

T.C.

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERDEN PANKREAS ADACIK BETA
HÜCRELERİNE BENZER İNSÜLİN SALGILAYAN HÜCRELERİN
REKOMBİNANT DNA TEKNOLOJİSİ İLE ELDESİ**

AYŞEGÜL BAĞLAR

Kocaeli Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin

Kök Hücre ve Doku Yenilenmesi Programı için Öngördüğü

BİLİM UZMANLIĞI (YÜKSEK LİSANS) TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır.

KOCAELİ

2014

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERDEN PANKREAS ADACIK BETA
HÜCRELERİNE BENZER İNSÜLİN SALGILAYAN HÜCRELERİN
REKOMBİNANT DNA TEKNOLOJİSİ İLE ELDESİ**

AYŞEGÜL BAĞLAR

Kocaeli Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin
Kök Hücre ve Doku Yenilenmesi Programı için Öngördüğü
BİLİM UZMANLIĞI (YÜKSEK LİSANS) TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır.

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Gökhan DURUKSU

Destekleyen Kurum ve Proje Kodu: Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu
(TÜBİTAK)-112S125

KOCAELİ

2014

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(Tez Onay Sayfası)




Tez adı: *Metabolik Kötü Hastalardan Pankreas Adacık Beta Hücrelerine Benzer İncin Salgılayan Hücrelerin Rekombinant DNA Teknolojisi ile Eldeşi*

Tez yazarı: *Aysenül BAĞLAR*

Tez savunma tarihi: *01.07.2014*

Tez Danışmanı: *Yard. Doc. Dr. Gökhan DURUKSU*

İş bu çalışma Jürimiz tarafından Kötü Hastalardan Anabilim Dalı
Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Sınavı jüri üyeleri		İmzası
Ünvanı Adı Soyadı		
Üye	<i>Prof. Dr. Erdol KARAÖZ</i>	
Üye	<i>Prof. Dr. Tuncay DELİBASİ</i>	
Üye	<i>Yard. Doc. Dr. Gökhan DURUKSU</i>	

ONAY

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

...../...../20

Prof. Dr. Tuncay Çolak
Enstitü Müdürü

ÖZET

MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERDEN PANKREAS ADACIK BETA HÜCRELERİNE BENZER İNSÜLİN SALGILAYAN HÜCRELERİN REKOMBİNANT DNA TEKNOLOJİSİ İLE ELDESİ

Sunulan tez çalışmasında mezenkimal kök hücreler kullanılarak gen aktarımı sonrası kimyasal uyarılma ile tip 1 diyabetin hücresel tedavisi için insülin üretebilen beta benzeri hücre elde etme potansiyelinin gözlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmada sıçan pankreatik adacıklarından izole edilen mezenkimal kök hücreler (sPA-MKH) kullanılmıştır. İzole edilen pankreatik adacıklardan spesifik primerler kullanılarak Ngn3 (Neurogenin3), Pax4 (paired box gene 4), MafA (musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog A) ve Gck (Glucokinase) transkripsiyon faktörleri çoğaltılmış ve bu genlerden toplam dokuz grup oluşturularak sPA-MKH'lere elektroporasyon ile aktarılmıştır. Aktarılan genlerin birbirleriyle olan etkileşimleri ve gruplar arasındaki fark anlaşılmaya çalışılmıştır. Gen aktarımı sonrası hücreler kimyasal ajanlar ile endokrin yönde uyarılmış ve hücrelerin farklılaşma potansiyelleri morfolojik olarak ve beta hücre belirteçleri açısından gen ekspresyon profilleri karşılaştırılmıştır. Hücre içi proteinlerin sentezi arasındaki farkı belirleyebilmek için Western Blot Hibridizasyon yapılmıştır.

