) ELISA kit, (Millipore, Cat # EGLP-35K) kiti kullanıldı. HT1080 hücreleri 24 kuyulu petrilere her bir kuyuya 50,000 hücre olacak şekilde ekildi ve 24 saat 37 °C’de inkübe edildi. Hücreler artan dozlarda (Multiplicity of İnfection-MOI) lentivirus ile polybrene varlığında enfekte edildi ve besiyeri değiştirilmeden önce 24 sat süreyle inkübe edildi. LentiGLP-1 ile transdükte edilmiş HT1080 hücrelerinin süpernatantları ELISA için toplandı ve Dipeptidylpeptidase IV inhibitörü eklenerek saklandı. Süpernatantlar önceden anti-GLP-1 monoklonal antikoru 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 GLP-1 miktarı saptandı.

3.2.4. cAMP Sentez Miktar Analizi

GLP-1 kodlayan lentiviral vektörlerin artan konsantrasyonlarında (5, 25 ve 100 MOI) Min6 pankreatik beta hücrelerine transdüksiyonu sonrasında hücrelerde cAMP analizi yapıldı. 100 MOI LentiLacZ enfekte hücreler kontrol olarak kullanıldı. Analiz öncesinde hücrelerin üzerindeki besiyeri çekildikten sonra Min6 hücreleri HCl ile muamele edilerek mikrosantrifuj tüplerine aktarıldı. Maksimum hızda yapılan santrifügasyon sonrasında süpernatantlar, cAMP Direct Immunoassay Kit (Abcam, ab65355) kullanılarak analiz edildi. Kit içeriğinde tedarik edilen standart örnekler belirtilen miktarlarda hazırlandıktan sonra her bir standart ve örnek, nötralizasyon solüsyonu ile muamele edildi. Asetilasyon karışımı eklenerek kullanıma hazırlanan örnekler kuyulara yüklendikten sonra cAMP tespit antikoru eklendi. İnkübasyon süresi sonunda örnekler, HRP konjuge edilmiş sekonder antikor eklenerek oda sıcaklığında bekletildi. Sekonder antikora konjuge HRP’nin reaksiyon verebilmesi için HRP developer solüsyonu eklenen örnekler bir saat süreyle oda sıcaklığına bırakıldı. Süre sonunda reaksiyon durdurularak 450 nm dalga boyunda yapılan spektrofotometrik ölçüm ile gelişen rengin absorbans değerleri belirlendi. Standartlardan alınan absorbans ölçümleri yardımıyla hazırlanan kalibrasyon eğrisinden elde edilen denklem kullanılarak örneklerdeki toplam cAMP miktarı saptandı.

3.2.5. Glukoz İndüklü İnsülin Salınım Testi

LentiGLP-1 ile transdükte edilmiş MIN6 hücreleri glukoz indüklenmesinin ardından insülin ELISA testine tabi tutuldu. Pankreatik beta hücre hattı MIN6 hücreleri (Prof. Dr. Jun-ichi Miyazaki'nin hediyesi, Japonya) 96 kuyulu petrilere her bir kuyuda 1×10^5 MIN6 hücresi olacak şekilde ekildi ve bir gece hücre kültür inkübatöründe bekletildi. Daha sonra MIN6 hücreleri artan MOI oranlarında (5, 25 ve 100) LentiGLP-1 veya LentiLacZ (100 MOI) ile polybrene varlığında transdükte edildi. Transdüksiyondan bir gün sonra besiyeri 250 μ l polybrensiz DMEM ile değiştirildi ve 3 gün süreyle MIN6 hücreleri 37°C, %5 CO₂ 'li ortamda inkübe edildi. Daha sonra süpernatantlar ELISA analizlerinde kullanılmak üzere toplandı ve -20°C'de saklandı. Glukoz indüklü insülin salınım testini gerçekleştirmek için, lentivirus ile transdükte edilmiş MIN6 hücreleri PBS ile yıkandıktan sonra glukozsuz Krebs Ringer Buffer (KRB)da bekletildi. Tüm kuyular 2.8 mM glukoz içeren KRB tamponunda 30 dk 37 °C'de preinkübasyona bırakıldıktan sonra hücreler üzerindeki sıvılar uzaklaştırıldı ve hücreler glukozsuz KRB ile yıkandı. Daha sonra hücrelere 0, 2.8 veya 25 mM glukoz içeren farklı KRB tamponlarından 250 μ l eklendi ve hücreler 1 saat süreyle 37 °C'de inkübe edildi. Süre sonunda süpernatantlar toplandı ve -20 °C'de saklandı. Daha sonra bu süpernatantlarda salınan insülin miktarının tespiti için Ultra Sensitive Mouse/Rat insülin ELISA kit (CrystalChem, Cat No: 90080) kullanarak ELISA deneyi gerçekleştirildi.

Ultra Sensitive Mouse/Rat İnsülin ELISA kit (Crystal Chem INC. Cat # 90080, Downers Grove, IL USA) MIN6 hücre hattından insülin salınımının kantitatif analizi amacıyla kullanıldı. Süpernatant örnekleri guinea pig anti-insülin antikoru ile kaplanmış mikropılaka kuyularına eklendi. Bağlanmayan moleküllerin uzaklaştırılmasının ardından horse radish peroksidaz (POD)-konjuge anti-insülin antikoru guinea pig anti-insülin/fare insülin kompleksini tespit etmek üzere kuyulara eklendi. Fazla POD-konjugatı yıkama ile uzaklaştırıldıktan sonra bağlanmış olan POD konjugatı, 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) substrat solüsyonunun eklenmesiyle görünür hale getirildi. Oluşan renkli ürün 450 nm ve 630 nm'de yapılan absorbans ölçümleriyle değerlendirildi. 630 nm'de alınan absorbans değerinden 450 nm'deki absorbans değerleri çıkarıldıktan sonra elde edilen değerler, bilinen miktarlarda fare/sıçan insülin standart konsantrasyonu değerleri ile hazırlanan standart eğri kullanılarak interpo-

edildi ve böylelikle örneklerdeki insülin konsantrasyonu hesaplandı. Hücrelerdeki total insülin içeriğinin ölçümü için MIN6 hücreleri %100 EtOH, 0.4 M HCl solüsyonunda + 4 °C’de bir gece inkübe edildi. Daha sonra toplanan hücreler -20 °C’de saklandı ve yukarıda anlatıldığı şekliyle intraselüler insülin konsantrasyonu belirlendi.

3.3 Deney Hayvan Modelinin oluşturulması

Akdeniz Üniversitesi Deney hayvanları ünitesinden, 4 haftalıkken alınan erkek Sprague Dawley sıçanlar, her bir kafeste 4 hayvan olacak şekilde, nem, ısı ve ışık kontrolü yapılan odalarda steril ortamda besin kısıtlaması yapılmadan beslendi. Deney tasarımına bağlı olarak ya standart yemle ya da kalorisinin %60’ı yağdan gelen yüksek yağlı yem (YYY) ile beslenen sıçanlara, 3 aylık besleme sonrasında 40 mg/kg dozda STZ enjeksiyonu intraperitoneal yolla gerçekleştirdi. STZ (Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA)), 0.01 M, pH 4.5 sitrat tamponunda enjeksiyondan hemen önce çözdürüldü ve enjeksiyon anına kadar buz üzerinde bekletildi. STZ enjeksiyonu sonrası poliürik hayvanlara kuru bir ortam sağlamak amacıyla kafesler periyodik olarak haftada iki kez temizlendi. Deney gruplarıyla aynı yaşta olan non-diyabetik sıçanlar kontrol olarak kullanıldı. Çalışma süresinde tüm sıçanlar belirlenen yemler ile beslenmeye devam etti. Deneysel çalışmalar Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Bakım ve Kullanım Komitesinin düzenlemelerine uygun olarak gerçekleştirildi. Sakrifikasyon sonrası intrakardiyak enjeksiyon yoluyla alınan kan örneklerinden, serum ayrıştırıcı tüpler yardımıyla (Vacuaette, Greiner bio-one Cat. No. 454343) 3,000 rpm’de 15 dk santrifüj sonrasında kan serumları elde edildi. Analizlerde kullanılana kadar örnekler -20 °C’de saklandı.

3.4 Kan Glukoz Ölçümü

Glukoz seviyeleri, sıçanların kuyruk veninden alınan kanda AccuCheck Kompakt Glukometre (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) yardımıyla ölçüldü. AccuCheck Kompakt cihazının ölçüm aralığı 10-600 mg/dL olup, 600 mg/dL’den büyük olan her ölçüm high (HI) göstergesi vermektedir. HI olarak okunan değerler 600 mg/dL olarak kaydedildi. STZ enjeksiyonunu takiben, kan glukoz seviyeleri ve olası ağırlık kayıpları periyodik olarak ölçüldü. 250 mg/dL değerinin üzerinde kan glukoz ölçümü veren sıçanlar diyabetik olarak değerlendirildi. Tüm kan glukoz ölçümleri, farklı

saatlerde farklı beslenme alışkanlıkları dolayısıyla gerçekleşebilecek değişikliklerin elimine edilmesi amacıyla, öğleden sonra ilk saatlerde farelerin tamamen tok oldukları zamanda yapıldı.

3.5 İntraperitoneal Glukoz Tolerans Testi

İntraperitoneal glukoz tolerans testi deneklere 8 saat açlık sonrası uygulandı. Bunun için sıçanlara intraperitoneal olarak 2 g/kg dozunda glukoz enjeksiyonu yapıldıktan sonra kan glukoz değerleri 0 (bazal), 15, 30, 60 ve 120 dk sonra kuyruk veninden alından kanla glukoz metre kullanılarak belirlendi.

3.6 İnsülin Duyarlılık Testi

İnsülin duyarlılık testi için, 7 saat aç bırakılan sıçanlara 1U/ kg olacak şekilde insülin (humalog- insülin lispro) intraperitoneal olarak enjekte edildi. Kan glukoz ölçümleri ilk anda, 15., 30., 60., ve 120. dklarda glukometre ile ölçüldü.

3.7 Trigliserit Analizi

Kan serumundaki trigliserit seviyeleri enzimatik/kolorimetrik metodlarla belirlendi. EnzyChrom Triglyceride Assay Kit (BioAssay Systems, Cat No. ETGA-200) trigliserit tayininde kullanıldı. Kitin prensibine göre, trigliserit hidrolizi ve gliserol belirlenmesini tek bir basamakta birleştiren bir kimyasal ajan yardımıyla okside olan boya molekülleri renkli bir ürün ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Ek olarak, plazma örnekleri dH₂O'da 5 kat dilüe edildikten sonra direkt olarak analizde kullanıldı. Bu amaçla, 10 µl örnek 96 kuyulu petrielerin kuyularına eklendikten sonra kullanılacak Solüsyon karışımı her bir kuyu için 100 µl Assay Tamponu, 2 µl Enim Karışımı, 5 µl Lipaz, 1 µl ATP ve 1 µl Boya solüsyonu olacak şekilde karıştırılarak hazırlandı. Hazırlanan çalışma solüsyonundan 100 µl alınarak standart ve örnek kuyularına eklendi. 30 dk oda sıcaklığında inkübe edilen örneklerin 570 nm'de ölçülen optik dansitesi direkt olarak örnek içindeki trigliserit miktarı ile doğru orantılı olarak hesaplandı.

3.8 Kolesterol Tayini

Kan serumundaki kolesterol seviyelerinin belirlenmesi Kolesterol/Cholesteryl Ester Quantitation Kit (Abcam, #ab65359) yardımıyla kolorimetrik metodla gerçekleştirildi. Bu kit ile serbest kolesterolün, kolesteril esterlerin veya her ikisinin birlikte duyarlı

olarak miktar tayini yapılabilmektedir. Kandaki kolesterolün büyük çoğunluğu kolesterol esteraz aracılığıyla kolesterole hidroliz edilebilen kolesteril esterler olarak bulunmaktadır. Daha sonra kolesterol oksidaz ile okside olan kolesterol H_2O_2 oluşumuna yol açar. Oluşan H_2O_2 duyarlı bir kolesterol probuyla reaksiyona girerek renkli ürün ortaya çıkmasına neden olur. Oluşan renk kolorimetrik olarak ($\lambda_{max} = 570 \text{ nm}$) ve floresans olarak ($Ex/Em = 535/587 \text{ nm}$) ölçülebilir. Bu kit ile kolesterol esteraz varlığında total kolesterol (kolesterol ve kolesteril esterler); kolesterol esteraz eklenmeyen reaksiyonla da serbest kolesterol saptanabilmektedir. Serum örnekleri kolesterol assay tamponunda 10 kat dilüe edildikten sonra her bir kuyuya 5 μl olacak şekilde eklendi. Standartlar kit protokolünde önerildiği şekilde hazırlandı. Kolesterol Assay Tamponu, Kolesterol probu, Kolesterol enzim karışımı ve Kolesterol Esteraz içeren reaksiyon karışımı hazırlandıktan sonra her bir standart ve örnek kuyusuna 50 μl olacak şekilde eklendi. Reaksiyon daha sonra 60 dk süreyle 37°C 'de karanlıkta inkübe edildi. Kolorimetrik yöntem kullanıldığından 570 nm'de spektrofotometrik ölçümler yapıldı.

3.9. GLP-1 Enzim Bağımlı İmmünoanalizi (ELISA) ile sıçanların kan örneklerindeki GLP-1 miktarının tayini

İn vivo GLP-1 miktarının ölçümü için Glucagon-Like-Peptide-1 (Active) ELISA kiti (Millipore, Cat # EGLP-35K) kullanıldı. İn vivo analizler için sakrifiye sıçanlardan alınan kan örneklerine Dipeptidylpeptidase IV inhibitörü eklendikten sonra ELISA'ya tabi tutuldu. Alınan kan örnekleri önceden anti-GLP-1 monoklonal antikoru ile kaplanmış kuyucuklara yüklendi. İnkübasyon sonrası kit içeriğinde verilen bağlanma reaksiyonunu tanıyacak konjugat solüsyonu ve florokrom substrat eklenmesi sonrasında oluşan reaksiyonun florometrik analizi ile kan dolaşımındaki aktif GLP-1 miktarı saptandı.

3.10. Abdominal dokularda genoma entegre kopya sayılarının analizi

İn vivo LentiGLP-1 enjeksiyonunu takiben sakrifiye edilen sıçanların karaciğer, dalak, böbrek ve pankreas dokularından alınan örneklerde DNeasy Blood&Tissue Kiti (Qiagen, 69504) aracılığıyla DNA izolasyonu yapıldı. İzole edilen DNA örneklerinde genoma entegre kopya sayılarının belirlenmesi amacıyla kantitatif PCR analizi gerçekleştirildi.

WPRES primerleri (Fwd: 5'- CCGTTGTCAGGCAACGTG-3' ; Rev: 5'- AGCTGACAGGTGGTGGCAAT -3') viral genomun miktar tayini için kullanılırken, Albumin primerleri (Fwd: 5'- GCTGTCATCTCTTGTGGGCTGT- 3' ; Rev: 5'- ACTCATGGGAGCTGCTGGTTC -3') internal kontrol olarak kullanıldı. Standart eğrinin eldesi için, daha önce Addgene şirketinden alınmış olan albumin plasmidinin farklı konsantrasyonları kullanıldı. Real-Time PCR reaksiyonu Quantitect SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Cat No: 204143) kullanılarak ABI 7500 Fast Real-Time PCR cihazında gerçekleştirildi.

3.11. Histolojik Çalışmalar

3.11.1. Beta hücre yıkımını belirlemek için yapılan immünohistokimyasal analizler

Adacıklardaki pankreatik beta hücrelerinin yıkımını doğrulamak amacıyla sıçanlar STZ enjeksiyonundan 30 gün sonra sakrifiye edildi. Pankreas formalin ile fikse edildi ve parafine gömüldü. Alınan kesitlerde hematoksilin&eosin (H&E) boyaması ve poliklonal tavşan anti-insülin antikoru (Abcam, Cat No. ab63820) ile insülin boyaması gerçekleştirildi. Glukagon boyamaları polyclonal rabbit anti-glucagon antikoru kullanılarak (Abcam, Cat No. ab18461) yapıldı. Beta hücre alan ölçümü histolojik olarak belirlendi. Bunun için öncelikle pankreas çıkarıldı, fikse edildi ve kesit almadan önce parafine gömüldü. Kesitler poliklonal tavşan anti-insülin antikoru (Abcam, Cat No. ab63820) ile immünohistokimyasal boyama işlemine tabi tutuldu. Her bir kesit Olympus IX81 motorize inverted floresan mikroskopu kullanılarak görüntüledi ve kaydedildi. İnsülin pozitif ve total pankreas alanlar Image J yazılımı (National Institutes of Health, Bethesda, MD; <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) ile ölçüldü ve insülin pozitif alanların tüm pankreasa oranı hesaplandı.

3.11.2. Pankreatik Adacık GLP-1 Ligand ve Reseptör Kompozisyonunun belirlenmesi

Sakrifiye edilen sıçanlardan alınan dokular, öncelikle fikse edildi ve kesit almadan önce parafine gömüldü. 5µ çapında alınan kesitlerde, deparafinizasyon işleminin ardından TRIS-EDTA pH 9.0 solüsyonu ile antijen retrieval işlemi gerçekleştirildi. Peroksit bloklama ve protein bloklama işlemleri EXPOSE Rabbit specific HRP/DAB detection IHC kit (Abcam, ab80437) kullanarak gerçekleştirildi. Kesitlere primer antikoları

uygulandıktan sonra +4 C'de 1 saat süreyle bekletildi. İnkübasyon süresi sonunda kit içeriğinde bulunan HRP (Horse Radish Peroxidase) konjuge edilmiş keçi anti-tavşan sekonder antikorunu uygulandı. 15 dk süreyle sekonder antikorla muamele edilen preparatlara DAB Kromojenik Substratı uygulandıktan sonra Hematoksilin ile karşıt boyama gerçekleştirildi. İmmünohistokimyasal boyama işlemlerini takiben dehidratasyon işlemleri gerçekleştirildikten sonra lamalar entellan ile kapatıldı. Kesitlerde insülin, GLP-1 ve GLP-1R olmak üzere 3 farklı primer antikor kullanılarak immünohistokimyasal analizler yapıldı. Bu analizler anti-tavşan Expose kit ile gerçekleştirildiğinden tüm primer antikorlar poliklonal tavşan kökenli olarak seçildi. Bu antikorlar sırasıyla, Tavşan poliklonal anti-insülin (Abcam ab63820); Tavşan poliklonal anti-GLP-1 (Abcam, ab22625) ve Tavşan poliklonal anti-GLP-1R (Bioss, bs1559R). antikorlarıdır. İmmünohistokimyasal boyama yapılan her bir kesit Olympus IX81 motorize inverted florasan mikroskobu kullanılarak görüntülendi ve kaydedildi. Her bir antikor için farklı deney gruplarındaki insülin, GLP-1 ve GLP-1R ekspresyonları skorlanarak karşılaştırıldı. Skorum sinyal yaygınlığı (1 seyrek, 2 orta, 3 yaygın) ve sinyal şiddeti (1 hafif, 2 orta, 3 şiddetli) açısından değerlendirildi ve karşılaştırma toplam skor üzerinden gerçekleştirildi.

3.11.3. LentiGLP-1 uygulamasını takiben abdominal organlarda GLP-1 dağılımının immünohistokimyasal analizi

LentiGLP-1 uygulaması alan sıçanların sakrifikasyonunu takiben karaciğer, dalak, böbrek ve pankreas dokularının fiksasyon ve parafinasyonu ardından 5 mikronluk kesitlerinde Tavşan poliklonal anti-GLP-1 (Abcam, ab22625) antikorunu ile 3.11.2'de detaylı olarak açıklanan aynı protokol doğrultusunda immünohistokimyasal analiz gerçekleştirildi.

3.11.4. İnsülin Pozitif hücrelerin immünoflorasan ile detaylı analizi

Vektör uygulaması sonrasında sıçanların pankreas kesitlerinde, insülin, CK19 (duktal hücre belirteci), pankreatik alfa amilaz (asiner hücre belirteci), Pdx-1 (beta hücre belirteci), Ngn3, Ki67'ye karşı antikorlar kullanılarak immünoflorasan analizleri gerçekleştirildi.

Sakrifiye edilen sıçanlardan izole edilen pankreas dokuları fikse edildikten sonra parafin bloklara gömüldü. Mikrotom cihazında 4 mikronluk kesitler alındıktan sonra dokular öncelikle deparafinizasyon işlemine tabi tutuldu. Deparafinizasyonu takiben antijen açığa çıkarma işlemi için dokular borik asit solüsyonunda (pH 7.2) 56 °C'de bir gece bekletildi. Ertesi gün PBS ile yıkama yapıldıktan sonra %1 BSA solüsyonunda 5 dakika süreyle bloklama işlemi gerçekleştirildi. Bloklamayı takiben boyaması yapılacak primer antikorların ikili kombinasyonları eşit hacimde karıştırılarak dokulara eklendi. Kesitler, primer antikorlarla 1 gece boyu +4 °C'de inkübe edildi. Ertesi gün PBS ile yıkanan kesitlere karanlık ortamda kırmızı ve yeşil florasan ışımaya yapan sekonder antikorlar eklendi. Sekonder antikorlarla karanlıkta, oda sıcaklığında 1 saat süreyle inkübe edilen kesitlerde PBS ile yapılan yıkama sonrasında DAPI ile çekirdek boyaması yapıldı. Boyama sonuçları Olympus IX81 inverted florasan mikroskopta incelenerek görüntüler kaydedildi.

3.12 İstatistiksel analizler

İstatistiksel analizler GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) kullanılarak gerçekleştirildi. Datalar +/- SEM olarak sunuldu ve P değeri 0.05 olarak belirlendi.

4. BULGULAR

4.1. GLP-1 Kodlayan 3. Nesil Lentiviral Vektörlerin Oluşturulması

GLP-1 geninin sekans dizisi, çift zincirli sentetik DNA olarak (G blok) İowa'daki Integrated DNA Technologies (İDT) firması tarafından liyofilize olarak tedarik edildi. Dizi tasarımında, klonlama stratejisi göz önüne alınarak dizinin 5' ucuna CACC spesifik bazları ile, furin kesim bölgesi ve insülin sinyal peptid (İNS_SP) sekansı içeren bir tasarım oluşturuldu. Bu şekilde 193 bp uzunluğunda GLP-1_INS_SP çift zincirli sentetik DNA'sı elde edildi.

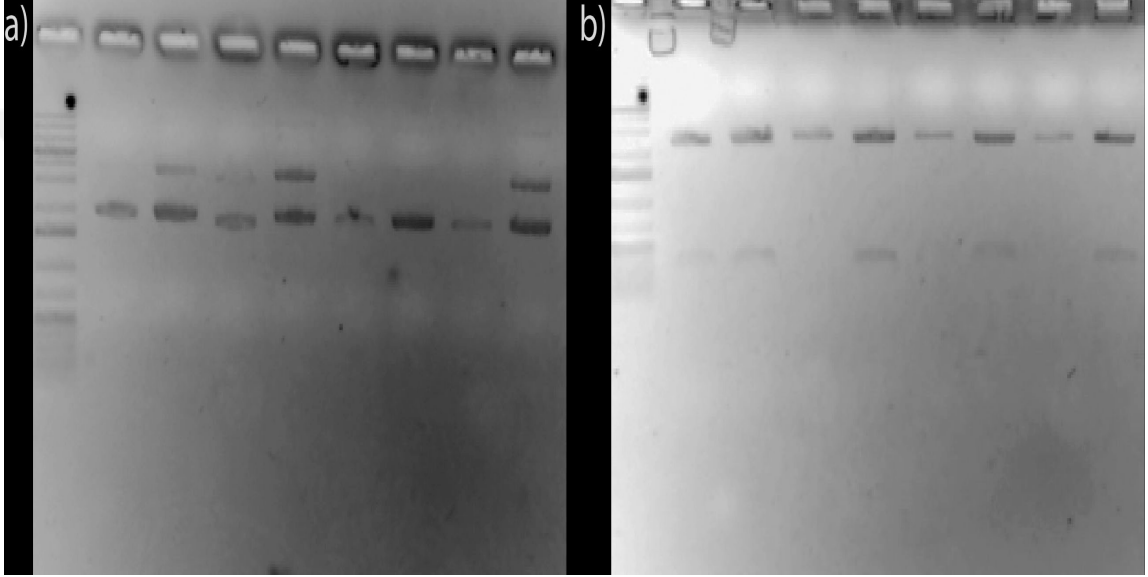
GLP-1_INS_SP sekans dizisi:

```
5' CACC CCT TCT GCC ATG GCC CTG TGG ATG CGC CTC CTG CCC CTG CTG
GCG CTG CTG GCC CTC TGG GGA CCT GAC CCA GCC GCA GCC AGA CAA
AGA AGA CAT GCT GAA GGG ACC TTT ACC AGT GAT GTA AGT TCT TAT
TTG GAA GGC CAA GCT GCC AAG GAA TTC ATT GCT TGG CTG GTG AAA
GGC CGA GGA TAG 3'
```

Sentezlenen dizi; ilk 13 baz klonlama ve dizi stabilizasyonu için eklenen bazlar, sonraki 72 baz insülin sinyal peptidi sekansı, ardına eklenen 12 baz 4 aminoasitten oluşan (RGRR) furin kesim bölgesi sekansı ve son olarak 96 baz GLP-1-7-37 genine ait sekans olmak üzere, toplamda 193 bazdan oluşmaktadır.

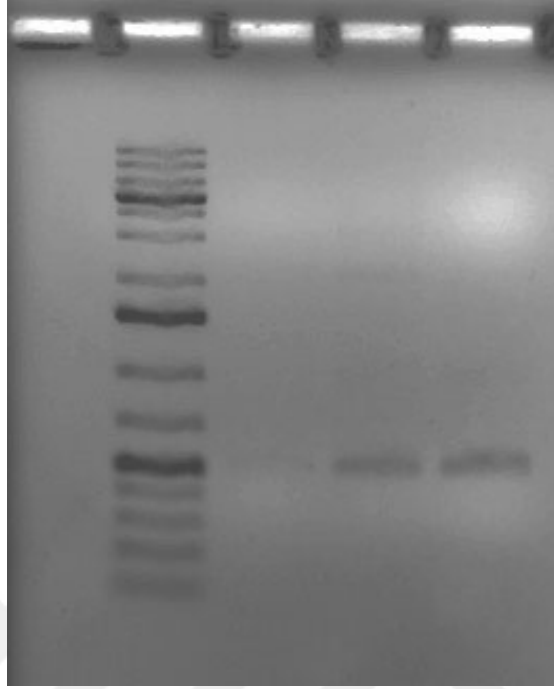
Elde edilen sentetik DNA'nın yönlendirilmiş TOPO Klonlama Stratejisi ile klonlanması amaçlandığından öncelikle PZR ile çoğaltılan DNA dizisi, Invitrogen'nin pENTR/D-TOPO Klonlama kiti yardımıyla giriş vektörüne klonlarak GLP-1 geni taşıyan giriş vektörü elde edildi. Reaksiyonu takiben TOP10 hücrelerine yapılan transformasyon sonrasında elde edilen kolonilerden izole edilen plazmidlere restriksiyon enzim kesimleri yapılarak doğru koloniler belirlendi. D-TOPO vektörü kendi yapısında EcoRI restriksiyon kesim bölgesi içermemektedir ve AflII enzimi için de bir kesim bölgesi içermektedir. Klonlamak istediğimiz GLP-1_INS_SP DNA'sında EcoRI için bir kesim bölgesi yer almaktadır. Bu sebeple EcoRI ve AflII ile yapılacak ikili enzim kesim reaksiyonunda doğru kolonilerde 2485 bp & 288 bp olmak üzere iki bant çıkması

gerekmektedir. Eğer klonlama istendiği şekilde gerçekleşmemiş olursa EcoRI enziminin keseceği bir bölge bulunamayacağından sadece AflII enzimi ile kesim gerçekleşeceğinden 2580 bp uzunluğunda lineer plazmid bandı görülecektir. Kesim reaksiyonu yapılmadan agaroz jel elektroforezi yapılan koloniler ile restriksiyon kesim reaksiyonu sonucu elde edilen jel görüntüleri incelendiğinde, istenilen tasarımda oluşturulmuş 5 farklı koloni olduğu belirlendi (şekil 4.1).