Sonuç olarak gen aktarımı sonrası elde edilen gruplar arasında belirgin farklar olduğu ve yalnızca beta benzeri hücre değil diğer adacık hücrelerinin karakterini taşıyan hücrelerin de elde edildiği gözlenmiştir. Endokrin yönde kimyasal uyarılma sonucunda ise bazı gruplarda adacık benzeri hücre topluluklarının oluşmasını sağladığı görülürken, yalnızca Ngn3-Pax4-MafA genlerinin bir arada aktarıldığı grup hücreler üzerinde önemli bir etki yaratarak insülin granüllerine benzer yapı elde edildiği immünfloresan tekniklerle gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Mezenkimal kök hücre, Ngn3, Pax4, MafA, Gck, endokrin farklılaşma, tip 1 diyabet

ABSTRACT

THE PRODUCTION OF PANCREATIC ISLET BETA LIKE INSULIN PRODUCING CELLS FROM MESENCHYMAL STEM CELLS BY RECOMBINANT DNA TECHNOLOGY

In the presented thesis, the detection of the differentiation potential of the mesenchymal stem cells into insulin producing beta like cells by chemical induction following the gene transfer was aimed for the cellular therapy of type 1 diabetes. In the study, rat pancreatic islet derived mesenchymal stem cells (rPI-MSC) were used. Ngn3 (Neurogenin3), Pax4 (paired box gene 4), MafA (musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog A) and Gck (Glucokinase) transcription factors were isolated from rat pancreatic islets and transfected into rPI-MSC by electroporation in different combination forming nine experimental groups. The interactions of these genes and the differences between the groups were tried to be understood. Cells following gene transfection were induced to differentiate into endocrine cell lineage with chemical agents, and the differentiation potential of these cell groups were compared morphologically and by gene expression profiling. Western Blot Hybridization analyses used to determine the cellular protein differences between cell groups.

As a result, the cell groups that transfected with genes showed significant differences, and not only the beta cells but also the other types of cells in pancreatic islets were obtained. While some group of cells forms cell clusters like islets after the chemical induction, only the Group 9 cells, which were co-transfected with Ngn3, Pax4, MafA, was shown to form insulin granules that showed by immunofluorescence staining after the chemical induction.

Keywords: Mesenchymal stem cell, Ngn3, Pax4, MafA, Gck, endocrine differentiation, type 1 diabetes

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca beni destekleyen, bilgi ve deneyimini paylaştan bölüm başkanım sayın hocam, **Prof. Dr. Erdal KARAÖZ**'e; çalışma konumu belirlemede ve yürütmeye beni her zaman destekleyerek hem bilimsel hem de manevi anlamda yardımlarını esirgemeyen hocam **Yrd. Doç. Dr. Gökhan DURUKSU**'ya; eğitim sürem boyunca büyük desteğini ve yardımlarını gördüğüm hocalarım, **Yrd. Doç. Dr. Ayla EKER SARIBOYACI** ve **Yrd. Doç. Dr. Gülçin GACAR**'a; tüm bilgilerini içtenlikle paylaştan, beni her zaman destekleyen çalışma arkadaşlarım ve ablalarım **Uzm. Tıbbi Biyolog Zehra Seda ÜNAL**'a, **Uzm. Biyolog Özlem SAĞLAM**'a ve **Biyolog Gülay ERMAN**'a; ve her zaman yanımda olan ağabeyim **Tıbbi Lab. Tek. Alparslan OKÇU**'ya teşekkürlerimi sunarım.

Gerek bilimsel olarak gerekse sıcak dostluklarıyla her zaman yanımda olan **Uzm. Biyolog Ayça AKSOY**'a, **Uzm. Biyolog Gizem TURAÇ**'a, **Uzm. Biyolog İrem YILMAZ**'a; zorlukları birlikte atlattığım sevgili dönem arkadaşlarım **Biyolog Cansu SUBAŞI**'na, **Biyolog Büşra ÖNCEL DUMAN**'a ve yardımlarını hiç unutamayacağım canım arkadaşım **Araştırma Görevlisi Çiğdem İNCİ**'ye sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Uzun yıllar acı tatlı çok şey paylaştığım canım dostlarım **Büşra GÜL**, **Gülbahar ÜNAL** ve **Merve KAYNAK**'a sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca, 112S125 numaralı proje kapsamında maddi destek sağlayan Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) Hızlı Destek Fonu'na teşekkür ederim.