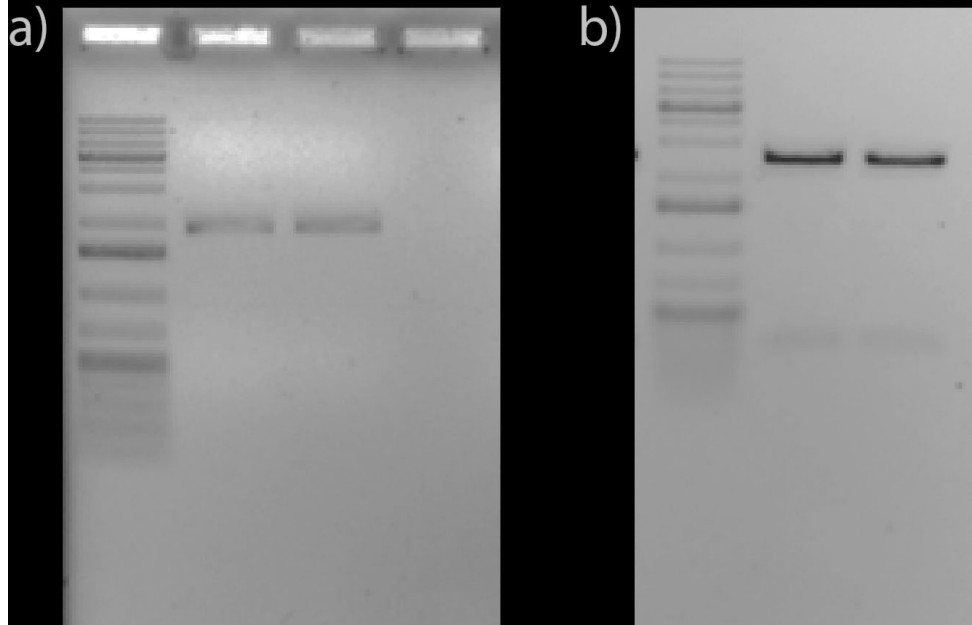


şekil 4.1. TOPO teknolojisi ile oluşturulan GLP-1 kodlayan giriş vektörlerinin agaroz jel elektroforezi ile doğrulanması **a.** EcoRI enzim kesimine ait agaroz jel görüntüsü (%1 Agaroz jel, Kuyular sırasıyla, Gene Ruler 1 kb Plus Ladder, Koloni 1,2,5,6,7,8,19,20) **b.** EcoRI&AflII ikili enzim kesimine ait agaroz jel görüntüsü. (%1 Agaroz jel, Kuyular sırasıyla, Gene Ruler 1 kb Plus Ladder, Koloni 1,2,5,6,7,8,19,20)

Restriksiyon enzim kesimi ile doğrulan kolonilerin M13 primerleri kullanılarak gerçekleştirilen PCR reaksiyonu sonrasında (şekil 4.2) koloniler DNA dizileme reaksiyonu ile de konfirme edildi.



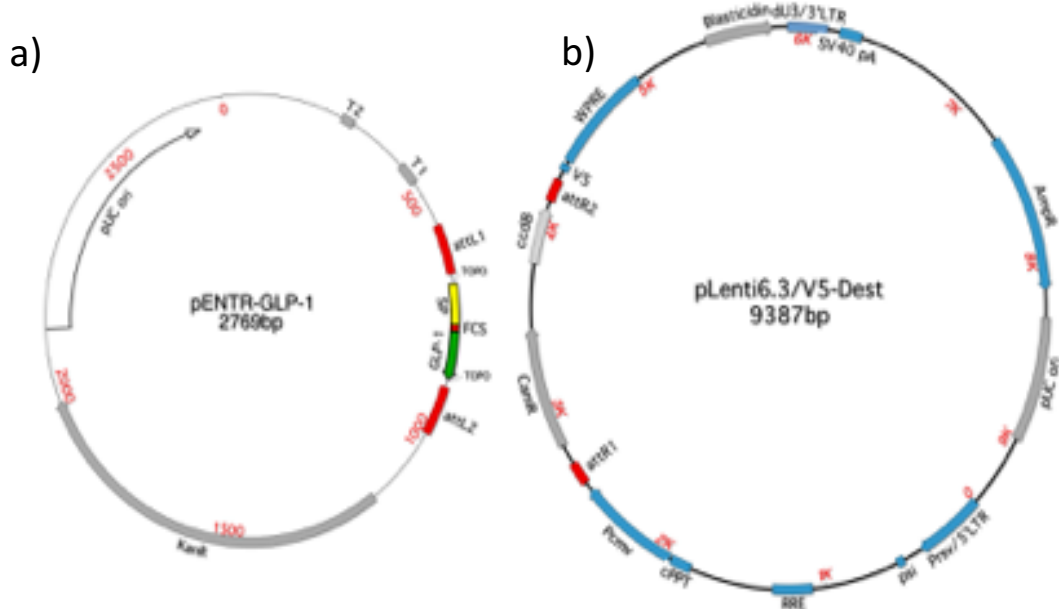
Şekil 4.2. Doğrulama sonrasında 3 farklı plazmid için M13 primerleri ile kurulan PCR reaksiyonunun agaroz jel görüntüsü. (%1 Agaroz jel, Kuyular sırasıyla, Gene Ruler 1 kb Plus Ladder, Koloni, 7,8, 19)



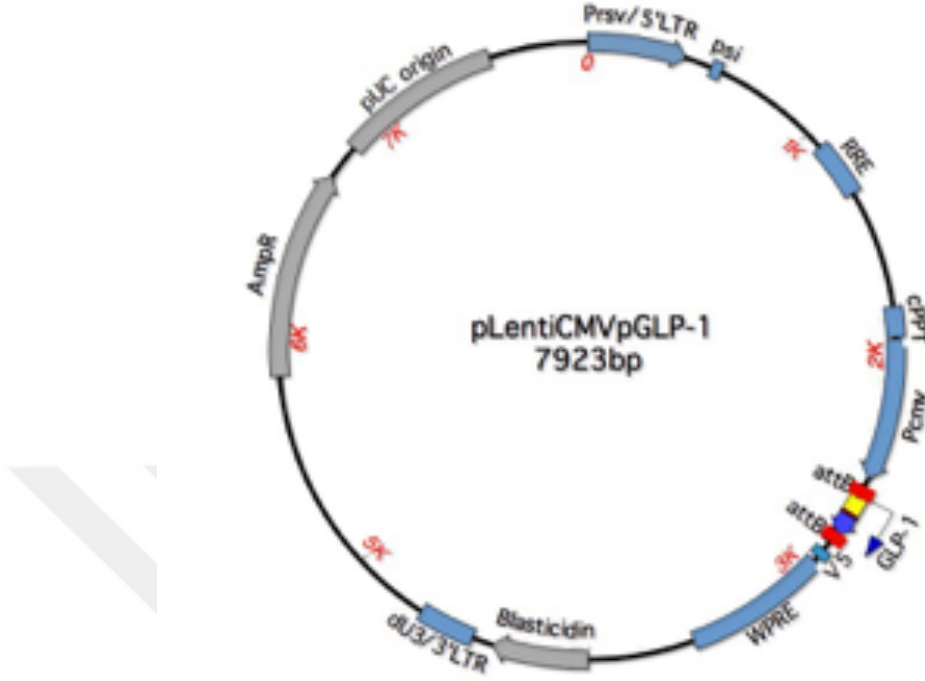
Şekil 4.3. DNA dizi analizi ile doğrulanan kolonilerin midi ölçekte üretim ve izolasyonu sonrası agaroz jel elektroforezi ile doğrulanması. **a.** Sekanslama ile doğrulanmış 8. Ve 19. Koloniden kurulmuş midi kültür sonrası midi prep ile izole edilmiş plazmidlerin yürütüldüğü agaroz jel görüntüsü. **b.** Midi Prep sonrası izole edilmiş plazmidlerin EcoRI ve AflII ikili enzim kesimi sonrası elde edilen agaroz jel görüntüsü (%1 Agaroz jel, Kuyular sırasıyla, Gene Ruler 1 kb Plus Ladder, Koloni, 8, 19)

Sekans reaksiyonu sonrasında Gateway klonlama stratejisinde kullanıma yetecek miktarda giriş vektörü elde etmek üzere kurulan midi kültür sonrasında kolonilerde bölünme sırasında istenmeyen bir rekombinasyon olup olmadığının kontrolü için plazmid izolasyonu yapılarak plazmidler agaroz jel elektroforezinde yürütülerek doğrulandı (Şekil 4.3).

Giriş vektörlerinin oluşturulmasının ve doğrulanmasının ardından, GLP-1 kodlayan HIV tabanlı 3. Nesil lentiviral vektörlerin oluşturulması amacıyla Gateway HiPerform Lentiviral Ekspresyon Sistemi (Invitrogen) kullanıldı. Bu sistemde kullanılan destinasyon vektörü ile giriş vektörü arasında, bakteriyofaj lambdanın bölgeye özgü rekombinasyon özelliği olan att bölgelerinden yararlanılarak gerçekleştirilen bir çaprazlama reaksiyonu ile ilgili genin istenilen lentiviral özelliklere sahip destinasyon vektörüne klonlanması sağlanmaktadır. Kit içeriğinde bulunan ve oluşturulan transfer plazmidine lentiviral özellikleri kazandıracak elementleri içeren destinasyon vektörü ile TOPO klonlama stratejisi ile oluşturulan giriş vektörünün, LR rekombinasyon reaksiyonu olarak isimlendirilen çaprazlama reaksiyonları (Şekil 4.4) sonucunda insan GLP-1 geni kodlayan lentiviral ekspresyon plazmidleri oluşturuldu (Şekil 4.5).



Şekil 4.4. LxR rekombinasyon reaksiyonu. Bu reaksiyon, LR Rekombinaz II enzim karışımı (Invitrogen) yardımıyla, destinasyon vektörü (pLenti6.3/V5-Dest) üzerindeki attR1/attR2 bölgeleri ve GLP-1 giriş plazmidindeki attL1/attL2 bölgeleri arasında parça değişimini amaçlar. Klonaz enzim karışımının varlığında giriş GLP-1 klonuyla destinasyon vektörünün LxR rekombinasyon reaksiyonu GLP-1 transgenini taşıyan ekspresyon vektörünün oluşumunu sağlar.

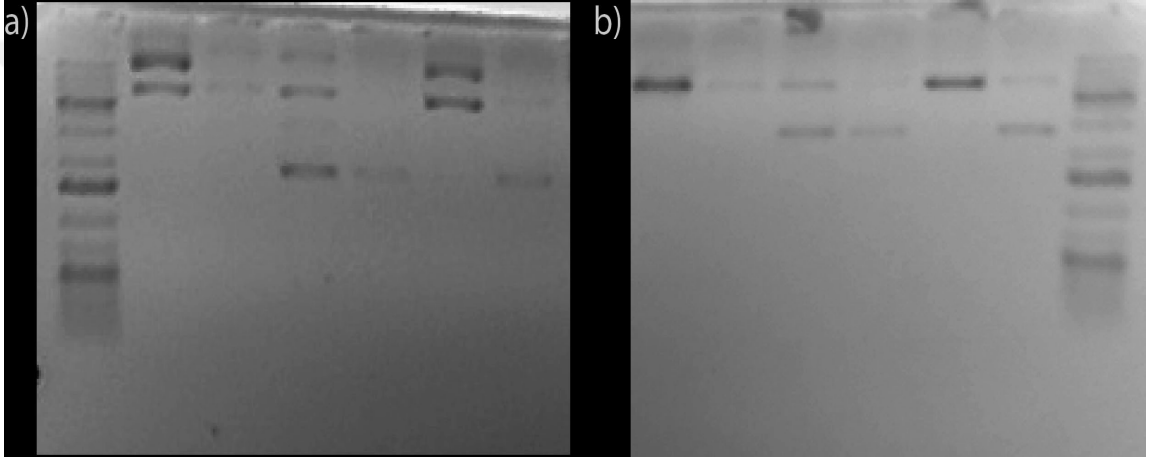


Şekil 4.5. pLentiGLP-1 ekspresyon klonunun vektör haritası. Giriş GLP-1 klonu ve destinasyon vektörünün LXR rekombinasyonu sonucu oluşan pLentiGLP-1 vektörü üzerinde GLP-1 geninin pozisyonu, HIV tabanlı 3. nesil lentiviral vektör genleriyle birlikte gösterilmiştir.

Gateway HiPerform Lentiviral Ekspresyon Sistemi (Invitrogen) kullanılarak gerçekleştirilen LR rekombinasyon reaksiyonu sonrasında, 7926 bp boyutunda ekspresyon vektörünün oluşması gerekmektedir (Şekil 4.6.a). Ayrıca restriksiyon kesim reaksiyonunda EcoRI enzimi ile tekli kesim gerçekleştirilerek transfer plazmidleri doğrulandı (Şekil 4.6.b.).

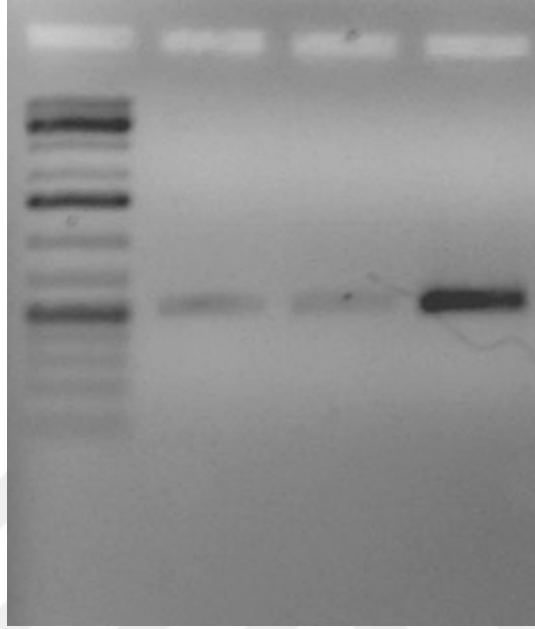
pLenti6.3/V5-Dest vektöründe biri Kloramfenikol dirençlilik geninden olmak üzere EcoRI enzimi için 2 kesim bölgesi yer almaktadır. LR rekombinasyon reaksiyonu istendiği gibi gerçekleştiği takdirde Kloramfenikol dirençlilik geni çıkıp yerine giriş vektörünün taşıdığı gen gireceğinden bu kesim bölgesi ekspresyon vektöründe yer almayacaktır. Aktarılması öngörülen gende de bir adet EcoRI kesim bölgesi vardır fakat kesim bölgesi pozisyon açısından farklı bir noktada olduğundan oluşacak bantlar farklı boyutlarda olacaktır. Eğer LR rekombinasyon reaksiyonu istenildiği gibi gerçekleşmişse oluşması öngörülen bant boyutları, 199 bp ve 7727 bp şeklindedir. Eğer reaksiyon istenildiği gibi gerçekleşmemişse oluşacak olan bant boyutları 463 bp ve 8924 bp

şeklinde oluşacaktır. Bu bantlar agaroz jel elektroforezi ile kolaylıkla ayırt edilebileceğinden tekli enzim kesimi plazmidlerin doğrulanması için yeterli görülmüştür (Şekil 4.6). Ancak, oluşturulan ekspresyon vektörlerinin doğrulanmasını takiben, vektör oluşturulurken LTR bölgelerinde herhangi bir değişim oluşmadığından emin olmak için kitede önerilen AflII, XhoI enzimleri ile de ikili kesim gerçekleştirildi. Hem tekli hem ikili kesim ile doğrulanan plazmidler belirlendi. Buna göre 1,2 ve 5 numaraları kolonilerden izole edilen plazmidlerin doğru olduğu öngörüldü.



Şekil 4.6. LR rekombinasyon reaksiyonu ile oluşturulan CMV promotörü altında GLP-1_INSSP kodlayan ekspresyon vektörlerinin **a.** Plazmid DNA agaroz jel görüntüsü **b.** EcoRI restriksiyon enzim kesimine ait agaroz jel görüntüsü. (%1 Agaroz jel, Kuyular sırasıyla, Gene Ruler 1 kb Plus Ladder, Koloni, 1, 2, 3, 4, 5, 6)

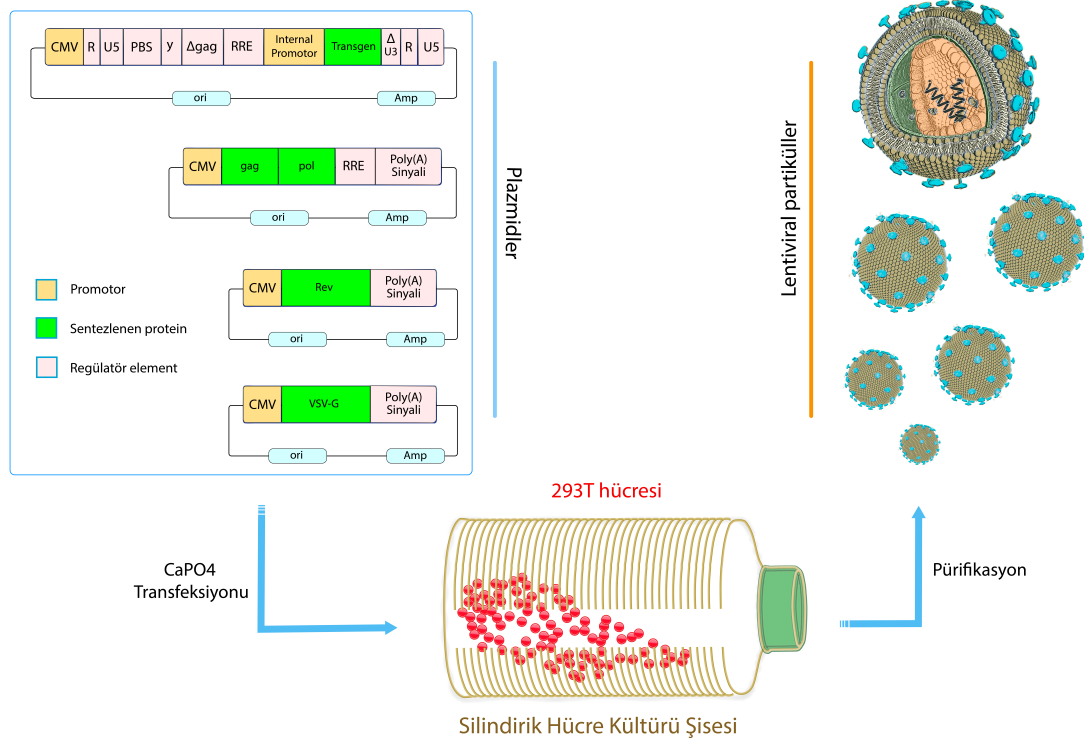
Kolonilerin restriksiyon enzim kesimleri ile yapılan doğrulama işleminin ardından dizi analizine tabi tutulmak üzere PZR reaksiyonları kuruldu. Saflaştırılan PZR ürünleri ile, her bir ürün için 1 ileri 1 geri olmak üzere CMV ileri ve V5 geri primerleri ile sekans reaksiyonu kuruldu. AB 9800 Fast Thermal Cycler cihazında gerçekleştirilen sekans analizi sonrasında belirlenen bu 3 koloninin doğru oryantasyonda ve istenilen dizide klonlandığı belirlendi (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. Oluşturulan ekspresyon vektörlerinden 3 farklı Koloniden elde edilen plazmidlerden CMV Forward ve V5 Reverse Primerleri ile kurulan PZR reaksiyon ürünlerinin agaroz jel görüntüsü. (%1 Agaroz jel, , Kuyular sırasıyla, Gene Ruler 1 kb Plus Ladder Koloni, 1, 2, 5)

Klonlama sonrasında diagnostik restriksiyon enzim kesimleri ve DNA dizi analizleri ile; hem GLP-1 geninin transfer plazmidindeki oryantasyonu, hem de oluşturulan transfer plazmidinin DNA dizisi doğrulanarak GLP-1 kodlayan lentiviral transfer plazmidini başarıyla oluşturuldu (LentiGLP-1).

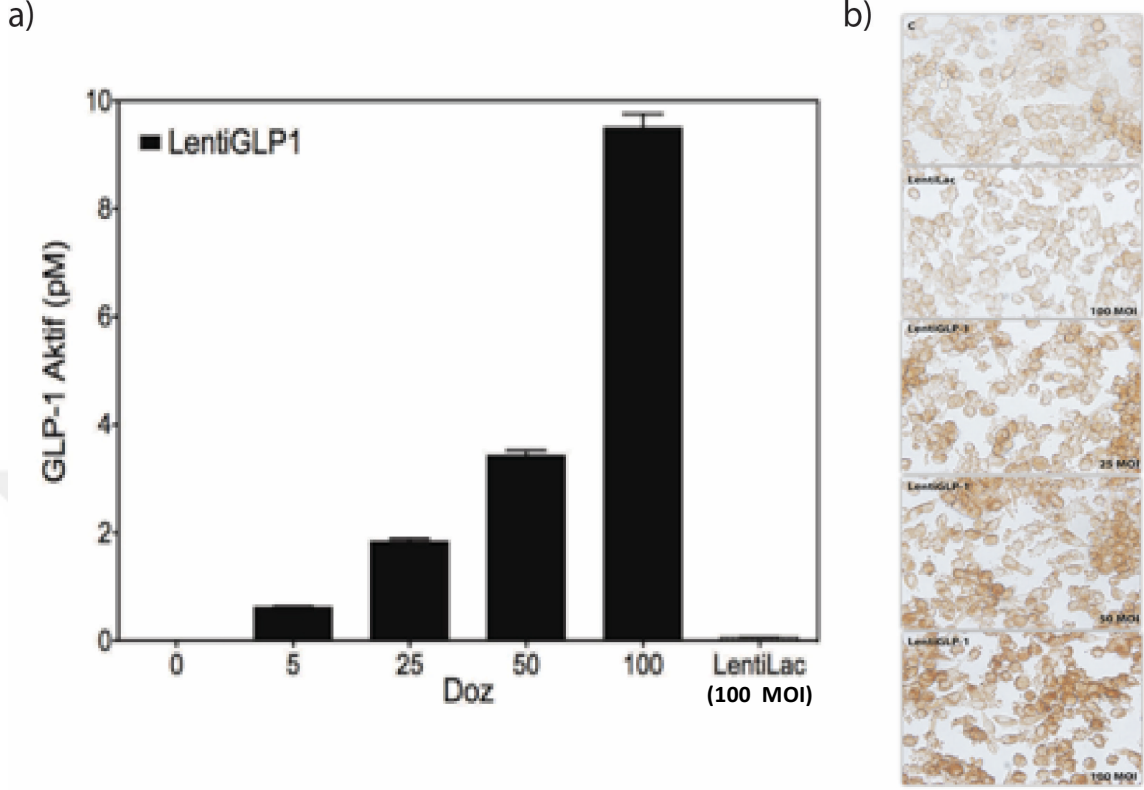
Deneylerde kontrol vektörü olarak kullanılmak üzere beta galaktosidaz sentezleyen lentiviral transfer plazmid (LentiLacZ) benzer şekilde inşa edildi. Ayrıca lentiviral vektör üretim optimizasyonlarında kullanılmak üzere üzerinde kırmızı floresan proteini kodlayan geni taşıyan lentiviral transfer plazmid de (LentiRFP) benzer şekilde oluşturuldu. Lentiviral vektör üretimleri, transfer plazmid dahil 4 farklı plazmidin 293T hücrelerine kalsiyum fosfat yöntemi ile aktarılmasını esas alan geçici transfeksiyon yöntemiyle, döner hücre kültürü şişelerinde gerçekleştirildi (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. Plazmid tabanlı geçici transfeksiyonla lentiviral vektör üretimi. Kapsid ve matris proteinleri gag geni tarafından kodlanırken; proteaz, ters transkriptaz ve integras fonksiyonları pol geni tarafından sağlanır. Transfer vektör ve paketleme vektör genomlarının çekirdekten çıkması için Rev geninin mutlaka sentezi de gereklidir. VSV-G zarf proteini lentiviral vektörlere çok farklı spektrumda memeli hücrelerini enfekte etme özelliği ve dayanıklılığı kazandırır. (Olgun ve ark., 2018)

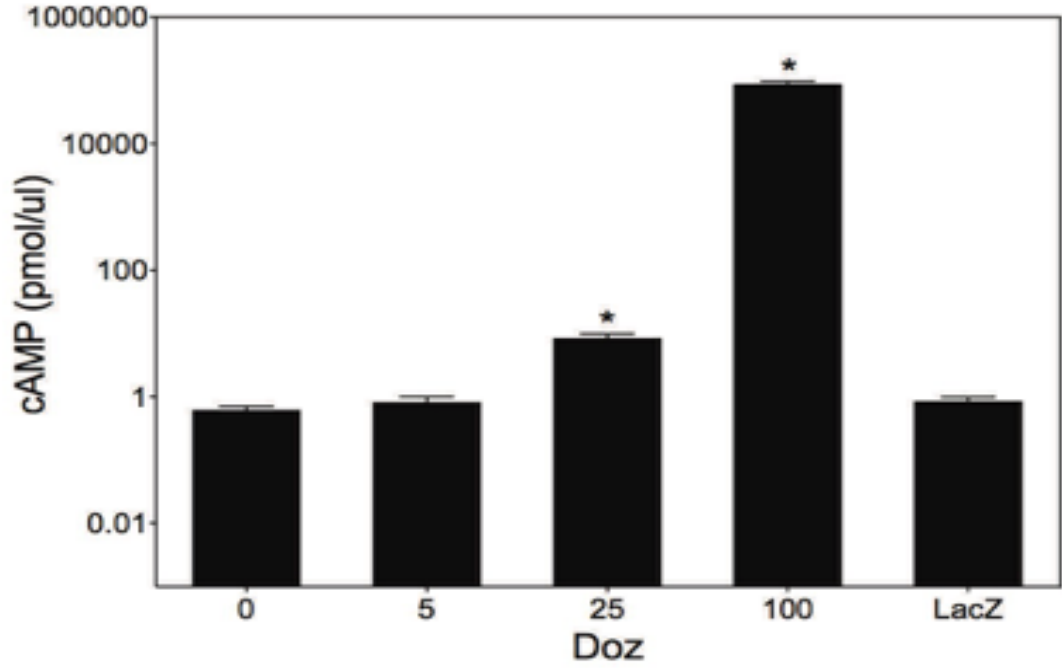
4.2 LentiGLP-1 Vektörünün İn Vitro Fonksiyonellik Analizi

Oluşturulan LentiGLP-1 vektörünün in vitro koşullarda fonksiyonel olup GLP-1 sentezi oluşturup oluşturmadığını göstermek için HT1080 hücreleri (virus doz titresi belirlenmesinde kullanılan hücre hattı) LentiGLP-1 ile transdükte edilerek hücrelerin süpernatantlarından aktif GLP-1 ELISA analizi gerçekleştirildi (Şekil 4.9a). Kontrol vektörü olarak beta galaktosidaz kodlayan LentiLacZ vektörlerinin kullanıldığı analizler sonucunda, LentiGLP-1 vektörü ile transdükte HT1080 hücrelerinde doza bağımlı GLP-1 sentez ve sekresyonunun olduğu belirlendi. GLP-1 sentez ve sekresyonu transdükte HT1080 hücrelerinde GLP-1'e karşı antikor kullanılarak yapılan immünohistokimyasal analiz ile de gösterildi (Şekil 4.9b).

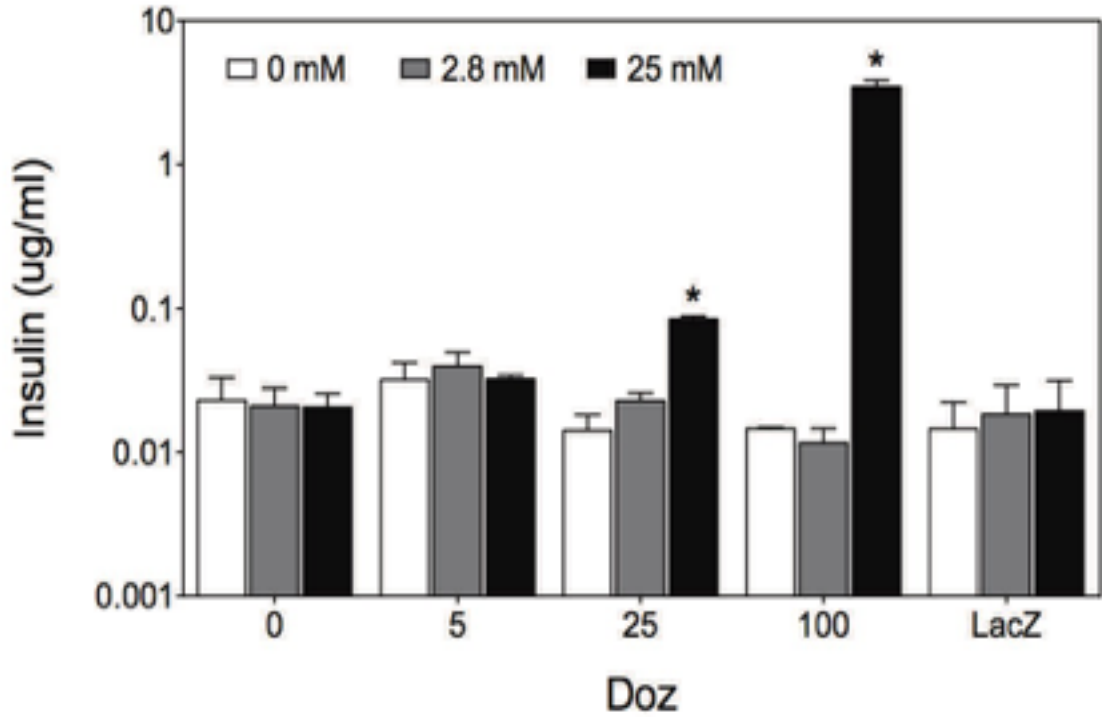


Şekil 4.9. a. LentiGLP-1 transdükte HT1080 hücrelerinde GLP-1 sentez ve sekresyonunu gösteren grafik. HT1080 hücreleri ya LentiGLP-1 veya LentiLacZ lentiviral vektörleriyle transdükte edildikten sonra 3. günde alınan süpernatantlarda yapılan GLP-1 ELISA sonucu (n=6/grup, istatistiksel analiz One way Anova, $p < 0.0001$). **b.** HT1080 hücrelerine yapılan transdüksiyon sonrası GLP-1 sekresyonunun immünohistokimya analizi ile gösterimi.