Lisans eğitimim sırasında hayatıma katılan, her anımı paylaştan, desteğini hep yanımda hissettiğim, geleceği birlikte kurmayı dilediğim sevgili **Cem AÇIKSARI**'ya tüm kalbimle sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Tüm hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini hiç esirgemeyen, büyük özveriyle ve sabırla bugünlere gelmemi sağlayan canım **AİLEME** sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xvii
1 GİRİŞ VE AMAÇ	1
2 GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 Kök Hücreler.....	3
2.1.1 Kök Hücre Çeşitleri	5
2.1.1.1 Embriyonik Kök Hücreler	6
2.1.1.2 Embriyonik Olmayan Kök Hücreler	7
2.2 Diyabet.....	9
2.2.1 Pankreas gelişim mekanizması	10
2.3 Diyabetin Tedavisi ve Kök Hücreler	12
2.3.1 Gen Aktarımı ile İnsülin Üreten Hücre Eldesi	13
3 GEREÇ VE YÖNTEM	17
3.1 Pankreas Adacık İzolasyonu.....	17
3.2 Sıçan Pankreatik Adacık Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre İzolasyonu	17
3.3 sPA-MKH Karakterizasyonu	18
3.3.1 sPA-MKH'lerin İmmünohistokimyasal Analizi.....	18
3.3.2 sPA-MKH'lerin Akım Sitometri ile Analizi	19
3.3.3 sPA-MKH'lerin <i>İn-vitro</i> Farklılaştırılması.....	19
3.4 Sıçan Pankreatik Adacıktan Genlerin İzolasyonları	20

3.4.1	RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi	20
3.4.2	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ve Agaroz Jelden Genlerin Saflaştırılması.....	21
3.5	İzole Edilen Genlerin Restriksiyon Enzimi ile Kesimi ve Klonlama Vektörüne Ligasyonu.....	23
3.6	Transformasyon ve Plazmit İzolasyonu.....	23
3.7	Genin Plazmitten Kesilerek Ekspresyon Vektörüne Aktarılması	24
3.8	Kök Hücelere Genlerin Aktarılması (Elektroporasyon).....	25
3.9	Gen Aktarılmış Hücrelerin Karakterizasyonu	26
3.9.1	Gen Ekspresyon Analizi	27
3.9.1.1	Gen Kopya Sayısı Belirlenmesi	27
3.9.1.2	Real-Time PCR ile Kantitatif Analiz	27
3.9.2	Gen Aktarılmış Hücrelerin Kök Hücre Belirteçlerini Taşması (Akım Sitometri).....	28
3.9.3	Hücre İçi Proteinlerin İncelenmesi	29
3.9.3.1	İmmün Floresan.....	29
3.9.3.2	Western Blot Hibridizasyon.....	30
3.10	Endokrin Hücre Farklılaşması	30
3.11	İstatistiksel analiz.....	31
4	BULGULAR	32
4.1	İzole edilen sPA-MKH'ler ve Karakterizasyonu	32
4.2	Genlerin Çoğaltılması ve Klonlama Vektörüne Aktarılması.....	36
4.2.1	Ngn3, Pax4, MafA, Gck genlerinin PCR ile Çoğaltılması.....	37
4.2.2	Vektörün Tasarlanması.....	38
4.3	Gen Aktarılmış Hücrelerin Karakterizasyonu	40
4.3.1	Hücre Morfolojileri.....	41
4.3.2	Gen Kopya Sayısı	50

4.3.3	Gen Ekspresyon Analizi	51
4.3.4	Gen Ekspresyonu Sonrasında Hücrelerin Kök Hücre Belirteçlerini Taşımaları (Akım Sitometrisi).....	58
4.3.5	Hücre İçi Proteinlerin İncelenmesi	59
4.3.5.1	İmmün Flüoresan.....	59
4.3.5.2	Western Blot Hibridizasyon	65
4.4	Endokrin Hücre Farklılaşması	66
4.4.1	Kimyasal Uyarılma Sonrası Morfolojik Görünüm	67
4.4.2	Beta Hücre Belirteçlerinin İfadesi (İmmünfloresan)	72
4.4.3	Gen Ekspresyon Analizi	74
5	TARTIŞMA	77
	SONUÇLAR VE ÖNERİLER	83
	KAYNAKLAR.....	85
	EKLER	89
	ÖZGEÇMİŞ.....	96

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ALS : Amyotrophik lateral skleroz

ASMA : Alfa smooth muscle actin

bHLH : Basic helix loop helix

bp : Baz çifti

DM : Diabetes Mellitus

DMEM/F12: Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12

D-MEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSO: Dimetil sülfoksit

DNA : Deoksiribonükleik asit

DTZ: dithiozone

EGF : Epidermal growth factor

EKH : Embriyonik kök hücre

EMT : Epitel mezenkimal geçişi

FBS : Fetal sığır serumu

FGF : Fibroblast growth factor

FITC : Floresan izotiyosiyonat

G3PDH : Glyceraldehide 3-phosphate dehydrogenase

Gcg : Glucagon

Gck : Glucokinase

HBSS: Hank's Buffered Salt Solution

HGF : Hepatocyte growth factor

HKH : Hematopoietik kök hücre

IBMX: 3-isobutyl-1-methylxanthine

Ins1 : İnsülin 1

Ins2 : İnsülin 2

LIF : Lösemi inhibitör faktör

MafA : musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog A

MKH : Mezenkimal kök hücre

MS : multiple skleroz

NeuroD : Neurogenic differentiation

Ngn3 : Neurogenin3

Pax4 : paired box gene 4
PBS : Fosfat salin tamponu
PCR : Polimeraz zincir reaksiyonu
Pdx1 : Pancreatic and duodenal homeobox gene 1
PE : Fikoeritrin
Pen/Strep : Penisilin/Streptomisin
PFA : Paraformaldehit
Ptf1a : Pancreas-specific transcription factor 1a
RNA: Ribonükleik asit
RPMI: Roswell Park Memorial Institute
SHH : Sonic hedgehog
sPA-MKH : sıçan pankreatik adacık kaynaklı mezenkimal kök hücre
Sst : Somatostatin
T1D : Tip 1 diyabet
T2D : Tip 2 diyabet
VEGF : Vascular endothelial growth factor

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Telomer ve telomeraz.....	4
Şekil 2.2 Elde edildikleri kaynaklara göre kök hücre sınıflandırması	6
Şekil 2.3 Pankreasın embriyonik gelişim süreci.	10
Şekil 2.4 Pankreasın embriyonik gelişim sürecinin moleküler mekanizması	11
Şekil 2.5 Pankreas rejenerasyonu ve neogenezini.....	13
Şekil 3.1 Ekspresyon vektörü olarak kullanılan pIRES2-DsRed-Express2 haritası.	25
Şekil 4.1 Sıçan pankreatik adacık kaynaklı kök hücrelerin akım sitometrisi (hücre sayar) ile yüzey belirteçlerinin belirlenmesi.	33
Şekil 4.2 sPA-MKH'lerin kök hücre belirteçlerine yönelik immünfloresan boyamalar ile gösterilmesi.....	34
Şekil 4.3 sPA-MKH'lerin adipojenik hücre farklılaştırması çalışması.....	35
Şekil 4.4 sPA-MKH'lerin osteojenik hücre farklılaştırması çalışması.	36
Şekil 4.5 Sıçan pankreas adacık izolasyonu.....	37
Şekil 4.6 Ngn3, Pax4 ve Gck genlerinin PCR ile çoğaltılması sonucu agaroz jel görüntüsü.	38
Şekil 4.7 Ekspresyon vektörüne ilgili gen aktarılması sonrasında kesim öncesi ve kesim sonrası plazmitlerin agaroz jel üzerinde incelenmesi.	39
Şekil 4.8 Grup 1 (Ngn3) hücrelerinin gen aktarımı sonrasında mikroskop altındaki görüntüleri.	41
Şekil 4.9 Grup 2 (MafA) hücrelerinin gen aktarımı sonrasında mikroskop altındaki görüntüleri.	42