Üretilen LentiGLP-1 vektörünün in vitro koşullarda HT1080 hücrelerinde GLP üretim ve sekresyonunu sağladığı ELISA yöntemleriyle belirlendikten sonra, LentiGLP-1 vektörünün pankreatik beta hücre hatlarında da fonksiyonel olup olmadığının belirlenmesi amacıyla MIN6 hücrelerinde, cAMP miktar analizi ve glukoz indüklü insülin salınım testleri gerçekleştirildi. Transdüksiyondan 3 gün sonra toplanan hücre lizatlarında doza bağımlı cAMP miktar artışı ile birlikte; transdükte hücrelerde GLP-1 peptidinin pankreatik beta hücrelerindeki ilgili reseptörlerine bağlanarak adenilil siklaz aktivasyonunu indüklediği ve böylece ATP'den cAMP oluşumunu sağladığı gösterildi (Şekil 4.10).



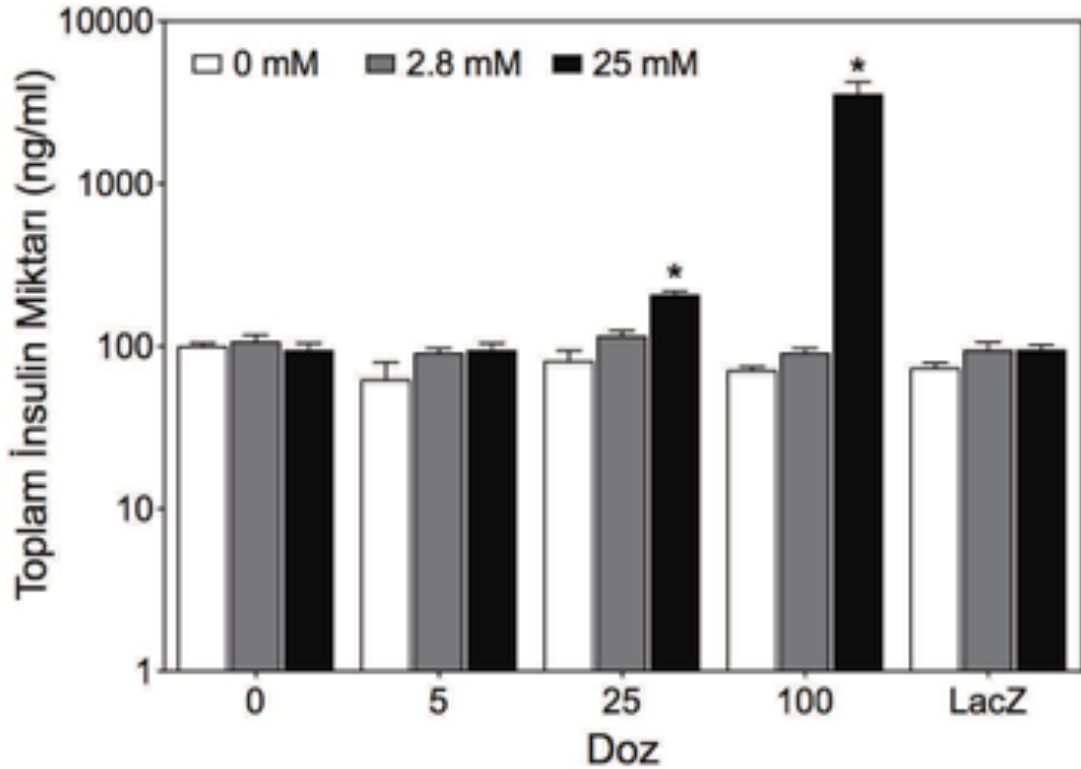
Şekil 4.10. LentiGLP-1 transdükte pankreatik beta hücrelerinde hücre içi cAMP miktar artışı. LentiLacZ kontrol vektörü olarak kullanılmıştır (n=6, istatistiksel analiz One way Anova, p<0.0001).



Şekil 4.11. LentiGLP-1 transdükte pankreatik beta hücrelerinde yüksek glukoz konsantrasyonunda insülin sekresyonunun artışı. Pankreatik beta hücrelerine LentiGLP-1 enfeksiyonu yalnızca yüksek glukoz konsantrasyonunda insülin sekresyonunu artırır (n=6/grup) (İstatistiksel analiz, Two Way Anova p<0.001).

GLP-1 peptidinin pankreatik beta hücreleri üzerinde insülinotropik etki gösterip göstermediğinin belirlenmesi amacıyla MIN6 hücrelerinin LentiGLP-1 ile transdüksiyonu sonrası 3. günde Glukoz İndüklü İnsülin Salınım (GSIS) testi uygulandı. Transdükte hücrelerde farklı glukoz konsantrasyonlarında yapılan analiz sonucunda LentiGLP-1'in pankreatik beta hücrelerinde yalnızca yüksek glukoz konsantrasyonlarında insülin sekresyonunu arttırdığı belirlendi (Şekil 4.11).

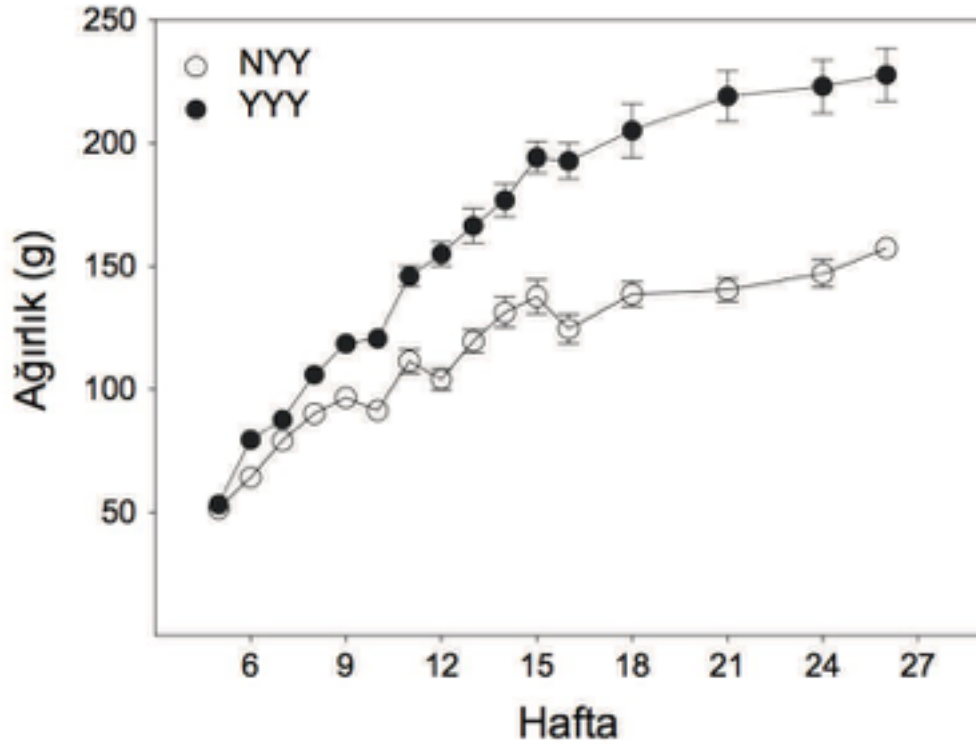
Hücre içeriğinde kalan ve dışarı salınan insülin miktarları toplanarak elde edilen data lar incelendiğinde de total insülin miktarı açısından yine 25 ve 100 MOI ile transdükte olmuş hücrelerde bir artış olduğu saptandı. Tüm bu sonuçlar doğrultusunda pankreatik LentiGLP-1 ile transdükte beta hücrelerinde hem insülinin biyosentezinin hem de yüksek glukoz konsantrasyonlarında insülin salınımının tetiklendiği gösterildi (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. LentiGLP-1 transdükte pankreatik beta hücrelerinde yüksek glukoz konsantrasyonunda insülin sentezinin artışı (n=6 istatistiksel analiz, Two Way Anova p<0.001).

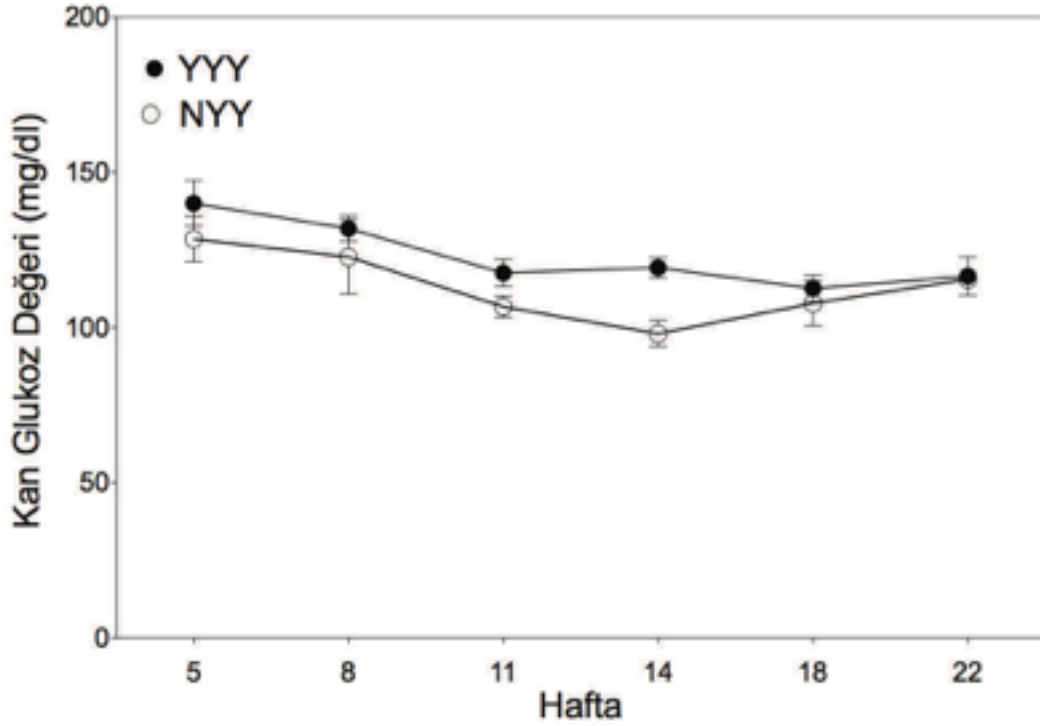
4.3 Obez Tip 2 Diyabet Deneysel Hayvan Modeli Oluşturma

Obez T2DM deneysel hayvan modeli oluşturabilmek için 4 haftalıkken alınan kalorinin %60 'ının yağdan geldiği yüksek yağlı yem ile beslenen Sprague Dawley (SD) sıçanların 27 hafta boyunca alınan ağırlık ölçümleri sonucunda, NYY ve YYY beslenen sıçanlar arasında ağırlık kazancı bakımından istatistiksel açıdan belirgin farkların olduğu ve bu farklılığın YYY ile beslenme başladıktan 5 hafta sonra yani 9. haftada belirginleştiği 2 way ANOVA analizi ile saptandı (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. NYY ile (n=14) veya YYY ile (n=15) beslenen sıçanların zamana bağlı ağırlık kazanç grafiği (İstatistiksel analiz; Mann Whitney U test; p=0,0249).

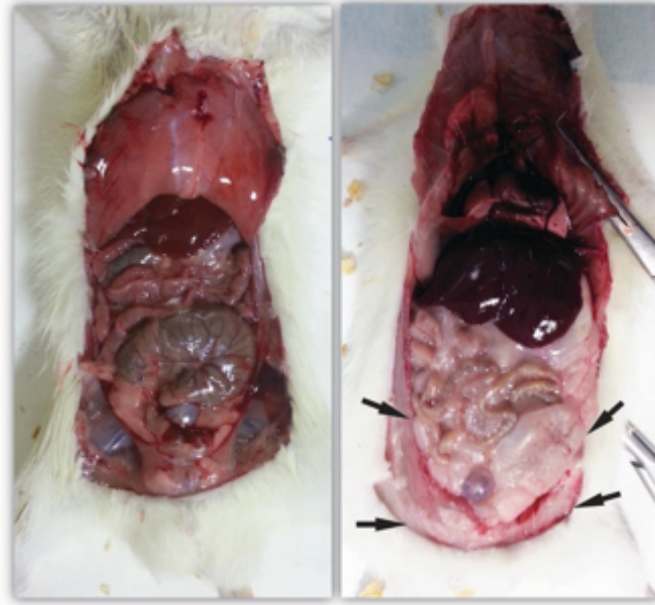
YYY ile beslenen sıçanlar ağırlıklarının dışında kan glukoz değerleri açısından da değerlendirildi. Bu değerlendirmede her iki grup arasında istatistiksel olarak belirgin bir farklılık olmadığı görüldüğünden sıçanları YYY ile beslemenin tek başına diyabeti indüklemek için yetersiz olduğu sonucuna varıldı (Şekil 4.14).



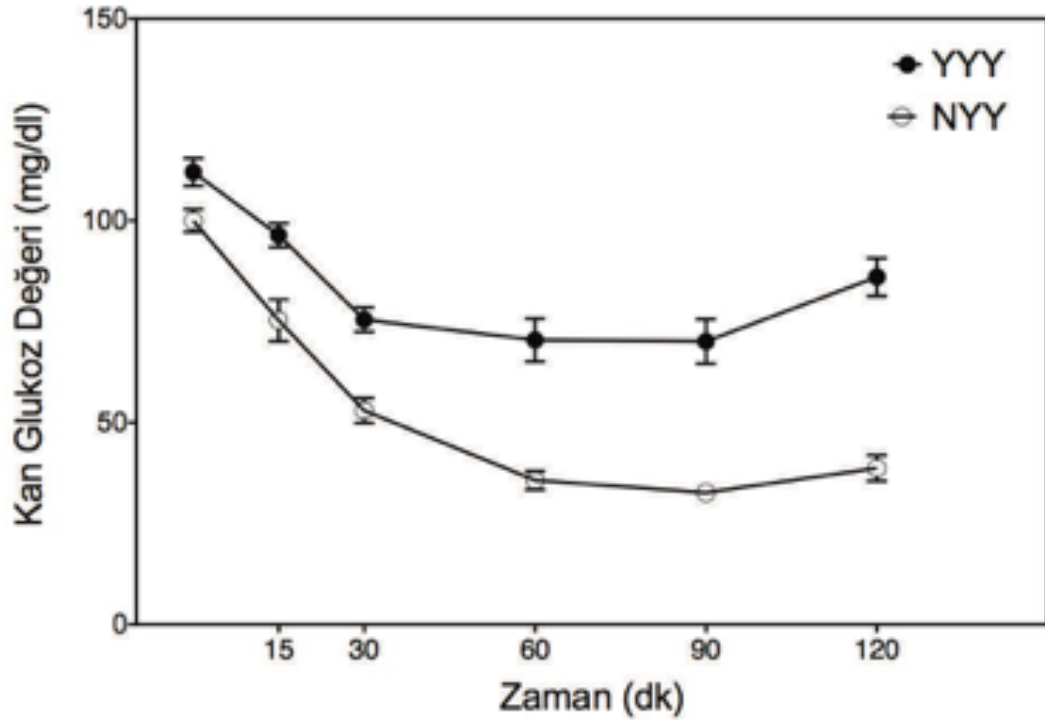
Şekil 4.14. NYY ile (n=14) veya YYY ile (n=15) beslenen sıçanların zamana bağlı kan glukoz seviye farklılıkları. (İstatistiksel analiz; Mann Whitney U test; $p=0,1797$)

Kan glukoz değerlerine bakıldığında her ne kadar diyabeti indüklemek için YYY ile besleme yetersiz bulunsa da sıçanlar abdominal yağlanma açısından değerlendirildiğinde, YYY ile beslenen hayvanların NYY ile beslenen deneklere oranla aşırı yağlandığı tespit edildi. Dolayısıyla YYY ile beslenme, diyabet oluşturmak için yetersiz olsa da beslenme farklılığı ile obezitenin başarıyla indüklendiği belirlendi (Şekil 4.15).

Obez hastalarda insülin dirençliliği ve glukoz tolerans bozukluğu prediyabetik bulgular olarak bilinmektedir. Bu nedenle YYY ile beslenme sonucunda diyabet indüklenemese de obezitenin indüklendiğinin belirlenmesi üzerine, 2 ay süreyle YYY ile beslenen obez sıçanlar insülin duyarlılık ve glukoz tolerans açısından değerlendirildi. 6-8 saat aç bırakılan sıçanlarda kan glukoz değerleri ölçüldükten intraperitoneal insülin enjeksiyonu sonrasında zamana bağımlı olarak yapılan İnsülin duyarlılık testi (IDT) sonucunda YYY ile beslenen sıçanlarda NYY ile beslenen sıçanlara oranla insülin dirençliliğinin geliştiği tespit edildi ($p=0.0465$) (Şekil 4.16).

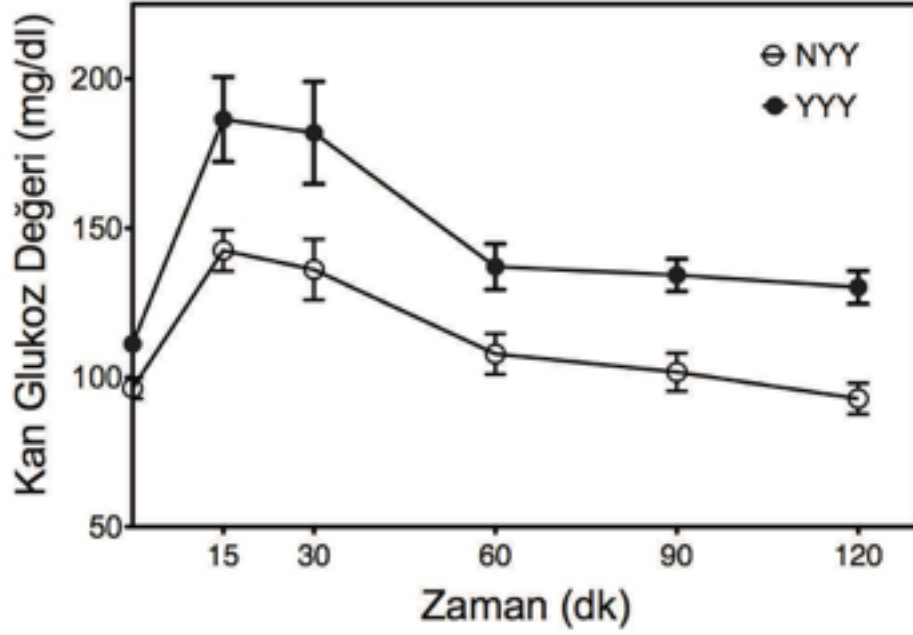


Şekil 4.15. Kontrolle kıyasla obez sıçanlarda abdominal yağlanma düzeyi (n=5/grup). 8 hafta boyunca NYY (soldaki resim n=5) veya YYY (sağdaki resim n=6) ile beslenen SD sıçanların abdominal organlarının görüntüsü. Oklar abdominal yağ birikintilerini göstermektedir.



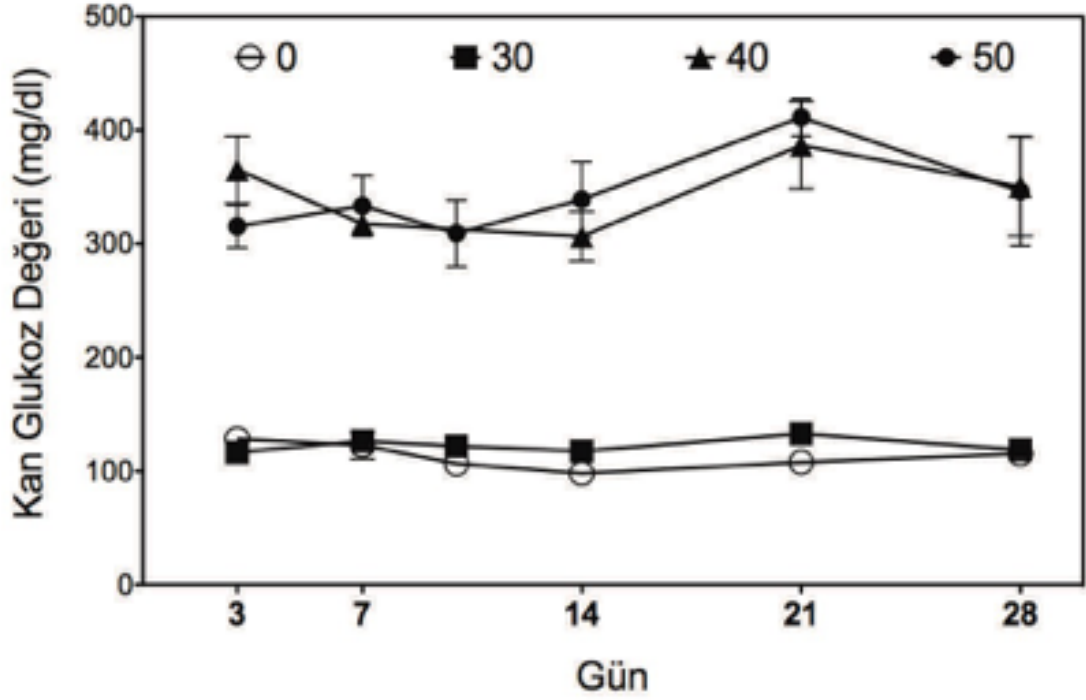
Şekil 4.16. YYY ile beslenen sıçanlar (n=15) ve NYY (n=14) ile beslenen sıçanların insülin dirençlilik grafiği (IDT, 1 U/kg Humalo, Elli Lilly enjeksiyonu ile gerçekleştirildi.) (İstatistiksel analiz; Two-way ANOVA, p=0.0465)

İnsülin Duyarlılık testinin ardından yine 6-8 saat aç bırakılan sıçanlarda kan glukoz değerleri ölçüldükten intraperitoneal glukoz enjeksiyonu sonrasında zamana bağımlı kan glukoz ölçümleriyle yapılan İntraperitoneal Glukoz Tolerans Testi (IPGTT) sonucunda, YYY ile beslenen sıçanların NYY ile beslenen sıçanlara oranla glukoz toleranslarının da bozuk olduğu saptandı ($p=0.0483$) (Şekil 4.17).



Şekil 4.17. YYY ile beslenen sıçanlar ($n=15$) ve NYY ile beslenen sıçanların ($n=14$) glukoz tolerans grafiği (IPGTT, 2 g/kg glukoz enjeksiyonu ile gerçekleştirildi.) (İstatistiksel analiz; Two-way ANOVA, $p=0.0483$)

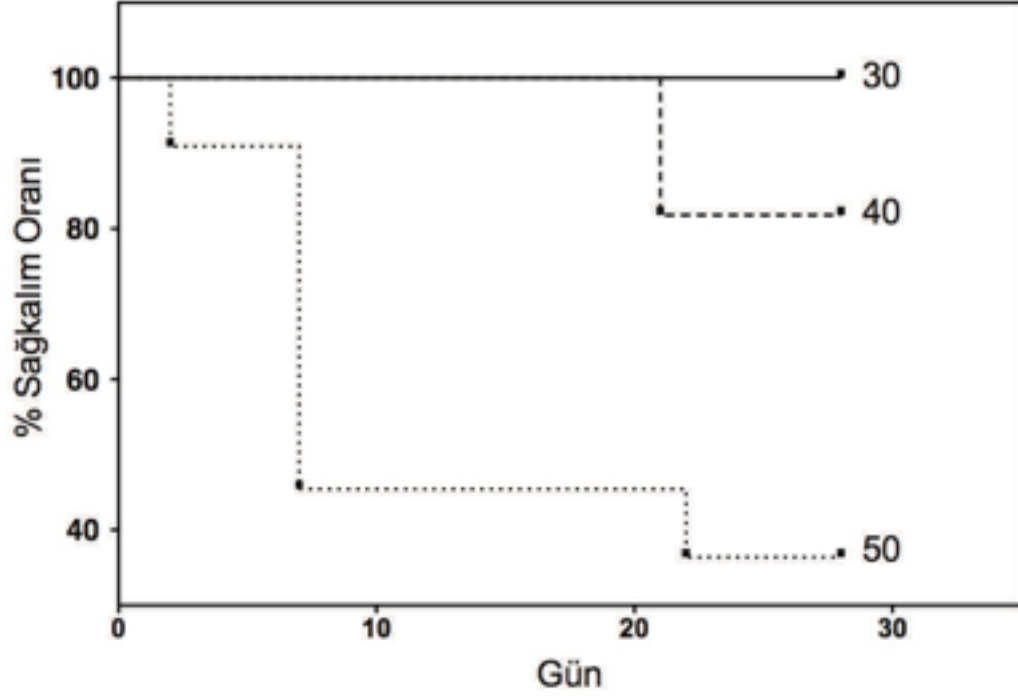
Yapılan analizler doğrultusunda, sadece YYY ile besleme sonucu obezite kaynaklı prediyabetik Sprague Dawley sıçan modelinin başarıyla oluşturulduğu belirlendi. SD sıçanlarının yüksek yağ içerikli yem ile beslenmesi obeziteye, insülin dirençliliğine ve glukoz tolerans bozukluğuna yol açsa da, kan şekerini diyabet geliştirecek seviyelere yükseltmediğinden, SD sıçanlarda diyabet indüklemek amacıyla farklı dozlarda (30 mg/kg, 40 mg/kg ve 50 mg/kg) STZ (Streptozotocin) uygulaması yapıldı (Şekil 4.18).



Şekil 4.18. Farklı doz STZ uygulamaları ve diyabet gelişimi. Obez SD sıçanlara 0 (n=14), 30 (n=10), 40 (n= 11) ve 50 (n=13) mg/kg STZ enjeksiyonu sonucu kan glukoz seviyelerinde gerçekleşen değişimler (One way Anova ve Bonforroni Çoklu karşılaştırmalı analiz, $p<0.0001$).

2 aylık YYY ile besleme sonrasında, intraperitoneal enjeksiyonla yapılan STZ uygulaması sonrasında sıçanlar 1 ay süreyle takip edildi. Takip süresince ağırlıklar, kan glukoz seviyeleri ve sağ kalım oranları incelenerek kaydedildi. Bu değerlere göre diyabeti indükleyecek en uygun dozun bulunması hedeflendi. 30 mg/kg STZ uygulamasıyla, SD sıçanlarda kan glukoz düzeyi diyabet oluşturmaya yetecek seviyeye ulaşmazken, 40 ve 50 mg/kg STZ uygulamalarıyla diyabet başarılı bir şekilde indüklendi (Şekil 4.18). Bununla birlikte, STZ uygulaması sonrasında sıçanların sağkalım oranları karşılaştırıldığında 50 mg/kg STZ dozunun mortalite oranının oldukça yüksek olduğu saptandı (Şekil 4.19).

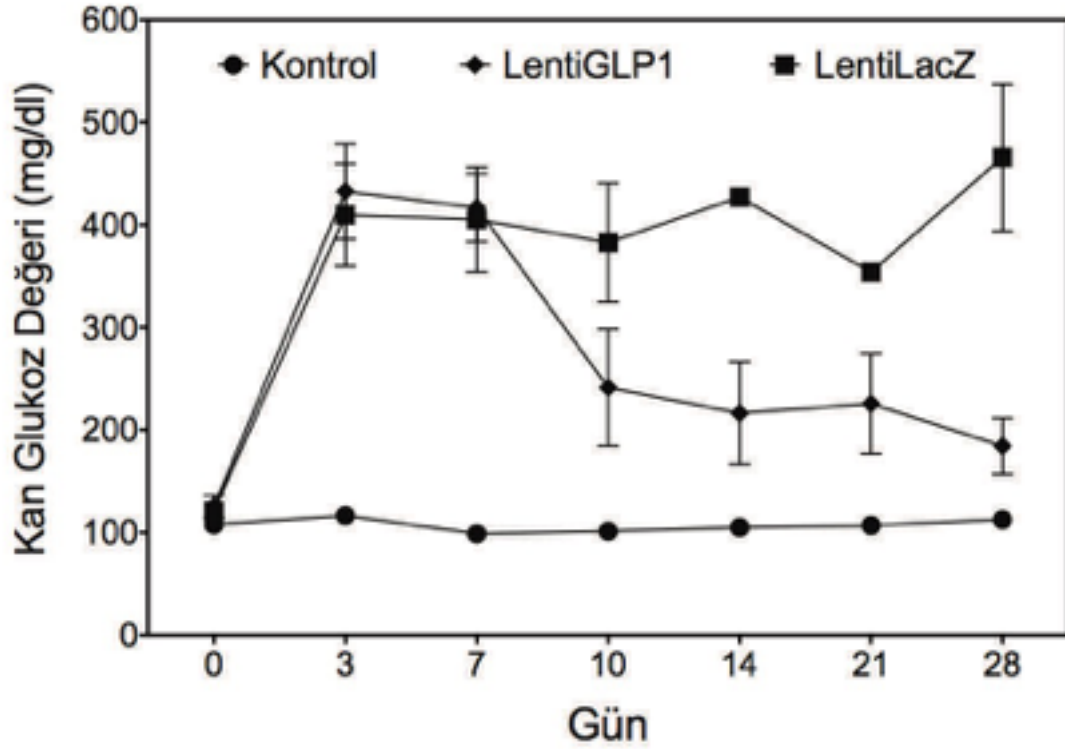
Bu bulgular doğrultusunda, her 3 STZ dozunun SD sıçanların kan şeker düzeyleri üzerindeki etkileri (Şekil 4.18) ve sağ kalım oranları (Şekil 4.19) değerlendirildiğinde 40 mg/kg STZ dozunun SD sıçanlarda diyabet indüklemek için en uygun doz olduğuna karar verilerek obez T2DM sıçan modeli başarıyla oluşturuldu.