Şekil 4.10 Grup 2 (MafA) hücrelerinin gen aktarımı sonrası ilerleyen pasajdaki görünümleri	43
Şekil 4.11 Grup 3 (Pax4) hücrelerinin gen aktarımı sonrasında mikroskop altındaki görüntüleri.	43
Şekil 4.12 Grup 3 (Pax4) hücrelerinin gen aktarımı sonrasında mikroskop altındaki 21. gün görüntüleri..	44
Şekil 4.13 Grup 4 (Pax4-MafA) hücrelerinin gen aktarımı sonrasında mikroskop altındaki görüntüleri.	45
Şekil 4.14 Grup 4 (Pax4-MafA) hücrelerinin ilerleyen pasajdaki görünümleri.....	45
Şekil 4.15 Grup 5 (Pax4-Gck) hücrelerinin gen aktarımı sonrasında mikroskop altındaki görüntüleri.	46
Şekil 4.16 Grup 6 (Ngn3-MafA) hücrelerinin gen aktarımı sonrasında epitel hücre ve mezenkimal kök hücre benzeri görüntüleri.	47
Şekil 4.17 Grup 6 (Ngn3-MafA) hücrelerinin gen aktarımı sonrası ilerleyen pasajda görünümleri.	47
Şekil 4.18 Grup 7 hücrelerinin gen aktarımı sonrasında mikroskop altındaki görüntüleri..	48
Şekil 4.19 Grup 8 hücrelerinin gen aktarımı sonrasında mikroskop altındaki görüntüleri.	49
Şekil 4.20 Grup 9 hücrelerinin gen aktarımı sonrasında mikroskop altındaki görüntüleri.	49
Şekil 4.21 Hücrenin genomuna girmiş aktarılan genlerin kopya sayıları.	50
Şekil 4.22 Grup 1 (Ngn3) hücrelerinin gen aktarılmamış olan (Grup 10) hücelere göre pankreas adacık belirteç genlerinin hücre içi ekspresyonundaki değişimi.....	51
Şekil 4.23 Grup 2 (MafA) hücrelerinin gen aktarılmamış olan (Grup 10) hücelere göre pankreas adacık belirteç genlerinin hücre içi ekspresyonundaki değişimi.....	52
Şekil 4.24 Grup 3 (Pax4) hücrelerinin gen aktarılmamış olan (Grup 10) hücelere göre pankreas adacık belirteç genlerinin hücre içi ekspresyonundaki değişimi.....	53

Şekil 4.25 Grup 4 (Pax4-MafA) hücrelerinin gen aktarılmamış olan (Grup 10) hücelere göre pankreas adacık belirteç genlerinin hücre içi ekspresyonundaki değişimi.....	53
Şekil 4.26 Grup 5 (Pax4-Gck) hücrelerinin gen aktarılmamış olan (Grup 10) hücelere göre pankreas adacık belirteç genlerinin hücre içi ekspresyonundaki değişimi.....	54
Şekil 4.27 Grup 6 (Ngn3-MafA) hücrelerinin gen aktarılmamış olan (Grup 10) hücelere göre pankreas adacık belirteç genlerinin hücre içi ekspresyonundaki değişimi.....	55
Şekil 4.28 Grup 7 (Ngn3-Gck) hücrelerinin gen aktarılmamış olan (Grup 10) hücelere göre pankreas adacık belirteç genlerinin hücre içi ekspresyonundaki değişimi.....	56
Şekil 4.29 Grup 8 (Ngn3-Pax4) hücrelerinin gen aktarılmamış olan (Grup 10) hücelere göre pankreas adacık belirteç genlerinin hücre içi ekspresyonundaki değişimi.....	57
Şekil 4.30 Grup 9 (Ngn3-Pax4-MafA) hücrelerinin gen aktarılmamış olan (Grup 10) hücelere göre pankreas adacık belirteç genlerinin hücre içi ekspresyonundaki değişimi..	58
Şekil 4.31 Gen aktarımı sonrasında 1.Grup (Ngn3) hücrelerinin beta hücre ve diğer adacık hücre belirteçlerine yönelik immünfloresan boyanması.....	60
Şekil 4.32 Gen aktarımı sonrasında 2. Grup (MafA) hücrelerinin beta hücre ve diğer adacık hücre belirteçlerine yönelik immünfloresan boyanması.....	61
Şekil 4.33 Gen aktarımı sonrasında 3. Grup (Pax4) hücrelerinin beta hücre ve diğer adacık hücre belirteçlerine yönelik immünfloresan boyanması.....	61
Şekil 4.34 Gen aktarımı sonrasında 4. Grup (Pax4-MafA) hücrelerinin beta hücre ve diğer adacık hücre belirteçlerine yönelik immünfloresan boyanması.	62
Şekil 4.35 Gen aktarımı sonrasında 5. Grup (Pax4-Gck) hücrelerinin beta hücre ve diğer adacık hücre belirteçlerine yönelik immünfloresan boyanması.	62
Şekil 4.36 Gen aktarımı sonrasında 6. Grup (Ngn3-MafA) hücrelerinin beta hücre ve diğer adacık hücre belirteçlerine yönelik immünfloresan boyanması.	63
Şekil 4.37 Gen aktarımı sonrasında 7. Grup (Ngn3-Gck) hücrelerinin beta hücre ve diğer adacık hücre belirteçlerine yönelik immünfloresan boyanması.	63