Şekil 4.19. 30 (n=10), 40 (n= 11) ve 50 (n=13) mg/kg STZ uygulaması almış obez sıçanların sağ kalım oranları (Sağkalım analizleri, Log-Rank (Mantel-Cox) test, p=0.0094).

4.4 LentiGLP-1 Vektörünün T2DM Modelinde Terapötik Etkinliğinin Belirlenmesi

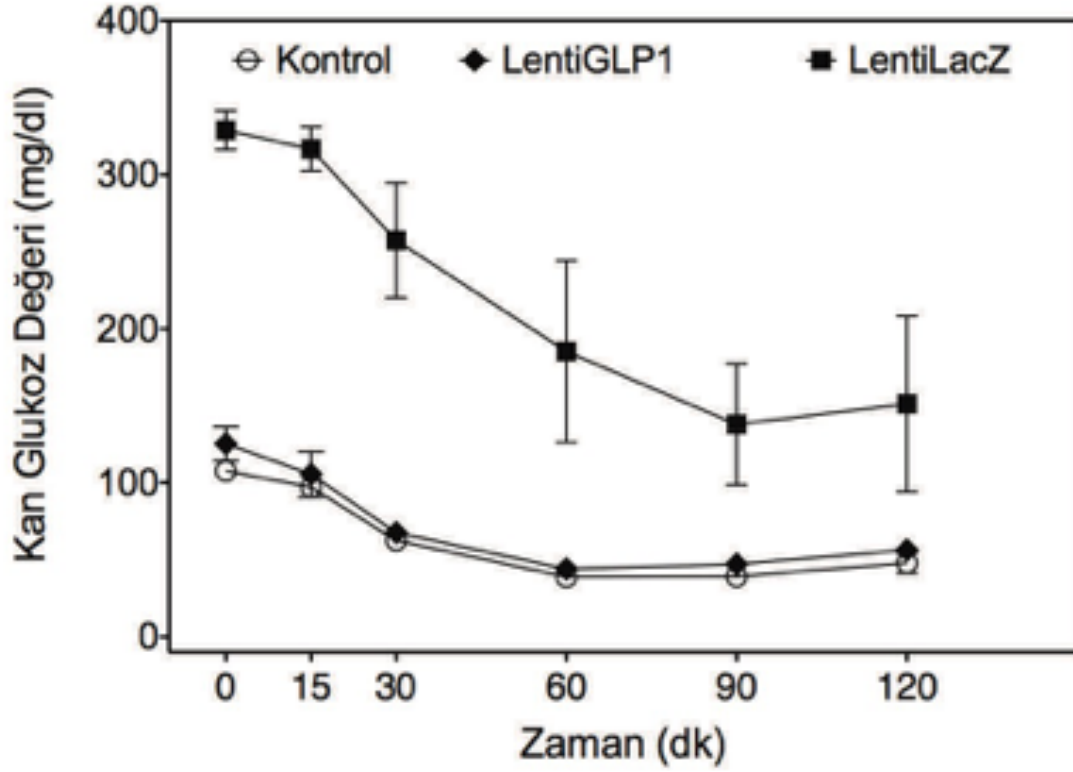
LentiGLP-1 vektörünün in vitro fonksiyonel etkinlikleri belirlendikten sonra obez diyabet SD sıçanlara yapılacak intraperitoneal enjeksiyonuyla vektörün in vivo terapötik etkinliğinin belirlenmesi için çalışmalar yapıldı. İki ay süreyle YYY ile beslenen sıçanlarda 40 mg/kg STZ enjeksiyonuyla diyabet indüklendikten sonra diyabetik sıçanlar 2 gruba ayrıldı. STZ enjeksiyonunun 7. gününde terapötik gruba 1×10^{11} TU LentiGLP-1 vektörü, diyabetik kontrol grubuna ise aynı dozda LentiLac vektörü intraperitoneal olarak enjekte edildi. Periyodik kan glukoz ölçümleri doğrultusunda LentiGLP-1 uygulanan sıçanların kan glukoz değerlerinin 10. günden itibaren 250 mg/dl değerinin altına düştüğü ve takip süresi boyunca (1 - 5 ay) normoglisemik seyrettiği belirlendi. Buna karşın LentiLacZ enjekte edilmiş sıçanların kan şekerinde herhangi bir düşme olmadığı gibi takip süresince 250 mg/gl değerinin üzerinde kaldığı belirlendi (Şekil 4.20).



Şekil 4.20. STZ indüklü diyabetik obez sıçanlara LentiGLP-1 enjeksiyonu sonrasında kan glukoz seviyelerini gösteren grafik. YYY ile beslenen 40 mg/kg STZ almış diyabetik sıçanlar önce 2 gruba ayrıldı. Bir gruba LentiGLP-1 (n=10) diğer gruba da LentiLacZ (n=10) vektörü intraperitoneal olarak enjekte edildi. Kontrol grubu olarak diyabetik olmayan sıçanlara (n=8) aynı hacimde PBS enjeksiyonu yapıldı (İstatistiksel analiz, Two way ANOVA, $p < 0,001$).

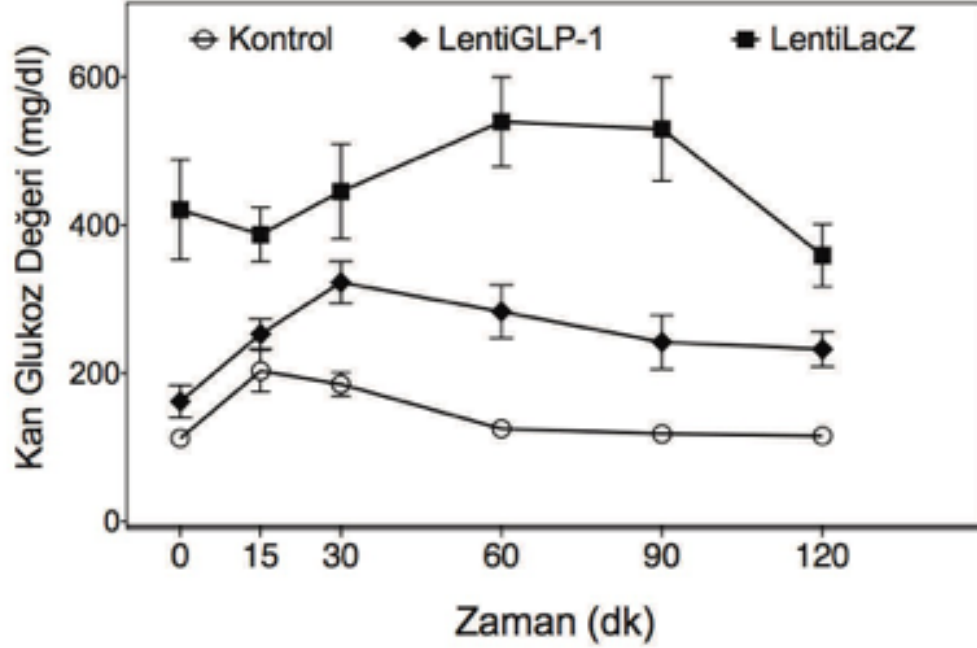
Gen nakli yapılan sıçanlarda kan glukoz değerlerinin düşüşü belirlense de diyabet modeli oluşturulurken bozulduğu tespit edilen insülin duyarlılık ve glukoz tolerans açısından gen naklinin etkinliğini test etmek amacıyla, gen naklini takiben 5 hafta sonra İnsülin Duyarlılık testi (İDT) ve İntraperitoneal Glukoz Tolerans Testi (IPGTT) uygulandı.

Diyabetik sıçanlar insülin duyarlılık açısından değerlendirildiğinde, LentiGLP-1 uygulaması alan sıçanların diyabet olmayan kontrol sıçan grubunda farklı olmayacak düzeyde bir insülin duyarlılığı geliştirdikleri saptandı ($p=0,6416$). Bununla birlikte LentiLacZ uygulanan diyabetik sıçanların insülin duyarlılık eğrisinin terapötik ve diyabet olmayan kontrol gurubundan belirgin düzeyde farklı olduğu ve bu sıçanların insülin dirençli olduğu belirlendi. Bu bulgular doğrultusunda, lentiviral GLP-1 gen nakliyle obez diyabet sıçanların insülin direncinin kırılabildiği ortaya çıkarıldı (Şekil 4.21).



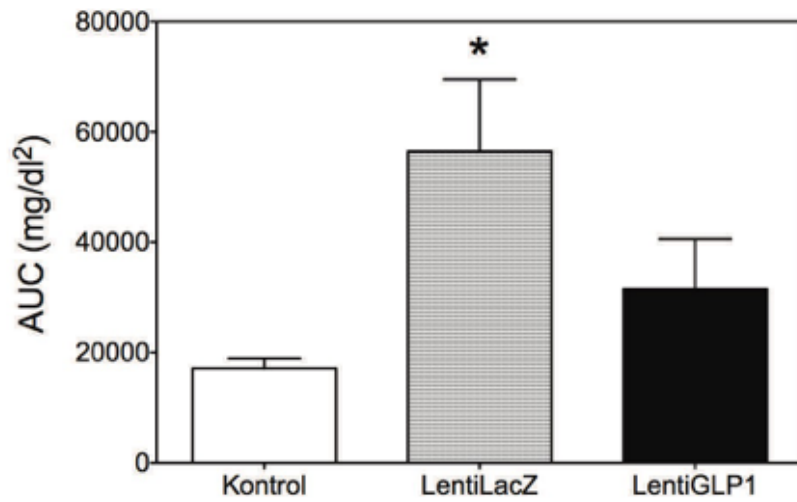
Şekil 4.21. STZ indüklü diyabetik obez sıçanlara LentiGLP-1 enjeksiyonu sonrasında insülin dirençlilik eğrilerini gösteren grafik. Lenti vektör uygulamasını takiben kontrol (n=8), LentiGLP-1 (n=10) ve LentiLacZ (n=10) grubu sıçanların insülin duyarlılık testi sonuçlarını. IDT 1 U/kg Humalog (Elli Lilly) enjeksiyonu ile gerçekleştirildi. İstatistiksel analiz; Unpaired T test, LentiGLP-1/LentiLacZ p=0.0017; LentiGLP-1/Kontrol p=0,6416.

Glukoz toleransı açısından sıçanlar incelendiğinde ise, LentiGLP-1 uygulanan sıçanların glukoz toleransının gelişerek LentiLacZ almış diyabetik sıçanların glukoz tolerans bozukluğuna oranla belirgin düzeyde bir iyileşme gösterdikleri saptandı (Şekil 4.22).



Şekil 4.22. STZ indüklü diyabetik obez sıçanlara LentiGLP-1 enjeksiyonu sonrasında glukoz tolerans eğrilerini gösteren grafik. Vektör uygulamasını takiben sıçanların (n=10/grup, kontrol grup n=8) intraperitoneal glukoz tolerans testi sonuçlarını gösteren grafik. IPGTT, 2 g/kg glukoz enjeksiyonu ile gerçekleştirildi. İstatistiksel analiz; Unpaired T test, LentiGLP-1/LentiLacZ p=0.0004)

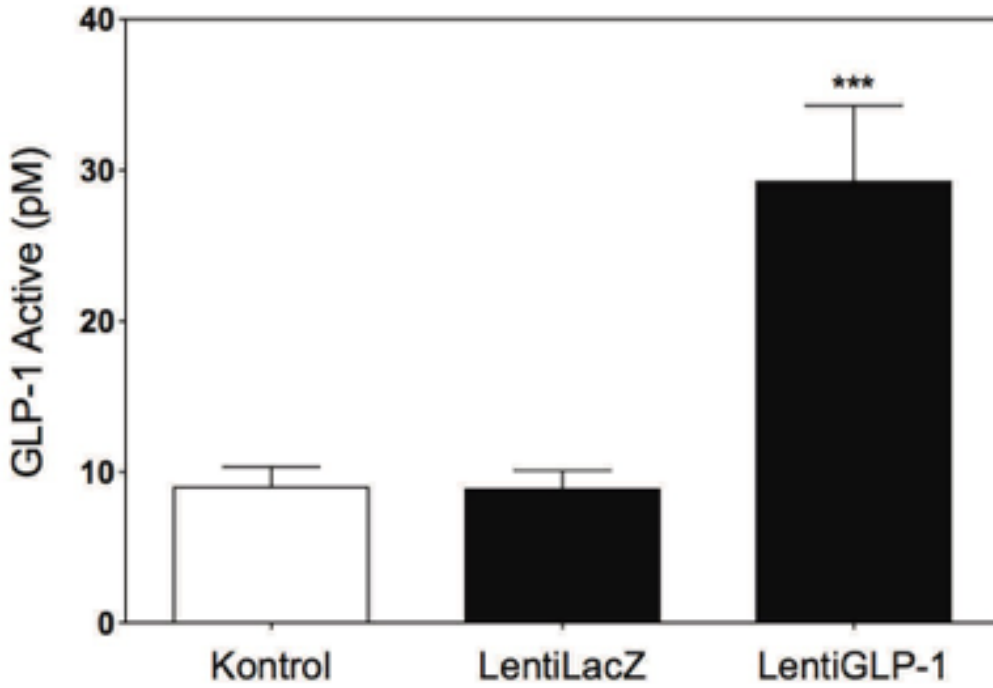
İntraperitoneal glukoz tolerans testi sonrası elde edilen grafikte eğriler altında kalan alanların (AUC) hesaplanmasıyla da glukoz tolerans değerlerindeki iyileşme doğrulanmış olup, LentiGLP-1 almış sıçanların AUC değerlerinin LentiLacZ almış diyabetik sıçanlara göre belirgin oranda düşük olduğu saptanmıştır (Şekil 4.23).



Şekil 4.23. Gen nakli sonrası IPGTT testinde gruplar-arası eğri altında kalan alan (AUC) profillerindeki değişimler. İstatistiksel analiz; One Way ANOVA, p=0,002.

Diyabetik hayvan modelinde LentiGLP-1 ve LentiLac uygulamasını takiben 1 ay süreyle yapılan kan şekeri takibi, akabinde gerçekleştirilen glukoz tolerans ve insülin duyarlılık analizleri sonrasında, kan lipid profilleri ve pankreatik adacıklar üzerindeki olası değişikliklerin incelenmesi amacıyla sıçanlar sakrifiye edildi.

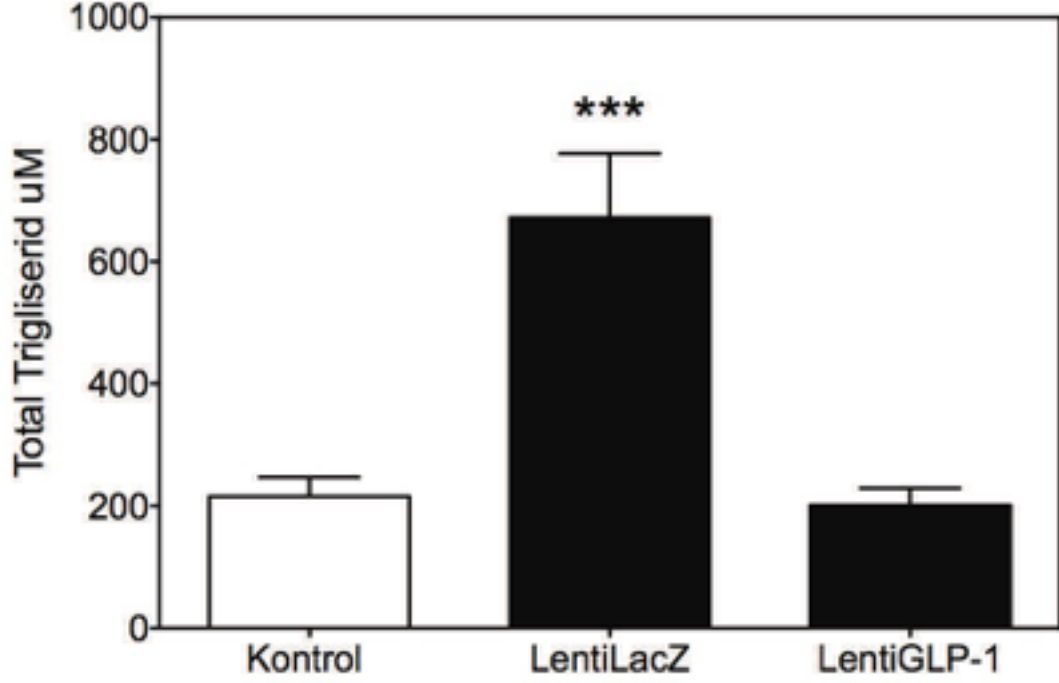
LentiGLP-1 uygulamasının diyabetik sıçanlarda in vivo etkilerinin kan değerlerindeki GLP-1 miktar artışına bağlı olup olmadığının değerlendirilebilmesi amacıyla öncelikle kan dolaşımındaki aktive GLP-1 miktarı ELISA analizi ile belirlendi. Analiz sonucunda LentiGLP-1 uygulanmış sıçanların kan örneklerindeki plazma GLP-1 seviyesinin; kontrol grubu ve LentiLac uygulanmış sıçanların kanlarındaki GLP-1 seviyesine göre 3 kat daha fazla olduğu belirlendi (Şekil 4.24).



Şekil 4.24. STZ indüklü diyabetik obez sıçanlara LentiGLP-1 enjeksiyonu serum GLP-1 seviyelerini gösteren grafik. Sakrifiye edilen sıçanların (n=10/grup) kalpten toplanan kan örneklerindeki aktif GLP-1 miktarlarının karşılaştırmalı analizi (İstatistiksel analiz; One Way ANOVA, p=0,0006). Kontrol YYY ile beslenen gen nakli yapılmamış denekleri temsil eder.

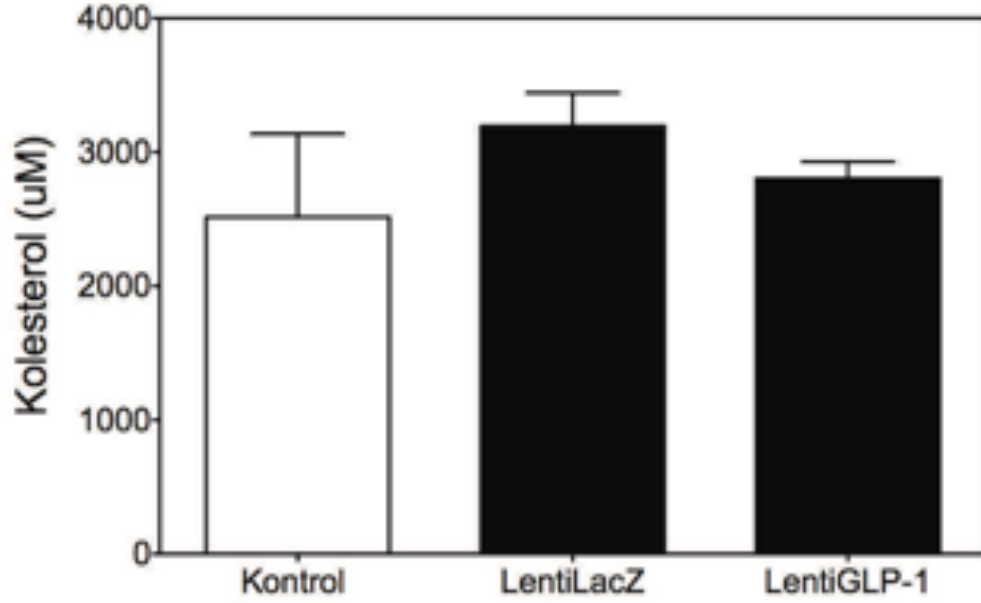
LentiGLP-1 uygulaması almış sıçanların kanlarındaki plazma Trigliserit ve Kolesterol seviyelerinin incelenmesi amacıyla sakrifikasyon sırasında toplanan kan örneklerinden Enzychrom Triglyceride Assay Kit (Bioassay Systems, Cat # ETGA200) ile trigliserit düzeyleri belirlendi. Analiz sonucunda, LentiLacZ uygulanmış diyabetik sıçanların

trigliserit seviyelerinin yüksek olduğu belirlenirken, LentiGLP-1 enjekte edilmiş sıçanların trigliserit seviyelerinin normal değerlere düştüğü saptandı (Şekil 4.25).



Şekil 4.25. Gen nakli sonrasında sıçanların plazma trigliserid seviyelerini gösteren grafik (İstatistiksel analiz; One Way ANOVA, $p= 0,0008$) Kontrol YYY ile beslenen gen nakli yapılmamış denekleri temsil eder.

Trigliserid seviyeleri ile birlikte kolesterol seviyeleri de, Cholesterol/Cholesteryl Ester Assay Kit (abcam, cat # ab65359) ile belirlendi. Analiz sonuçları incelendiğinde LentiGLP-1 uygulamasının diyabetik sıçanların kolesterol seviyelerine belirgin bir etkisinin olmadığı belirlendi (Şekil 4.26).



Şekil 4.26. Gen nakli sonrasında sıçanların plazma kolesterol seviyelerini gösteren grafik STZ indüklü diyabetik obez sıçanlara LentiGLP-1 enjeksiyonu (n=10/grup) plazma kolesterol seviyesini etkilemez (İstatistiksel analiz, One Way ANOVA, p=0,4567). Kontrol YYY ile beslenen gen nakli yapılmamış denekler.

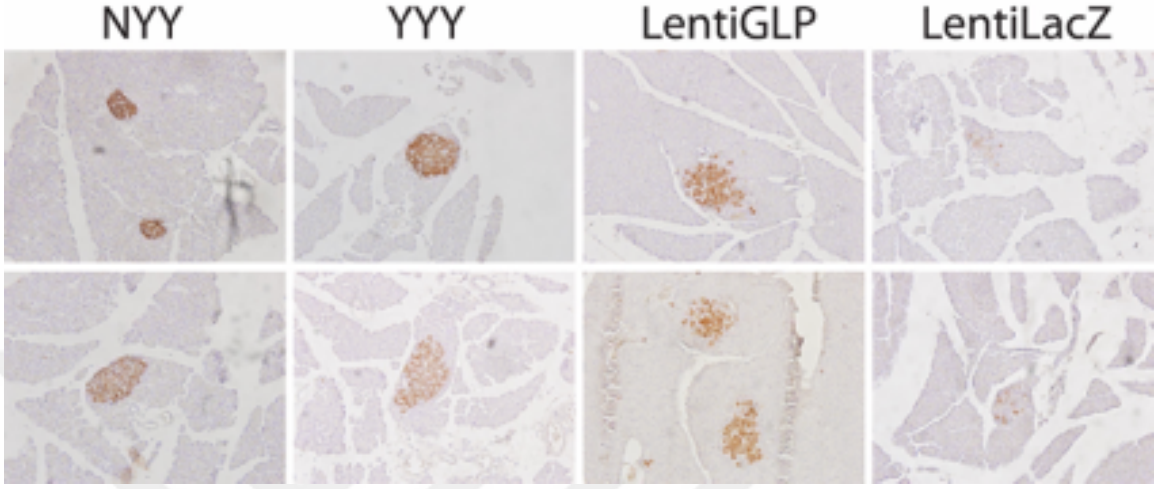
4.5 Pankreas Dokusunda yapılan Histolojik Analizler

4.5.1. Tip 2 Diyabet Modelinde oluşturulan beta hücre yıkımı ve LentiGLP-1 aktarımının beta hücre kitlesi üzerine etkisinin belirlenmesi

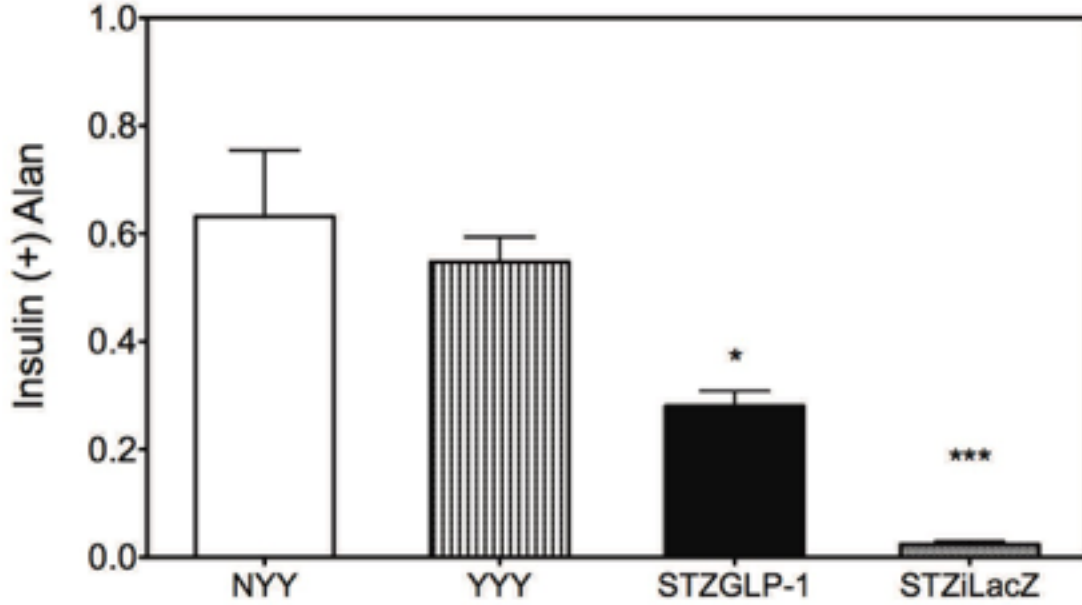
Tip2 diyabet hayvan modelinde hem oluşturulan modeldeki beta hücre kitle kaybını gösterilmesi hem de lentiviral vektör aracılı gen aktarımının pankreatik adacıklar üzerindeki etkisinin incelenmesi amacıyla SD sıçanların 4 farklı grubunda parafine gömülü pankreas kesitleri üzerinde immünohistokimyasal analizler yapıldı. Kontrol grubu sıçanlar NYY ile beslenen, obez kontrol grup olarak ayrılan sıçanlar ise YYY ile beslenen sıçan grubunu ifade etmektedir. YYY ile beslenen ve 40 mg/kg dozda STZ enjeksiyonu ile diyabetin indüklendiği sıçanlarda LentiGLP-1 ve LentiLac vektörü uygulanan iki ayrı grupta da lentiviral gen naklinin etkileri incelendi. İnsülin antikoru (Tavşan poliklonal anti-insülin antikor, Abcam ab63820) ile yapılan immünohistokimyasal boyama ile adacıklardaki insülin pozitif alanlar belirlendi.

Pankreaslarda yapılan beta hücre kitle analizleri değerlendirildiğinde, diyabet indüklenen ve terapötik gen nakli yapılmayan sıçanların beta hücre kitlesinin belirgin

oranda azaldığı saptanırken, LentiGLP-1 uygulaması alan sıçanların insülin pozitif hücre kitlesinde ciddi düzeyde artış olduğu saptandı (Şekil 4.27).



Şekil 4.27. STZ indüklü diyabetik obez sıçanlara LentiGLP-1 enjeksiyonu sonrasında beta hücre kitlesinin immünohistokimyasal analizi. Pankreatik adacıklardaki beta hücre kitlesi insüline karşı geliştirilen antikor ile yapılan immünohistokimyasal boyama ile gösterilmiştir (n=6).

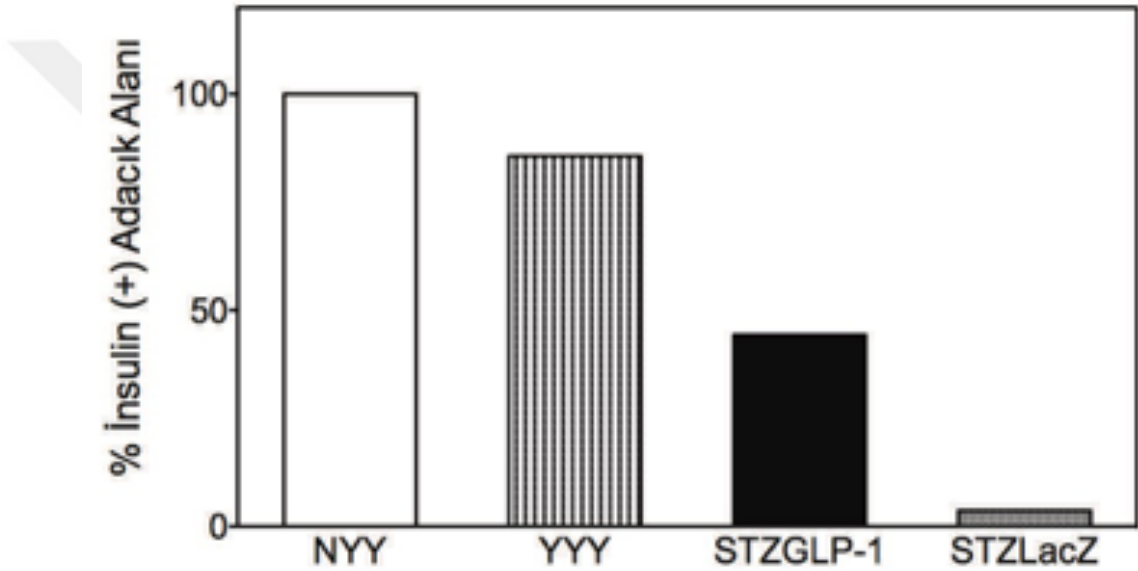


Şekil 4.28. STZ indüklü diyabetik obez sıçanlara gen nakli sonrası beta hücre alan skorları (n=6) (İstatistiksel analiz, Oneway ANOVA, p=0,005).

Beta hücre kitle analizlerinin sayısal olarak değerlendirilebilmesi için, insülin pozitif alanın doku içerisindeki yüzdesi hesaplandığında, NYY kontrol grubu ile YYY kontrol grubunun adacık yüzdesi arasında belirgin bir fark görülmezken, LentiGLP-1

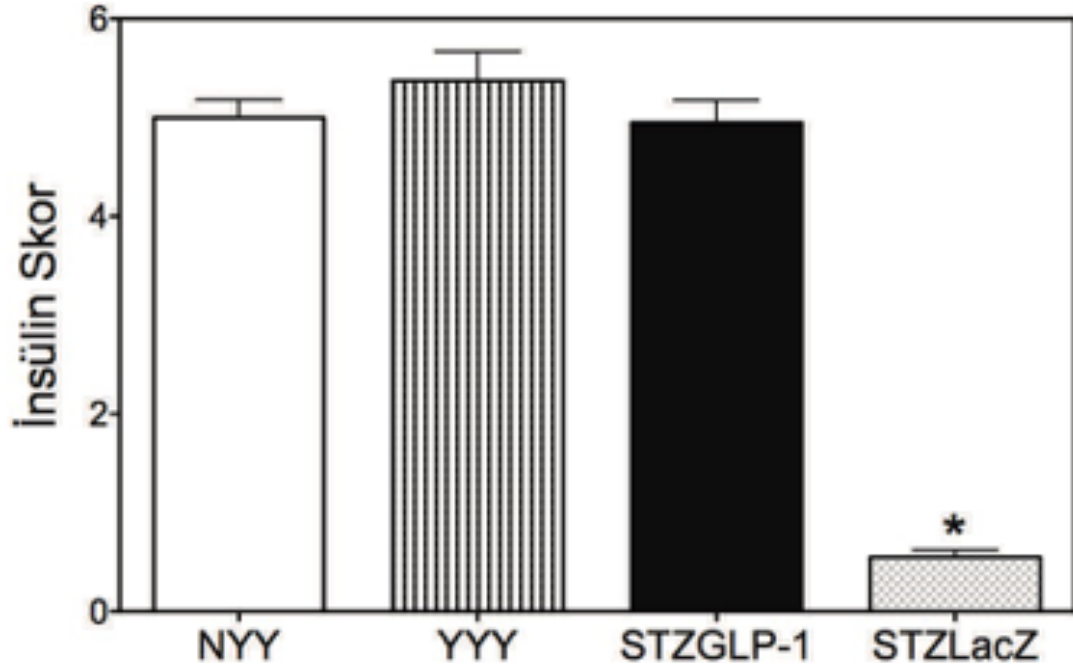
enjeksiyonu almış sıçanların LentiLacZ almış diyabetik sıçanlara oranla çok daha yüksek seviyede insülin pozitif hücre kitlesine sahip olduğu belirlendi (Şekil 4.28).

Yapılan beta hücre kitle analizlerinde NYY kontrol grubundaki sıçanların insülin pozitif alanını % 100 kabul ederek yapılan değerlendirmede, STZ enjeksiyonu almış ve LentiLacZ uygulanmış diyabet sıçanlarda %90 'ın üzerinde bir beta hücre kaybı gözlenirken, LentiGLP-1 uygulanan deneklerde adacık kaybının %50 civarında olduğu tespit edildi (Şekil 4.29).



Şekil 4.29. STZ indüklü diyabetik obez sıçanlara gen nakli sonrası beta hücre kitlesi kaybının % oranları (n=6).

İmmünohistokimyasal analizler sonucu yapılan insülin boyamanın skorlaması yapıldığında, LentiGLP-1 uygulaması almış sıçanlarda, NYY ve YYY kontrol grubuna benzer oranda insülin skoru belirlenmiş olup, LentiLacZ uygulaması almış diyabetik sıçanlarda ise beta hücre kitle kaybına bağlı olarak insülin skorunun da bariz ölçüde düştüğü saptanmıştır (Şekil 4.30).

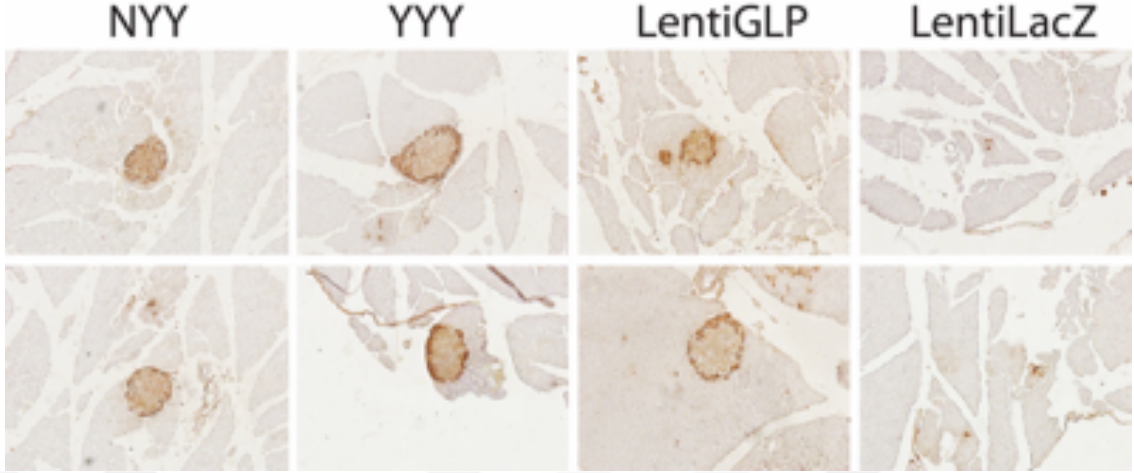


Şekil 4.30. STZ indüklü diyabetik obez sıçanlara gen nakli sonrasında pankreas beta hücresi insülin sentez skorlarındaki değişim (n=6) (İstatistiksel analiz, One way ANOVA, $p < 0,0001$).

4.5.2. GLP-1 Ligand ve Reseptör Sentez Profili

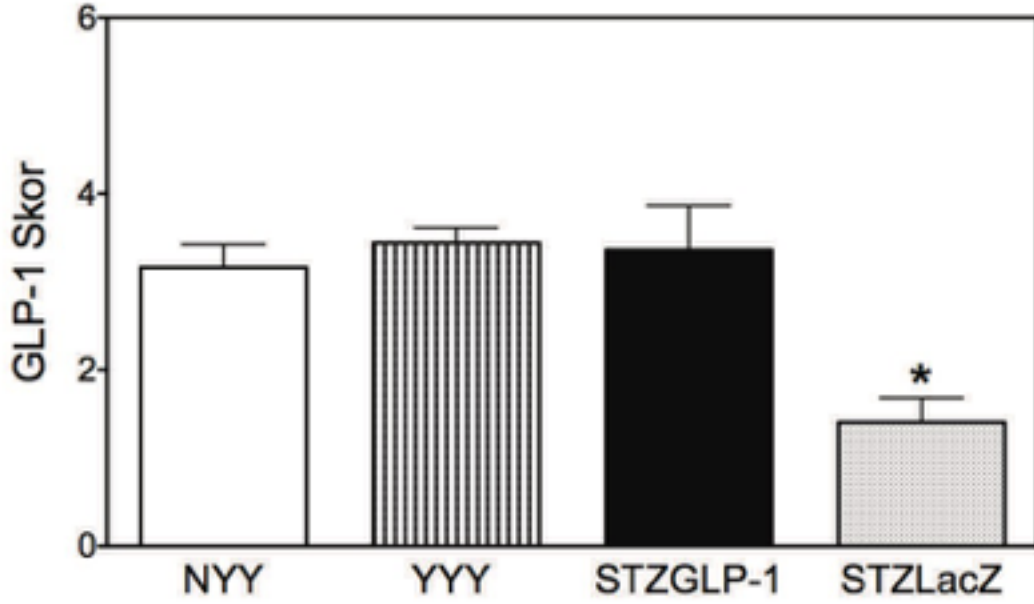
Tip 2 diyabet deney hayvan modelinde gen nakli öncesi ve sonrasında GLP-1 ligand (GLP-1) ve reseptör (GLP-1R) seviyelerindeki olası değişiklikleri belirlemek için pankreas kesitleri üzerinde immünohistokimyasal boyamalarla birlikte bu boyamaların skorlamaları yapıldı.

Sprague Dawley sıçanlarda GLP-1 ve GLP-1R saptamak için yapılan pankreatik immünohistokimyasal analizler sonucu YYY ile beslenen kontrol hayvanların adacıklarında NYY ile beslenen kontrol grubuna göre istatistiksel olarak bir fark gözlemlenmedi. Buna karşın LentiLacZ almış diyabet hayvanlarda yapılan analizler; pankreatik GLP-1 ekspresyonunun NYY ve YYY kontrol sıçanlara göre azaldığını ortaya koymuştur ($p < 0,0001$). STZ indüklü diyabet sonrası LentiGLP-1 uygulaması almış olan sıçanlarda ise GLP-1 ekspresyonunun NYY veya YYY kontrol sıçanlara oranla benzer değerlerde olduğu belirlendi (Şekil 4.31).



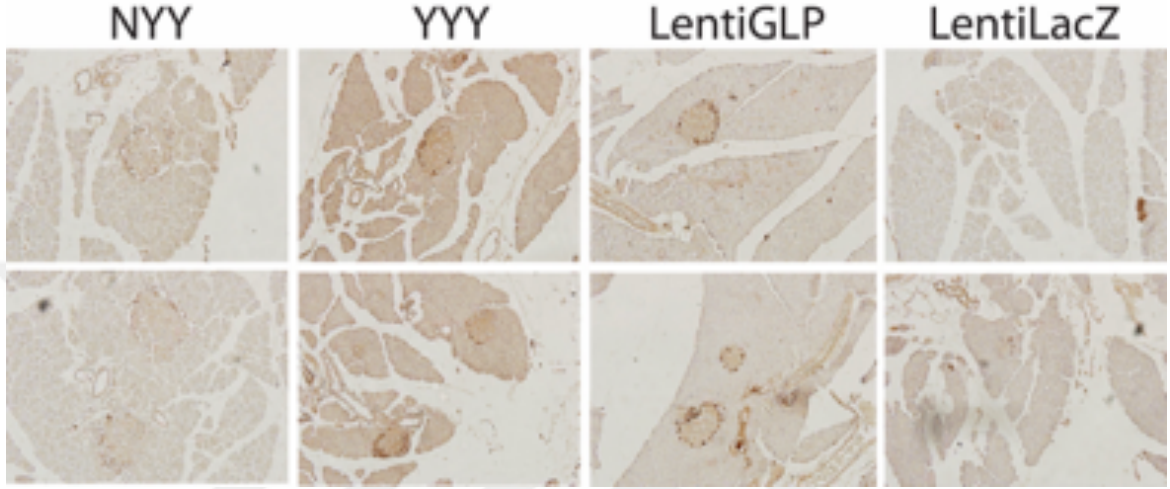
Şekil 4.31. STZ indüklü diyabetik obez sıçanlara gen nakli sonrasında pankreas beta hücresi GLP-1 sentez oranları (n=6/grup). Analizlerde antikorunun çapraz-reaksiyon gösterdiği glukagon sentezleyen alfa hücreleri değerlendirmeye alınmamıştır.

GLP-1 boyama sonrası yapılan skorlama sonucunda da, diyabet gelişimiyle azalan GLP-1 sentez miktarının, GLP-1 gen nakli ile kontrol deneklerin seviyelerine çıkartılabildiği saptandı (Şekil 4.32).



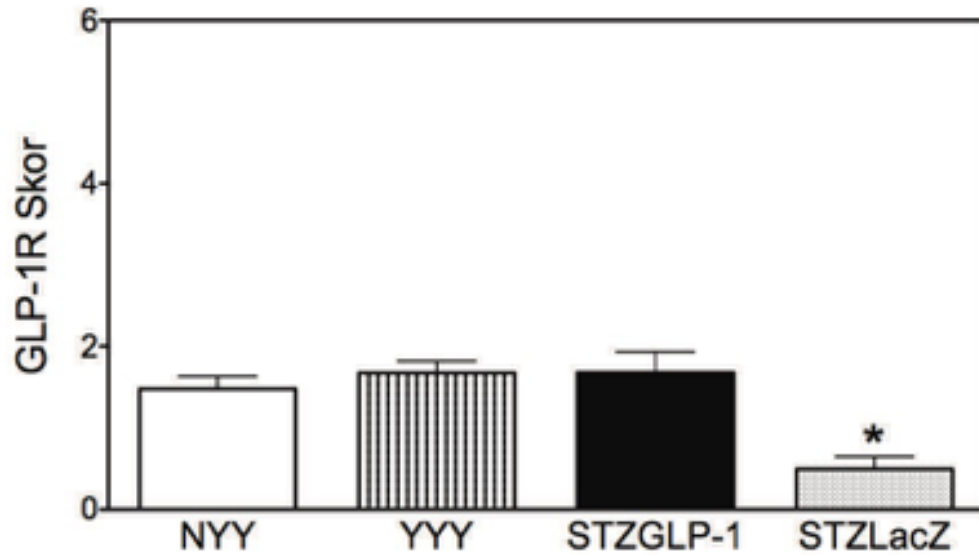
Şekil 4.32. STZ indüklü diyabetik obez sıçanlara gen nakli sonrasında pankreas beta hücresi GLP-1 sentez skorlarındaki değişim (n=6/grup) (İstatistiksel analiz, One way ANOVA, p<0,0001).

GLP-1 ligand sentezinin belirlenmesinin yanısıra GLP-1 reseptör profilleri incelendiğinde, GLP-1 ligandı kadar belirgin düzeyde bir ekspresyon gözlenmemiştir (Şekil 4.33).



Şekil 4.33. STZ indüklü diyabetik obez sıçanlara gen nakli sonrasında pankreas beta hücresi GLP-1 reseptörü (GLP-1R) sentez profili (n=6/grup).

Bununla birlikte, immünohistokimya analizleri sonucu skora yapıldığında, LentiLacZ almış diyabetik sıçanların GLP-1R seviyelerinde adacık kaybına bağlı olarak bariz bir azalma olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.34).



Şekil 4.34. STZ indüklü diyabetik obez sıçanlara gen nakli sonrasında pankreas beta hücresi GLP-1R adacık ekspresyon skorası (İstatistiksel analiz, One way ANOVA, $p < 0,0001$).

Histolojik analizler sonucunda GLP-1 reseptör ve ligand profillerinin değerlendirilmesiyle elde edilen bulgular, LentiLacZ enjekte edilmiş diyabetik sıçanlarda, GLP-1 ve GLP-1R seviyelerinde, adacık kaybına bağlı olarak hiperglisemi ile korelasyon gösteren bir azalma olduğunu gösterdi. Terapötik gen nakli yapılan diyabetik sıçanlarda ise normogliseminin sağlanmasıyla birlikte adacıklardaki GLP-1 ve GLP-1R sentezinin de restore edildiği bulguları.

4.5.3. GLP-1 gen nakli sonrası abdominal dokularda genoma entegre kopya sayıları ve GLP-1 profili

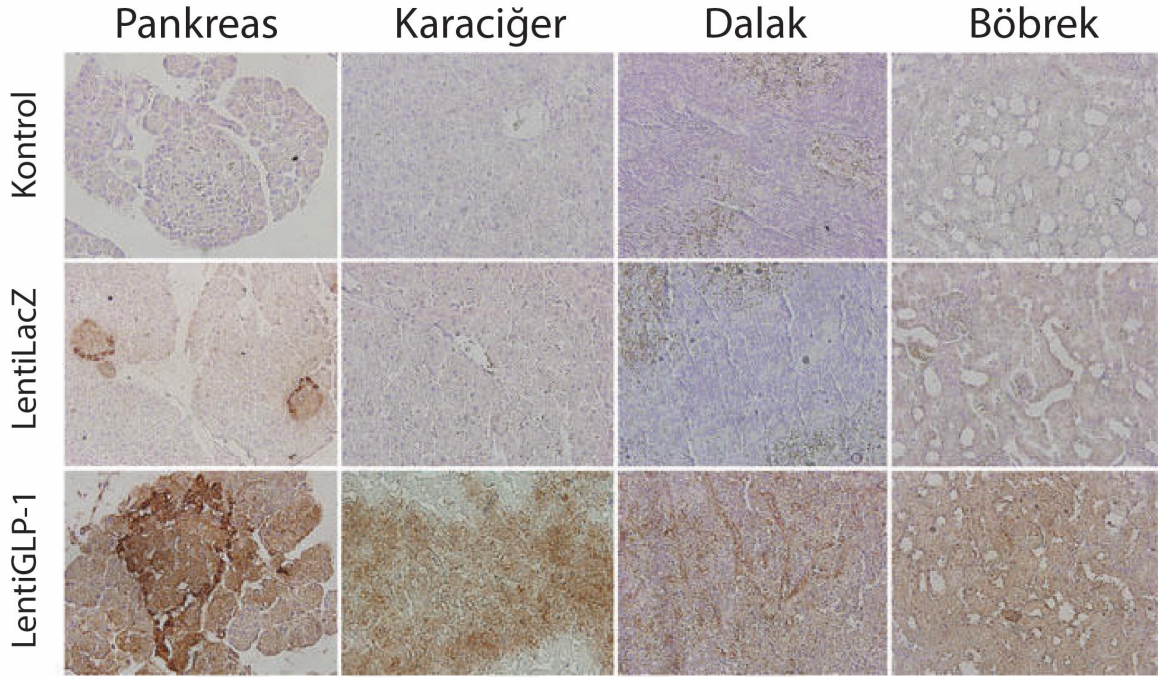
Majör antidiyabetik özellikleri olan GLP-1'in intraperitoneal yolla enjeksiyonunu takiben, LentiLacZ ve LentiGLP-1 vektörlerinin dokulara dağılım profillerinin birbirine benzer oranlarda abdominal dokulara dağıldığı genoma entegre kopya sayıları ile belirlendi (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. Lentiviral vektörlerin intraabdominal doku dağılım profilleri (n=9/grup).

<i>Doku</i>	<i>LentiLac</i>	<i>LentiGLP-1</i>
Pankreas	1.966 ± 0.832	3.231 ± 1.272
Karaciğer	13.522 ± 3.598	18.321 ± 6.455
Dalak	8.257 ± 3.0592	8.817 ± 4.749
Böbrek	44.85 ± 5.171	27.63 ± 6.746

* Veriler grupların ortalama ± SEM değerlerini ifade etmektedir.

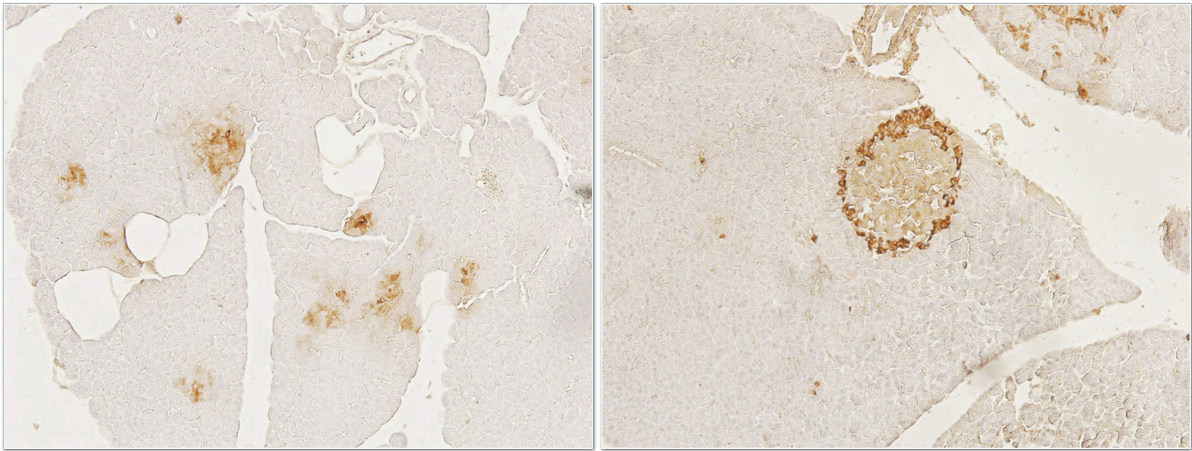
Genoma entegre kopya sayıları ile orantılı olarak GLP-1 uygulaması alan sıçanların dokularında GLP-1 antikoru ile yapılan immünohistokimyasal analizler doğrultusunda da, kandaki GLP-1 miktar artışı ile korale olacak şekilde dokularda belirgin oranda GLP-1 ekspresyonunun varlığı gösterildi (Şekil 4.35).



Şekil 4.35. GLP-1 gen nakli yapılmış sıçanların abdominal organlarının doku kesitlerinde GLP-1 profili.

4.5.4 GLP-1 gen nakli sonrası pankreas dokusunda görülen insülin Pozitif hücrelerin detaylı analizi

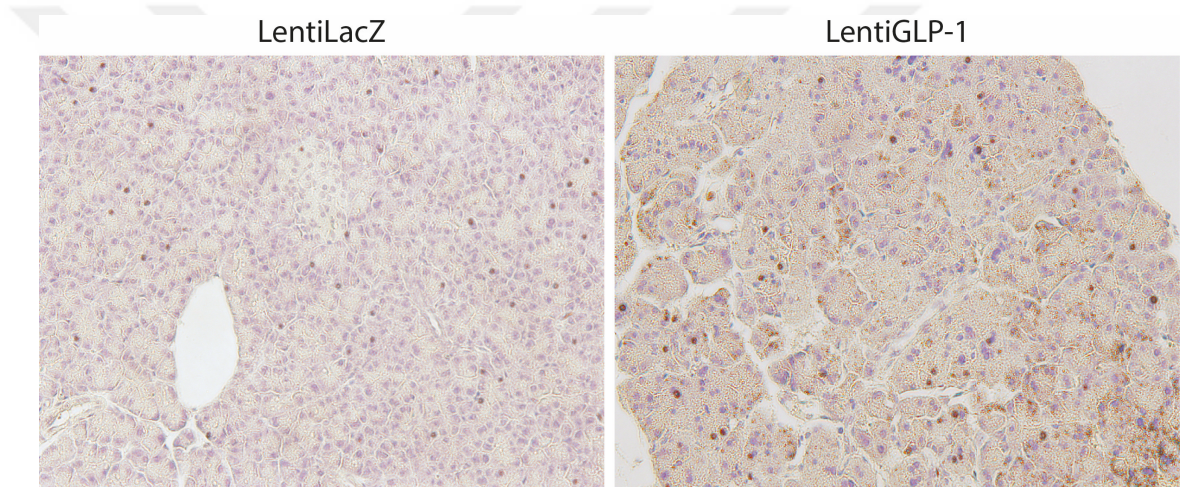
LentiGLP-1 gen naklinin insülin direncini kıran, glukoz toleransını geliştiren, hiperglisemiye iyileştiren ve beta hücre kitlesini arttıran terapötik etkileri ile birlikte, yapılan immünohistokimyasal analizlerde pankreas dokusunda adacık olmayan 2-8 hücreden oluşan insülin pozitif hücreler belirlendi (Şekil 4.36).



Şekil 4.36. GLP-1 gen nakli yapılmış sıçanların pankreatik doku kesitlerinde gözlenen insülin pozitif hücre kümeleri.

Pankreatik dokuda belirlenen insülin pozitif hücre kümelerinin orijininin belirlenmesi amacıyla ileri immünohistokimyasal ve immünoflorasan analizler gerçekleştirildi.

GLP-1'in pankreatik beta hücreleri üzerinde proliferatif etkileri olduğu bilindiğinden öncelikle Ki67 antikoru ile immünohistokimyasal boyamalar gerçekleştirildi. Yapılan analiz doğrultusunda GLP-1 gen nakli almış sıçanların pankreas dokularında, LentiLac kontrol vektörü almış sıçanlara oranla belirgin düzeyde proliferasyon artışı olduğu saptandı (Şekil 4.37).

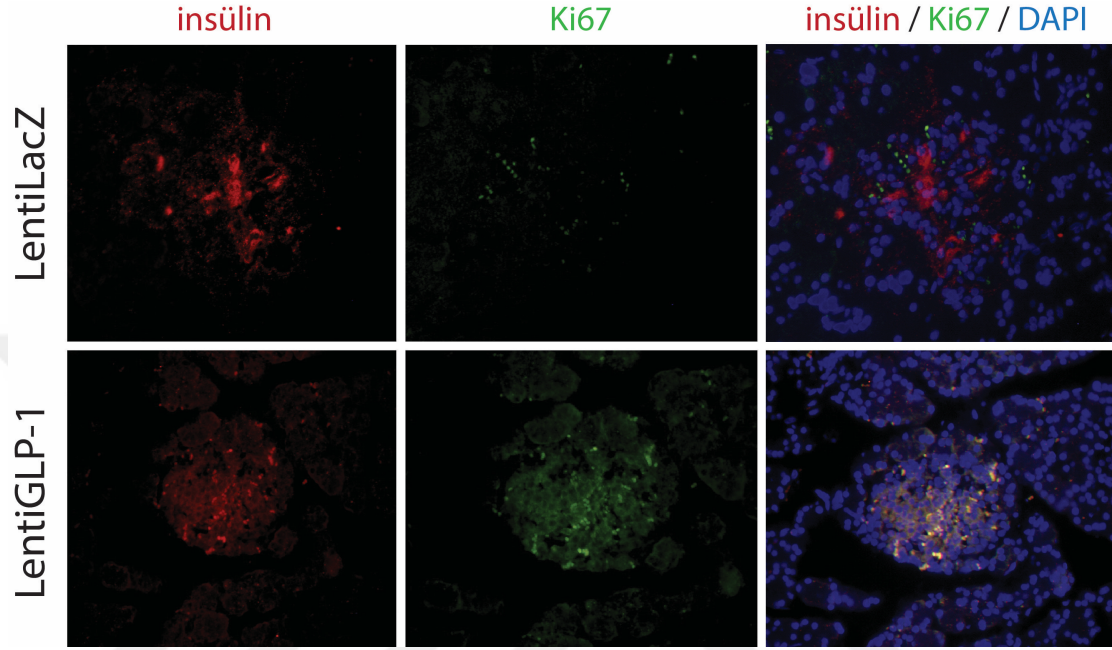


Şekil 4.37. Terapötik grup ve diyabetik gruplarda Ki67 proliferasyon belirteci ile yapılan immünohistokimyasal analiz sonuçları.

İmmünohistokimyasal analiz sonucunda proliferen hücrelerin insülin pozitif olup olmadığının belirlenmesi amacıyla yapılan immünoflorasan analizleri doğrultusunda, diyabetik sıçanların pankreas dokusunda az miktarda da olsa proliferen hücrelerin insülin (kırmızı) salgılamadığı belirlendi. Buna karşın, GLP-1 gen nakli alan sıçanlarda, insülin sentezleyen hücrelerde proliferasyon artışına dair bulgular elde edildi (Şekil 4.38).

İnsülin pozitif hücrelerin proliferasyon belirteci ile birlikte (sarı) sinyal vermesinin yanı sıra, asiner doku arasında da sarı sinyallerin varlığı, asiner doku içerisinde bulunan potansiyel hücrelerin insülin pozitif hücrelere dönüştüğü belirlendi. Dolayısıyla elde edilen sonuçlar doğrultusunda GLP-1'in lentiviral vektörler aracılı gen nakli ile

pankreatik dokularda insülin pozitif hücrelerin proliferasyonunu indükleyerek beta hücre geri kazanımında rol oynadığı tespit edildi.



Şekil 4.38. GLP-1 gen nakli uygulaması alan ve almayan sıçanlarda pankreas dokularında insülin ve Ki67 antikorları ile yapılan immüno Floresan analiz sonucu. İnsülin (kırmızı), Ki67 (yeşil). Terapötik grupta iki sinyalin aynı hücrede görülmesi ile sarı ışımaya gözlenmiştir.