Şekil 4.38 Gen aktarımı sonrasında 8. Grup (Ngn3-Pax4) hücrelerinin beta hücre ve diğer adacık hücre belirteçlerine yönelik immünfloresan boyanması.	64
Şekil 4.39 Gen aktarımı sonrasında 9. Grup (Ngn3-Pax4-MafA) hücrelerinin beta hücre ve diğer adacık hücre belirteçlerine yönelik immünfloresan boyanması	64
Şekil 4.40 Gen aktarılmamış 10. Grup (Kontrol) hücrelerin beta hücre ve diğer adacık hücre belirteçlerine yönelik immünfloresan boyanması.....	65
Şekil 4.41 Western blot hibridizasyon analizi sonucu..	66
Şekil 4.42 Endokrin farklılaşma sonrasında 1. Grup (Ngn3) hücrelerin kültürdeki görünümleri.	68
Şekil 4.43 Endokrin farklılaşma sonrasında 2. Grup (MafA) hücrelerin kültürdeki görünümleri.	68
Şekil 4.44 Endokrin farklılaşma sonrasında 3. Grup (Pax4) hücrelerin kültürdeki görünümleri.	69
Şekil 4.45 Endokrin farklılaşma sonrasında 4. Grup (Pax4-MafA) hücrelerin kültürdeki görünümleri.	69
Şekil 4.46 Endokrin farklılaşma sonrasında 5. Grup (Pax4-Gck) hücrelerin kültürdeki görünümleri.	70
Şekil 4.47 Endokrin farklılaşma sonrasında 6. Grup (Ngn3-MafA) hücrelerin kültürdeki görünümleri.	70
Şekil 4.48 Endokrin farklılaşma sonrasında 8. Grup (Ngn3-Pax4) hücrelerin kültürdeki görünümleri.	71
Şekil 4.49 Endokrin farklılaşma sonrasında 9. Grup (Ngn3-Pax4-MafA) hücrelerin kültürdeki görünümleri.	71
Şekil 4.50 Endokrin farklılaşma sonrasında 10. Grup (Kontrol) hücrelerin kültürdeki görünümleri.	72
Şekil 4.51 Endokrin farklılaşmaların İnsülin boyaması..	73

Şekil 4.52 Endokrin farklılaşmaya yönlendirdikten sonra gen aktarılmış hücrelerin pankreas adacık hücre belirteçleri genlerinin ekspresyon analizi 75

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Genlerin çoğaltılması için tasarlanan primerler ve dizileri.....	22
Çizelge 3.2. PCR sırasında gene spesifik primerler için bağlanma sıcaklıkları.....	22
Çizelge 3.3. Ligasyon sonrası elde edilen klonlama vektörleri.....	23
Çizelge 3.4. Hücre Grupları ve Aktarılan Genler.....	26
Çizelge 3.5. Gen ekspresyon profili belirlemede kullanılan primerler ve dizileri.....	28
Çizelge 4.1. Endotoksinde temizlenmiş plazmitlerin spektrofotometrede ölçülen değerleri.....	40

1 GİRİŞ VE AMAÇ

Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization, WHO) verilerine göre günümüzde yaklaşık 347 milyon insan diyabet hastasıdır. Diyabetin tedavisi için farklı yollar denenmiş olsa da kesin tedavisi henüz bulunamamıştır.

Kandaki glikoz seviyesinin dengede kalması için pankreatik adacıklarda insülin hormonu salgılanan beta hücrelerinin otoimmün yıkımı sonucunda kandaki glikoz seviyesi ayarlanamadığı için hiperglisemi ortaya çıkmaktadır. Hipergliseminin yol açtığı çeşitli komplikasyonlar ile seyreden bu otoimmün hastalık tip 1 diyabet olarak tanımlanmaktadır. Tip 1 diyabetli hastaların günlük hayatlarını sağlıklı sürdürebilmeleri için insülin takviyesine ihtiyaç vardır. Ancak kesin çözüm sağlanamaması nedeniyle farklı tedavi yolları araştırılmaktadır.

Son zamanlarda hücresel tedavi yaklaşımları birçok hastalık için umut ışığı olmuştur. Özellikle kişinin kendi vücudundan elde edilerek kullanılacak olan (otolog) kök hücreler immün red oluşturmayaacağı için araştırmalarda sıklıkla tercih edilmektedir. Kendini yenileyebilen, bölünme kapasitesi yüksek ve farklılaşma potansiyelleri olan kök hücreler birçok hastalık gibi diyabetin tedavisi için de araştırılmaktadır.

Kök hücrelerin farklılaşma özellikleri kullanılarak yıkıma uğramış olan beta hücrelerinin yerine insülin salgılayabilen kök hücre nakledilmesi yeni tedavi araştırmalarından biri olarak önerilmektedir. Kök hücrelerin farklılaştırılabilmesi için kimyasal ajanlar kullanılarak yönlendirme sağlanabilir. Uygulanabilecek yöntemlerden birisi de gen aktarım teknolojisidir. İnsülin üretebilen beta benzeri hücre elde edilmesi için insülin proteininin üretiminde rolü olan transkripsiyon faktörleri kullanılabilir. Ayrıca embriyonik dönemde pankreasın gelişiminde önemli rolleri olan transkripsiyon faktörleri ile insülin üretebilen hücrelere farklılaştırma sağlanabilir. Elde edilmek istenen hücrenin glikoza cevap olarak insülin üretebilmesi için de glikoz algı mekanizmasında rol oynayan bir transkripsiyon faktörü aktarılması hedeflenen hücreye ulaşmayı sağlayacaktır.

Bu çalışmada sıçan pankreatik adacıklardan elde edilen mezenkimal kök hücrelere (sPA-MKH) Ngn3 (Neurogenin3), Pax4 (paired box gene 4), MafA (musculoaponeurotic

fibrosarcoma oncogene homolog A) ve Gck (Glucokinase) transkripsiyon faktörleri aktarılarak glikoza cevap niteliğinde insülin salgılayabilen beta benzeri hücrelerin elde edilmesi amaçlanmıştır. Ayrıca gen aktarımı sonrasında hücreler kimyasal olarak indüklenerek iki farklı teknikte uygulanmıştır. Böylece gen aktarımı ve kimyasal indüklemenin hücreler üzerindeki etkileri karşılaştırmalı olarak incelenmiştir.

Bu yaklaşım kullanılarak elde edilecek olan hücrelerin glikoza cevap olarak insülin üretebilmesinin sağlanması halinde, bu hücrelerin tip 1 diyabetli hastalarda otolog hücre sel tedavisinde kullanılmak için olanak sağlayacaktır.