Tüm bu bulgular doğrultusunda, doğal GLP-1 geninin sentetik DNA formundan yola çıkılarak üretilen GLP-1 kodlayan lentiviral vektörlerin in vivo uygulamasıyla hem diyabetik bulguların iyileştirildiği (H. M. Tasyurek, Altunbas, ve ark., 2018) hem de pankreatik beta hücrelerin geri kazanımına insülin pozitif hücrelerin proliferasyonu katkı sağlandığı saptandı. Bununla birlikte, farklı antikorlarla yapılacak ileri immüno Floresan analizleri sonucunda GLP-1 gen naklinin beta hücrelerin geri kazanımına başka yollar (transdiferasyon ve neogenez) üzerinden de katkı sağlayıp sağlamadığının da incelenmesi gerekmektedir. Bu amaçla bazı ön çalışmalar yapılmış olsa da, net bulguların elde edilmesi için yenidoğan sıçan modeli gibi beta hücre oluşum mekanizmalarını daha iyi aydınlatacak deney hayvan modellerinin kullanılması gerekmektedir.

5. TARTIŞMA

İnkretin etkili hormonlar, pankreatik beta hücrelerinden glukoz indüklü insülin sekresyonunu (insülinotropik etki) tetiklemek üzere intestinal mukozadan salınırlar (Vilsboll ve Holst, 2004). Dolayısıyla, inkretin hormonlar periferal dokulara glukoz transferine yardımcı olarak postprandiyal glukoz seviyelerinin belirli düzeylerde tutulmasında önemli rol oynarlar (S. Russell, 2013).

GLP-1, glukoz homeostazisinin düzenlenmesinde görev alan iki önemli bağırsak-kökenli inkretin hormondan birisidir. GLP-1'in insülinotropik aktivitesi prelinik ve klinik çalışmalarla kanıtlanmıştır (D. Drucker ve ark., 1987a; Kreymann ve ark., 1987). Öğünlerden sonra, GLP-1 kan dolaşımına salınarak, G protein kenetli reseptör (GLP-1R) aracılığıyla, glukoz-bağımlı insülin salınımını ve pankreatik beta hücrelerinde insülin biyosentezini stimüle eder (Thorens ve ark., 1993). GLP-1 sekresyonuna neden olan etkili ajanlar karbonhidratlardır ancak proteinler ve yağlar da GLP-1 sekresyonuna katkı sağlarlar (Gribble, 2012; Tolhurst ve ark., 2012). İnsülinotropik faaliyetin dışında, GLP-1 glukagon salınımını baskılar ve yaşa bağlı gelişen glukoz intoleransında iyileştirici etki gösterir (Y. Wang ve ark., 1997). Buna ek olarak, GLP-1 hücre farklılaşmasına (Abraham ve ark., 2002) ve beta hücre kitlesinde artışa (C Tourrel ve ark., 2002) yol açan mitojenik etkilere sahiptir. Gastrointestinal hareketliliğin azalması ve merkezi sinir sistemi üzerinden etki göstererek iştah ve gıda alımının azalmasına bağlı olarak ağırlık kaybına da sebebiyet verir (Wettergren ve ark., 1993). Son olarak, miyokardial iskemi ve kalp yetmezliği hastalarında GLP-1'in faydalı etkilerinin olduğu gösterilmiştir (T. Zhao, 2013).

Tip 2 Diyabet (T2DM) hastalarında yapılan izoglisemik glukoz tolerans testleri açıkça göstermektedir ki, sağlıklı kontrol bireylere göre T2DM hastalarında inkretin etkisi %50 azalmıştır (Knop ve ark., 2007). Dolayısıyla, inkretinler postprandiyal glukoz dolaşımının ana modülatörleri olduğundan, inkretin yanıtın kaybı T2DM hastalarında kesin olarak glukoz intoleransına yol açmaktadır. İlginç bir şekilde, T2DM hastalarında, postprandiyal GIP sekresyonu değişmezken, öğün sonrası oluşan GLP-1 yanıtı, oldukça azalmıştır (Toft-Nielsen ve ark., 2001). Ek olarak, T2DM hastalarında GIP uygulaması

ile inkretin yanıt alınamazken GLP-1'in insülinotropik etkisi muhafaza edimiştir (MA Nauck ve ark., 1993). T2DM hastalarında, azalmış beta hücre yanıtı GLP-1 infüzyonu ile geri kazanılabildiğinden (Kjems ve ark., 2003) GLP-1, T2DM tedavisi için terapötik bir ajan olarak değerlendirilmektedir. GLP-1 hipoglisemiye neden olmaksızın, etkin bir şekilde glukoz indüklü insülin salınımını uyarır (Vilsboll ve ark., 2001). Ancak, GLP-1 yaygın bir serin proteaz olan Dipeptidil Peptidaz-4 (DPP-4) ile hızla kesime uğradığından, biyolojik yarı ömrü oldukça kısadır (2-3 dakika). Bu özellik, sık sık injeksiyon gerektirmesi veya daha fazla miktarlarda kullanılması gerekliliğinden dolayı, GLP-1'in terapötik kullanımını sınırlandırmaktadır (T. Kieffer ve Habener, 1999a). Biyolojik ömrü kısa olan GLP-1'in bu özelliğini telafi etmek amacıyla, biyolojik olarak aktif GLP-1 üretiminin ve sekresyonunun sağlanması için viral ve viral olmayan gen aktarım teknolojileri geliştirilmiştir (Rowzee ve ark., 2011).

Denenen gen nakil metodları arasında viral ve viral olmayan gen nakil denemeleri yer almaktadır (M. H. Tasyurek, Altunbas, Canatan, ve ark., 2014). Bilindiği gibi plasmid 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 hemde kargo 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).

Bu doğrultuda, yapılan çalışmada diyabetik sıçanlara GLP-1'in doğal formu ile yapılacak gen nakli için, furin kesim bölgesi ve insülin sinyal peptid sekansları eklenerek tasarlanan dizi, TOPO-D teknolojisi kullanılarak giriş vektörlerine klonlandıktan sonra, Veziküler Stomatit Virusü G glikoproteini (VSV-G) psödoplekslenmiş 3. Nesil SIN vektörler, ViraPower HiPerform Promotorsuz Gateway Ekspresyon Sistemi (Invitrogen) ile oluşturuldu. Bir seri klonlama reaksiyonları, restriksiyon enzim kesimleri, DNA dizi analizleri, mini-midi-maksi ve mega prep aşamalarından sonra 293T hücrelerine 4 farklı plazmidin geçici transfeksiyonunu içeren bir yöntemle, döner hücre kültürü şişelerinde lentiviral vektörler üretildi. Fiziksel partikül ve fonksiyonel titre belirleme aşamalarından sonra bir döner hücre kültürü

şişesinde yapılan üretimden 10^{11} TU/ml konsantrasyonda lentiviral partikül elde edildiği belirlendi. HT1080 hücre hattında yapılan ELİSA deneyi ile LentiGLP-1 vektöründen GLP-1 sentezi olduğu gösterildi. LentiGLP-1 vektörünün fonksiyonel özellikleri Min6 pankreatik beta hücre hattında (Prof. Dr. Jun-ichi Miyazaki'nin hediyesi, Japonya) cAMP üretim ve glukoz indüklü insülin salınım testleriyle belirlendi. Transdükte MIN6 hücrelerinde cAMP üretim miktarının ve glukoz indüklü insülin salınımının artması LentiGLP-1 vektörünün beta hücreleri üzerinde de fonksiyonel olduğunu gösterdi. Ayrıca LentiGLP-1 uygulamasının pankreatik beta hücrelerinde insülin sentezini de arttırdığı tespit edildi.

GLP-1 gen aktarımı ile ilgili deneysel gen terapi çalışmalarının çoğu, ob/ob, db/db ve Zucker diyabetik sıçanlar gibi, genetik olarak modifiye edilmiş kemirgen obezite modellerinde gerçekleştirilmiştir (Oh ve ark., 2003; Kumar ve ark., 2007; YS Lee ve ark., 2007; Parsons ve ark., 2007). Bu modeller, iştahı (leptin (ob/ob) veya leptin reseptörleri (db/db, Zucker diyabetik fa/fa sıçanlar)) etkileyen genlerde mutasyonlar taşıdığından, genetik olarak modifiye edilmiş diyabet hayvan modellerinin kullanımı, metabolik değişimler ile ilgili uzun dönemli çalışmalar için ideal olmayabilir (Williams ve ark., 2006). İnsan hastalıkları için en uygun deneysel hayvan modeli, ilgilenilen insan hastalığının patofizyolojisini en iyi şekilde taklit edebilecek olan modeldir. Ek olarak, model standardizasyonu, sürekliliği, maliyeti, klinik faydaları ve geniş çapta araştırmacıların erişimi gibi faktörler, karar aşamasını etkileyen faktörlerdir. İnsanlarda T2DM, genler ve çevre ile etkileşim sonucu ortaya çıkan bir hastalık olduğundan, DIO ile birlikte düşük doz STZ enjeksiyonu uygulaması (beta hücre kaybını ve hiperglisemiye indüklemek için) ile oluşturulan model, hastalığın gerçek sürecini en iyi taklit eden model gibi görünmektedir. Diyet indüklü obez (DIO) deney hayvan modelinde ya C57BL/6J fareler yada Sprague Dawley (SD) sıçanlar tercih edilmektedir. Bu denekler YYY diyeti tükettiklerinde obez fenotipi geliştirirken, standart yağ diyeti (NYY) ise onların normal kalmalarını sağlar. YYY diyetiyle beslenen deneklerde insülin dirençliliği, glukoz tolerans bozukluğu, hiperglisemi, dislipidemi ve hipertansiyon gözlemlenir. Tüm bunlar zamanla adacık fonksiyon bozukluğuna yol açar. Diyet indüklü insülin dirençliliği düşük doz Streptozotosin (STZ) uygulamasıyla birleştirildiğinde insanlarda görülen T2DM modeline en yakın deney hayvan modeli oluşturulmuş olur.

Yapılan çalışmada, SD sıçanların 2 ay kadar kısa bir süre dahi YYY ile beslenmeleri NYY ile beslenen deneklere oranla ağırlık kazancı ve yağlanma düzeyi açısından yeterli bulundu. Çalışmanın temel amacı GLP geninin gen nakil vektörlerine aktararak terapötik etkinliğinin T2DM deney hayvan modellerinde test edilerek pankreatik beta hücreleri üzerindeki etkilerinin incelenmesidir. Bu amaç doğrultusunda, obez diyabetik SD modeli oluşturulduktan sonra yapılan gen nakillerinde LentiLacZ vektöründen ziyade LentiGLP-1 enjeksiyonunun diyabetik deneklerin kan şekerini düşürdüğünü tespit edildi. Uzun süreli yapılan takiplerde (5 ay) normogliseminin takip süresi boyunca devam ettiği gösterildi. Diyabetik deneklerde yapılan insülin duyarlılık ve glukoz tolerans testlerinde, GLP-1 gen nakli sonrasında diyabet gelişimiyle karakterize parametrelerden, insülin direncinin kırıldığı ve glukoz toleransının indüklendiği tespit edildi. Takip süresi sonunda sakrifiye edilen sıçanların kan örneklerinde yapılan GLP-1 ELISA analizi sonucunda bu gelişmelerin, kan serumunda 3 kat artan GLP-1 miktarıyla korale olduğu gözlemlendi. Aynı zamanda intraperitoneal yolla sıçanlara enjekte edilen LentiGLP-1 vektörünün abdominal organlardaki doku dağılımları genoma entegre kopya sayılarıyla belirlendi. Bu dokularda yapılan immünohistokimyasal analizler ile de, vektörün entegre olduğu dokularda terapötik gen nakli ile GLP-1 peptidinin eksprese edilerek kan dolaşımına salındığı doğrulandı.

Tip 2 diyabet hastalarının %80'inde, metabolik sendromun da belirteçlerinden biri olarak bilinen bir dislipidemik özellik olan yüksek trigliserit seviyeleri gözlenmektedir. Bu doğrultuda, deneklerin lipit profilleri değerlendirildiğinde terapötik gen nakli yapılan grupta (GLP-1) obez deneklerin serum trigliserid miktarlarında da bariz bir düşüş belirlenirken kolesterol seviyelerinde herhangi bir değişiklik saptanmadı. Kolesterol açısından Tip 2 diyabet incelendiğinde LDL kolesterolün kontrol altına alınması gerektiği bilinmektedir. Hastalık seyrinde HDL değeri azalırken LDL değeri artmaktadır. Araştırma kapsamında yapılan analizde kullanılan kit kandaki toplam kolesterole yönelik olduğundan terapötik grupta bu değerlerde anlamlı bir farklılık saptanmamış olması beklenen bir durumdur. GLP-1 gen naklinin kolesterol açısından iyileştirici etkisinin ileri biyokimyasal tetkiklerle belirlenmesi gerekmektedir.

Obez diyabetik hayvanlarda gen nakli sonrasında yapılan immunohistokimyasal analizlerde LentiGLP-1 verilmiş deneklerde pankreas adacık kitlesinin (insülin pozitif adacık alanı ve insülin boyama açısından) LentiLacZ almış gruba oranla bariz ölçüde arttığı saptandı. Tip 2 diyabet, pankreatik beta hücrelerinin büyük oranda fonksiyon kaybını takiben kitle kaybıyla seyreden ve hastalığın ileri aşamalarında hipergliseminin şiddetlendiği bir hastalıktır. Bu açıdan değerlendirildiğinde yapılan çalışmada, beta hücre kitlesinin geri kazanımına yönelik bu iyileştirici etkinin GLP-1 gen nakliyle başarılabilirdiği gösterildi.

Lentiviral GLP-1 gen nakli ile diyabet bulgularının iyileştirildiği ve adacık kitlesinin arttırıldığı gözlenirken yapılan immünohistokimyasal analizlerde adacık olamayacak kadar küçük insülin pozitif alanlara rastlanması doğrultusunda bu hücrelerin detaylı analizleri ile beta hücre geri kazanım mekanizmasını aydınlatmaya yönelik olarak Ki67 proliferasyon belirteci ile yapılan immünohistokimyasal analizlerde LentiGLP-1 uygulaması almış sıçanlarda belirgin oranda proliferasyon artışı saptandı. Prolifere olan hücrelerin hangi tür hücreler olduğunu saptamak üzere yapılan immünofloresan analizlerinde, GLP-1 gen nakli yapılan sıçanlarda insülin ile Ki67'nin kolokalizasyonu gözlemlendi. Dolayısıyla GLP-1 gen naklinin pankreasta insülin üreten hücrelerin proliferasyonunu indüklediğine yönelik bulgular elde edildi.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Başlangıçta pankreasa direkt olarak etkin bir biçimde gen transferi yapılması konusunda karşılaşılan teknik zorluklar, GLP-1 aracılı in vivo gen transfer çalışmalarının başarısını oldukça sınırlamıştır. Son zamanlarda gen aktarımı için farklı tekniklerden ve çeşitli gen transfer vektörlerinden faydalanmaya yönelik kaydedilen yeni gelişmeler sayesinde, Tip 2 Diyabet (T2DM) deney hayvan modelinde GLP-1 gen naklinin terapötik etkinliğinin daha efektif değerlendirilmesi sağlanmıştır.

Sonuç olarak, gerçekleştirilen çalışma ile doğal GLP-1 taşıyan HIV tabanlı 3. Nesil lentiviral vektörlerle diyet indüklü obez ve diyabetik deney hayvanlarına yapılan intraperitoneal gen nakli; obezite kaynaklı prediyabetik (insülin dirençliliği ve glukoz tolerans bozukluğu) ve diyabetik bulguları (hiperglisemi) düzeltirken, trigliserit düzeyinde belirgin bir iyileşme sağladı. Gerçekleştirilen gen nakliyle, uzun süreli ve stabil GLP-1 sentezi ve sekresyonu sağlanabildi. Lentiviral GLP-1 gen naklinin diyabetik hayvanlarda terapötik etki göstermesiyle, bu yöntemin GLP-1 peptid infüzyonuna veya peptidin günlük enjeksiyonuna alternatif bir yöntem olabileceği gösterildi. Bununla birlikte, lentiviral GLP-1 gen naklinin pankreasta insülin pozitif hücre kitlesini belirgin düzeyde arttırırken, insülin pozitif hücrelerin proliferasyonunu da indüklediği saptandı.

Tüm bu sonuçlar doğrultusunda, diyabetik sıçan modelinde gerçekleştirilen bu başarılı GLP-1 gen tedavisinin sonuçları umut vaat edici olsa da, en etkin GLP-1 gen transfer tekniği halen geliştirilme aşamasındadır. Ayrıca elde edilen bu terapötik bulguların klinik çalışmalara geçişini hızlandırmak için bu yöntemin daha büyük diyabetik hayvan modellerinde (kediler, köpekler, domuzlar ve primatlar) denenmesi gerektiğinin altını çizmek gerekmektedir. GLP-1 gen naklinin pankreasta insülin üreten hücrelerin oluşma mekanizmalarına farklı yönleriyle katkı sağladığı düşünüldüğünden, bu bağlamda özellikle yenidoğan diyabetik sıçan modellerinde yapılacak pankreatik beta hücre oluşum mekanizmalarının aydınlatılmasına yönelik çalışmalar büyük önem taşımaktadır.

KAYNAKLAR

Abraham, E., Leech, C., Lin, J., Zulewski, H., & Habener, J. Insülinotropic hormone glucagon-like peptide-1 differentiation of human pancreatic islet-derived progenitor cells into insülin-producing cells. *Endocrinology*. 2002; 143 (8): 3152-3161.

Ahlgren, U., Pfaff, S. L., Jessell, T. M., Edlund, T., & Edlund, H. Independent requirement for *Isl1* in formation of pancreatic mesenchyme and islet cells. *Nature*. 1997; 385 (6613): 257-260.

Ahren, B. Islet G protein-coupled receptors as potential targets for treatment of type 2 diabetes. *Nat Rev Drug Discov*. 2009; 8 (5): 369-385.

Ang, S. L., Wierda, A., Wong, D., Stevens, K. A., Cascio, S., Rossant, J., & Zaret, K. S. The formation and maintenance of the definitive endoderm lineage in the mouse: Involvement of *hnf3*/forkhead proteins. *Development*. 1993; 119 (4): 1301-1315.

Atkinson, M. A., & Rhodes, C. J. Pancreatic regeneration in type 1 diabetes: Dreams on a deserted islet? *Diabetologia*. 2005; 48 (11): 2200-2202.

Aye, T., Toschi, E., Sharma, A., Sgroi, D., & Bonner-Weir, S. Identification of markers for newly formed beta-cells in the perinatal period: A time of recognized beta-cell immaturity. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*. 2010; 58 (4): 369-376.

Baggio, L., Kieffer, T. J., & Drucker, D. J. Glucagon-like peptide-1, but not glucose-dependent insülinotropic peptide, regulates fasting glycemia and nonenteral glucose clearance in mice. *Endocrinology*. 2000; 141 (10): 3703-3709.

Baggio, L. L., & Drucker, D. J. Therapeutic approaches to preserve islet mass in type 2 diabetes. *Annual review of medicine*. 2006; 57: 265-281.

Ban, K., Noyan-Ashraf, M. H., Hoefler, J., Bolz, S. S., Drucker, D. J., & Husain, M. Cardioprotective and vasodilatory actions of glucagon-like peptide 1 receptor are

mediated through both glucagon-like peptide 1 receptor-dependent and -independent pathways. *Circulation*. 2008; 117 (18): 2340-2350.

Bell, G. I., Santerre, R. F., & Mullenbach, G. T. Hamster proglucagon contains the sequence of glucagon and two related peptides. *Nature*. 1983; 302 (5910): 716-718.

Betsholtz, C., Christmansson, L., Engstrom, U., Rorsman, F., Svensson, V., Johnson, K. H., & Westermark, P. Sequence divergence in a specific region of islet amyloid polypeptide (iapp) explains differences in islet amyloid formation between species. *FEBS letters*. 1989; 251 (1-2): 261-264.

Bonner-Weir, S. Perspective: Postnatal pancreatic beta cell growth. *Endocrinology*. 2000; 141 (6): 1926-1929.

Bonner-Weir, S., Baxter, L. A., Schuppin, G. T., & Smith, F. E. A second pathway for regeneration of adult exocrine and endocrine pancreas. A possible recapitulation of embryonic development. *Diabetes*. 1993; 42 (12): 1715-1720.

Bonner-Weir, S., Taneja, M., Weir, G. C., Tatarkiewicz, K., Song, K. H., Sharma, A., & O'Neil, J. J. In vitro cultivation of human islets from expanded ductal tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000; 97 (14): 7999-8004.

Bonner-Weir, S., & Weir, G. C. New sources of pancreatic beta-cells. *Nat Biotechnol*. 2005; 23 (7): 857-861.

Bouwens, L. Transdifferentiation versus stem cell hypothesis for the regeneration of islet beta-cells in the pancreas. *Microscopy research and technique*. 1998; 43 (4): 332-336.

Bouwens, L., Wang, R. N., De Blay, E., Pipeleers, D. G., & Kloppel, G. Cytokeratins as markers of ductal cell differentiation and islet neogenesis in the neonatal rat pancreas. *Diabetes*. 1994; 43 (11): 1279-1283.

Buteau, J. Glp-1 receptor signaling: Effects on pancreatic beta-cell proliferation and survival. *Diabetes Metab*. 2008; 34 Suppl 2: S73-77.

Buteau, J., Spatz, M. L., & Accili, D. Transcription factor foxo1 mediates glucagon-like peptide-1 effects on pancreatic beta-cell mass. *Diabetes*. 2006; 55 (5): 1190-1196.

Choi, S., Oh, S., Lee, M., & Kim, S. W. Glucagon-like peptide-1 plasmid construction and delivery for the treatment of type 2 diabetes. *Mol Ther*. 2005; 12 (5): 885-891.

Choi, S. a. L., HC. Long-term, antidiabetogenic effects of glp-1 gene therapy using a double-stranded, adeno-associated viral vector. *Gene Therapy*. 2011; 18: 155-163.

Copreni, E., Palmieri, L., Castellani, S., & Conese, M. A vsv-g pseudotyped last generation lentiviral vector mediates high level and persistent gene transfer in models of airway epithelium in vitro and in vivo. *Viruses*. 2010; 2 (8): 1577-1588.

Cornelius, J. G., Tchernev, V., Kao, K. J., & Peck, A. B. In vitro-generation of islets in long-term cultures of pluripotent stem cells from adult mouse pancreas. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme*. 1997; 29 (6): 271-277.

D'Alessio, D. A., Vogel, R., Prigeon, R., Laschansky, E., Koerker, D., Eng, J., & Ensnick, J. W. Elimination of the action of glucagon-like peptide 1 causes an impairment of glucose tolerance after nutrient ingestion by healthy baboons. *J Clin Invest*. 1996; 97 (1): 133-138.

Dahlquist, G., Blom, L., Holmgren, G., Hagglof, B., Larsson, Y., Sterky, G., & Wall, S. The epidemiology of diabetes in swedish children 0-14 years--a six-year prospective study. *Diabetologia*. 1985; 28 (11): 802-808.

Dan, M., & Chantler, J. K. A genetically engineered attenuated coxsackievirus b3 strain protects mice against lethal infection. *J Virol*. 2005; 79 (14): 9285-9295.

Dan, M., & Chantler, J. K. A novel pancreatropic coxsackievirus vector expressing glucagon-like peptide 1 reduces hyperglycemia in streptozotocin-treated mice. *J Virol*. 2011; 85 (23): 12759-12768.

Dash, P. R., Read, M. L., Barrett, L. B., Wolfert, M. A., & Seymour, L. W. Factors affecting blood clearance and in vivo distribution of polyelectrolyte complexes for gene delivery. *Gene Ther.* 1999; 6 (4): 643-650.

De Leon, D. D., Deng, S., Madani, R., Ahima, R. S., Drucker, D. J., & Stoffers, D. A. Role of endogenous glucagon-like peptide-1 in islet regeneration after partial pancreatectomy. *Diabetes.* 2003; 52 (2): 365-371.

Degn, K. B., Brock, B., Juhl, C. B., Djurhuus, C. B., Grubert, J., Kim, D., . . . Schmitz, O. Effect of intravenous infusion of exenatide (synthetic exendin-4) on glucose-dependent insulin secretion and counterregulation during hypoglycemia. *Diabetes.* 2004; 53 (9): 2397-2403.

Deutsch, G., Jung, J., Zheng, M., Lora, J., & Zaret, K. S. A bipotential precursor population for pancreas and liver within the embryonic endoderm. *Development.* 2001; 128 (6): 871-881.

Di Nunzio, F., Felix, T., Arhel, N. J., Nisole, S., Charneau, P., & Beignon, A. S. Hiv-derived vectors for therapy and vaccination against hiv. *Vaccine.* 2012; (in Press).

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.

Drucker, D., Philippe, J., Mojsov, S., Chick, W., & Habener, J. Glucagon-like peptide i stimulates insulin gene expression and increases cyclic amp levels in a rat islet cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987a; 84 (10): 3434-3438.

Drucker, D. J., Philippe, J., Mojsov, S., Chick, W. L., & Habener, J. F. Glucagon-like peptide i stimulates insulin gene expression and increases cyclic amp levels in a rat islet cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987b; 84 (10): 3434-3438.

Durand, S., & Cimarelli, A. The inside out of lentiviral vectors. *Viruses.* 2011; 3 (2): 132-159.

Edvell, A., & Lindstrom, P. Initiation of increased pancreatic islet growth in young normoglycemic mice (umea +/-). *Endocrinology*. 1999; 140 (2): 778-783.

Edwards, C. M., Todd, J. F., Mahmoudi, M., Wang, Z., Wang, R. M., Ghatei, M. A., & Bloom, S. R. Glucagon-like peptide 1 has a physiological role in the control of postprandial glucose in humans: Studies with the antagonist exendin 9-39. *Diabetes*. 1999; 48 (1): 86-93.

Ehnes, J. A., Casilla, V. R., Doty, T., Pospisilik, J. A., Winter, K. D., Demuth, H. U., . . . McIntosh, C. H. Glucose-dependent insülinotropic polypeptide promotes beta-(ins-1) cell survival via cyclic adenosine monophosphate-mediated caspase-3 inhibition and regulation of p38 mitogen-activated protein kinase. *Endocrinology*. 2003; 144 (10): 4433-4445.

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

Ferber, S., Halkin, A., Cohen, H., Ber, I., Einav, Y., Goldberg, I., . . . Karasik, A. Pancreatic and duodenal homeobox gene 1 induces expression of insülin genes in liver and ameliorates streptozotocin-induced hyperglycemia. *Nat Med*. 2000; 6 (5): 568-572.

Fernandes, A., King, L. C., Guz, Y., Stein, R., Wright, C. V., & Teitelman, G. Differentiation of new insülin-producing cells is induced by injury in adult pancreatic islets. *Endocrinology*. 1997; 138 (4): 1750-1762.

Follenzi, A., & Naldini, L. Hiv-based vectors. Preparation and use. *Methods Mol Med*. 2002; 69: 259-274.

Gaddy, D. F., Riedel, M. J., Bertera, S., Kieffer, T. J., & Robbins, P. D. Dsaav8-mediated gene transfer and beta-cell expression of il-4 and beta-cell growth factors are capable of reversing early-onset diabetes in nod mice. *Gene Ther*. 2012; 19 (8): 791-799.

Gaddy, D. F., Riedel, M. J., Pejawar-Gaddy, S., Kieffer, T. J., & Robbins, P. D. In vivo expression of hgf/nk1 and glp-1 from dsaav vectors enhances pancreatic ss-cell

proliferation and improves pathology in the db/db mouse model of diabetes. *Diabetes*. 2010; 59 (12): 3108-3116.

Georgia, S., & Bhushan, A. Beta cell replication is the primary mechanism for maintaining postnatal beta cell mass. *J Clin Invest*. 2004; 114 (7): 963-968.

Gerrish, K., Gannon, M., Shih, D., Henderson, E., Stoffel, M., Wright, C. V., & Stein, R. Pancreatic beta cell-specific transcription of the pdx-1 gene. The role of conserved upstream control regions and their hepatic nuclear factor 3beta sites. *J Biol Chem*. 2000; 275 (5): 3485-3492.

Gershengorn, M. C., Geras-Raaka, E., Hardikar, A. A., & Raaka, B. M. Are better islet cell precursors generated by epithelial-to-mesenchymal transition? *Cell cycle*. 2005; 4 (3): 380-382.

Gershengorn, M. C., Hardikar, A. A., Wei, C., Geras-Raaka, E., Marcus-Samuels, B., & Raaka, B. M. Epithelial-to-mesenchymal transition generates proliferative human islet precursor cells. *Science*. 2004; 306 (5705): 2261-2264.

Githens, S. The pancreatic duct cell: Proliferative capabilities, specific characteristics, metaplasia, isolation, and culture. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. 1988; 7 (4): 486-506.

Gradwohl, G., Dierich, A., LeMeur, M., & Guillemot, F. Neurogenin3 is required for the development of the four endocrine cell lineages of the pancreas. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000; 97 (4): 1607-1611.

Gribble, F. The gut endocrine system as a coordinator of postprandial nutrient homeostasis. *Proc Nutr Soc*. 2012; 71 (4): 456-462.

Gu, G., Brown, J. R., & Melton, D. A. Direct lineage tracing reveals the ontogeny of pancreatic cell fates during mouse embryogenesis. *Mech Dev*. 2003; 120 (1): 35-43.

Gu, G., Dubauskaite, J., & Melton, D. A. Direct evidence for the pancreatic lineage: Ngn3+ cells are islet progenitors and are distinct from duct progenitors. *Development*. 2002; 129 (10): 2447-2457.

Guz, Y., Montminy, M. R., Stein, R., Leonard, J., Gamer, L. W., Wright, C. V., & Teitelman, G. Expression of murine stf-1, a putative insulin gene transcription factor, in beta cells of pancreas, duodenal epithelium and pancreatic exocrine and endocrine progenitors during ontogeny. *Development*. 1995; 121 (1): 11-18.

Hayes, M. R., Bradley, L., & Grill, H. J. Endogenous hindbrain glucagon-like peptide-1 receptor activation contributes to the control of food intake by mediating gastric satiation signaling. *Endocrinology*. 2009; 150 (6): 2654-2659.

Hebrok, M. Hedgehog signaling in pancreas development. *Mech Dev*. 2003; 120 (1): 45-57.

Holst, J. J., Bersani, M., Johnsen, A. H., Kofod, H., Hartmann, B., & Orskov, C. Proglucagon processing in porcine and human pancreas. *J Biol Chem*. 1994; 269 (29): 18827-18833.

Holz, G. G. Epac: A new camp-binding protein in support of glucagon-like peptide-1 receptor-mediated signal transduction in the pancreatic beta-cell. *Diabetes*. 2004; 53 (1): 5-13.

Hui, H., Nourparvar, A., Zhao, X., & Perfetti, R. Glucagon-like peptide-1 inhibits apoptosis of insulin-secreting cells via a cyclic 5'-adenosine monophosphate-dependent protein kinase α - and a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway. *Endocrinology*. 2003; 144 (4): 1444-1455.

Hui, H., Wright, C., & Perfetti, R. Glucagon-like peptide 1 induces differentiation of islet duodenal homeobox-1-positive pancreatic ductal cells into insulin-secreting cells. *Diabetes*. 2001; 50 (4): 785-796.

Huo, L., Maeng, L., Bjorbaek, C., & Grill, H. J. Leptin and the control of food intake: Neurons in the nucleus of the solitary tract are activated by both gastric distension and leptin. *Endocrinology*. 2007; 148 (5): 2189-2197.

Imeryuz, N., Yegen, B. C., Bozkurt, A., Coskun, T., Villanueva-Penacarrillo, M. L., & Ulusoy, N. B. Glucagon-like peptide-1 inhibits gastric emptying via vagal afferent-mediated central mechanisms. *Am J Physiol*. 1997; 273 (4 Pt 1): G920-927.

Inada, A., Nienaber, C., Fonseca, S., & Bonner-Weir, S. Timing and expression pattern of carbonic anhydrase ii in pancreas. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*. 2006; 235 (6): 1571-1577.

Jacquemin, P., Lemaigre, F. P., & Rousseau, G. G. The onecut transcription factor hnf-6 (oc-1) is required for timely specification of the pancreas and acts upstream of pdx-1 in the specification cascade. *Developmental biology*. 2003; 258 (1): 105-116.

Jean, M., Alameh, M., Buschmann, M. D., & Merzouki, A. Effective and safe gene-based delivery of glp-1 using chitosan/plasmid-DNA therapeutic nanocomplexes in an animal model of type 2 diabetes. *Gene Ther*. 2011; 18 (8): 807-816.

Jean, M., Alameh, M., De Jesus, D., Thibault, M., Lavertu, M., Darras, V., . . . Merzouki, A. Chitosan-based therapeutic nanoparticles for combination gene therapy and gene silencing of in vitro cell lines relevant to type 2 diabetes. *Eur J Pharm Sci*. 2012; 45 (1-2): 138-149.

Jensen, J., Heller, R. S., Funder-Nielsen, T., Pedersen, E. E., Lindsell, C., Weinmaster, G., . . . Serup, P. Independent development of pancreatic alpha- and beta-cells from neurogenin3-expressing precursors: A role for the notch pathway in repression of premature differentiation. *Diabetes*. 2000; 49 (2): 163-176.

Jonsson, J., Carlsson, L., Edlund, T., & Edlund, H. Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice. *Nature*. 1994; 371 (6498): 606-609.

Katano, H., Kok, M. R., Cotrim, A. P., Yamano, S., Schmidt, M., Afione, S., . . . Chiorini, J. A. Enhanced transduction of mouse salivary glands with aav5-based vectors. *Gene Ther.* 2006; 13 (7): 594-601.

Kaung, H. L. Growth dynamics of pancreatic islet cell populations during fetal and neonatal development of the rat. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists.* 1994; 200 (2): 163-175.

Kawaguchi, Y., Cooper, B., Gannon, M., Ray, M., MacDonald, R. J., & Wright, C. V. The role of the transcriptional regulator ptf1a in converting intestinal to pancreatic progenitors. *Nature genetics.* 2002; 32 (1): 128-134.

Kieffer, T., & Habener, J. The glucagon-like peptides. *Endocr Rev.* 1999a; 20 (6): 876-913.

Kieffer, T. J., & Habener, J. F. The glucagon-like peptides. *Endocr Rev.* 1999b; 20 (6): 876-913.

Kim, J. G., Baggio, L. L., Bridon, D. P., Castaigne, J. P., Robitaille, M. F., Jette, L., . . . Drucker, D. J. Development and characterization of a glucagon-like peptide 1-albumin conjugate: The ability to activate the glucagon-like peptide 1 receptor in vivo. *Diabetes.* 2003; 52 (3): 751-759.

Kim, P. H., Lee, M., & Kim, S. W. Delivery of two-step transcription amplification exendin-4 plasmid system with arginine-grafted bioreducible polymer in type 2 diabetes animal model. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society.* 2012; 162 (1): 9-18.

King, A., Lock, J., Xu, G., Bonner-Weir, S., & Weir, G. C. Islet transplantation outcomes in mice are better with fresh islets and exendin-4 treatment. *Diabetologia.* 2005; 48 (10): 2074-2079.

Kjems, L., Holst, J., Volund, A., & Madsbad, S. The influence of glp-1 on glucose-stimulated insulin secretion: Effects on beta-cell sensitivity in type 2 and nondiabetic subjects. *Diabetes.* 2003; 52 (2): 380-386.

Knop, F., Vilsboll, T., Hojberg, P., Larsen, S., Madsbad, S., Volund, A., . . . Krarup, T. Reduced incretin effect in type 2 diabetes: Cause or consequence of the diabetic state? *Diabetes*. 2007; 56 (8): 1951-1959.

Kolligs, F., Fehmann, H. C., Goke, R., & Goke, B. Reduction of the incretin effect in rats by the glucagon-like peptide 1 receptor antagonist exendin (9-39) amide. *Diabetes*. 1995; 44 (1): 16-19.

Kreymann, B., Williams, G., Ghatge, M., & Bloom, S. Glucagon-like peptide-1 7-36: A physiological incretin in man. *Lancet*. 1987; 2 (8571): 1300-1304.

Kulkarni, R. N., Bruning, J. C., Winnay, J. N., Postic, C., Magnuson, M. A., & Kahn, C. R. Tissue-specific knockout of the insulin receptor in pancreatic beta cells creates an insulin secretory defect similar to that in type 2 diabetes. *Cell*. 1999; 96 (3): 329-339.

Kulkarni, R. N., Holzenberger, M., Shih, D. Q., Ozcan, U., Stoffel, M., Magnuson, M. A., & Kahn, C. R. Beta-cell-specific deletion of the igf1 receptor leads to hyperinsulinemia and glucose intolerance but does not alter beta-cell mass. *Nature genetics*. 2002; 31 (1): 111-115.

Kumar, M., Hunag, Y., Glinka, Y., Prud'homme, G., & Wang, Q. Gene therapy of diabetes using a novel glp-1/igg1-fc fusion construct normalizes glucose levels in db/db mice. *Gene Ther*. 2007; 14 (2): 162-172.

Kushner, J. A., Ciemerych, M. A., Sicinska, E., Wartschow, L. M., Teta, M., Long, S. Y., . . . White, M. F. Cyclins d2 and d1 are essential for postnatal pancreatic beta-cell growth. *Molecular and cellular biology*. 2005; 25 (9): 3752-3762.

Lechner, A., Nolan, A. L., Blacken, R. A., & Habener, J. F. Redifferentiation of insulin-secreting cells after in vitro expansion of adult human pancreatic islet tissue. *Biochemical and biophysical research communications*. 2005; 327 (2): 581-588.

Lee, Y., Kwon, M. K., Kang, E. S., Park, Y. M., Choi, S. H., Ahn, C. W., . . . Lee, H. C. Adenoviral vector-mediated glucagon-like peptide 1 gene therapy improves glucose homeostasis in Zucker diabetic fatty rats. *J Gene Med*. 2008; 10 (3): 260-268.

Lee, Y., Shin, S., Shigihara, T., Hahm, E., Liu, M., Han, J., . . . Jun, H. Glucagon-like peptide-1 gene therapy in obese diabetic mice results in long-term cure of diabetes by improving insulin sensitivity and reducing hepatic gluconeogenesis. *Diabetes*. 2007; 56 (6): 1671-1679.

Lee, Y. S., Park, M. S., Choung, J. S., Kim, S. S., Oh, H. H., Choi, C. S., . . . Jun, H. S. Glucagon-like peptide-1 inhibits adipose tissue macrophage infiltration and inflammation in an obese mouse model of diabetes. *Diabetologia*. 2012; 55 (9): 2456-2468.

Leonard, J., Peers, B., Johnson, T., Ferreri, K., Lee, S., & Montminy, M. R. Characterization of somatostatin transactivating factor-1, a novel homeobox factor that stimulates somatostatin expression in pancreatic islet cells. *Mol Endocrinol*. 1993; 7 (10): 1275-1283.

Levine, F., & Mercola, M. No pancreatic endocrine stem cells? *The New England journal of medicine*. 2004; 351 (10): 1024-1026.

Li, Y., Cao, X., Li, L. X., Brubaker, P. L., Edlund, H., & Drucker, D. J. Beta-cell pdx1 expression is essential for the glucoregulatory, proliferative, and cytoprotective actions of glucagon-like peptide-1. *Diabetes*. 2005; 54 (2): 482-491.

Lingohr, M. K., Buettner, R., & Rhodes, C. J. Pancreatic beta-cell growth and survival--a role in obesity-linked type 2 diabetes? *Trends in molecular medicine*. 2002; 8 (8): 375-384.

Linnemann, A. K., Baan, M., & Davis, D. B. Pancreatic beta-cell proliferation in obesity. *Adv Nutr*. 2014; 5 (3): 278-288.

Liu, M. J., Shin, S., Li, N., Shigihara, T., Lee, Y. S., Yoon, J. W., & Jun, H. S. Prolonged remission of diabetes by regeneration of beta cells in diabetic mice treated with recombinant adenoviral vector expressing glucagon-like peptide-1. *Mol Ther*. 2007; 15 (1): 86-93.

Lopez-Talavera, J. C., Garcia-Ocana, A., Sipula, I., Takane, K. K., Cozar-Castellano, I., & Stewart, A. F. Hepatocyte growth factor gene therapy for pancreatic islets in diabetes: Reducing the minimal islet transplant mass required in a glucocorticoid-free rat model of allogeneic portal vein islet transplantation. *Endocrinology*. 2004; 145 (2): 467-474.

Lukinius, A., Stridsberg, M., & Wilander, E. Cellular expression and specific intragranular localization of chromogranin a, chromogranin b, and synaptophysin during ontogeny of pancreatic islet cells: An ultrastructural study. *Pancreas*. 2003; 27 (1): 38-46.

Mashima, H., Ohnishi, H., Wakabayashi, K., Mine, T., Miyagawa, J., Hanafusa, T., . . . Kojima, I. Betacellulin and activin a coordinately convert amylase-secreting pancreatic ar42j cells into insulin-secreting cells. *J Clin Invest*. 1996; 97 (7): 1647-1654.

Masur, K., Tibaduiza, E. C., Chen, C., Ligon, B., & Beinborn, M. Basal receptor activation by locally produced glucagon-like peptide-1 contributes to maintaining beta-cell function. *Mol Endocrinol*. 2005; 19 (5): 1373-1382.

McKinnon, C. M., & Docherty, K. Pancreatic duodenal homeobox-1, pdx-1, a major regulator of beta cell identity and function. *Diabetologia*. 2001; 44 (10): 1203-1214.

Miller, C. P., McGehee, R. E., Jr., & Habener, J. F. Idx-1: A new homeodomain transcription factor expressed in rat pancreatic islets and duodenum that transactivates the somatostatin gene. *The EMBO journal*. 1994; 13 (5): 1145-1156.

Miralles, F., Battelino, T., Czernichow, P., & Scharfmann, R. Tgf-beta plays a key role in morphogenesis of the pancreatic islets of langerhans by controlling the activity of the matrix metalloproteinase mmp-2. *The Journal of cell biology*. 1998; 143 (3): 827-836.

Movassat, J., Saulnier, C., & Portha, B. Insulin administration enhances growth of the beta-cell mass in streptozotocin-treated newborn rats. *Diabetes*. 1997; 46 (9): 1445-1452.

Muhammad, A. K., Xiong, W., Puntel, M., Farrokhi, C., Kroeger, K. M., Salem, A., . . . Castro, M. G. Safety profile of gutless adenovirus vectors delivered into the normal

brain parenchyma: Implications for a glioma phase 1 clinical trial. *Hum Gene Ther Methods*. 2012; 23 (4): 271-284.

Mukai, E., Fujimoto, S., Sakurai, F., Kawabata, K., Yamashita, M., Inagaki, N., & Mizuguchi, H. Efficient gene transfer into murine pancreatic islets using adenovirus vectors. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2007; 119 (1): 136-141.

Nakazaki, M., Crane, A., Hu, M., Seghers, V., Ullrich, S., Aguilar-Bryan, L., & Bryan, J. Camp-activated protein kinase-independent potentiation of insulin secretion by camp is impaired in *sur1* null islets. *Diabetes*. 2002; 51 (12): 3440-3449.

Naldini, L., & Verma, I. M. Lentiviral vectors. *Adv Virus Res*. 2000; 55: 599-609.

Nauck, M., Heimesaat, M., Orskov, C., Holst, J., Ebert, R., & Creutzfeldt, W. Preserved incretin activity of glucagon-like peptide 1 [7-36 amide] but not of synthetic human gastric inhibitory polypeptide in patients with type-2 diabetes mellitus. *J Clin Invest*. 1993; 91 (1): 301-307.

Nauck, M., Stockmann, F., Ebert, R., & Creutzfeldt, W. Reduced incretin effect in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia*. 1986; 29 (1): 46-52.

Nauck, M. A., Heimesaat, M. M., Behle, K., Holst, J. J., Nauck, M. S., Ritzel, R., . . . Schmiegel, W. H. Effects of glucagon-like peptide 1 on counterregulatory hormone responses, cognitive functions, and insulin secretion during hyperinsulinemic, stepped hypoglycemic clamp experiments in healthy volunteers. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002; 87 (3): 1239-1246.

Nie, Y., Nakashima, M., Brubaker, P. L., Li, Q. L., Perfetti, R., Jansen, E., . . . Friedman, T. C. Regulation of pancreatic *pc1* and *pc2* associated with increased glucagon-like peptide 1 in diabetic rats. *J Clin Invest*. 2000; 105 (7): 955-965.

Nikolaidis, L. A., Elahi, D., Shen, Y. T., & Shannon, R. P. Active metabolite of glp-1 mediates myocardial glucose uptake and improves left ventricular performance in

conscious dogs with dilated cardiomyopathy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005; 289 (6): H2401-2408.

Novak, U., Wilks, A., Buell, G., & McEwen, S. Identical mrna for preproglucagon in pancreas and gut. *Eur J Biochem*. 1987; 164 (3): 553-558.

Offield, M. F., Jetton, T. L., Labosky, P. A., Ray, M., Stein, R. W., Magnuson, M. A., . . . Wright, C. V. Pdx-1 is required for pancreatic outgrowth and differentiation of the rostral duodenum. *Development*. 1996; 122 (3): 983-995.

Oh, S., Lee, M., Ko, K., Choi, S., & Kim, S. Glp-1 gene delivery for the treatment of type 2 diabetes. *Mol Ther*. 2003; 7 (4): 478-483.

Ohlsson, H., Karlsson, K., & Edlund, T. Ipfl, a homeodomain-containing transactivator of the insulin gene. *The EMBO journal*. 1993; 12 (11): 4251-4259.

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*. 2018.

Orskov, C., Rabenhoj, L., Wettergren, A., Kofod, H., & Holst, J. J. Tissue and plasma concentrations of amidated and glycine-extended glucagon-like peptide i in humans. *Diabetes*. 1994; 43 (4): 535-539.

Ouziel-Yahalom, L., Zalzman, M., Anker-Kitai, L., Knoller, S., Bar, Y., Glandt, M., . . . Efrat, S. Expansion and redifferentiation of adult human pancreatic islet cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 2006; 341 (2): 291-298.

Palgi, J., Stumpf, E., & Otonkoski, T. Transcription factor expression and hormone production in pancreatic ar42j cells. *Molecular and cellular endocrinology*. 2000; 165 (1-2): 41-49.

Parsons, G., Souza, D., Wu, H., Yu, D., Wadsworth, S., Gregory, R., & Armentano, D. Ectopic expression of glucagon-like peptide 1 for gene therapy of type ii diabetes. *Gene Ther*. 2007; 14 (1): 38-48.

Patti, M. E., McMahon, G., Mun, E. C., Bitton, A., Holst, J. J., Goldsmith, J., . . . Goldfine, A. B. Severe hypoglycaemia post-gastric bypass requiring partial pancreatectomy: Evidence for inappropriate insulin secretion and pancreatic islet hyperplasia. *Diabetologia*. 2005; 48 (11): 2236-2240.

Persaud, S. J., Liu, B., Sampaio, H. B., Jones, P. M., & Muller, D. S. Calcium/calmodulin-dependent kinase iv controls glucose-induced irs2 expression in mouse beta cells via activation of camp response element-binding protein. *Diabetologia*. 2011; 54 (5): 1109-1120.

Petropavlovskaja, M., & Rosenberg, L. Identification and characterization of small cells in the adult pancreas: Potential progenitor cells? *Cell and tissue research*. 2002; 310 (1): 51-58.

Pirila, E., Ramamurthy, N. S., Sorsa, T., Salo, T., Hietanen, J., & Maisi, P. Gelatinase a (mmp-2), collagenase-2 (mmp-8), and laminin-5 gamma2-chain expression in murine inflammatory bowel disease (ulcerative colitis). *Digestive diseases and sciences*. 2003; 48 (1): 93-98.

Ramiya, V. K., Maraist, M., Arfors, K. E., Schatz, D. A., Peck, A. B., & Cornelius, J. G. Reversal of insulin-dependent diabetes using islets generated in vitro from pancreatic stem cells. *Nat Med*. 2000; 6 (3): 278-282.

Rane, S. G., Dubus, P., Mettus, R. V., Galbreath, E. J., Boden, G., Reddy, E. P., & Barbacid, M. Loss of cdk4 expression causes insulin-deficient diabetes and cdk4 activation results in beta-islet cell hyperplasia. *Nature genetics*. 1999; 22 (1): 44-52.

Raper, S. E., Chirmule, N., Lee, F. S., Wivel, N. A., Bagg, A., Gao, G. P., . . . Batshaw, M. L. Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. *Mol Genet Metab*. 2003; 80 (1-2): 148-158.

Riedel, M. J., Gaddy, D. F., Asadi, A., Robbins, P. D., & Kieffer, T. J. Dsaav8-mediated expression of glucagon-like peptide-1 in pancreatic beta-cells ameliorates streptozotocin-induced diabetes. *Gene Ther.* 2010; 17 (2): 171-180.

Riedel, M. J., & Kieffer, T. J. Treatment of diabetes with glucagon-like peptide-1 gene therapy. *Expert Opin Biol Ther.* 2010; 10 (12): 1681-1692.

Riedel, M. J., Lee, C. W., & Kieffer, T. J. Engineered glucagon-like peptide-1-producing hepatocytes lower plasma glucose levels in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2009; 296 (4): E936-944.

Risbud, M. V., & Bhonde, R. R. Models of pancreatic regeneration in diabetes. *Diabetes research and clinical practice.* 2002; 58 (3): 155-165.

Roberge, J., & Brubaker, P. Regulation of intestinal proglucagon-derived peptide secretion by glucose-dependent insülinotropic peptide in a novel enteroendocrine loop. *Endocrinology.* 1993; 133 (1): 233-240.

Rooman, I., Heremans, Y., Heimberg, H., & Bouwens, L. Modulation of rat pancreatic acinoductal transdifferentiation and expression of pdx-1 in vitro. *Diabetologia.* 2000; 43 (7): 907-914.

Rosas, L. E., Grieves, J. L., Zaraspe, K., La Perle, K. M., Fu, H., & McCarty, D. M. Patterns of scaav vector insertion associated with oncogenic events in a mouse model for genotoxicity. *Mol Ther.* 2012; 20 (11): 2098-2110.

Rosenberg, L. In vivo cell transformation: Neogenesis of beta cells from pancreatic ductal cells. *Cell transplantation.* 1995; 4 (4): 371-383.

Rosenberg, L., Brown, R. A., & Duguid, W. P. A new approach to the induction of duct epithelial hyperplasia and nesidioblastosis by cellophane wrapping of the hamster pancreas. *The Journal of surgical research.* 1983; 35 (1): 63-72.

Rowzee, A., Cawley, N., Chiorini, J., & Di Pasquale, G. Glucagon-like peptide-1 gene therapy. *Exp Diabetes Res.* 2011; 2011: 601047.

Russell, D. W. Aav vectors, insertional mutagenesis, and cancer. *Mol Ther.* 2007; 15 (10): 1740-1743.

Russell, S. Incretin-based therapies for type 2 diabetes mellitus: A review of direct comparisons of efficacy, safety and patient satisfaction. *Int J Clin Pharm.* 2013; 35 (2): 159-172.

Rutter, G. A. Nutrient-secretion coupling in the pancreatic islet beta-cell: Recent advances. *Molecular aspects of medicine.* 2001; 22 (6): 247-284.

Samson, S. L., Gonzalez, E. V., Yechoor, V., Bajaj, M., Oka, K., & Chan, L. Gene therapy for diabetes: Metabolic effects of helper-dependent adenoviral exendin 4 expression in a diet-induced obesity mouse model. *Mol Ther.* 2008; 16 (11): 1805-1812.

Sander, M., & German, M. S. The beta cell transcription factors and development of the pancreas. *Journal of molecular medicine.* 1997; 75 (5): 327-340.

Sanlioglu, A., Karacay, B., Balci, M., Griffith, T., & Sanlioglu, S. Therapeutic potential of vip vs pacap in diabetes. *J Mol Endocrinol.* 2012; 49 (3): R157-167.

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

Sanlioglu, A. D., Karacay, B., Benson, P. K., Engelhardt, J. F., & Sanlioglu, S. Novel approaches to augment adeno-associated virus type-2 endocytosis and transduction. *Virus Res.* 2004; 104 (1): 51-59.

Sanlioglu, S., Benson, P., & Engelhardt, J. F. Loss of atm function enhances recombinant adeno-associated virus transduction and integration through pathways similar to uv irradiation. *Virology.* 2000; 268 (1): 68-78.

Sanlioglu, S., Benson, P. K., Yang, J., Atkinson, E. M., Reynolds, T., & Engelhardt, J. F. Endocytosis and nuclear trafficking of adeno-associated virus type 2 are controlled by rac1 and phosphatidylinositol-3 kinase activation. *J Virol.* 2000; 74 (19): 9184-9196.

Sanlioglu, S., Duan, D., & Engelhardt, J. F. Two independent molecular pathways for recombinant adeno-associated virus genome conversion occur after uv-c and e4orf6 augmentation of transduction. *Hum Gene Ther.* 1999; 10 (4): 591-602.

Sanlioglu, S., & Engelhardt, J. F. Cellular redox state alters recombinant adeno-associated virus transduction through tyrosine phosphatase pathways. *Gene Ther.* 1999; 6 (8): 1427-1437.

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.

Schirra, J., Nicolaus, M., Roggel, R., Katschinski, M., Storr, M., Woerle, H. J., & Goke, B. Endogenous glucagon-like peptide 1 controls endocrine pancreatic secretion and antro-pyloro-duodenal motility in humans. *Gut.* 2006; 55 (2): 243-251.

Schirra, J., Sturm, K., Leicht, P., Arnold, R., Goke, B., & Katschinski, M. Exendin(9-39)amide is an antagonist of glucagon-like peptide-1(7-36)amide in humans. *J Clin Invest.* 1998; 101 (7): 1421-1430.

Schwitzgebel, V. M., Scheel, D. W., Conners, J. R., Kalamaras, J., Lee, J. E., Anderson, D. J., . . . German, M. S. Expression of neurogenin3 reveals an islet cell precursor population in the pancreas. *Development.* 2000; 127 (16): 3533-3542.

Scrocchi, L. A., Brown, T. J., MaClusky, N., Brubaker, P. L., Auerbach, A. B., Joyner, A. L., & Drucker, D. J. Glucose intolerance but normal satiety in mice with a null mutation in the glucagon-like peptide 1 receptor gene. *Nat Med.* 1996; 2 (11): 1254-1258.

Scrocchi, L. A., Marshall, B. A., Cook, S. M., Brubaker, P. L., & Drucker, D. J. Identification of glucagon-like peptide 1 (glp-1) actions essential for glucose homeostasis in mice with disruption of glp-1 receptor signaling. *Diabetes.* 1998; 47 (4): 632-639.

Shiota, C., Larsson, O., Shelton, K. D., Shiota, M., Efanov, A. M., Hoy, M., . . . Magnuson, M. A. Sulfonylurea receptor type 1 knock-out mice have intact feeding-stimulated insulin secretion despite marked impairment in their response to glucose. *J Biol Chem.* 2002; 277 (40): 37176-37183.

Skibicka, K. P. The central glp-1: Implications for food and drug reward. *Front Neurosci.* 2013; 7: 181.

Slack, J. M. Developmental biology of the pancreas. *Development.* 1995; 121 (6): 1569-1580.

Song, K. H., Ko, S. H., Ahn, Y. B., Yoo, S. J., Chin, H. M., Kaneto, H., . . . Son, H. Y. In vitro transdifferentiation of adult pancreatic acinar cells into insulin-expressing cells. *Biochemical and biophysical research communications.* 2004; 316 (4): 1094-1100.

Song, W. J., Schreiber, W. E., Zhong, E., Liu, F. F., Kornfeld, B. D., Wondisford, F. E., & Hussain, M. A. Exendin-4 stimulation of cyclin a2 in beta-cell proliferation. *Diabetes.* 2008; 57 (9): 2371-2381.

Sonne, D. P., Engstrom, T., & Treiman, M. Protective effects of glp-1 analogues exendin-4 and glp-1(9-36) amide against ischemia-reperfusion injury in rat heart. *Regul Pept.* 2008; 146 (1-3): 243-249.

Sosa-Pineda, B., Chowdhury, K., Torres, M., Oliver, G., & Gruss, P. The pax4 gene is essential for differentiation of insulin-producing beta cells in the mammalian pancreas. *Nature.* 1997; 386 (6623): 399-402.

Stahlman, M. T., Gray, M. E., Hull, W. M., & Whitsett, J. A. Immunolocalization of surfactant protein-d (sp-d) in human fetal, newborn, and adult tissues. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society.* 2002; 50 (5): 651-660.

Stasiak, P. C., Purkis, P. E., Leigh, I. M., & Lane, E. B. Keratin 19: Predicted amino acid sequence and broad tissue distribution suggest it evolved from keratinocyte keratins. *The Journal of investigative dermatology.* 1989; 92 (5): 707-716.

Stoffers, D. A., Desai, B. M., DeLeon, D. D., & Simmons, R. A. Neonatal exendin-4 prevents the development of diabetes in the intrauterine growth retarded rat. *Diabetes*. 2003; 52 (3): 734-740.

Stoffers, D. A., Kieffer, T. J., Hussain, M. A., Drucker, D. J., Bonner-Weir, S., Habener, J. F., & Egan, J. M. Insülinotropic glucagon-like peptide 1 agonists stimulate expression of homeodomain protein *idx-1* and increase islet size in mouse pancreas. *Diabetes*. 2000; 49 (5): 741-748.

Suarez-Pinzon, W. L., Yan, Y., Power, R., Brand, S. J., & Rabinovitch, A. Combination therapy with epidermal growth factor and gastrin increases beta-cell mass and reverses hyperglycemia in diabetic nod mice. *Diabetes*. 2005; 54 (9): 2596-2601.

Suzuki, T., Kadoya, Y., Sato, Y., Handa, K., Takahashi, T., Kakita, A., & Yamashina, S. The expression of pancreatic endocrine markers in centroacinar cells of the normal and regenerating rat pancreas: Their possible transformation to endocrine cells. *Archives of histology and cytology*. 2003; 66 (4): 347-358.

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. *Human gene therapy*. 2018; 29 (7): 802-815.

Tasyurek, H. M., Altunbas, H. A., Balci, M. K., & Sanlioglu, S. Incretins: Their physiology and application in the treatment of diabetes mellitus. *Diabetes Metab Res Rev*. 2014; 30 (5): 354-371.

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 *db/db* 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.

Thibault, M., Nimesh, S., Lavertu, M., & Buschmann, M. D. Intracellular trafficking and decondensation kinetics of chitosan-pdna polyplexes. *Mol Ther.* 2010; 18 (10): 1787-1795.

Thorens, B., Porret, A., Buhler, L., Deng, S., Morel, P., & Widmann, C. Cloning and functional expression of the human islet glp-1 receptor. Demonstration that exendin-4 is an agonist and exendin-(9-39) an antagonist of the receptor. *Diabetes.* 1993; 42 (11): 1678-1682.

Thyssen, S., Arany, E., & Hill, D. J. Ontogeny of regeneration of beta-cells in the neonatal rat after treatment with streptozotocin. *Endocrinology.* 2006; 147 (5): 2346-2356.

Toft-Nielsen, M., Damholt, M., Madsbad, S., Hilsted, L., Hughes, T., Michelsen, B., & Holst, J. Determinants of the impaired secretion of glucagon-like peptide-1 in type 2 diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001; 86 (8): 3717-3723.

Tolhurst, G., Reimann, F., & Gribble, F. Intestinal sensing of nutrients. *Handb Exp Pharmacol.* 2012; 209: 309-335.

Tourrel, C., Bailbe, D., Lacorne, M., Meile, M., Kergoat, M., & Portha, B. Persistent improvement of type 2 diabetes in the goto-kakizaki rat model by expansion of the beta-cell mass during the prediabetic period with glucagon-like peptide-1 or exendin-4. *Diabetes.* 2002; 51 (5): 1443-1452.

Tourrel, C., Bailbe, D., Meile, M. J., Kergoat, M., & Portha, B. Glucagon-like peptide-1 and exendin-4 stimulate beta-cell neogenesis in streptozotocin-treated newborn rats resulting in persistently improved glucose homeostasis at adult age. *Diabetes.* 2001; 50 (7): 1562-1570.

Ugleholdt, R., Zhu, X., Deacon, C. F., Orskov, C., Steiner, D. F., & Holst, J. J. Impaired intestinal proglucagon processing in mice lacking prohormone convertase 1. *Endocrinology.* 2004; 145 (3): 1349-1355.

Unger, R. H., & Eisentraut, A. M. Entero-insular axis. *Arch Intern Med.* 1969; 123 (3): 261-266.

Usui, C., Asaka, M., Kawano, H., Aoyama, T., Ishijima, T., Sakamoto, S., & Higuchi, M. Visceral fat is a strong predictor of insulin resistance regardless of cardiorespiratory fitness in non-diabetic people. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo).* 2010; 56 (2): 109-116.

Vetrini, F., & Ng, P. Gene therapy with helper-dependent adenoviral vectors: Current advances and future perspectives. *Viruses.* 2010; 2 (9): 1886-1917.

Vetrini, F., & Ng, P. Liver-directed gene therapy with helper-dependent adenoviral vectors: Current state of the art and future challenges. *Curr Pharm Des.* 2011; 17 (24): 2488-2499.

VilSBoll, T., & Holst, J. Incretins, insulin secretion and type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia.* 2004; 47 (3): 357-366.

VilSBoll, T., Krarup, T., Madsbad, S., & Holst, J. No reactive hypoglycaemia in type 2 diabetic patients after subcutaneous administration of glp-1 and intravenous glucose. *Diabet Med.* 2001; 18 (2): 144-149.

Voutetakis, A., Bossis, I., Kok, M. R., Zhang, W., Wang, J., Cotrim, A. P., . . . Baum, B. J. Salivary glands as a potential gene transfer target for gene therapeutics of some monogenetic endocrine disorders. *J Endocrinol.* 2005; 185 (3): 363-372.

Voutetakis, A., Cotrim, A. P., Rowzee, A., Zheng, C., Rathod, T., Yanik, T., . . . Cawley, N. X. Systemic delivery of bioactive glucagon-like peptide 1 after adenoviral-mediated gene transfer in the murine salivary gland. *Endocrinology.* 2010; 151 (9): 4566-4572.

Wang, A. Y., Peng, P. D., Ehrhardt, A., Storm, T. A., & Kay, M. A. Comparison of adenoviral and adeno-associated viral vectors for pancreatic gene delivery in vivo. *Hum Gene Ther.* 2004; 15 (4): 405-413.

Wang, H., Iezzi, M., Theander, S., Antinozzi, P. A., Gauthier, B. R., Halban, P. A., & Wollheim, C. B. Suppression of pdx-1 perturbs proinsulin processing, insulin secretion and glp-1 signalling in ins-1 cells. *Diabetologia*. 2005; 48 (4): 720-731.

Wang, Q., & Brubaker, P. L. Glucagon-like peptide-1 treatment delays the onset of diabetes in 8 week-old db/db mice. *Diabetologia*. 2002; 45 (9): 1263-1273.

Wang, R. N., Bouwens, L., & Kloppel, G. Beta-cell proliferation in normal and streptozotocin-treated newborn rats: Site, dynamics and capacity. *Diabetologia*. 1994; 37 (11): 1088-1096.

Wang, R. N., Kloppel, G., & Bouwens, L. Duct- to islet-cell differentiation and islet growth in the pancreas of duct-ligated adult rats. *Diabetologia*. 1995; 38 (12): 1405-1411.

Wang, X., Cahill, C. M., Pineyro, M. A., Zhou, J., Doyle, M. E., & Egan, J. M. Glucagon-like peptide-1 regulates the beta cell transcription factor, pdx-1, in insulinoma cells. *Endocrinology*. 1999; 140 (10): 4904-4907.

Wang, Y., Perfetti, R., Greig, N., Holloway, H., DeOre, K., Montrose-Rafizadeh, C., . . . Egan, J. Glucagon-like peptide-1 can reverse the age-related decline in glucose tolerance in rats. *J Clin Invest*. 1997; 99 (12): 2883-2889.

Wang, Z., Ma, H. I., Li, J., Sun, L., Zhang, J., & Xiao, X. Rapid and highly efficient transduction by double-stranded adeno-associated virus vectors in vitro and in vivo. *Gene Ther*. 2003; 10 (26): 2105-2111.

Wang, Z., Zhu, T., Rehman, K. K., Bertera, S., Zhang, J., Chen, C., . . . Xiao, X. Widespread and stable pancreatic gene transfer by adeno-associated virus vectors via different routes. *Diabetes*. 2006; 55 (4): 875-884.

Weinstein, D. C., Ruiz i Altaba, A., Chen, W. S., Hoodless, P., Prezioso, V. R., Jessell, T. M., & Darnell, J. E., Jr. The winged-helix transcription factor hnf-3 beta is required for notochord development in the mouse embryo. *Cell*. 1994; 78 (4): 575-588.

Wettergren, A., Schjoldager, B., Mortensen, P., Myhre, J., Christiansen, J., & Holst, J. Truncated glp-1 (proglucagon 78-107-amide) inhibits gastric and pancreatic functions in man. *Dig Dis Sci.* 1993; 38 (4): 665-673.

Wideman, R. D., Covey, S. D., Webb, G. C., Drucker, D. J., & Kieffer, T. J. A switch from prohormone convertase (pc)-2 to pc1/3 expression in transplanted alpha-cells is accompanied by differential processing of proglucagon and improved glucose homeostasis in mice. *Diabetes.* 2007; 56 (11): 2744-2752.

Wideman, R. D., Gray, S. L., Covey, S. D., Webb, G. C., & Kieffer, T. J. Transplantation of pc1/3-expressing alpha-cells improves glucose handling and cold tolerance in leptin-resistant mice. *Mol Ther.* 2009; 17 (1): 191-198.

Wideman, R. D., & Kieffer, T. J. Mining incretin hormone pathways for novel therapies. *Trends Endocrinol Metab.* 2009; 20 (6): 280-286.

Wideman, R. D., Yu, I. L., Webber, T. D., Verchere, C. B., Johnson, J. D., Cheung, A. T., & Kieffer, T. J. Improving function and survival of pancreatic islets by endogenous production of glucagon-like peptide 1 (glp-1). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006; 103 (36): 13468-13473.

Wiedenmann, B., Franke, W. W., Kuhn, C., Moll, R., & Gould, V. E. Synaptophysin: A marker protein for neuroendocrine cells and neoplasms. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986; 83 (10): 3500-3504.

Williams, D., Baskin, D., & Schwartz, M. Leptin regulation of the anorexic response to glucagon-like peptide-1 receptor stimulation. *Diabetes.* 2006; 55 (12): 3387-3393.

Wilson, M. E., Kalamaras, J. A., & German, M. S. Expression pattern of iapp and prohormone convertase 1/3 reveals a distinctive set of endocrine cells in the embryonic pancreas. *Mech Dev.* 2002; 115 (1-2): 171-176.

Wilson, M. E., Scheel, D., & German, M. S. Gene expression cascades in pancreatic development. *Mech Dev.* 2003; 120 (1): 65-80.

Wu, K. L., Gannon, M., Peshavaria, M., Offfield, M. F., Henderson, E., Ray, M., . . . Stein, R. Hepatocyte nuclear factor 3beta is involved in pancreatic beta-cell-specific transcription of the pdx-1 gene. *Molecular and cellular biology*. 1997; 17 (10): 6002-6013.

Xu, G., Kaneto, H., Lopez-Avalos, M. D., Weir, G. C., & Bonner-Weir, S. Glp-1/exendin-4 facilitates beta-cell neogenesis in rat and human pancreatic ducts. *Diabetes research and clinical practice*. 2006; 73 (1): 107-110.

Xu, G., Stoffers, D. A., Habener, J. F., & Bonner-Weir, S. Exendin-4 stimulates both beta-cell replication and neogenesis, resulting in increased beta-cell mass and improved glucose tolerance in diabetic rats. *Diabetes*. 1999; 48 (12): 2270-2276.

Xuan, S., Kitamura, T., Nakae, J., Politi, K., Kido, Y., Fisher, P. E., . . . Efstratiadis, A. Defective insulin secretion in pancreatic beta cells lacking type 1 igf receptor. *J Clin Invest*. 2002; 110 (7): 1011-1019.

Yap, I. S., Giddings, G., Pocock, E., & Chantler, J. K. Lack of islet neogenesis plays a key role in beta-cell depletion in mice infected with a diabetogenic variant of coxsackievirus b4. *J Gen Virol*. 2003; 84 (Pt 11): 3051-3068.

Yew, K. H., Prasad, K. L., Preuett, B. L., Hembree, M. J., McFall, C. R., Benjes, C. L., . . . Gittes, G. K. Interplay of glucagon-like peptide-1 and transforming growth factor-beta signaling in insulin-positive differentiation of ar42j cells. *Diabetes*. 2004; 53 (11): 2824-2835.

Zangen, D. H., Bonner-Weir, S., Lee, C. H., Latimer, J. B., Miller, C. P., Habener, J. F., & Weir, G. C. Reduced insulin, glut2, and idx-1 in beta-cells after partial pancreatectomy. *Diabetes*. 1997; 46 (2): 258-264.

Zaret, K. S. Molecular genetics of early liver development. *Annual review of physiology*. 1996; 58: 231-251.

Zhao, S., Kanoski, S. E., Yan, J., Grill, H. J., & Hayes, M. R. Hindbrain leptin and glucagon-like-peptide-1 receptor signaling interact to suppress food intake in an additive manner. *Int J Obes (Lond)*. 2012; 36 (12): 1522-1528.

Zhao, T. Glucagon-like peptide-1 (glp-1) and protective effects in cardiovascular disease: A new therapeutic approach for myocardial protection. *Cardiovasc Diabetol*. 2013; 12: 90.

Zhou, J., Pineyro, M. A., Wang, X., Doyle, M. E., & Egan, J. M. Exendin-4 differentiation of a human pancreatic duct cell line into endocrine cells: Involvement of pdx-1 and hnf3beta transcription factors. *J Cell Physiol*. 2002; 192 (3): 304-314.

Zhou, J., Wang, X., Pineyro, M. A., & Egan, J. M. Glucagon-like peptide 1 and exendin-4 convert pancreatic ar42j cells into glucagon- and insulin-producing cells. *Diabetes*. 1999; 48 (12): 2358-2366.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı	Mükerrem Hale	Uyruğu	T.C.
Soyadı	TAŞYÜREK	Tel no	0 535 549 94 41
Doğum tarihi	25.05.1987	e-posta	htasyurek@gmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Mezun olduğu kurum	Mezuniyet yılı	
Lise	Antalya Anadolu Lisesi	2003
Lisans	Ege Üniversitesi Biyomühendislik	2008
Yüksek Lisans	Ege Üniversitesi Biyoteknoloji	2011
Doktora	Akdeniz Üniversitesi Tıbbi Biyoloji	

İŞ DENEYİMİ

Görevi	Kurum	Süre (yıl-yıl)
Araştırma Görevlisi	Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü	2012-2018

DİL BİLGİLERİ

Yabancı Dilleri	Sınav türü	Puanı
İngilizce	TOEFL	92

PROJE DENEYİMİ

Proje Adı	Destekleyen kurum	Süre (Yıl-Yıl)
İnsan Glukagon Benzeri Peptid-1 (GLP-1) Taşıyan Gen Nakil Vektörlerinin Diyabetik Deney Hayvan Modelinde Terapötik Etkinliklerinin Belirlenmesi	TUBITAK-112S114	2012-2015
Pankreatik Beta Hücrelerine Özgün Vazoaktif İntestinal Peptid Sentezinin Diyabetik Deney Hayvan Modellerinde Beta Hücre Fonksiyonu ve Adacık Kitle Kaybı Üzerindeki Terapötik Etkinliği	TUBITAK-111S157	2011-2014
Pankreasa Yönlendirilmiş Lentiviral Vektörlerle İnsülin Gen Naklinin Terapötik Etkinliğinin Diyabetik Deney Hayvan Modellerinde Belirlenmesi	TUBITAK-215S820	2017-2018

BURSLAR-ÖDÜLLER:

En İyi Sözlü Bildiri Ödülü Birinciliği, 53. Ulusal Diyabet Kongresi, Nisan 2017

Poster Birincilik Ödülü, XII. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi, Ekim 2016

Sözel Sunum İkincilik Ödülü, Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, Ekim 2015

YAYINLAR

- Tasyurek, H. M., Altunbas, H. A., Balci, M. K., Griffith, T. S. & Sanlioglu, S. 2018. Therapeutic Potential Of Lentivirus-Mediated Glucagon-Like Peptide-1 Gene Therapy For Diabetes. *Hum Gene Ther*, 29, 802-815.
- Tasyurek, H. M., Eksi, Y. E., Sanlioglu, A. D., Altunbas, H. A., Balci, M. K., Griffith, T. S. & Sanlioglu, S. 2018. Hiv-Based Lentivirus-Mediated Vasoactive Intestinal Peptide Gene Delivery Protects Against Dio Animal Model Of Type 2 Diabetes. *Gene Ther*, 25, 269-283.
- Olgun, H. B., Tasyurek, H. M., Sanlioglu, A. D. & Sanlioglu, S. 2018. High-Titer Production Of Hiv-Based Lentiviral Vectors In Roller Bottles For Gene And Cell Therapy. *Methods Mol Biol*.
- Olgun, H. B., Tasyurek, H. M., Sanlioglu, A. D., & Sanlioglu, S. High-grade purification of third-generation hiv-based lentiviral vectors by anion exchange chromatography for experimental gene and stem cell therapy applications. *Methods Mol Biol*. 2018.
- Tasyurek, M. H., Altunbas, H. A., Canatan, H., Griffith, T. S. & Sanlioglu, S. 2014. Glp-1-Mediated Gene Therapy Approaches For Diabetes Treatment. *Expert Rev Mol Med*, 16, E7.
- Tasyurek, H. M., Altunbas, H. A., Balci, M. K. & Sanlioglu, S. 2014. Incretins: Their Physiology And Application In The Treatment Of Diabetes Mellitus. *Diabetes Metab Res Rev*, 30, 354-71.

BİLDİRİLER

- Taşyürek M.H., Altunbaş H.A., Şanlıoğlu S., "Antidiyabetik gen terapi ajanı olarak Glukagon Benzeri Peptid-1 ve hücrel transdiferansiyasyon. ", 15. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, MUĞLA, TÜRKİYE, 26 Ekim - 29 Kasım 2017, ss.SS-031-SS-031
- Taşyürek M.H., Ekşi Y.E., Balci M.K., Şanlıoğlu S., "Pankreatik beta hücrelerine özgün insülin promotörlü proinsülin gen tedavi vektörünün oluşturulması", 53. Ulusal Diyabet Kongresi, Girne, KUZZEY KIBRIS TÜRK CUM., 19-23 Nisan 2017, ss.249-249
- Taşyürek M.H., Altunbaş H.A., Şanlıoğlu S., "Glucagon like peptide-1 as an antidiabetic gene therapy agent inducing transdifferentiation of pancreatic endocrine cells", ESGCT XXV Anniversary Congress, Berlin, ALMANYA, 17-20 Ekim 2017, pp.P277-P277

- 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, GİRNE, KUZEY KIBRIS TÜRK CUM., 19-23 Nisan 2017, ss.251-251
- Gümüştü E., Taşyürek M.H., Şanlıoğlu S., "Kök hücre kaynaklı pankreatik beta hücrelerinde uzun süreli insülin gen ekspresyonu yapabilen lentiviral gen tedavi vektörlerinin geliştirilmesi", 53. Ulusal Diyabet Kongresi, Girne, KUZEY KIBRIS TÜRK CUM., 19-23 Nisan 2017, ss.252-252
- Taşyürek M.H., Altunbaş H.A., Şanlıoğlu S., "İnkretin gen nakli diyabetik deneklerde insülin direncini kırıp glukoz toleransını geliştirerek beta hücre rejenerasyonu sağlar", 53. Ulusal Diyabet Kongresi, Girne, KUZEY KIBRIS TÜRK CUM., 19-23 Nisan 2017, ss.250-250
- Ekşi Y.E., Taşyürek M.H., Balci M.K., Şanlıoğlu S., "Pankreatik beta hücre hedefli HIV tabanlı insülin gen tedavi vektörünün oluşturulması", Uluslararası Katılımlı 12. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi, İZMİR, TÜRKİYE, 5-9 Ekim 2016, cilt.2, ss.206-206
- Taşyürek M.H., Ekşi Y.E., Balci M.K., Şanlıoğlu S., "EF-1 promotörü kontrolünde insülin gen ekspresyonu yapan HIV tabanlı lentiviral gen tedavi vektörünün oluşturulması", Uluslararası Katılımlı 12. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi, İZMİR, TÜRKİYE, 5-9 Ekim 2016, cilt.2, ss.200-200
- Taşyürek M.H., Altunbaş H.A., Şanlıoğlu S., "Glucagon like peptide-1 gene delivery increases beta cell replication and neogenesis in Type 2 Diabetic Obese Sprague Dawley Rats", Conference on Changing the Face of Modern Medicine - Stem Cells and Gene Therapy., FLORANSA, ITALYA, 18-21 Ekim 2016, vol.27, no.11, pp.A156-A156
- Ekşi Y.E., Taşyürek M.H., Şanlıoğlu A.D., Balci M.K., Şanlıoğlu S., "Construction of A lentiviral Vector Encoding Human Vasoactive Intestinal Peptide for Diabetes Treatment", EMBO Workshop , Evry, FRANSA, 30 Mart - 4 Nisan 2015, pp.185-185
- Taşyürek M.H., Ekşi Y.E., Balci M.K., Şanlıoğlu S., "Gen tedavisinde kullanılan lentiviral vektörlerin in vivo dağılımlarının Tip 2 Diyabet hayvan modelinde belirlenmesi", 51. Ulusal Diyabet Kongresi, ANTALYA, TÜRKİYE, 22-26 Nisan 2015, ss.146-147
- Olgun H.B., Taşyürek M.H., Altunbaş H.A., Canatan H., Şanlıoğlu S., "GLP-1 gen replasman tedavisinin Tip 2 Diyabet SpragueDawley Sıçanlarda rezidüel adacık replikasyon verejenerasyonu üzerindeki etkisinin incelenmesi", XIV. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, MUĞLA, TÜRKİYE, 27-30 Ekim 2015, ss.146-146

- Olgun H.B., Taşyürek M.H., Altunbaş H.A., Şanlıoğlu S., "Diyet bağımlı obez Sprague Dawley sıçanlarda STZ ile diyabet indüksiyonu pankreatik adacıklarda inkretin hormonu (GLP-1) sentezini azaltır", 51. Ulusal Diyabet Kongresi, ANTALYA, TÜRKİYE, 22-26 Nisan 2015, ss.146-146
- Şanlıoğlu S., Altunbaş H.A., Taşyürek M.H., "Diyabet tedavisi için insan Glukagon Benzeri Peptid-1 kodlayan lentiviral vektörlerin üretimi", 51. Ulusal Diyabet Kongresi, ANTALYA, TÜRKİYE, 22-26 Nisan 2015, ss.0-0
- Taşyürek M.H., Altunbaş H.A., Canatan H., Şanlıoğlu S., "Diyabet Tedavisinde HIV tabanlı lentivirus aracılı Glukagonbenzeri peptid-1 gen aktarımının terapötik etkileri", XIV. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, MUĞLA, TÜRKİYE, 27-30 Ekim 2015, ss.145-145
- Ekşi Y.E., Taşyürek M.H., Balci M.K., Şanlıoğlu S., "In vivo distribution of HIV based 3rd generation of lentiviral vectors used in gene therapy in DOI animal model of type 2 diabetes", ESGCT and FSGCT Collaborative Congress,2015, Helsinki, FINLANDIYA, 17-20 Eylül 2015, pp.A94-A94
- Olgun H.B., Taşyürek M.H., Altunbaş H.A., Şanlıoğlu S., "Obese and diabetic sprague dawley rats exhibited reduced GLP-1 expression in pancreatic islets of Langerhans", ESGCT and FSGCT Collaborative Congress,2015, Helsinki, FINLANDIYA, 17-20 Eylül 2015, pp.A67-A68
- Taşyürek M.H., Altunbaş H.A., Canatan H., Şanlıoğlu S., "Therapeutic outcomes of an HIV-based lentivirus mediated Glucagon-like peptide-1 gene delivery for diabetes treatment", ESGCT and FSGCT Collaborative Congress,2015, Helsinki, FINLANDIYA, 17-20 Eylül 2015, pp.A98-A98
- Ekşi Y.E., Taşyürek M.H., Şanlıoğlu A.D., Balci M.K., Şanlıoğlu S., "Construction of A Lentiviral Vector Encoding Human Vasoactive Intestinal Peptide for Diabetes Treatment", Human Gene Therapy ESGCT and NVGCT Collaborative Congress, THE HAGUE, HOLLANDA, 23-26 Ekim 2014, pp.P123-P123
- Taşyürek M.H., Ekşi Y.E., Şanlıoğlu A.D., Balci M.K., Şanlıoğlu S., "Therapeutic efficacy of an HIV-Based Lentivirus Mediated Vasoactive İntestinal Peptide Gene Delivery for Diabetes", The XXII. Annual ESGCT Congress in collaboration with the NCGCT, Hague, HOLLANDA, 23-26 Ekim 2014, pp.A86-A86
- Ekşi Y.E., Taşyürek M.H., Şanlıoğlu A.D., Balci M.K., Şanlıoğlu S., "Comperative efficacy of Diet İnduced Obesity in c57bl/6j versus Balb/C mice for gene Threapy applications", The XXII. Annual ESGCT Congress in collaboration with the NCGCT, Hague, HOLLANDA, 23-26 Ekim 2014, pp.A60-A60

- Ekşi Y.E., Taşyürek M.H., Balık O., Altunbaş H.A., Balci M.K., Şanlıoğlu S., "C57BL6J FARELER DİYETLE SPRAGUE DAWLEY SIÇANLARA KIYASLA DAHA HIZLI VE ETKİN PREDİYABET GELİŞİMİ GÖSTERDİ", 50. Ulusal Diyabet Kongresi, ANTALYA, TÜRKİYE, 23-27 Nisan 2014, ss.167-167
- Şanlıoğlu S., Altunbaş H.A., Balci M.K., Taşyürek M.H., Balık O., Ekşi Y.E., "Diyabet hastalığına karşı geliştirilen insan vazoaktif intestinal peptid kodlayan HIV tabanlı gen transfer vektörlerinin yapımı ve testi", 50. Ulusal Diyabet Kongresi, ANTALYA, TÜRKİYE, 23-27 Nisan 2014, ss.12-12
- Taşyürek M.H., Ekşi Y.E., Altunbaş H.A., Balci M.K., Şanlıoğlu S., "Generation of A Lentiviral Vector Encoding Human Glucagon Like Peptide-1 (GLP-1) for Diabetes Treatment", ESGCT AND NVGCT COLLABORATIVE CONGRESS, 2014, The Hauge, Amsterdam, HOLLANDA, 23-26 Ekim 2014, vol.25, no.11, pp.87-88
- Ekşi Y.E., Taşyürek M.H., Altunbaş H.A., Şanlıoğlu S., "Induction of Diet Induced Obesity in Sprague Dawley Rats as a Model of Type 2 Diabetes", The XXII. Annual ESGCT Congress in collaboration with the NCGCT, Hague, HOLLANDA, 23-26 Ekim 2014, pp.A60-A61
- Taşyürek M.H., Ekşi Y.E., Altunbaş H.A., Balci M.K., Şanlıoğlu S., "Up Regulation of Glucagon Like Peptide-1 Expression in Pancreases of C57BL6j Mice with Diabetes", The XXII. Annual ESGCT Congress in collaboration with the NCGCT, Hague, HOLLANDA, 23-26 Ekim 2014, pp.A63-A63
- Balık O., Taşyürek M.H., Ekşi Y.E., Altunbaş H.A., Balci M.K., Şanlıoğlu S., "C57BL6J FARELERDE DİYABET İNDÜKSİYONU PANKREAS KÖKENLİ GLP-1 SENTEZİNİ ARTTIRDI", 50. Ulusal Diyabet Kongresi, ANTALYA, TÜRKİYE, 23-27 Nisan 2014, ss.166-166
- Ekşi Y.E., Taşyürek M.H., Balık O., Altunbaş H.A., Balci M.K., Şanlıoğlu S., "Constitution of Pre-diabetic State in C57BL6J Mice Versus Sprague Dawley Rats", American Diabetes Association, SAN FRANCİSCO, ABD, 13-17 Haziran 2014, vol.63, pp.A659-A659
- Hapil F.Z., Taşyürek M.H., Güzel N., Şanlıoğlu A.D., Balci M.K., Şanlıoğlu S., "Downregulation of Vasoactive Intestinal Peptide Expression in Type 2 Diabetes", Congress of American Diabetes Association, chicago, ABD, 21-25 Haziran 2013, vol.62, pp.2258P-2258P
- Şanlıoğlu S., Şanlıoğlu A.D., Hapil F.Z., Balci M.K., Taşyürek M.H., Güzel N., "Tip 2 diyabet deney hayvan modelinde diyabet induksiyonu adacıklarda vazoaktif intestinal peptid azalimiyla korelasyon gosterdi", 49. Ulusal Diyabet Kongresi, ANTALYA, TÜRKİYE, 17-21 Nisan 2013, ss.20-20

- Taşyürek M.H., Hapil F.Z., Altunbaş H.A., Canatan H., Şanlıoğlu S., "GLP-1 and GLP-1-receptor expression profiles in pancreatic islets of Diet Induced Obese (DIO) Mice", Collaborative Congress of the European-Society-for-Gene-and-Cell-Therapy and the Spanish Society for Gene and Cell Therapy, MADRID, ISpanya, 25-28 Ekim 2013, vol.24, no.12, pp.138-138
- Hapil F.Z., Taşyürek M.H., Şanlıoğlu A.D., Balci M.K., Şanlıoğlu S., "Pancreatic expression profiles of vasoactive intestinal peptide and its receptors in mouse model of type 2 diabetes", Collaborative Congress of the European-Society-for-Gene-and-Cell-Therapy and the Spanish Society for Gene and Cell Therapy, MADRID, ISpanya, 25-28 Ekim 2013, vol.24, no.12, pp.138-138
- Güzel N., Taşyürek M.H., Şanlıoğlu A.D., Balci M.K., Şanlıoğlu S., "Generation of a cost effective and a practical animal model for Type 2 Diabetes", Collaborative Congress of the European Society of Gene and Cell Therapy/French Society of Cell and Gene Therapy, VERSAILLES, FRANSA, 25-29 Ekim 2012, vol.23, no.10, pp.78-79