2 GENEL BİLGİLER

2.1 Kök Hücreler

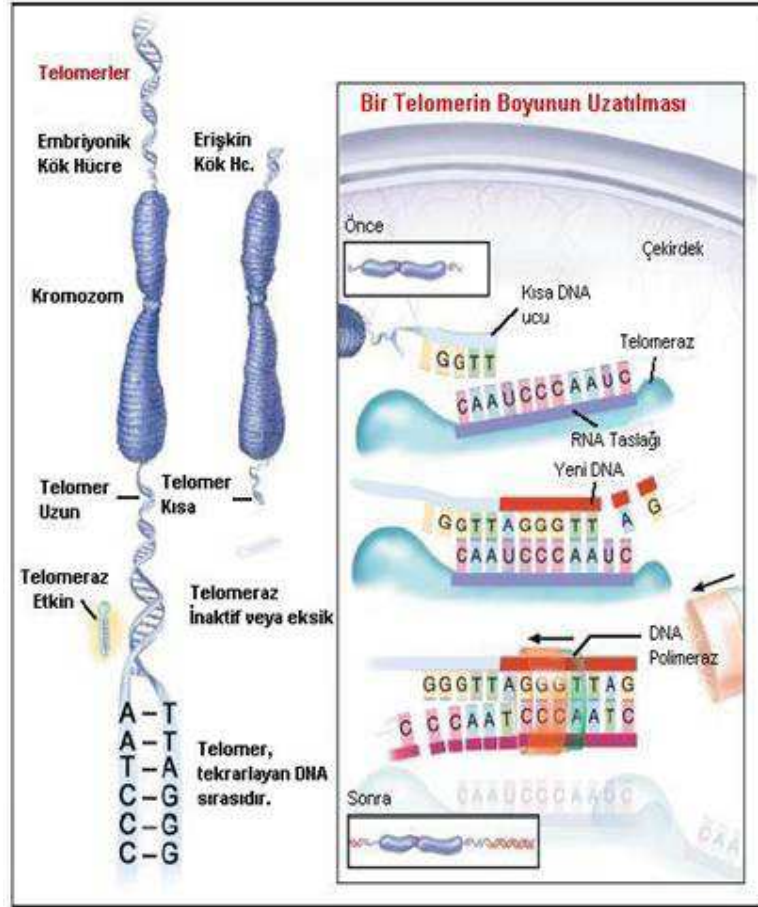
Hücre esaslı tedavinin (hücre sel tedavinin) amacı, hasar gören bir hücre, doku veya organın biyolojik işlevini yerine koymak, tamir etmek veya genişletmektir. Bir hedef organa, o organın işlevlerini eski haline getirmeye yetecek sayıda ve kalitede izole edilmiş ve özellikleri belirlenmiş olan hücrelerin nakledilmesiyle bu amaca ulaşılabilir. Yenileyici (rejeneratif) veya tamir edici (reparatif) tıp olarak da adlandırılan bu alanda kök hücreler oldukça önemli kullanıma potansiyeli göstermektedir.

Kök hücreler uzun zaman dilimleri boyunca bölünebilme ve kendilerini yenileyebilme yeteneğine sahip, özelleşmemiş hücrelerdir. Kök hücrelerden farklılaşma sonucu elde edilen bir yavru hücre, özelleşmiş hücrelere kaynaklık edebilir.

Hücrelerin bölünme kapasitesini belirleyen faktörlerden biri doğrusal kromozomların ucunda yer alan ve “telomer” denilen DNA zincirleridir. Telomerler kromozom uçlarının parçalanmasını ve dağılmasını ya da diğer kromozomlarla kaynaşmasını engelleyerek, kromozomların yapısal bütünlüğünün korunmasını sağlayan, binlerce kez tekrarlanan kısa DNA tekrar dizileridir (insanda TTAGGG). Her bir bölünme sonucunda çeşitli sebeplerden dolayı bu telomerik DNA kısmı kısalır. Bu kaybı karşılamak için, telomerler bünyesinde tersine transkriptaz telomeraz proteinini (hTERT) ve telomeraz RNA (hTR) taşıyan bir ribonükleoprotein olan telomeraz enzimi tarafından uzatılır. Enzim, her replikasyon sonrası telomerin kısalmasını önlemek için sayısız telomerik tekrar dizilerini kromozomun 3' ucuna takarak kromozomun kısalmasını engeller (Şekil 2.1.).

Somatik hücrelerin çoğunda telomeraz enzim aktivitesi düşüktür ve bundan dolayı, her hücre bölünmesi sonucu kromozomların telomerleri kısalır. Birçok bölünmeden sonra telomerde ciddi aşınmalar olur ve hücre bölünme kapasitesini yitirir. Diğer yandan, insan germ, tümör ve embriyonik kök hücre serilerinde telomeraz etkinliği bulunmuştur ve bu hücre tiplerinin sınırsız bir şekilde kendini yenileyebilme kapasitesinden bu enzimin

sorumlu olduğu düşünölmektedir. Kök hücrelerin de telomeraz enzim aktivitesi yüksek olduğu için uzun zaman bölünerek kendilerini yenileyebilirler.



Şekil 2.1. Telomer ve telomeraz.

Bir kök hücrenin temel özelliklerinden biri bu hücrenin özelleşmiş işlevleri yerine getirebilecek herhangi bir dokuya benzer yapıya sahip olmamasıdır. Fakat özelleşmemiş kök hücreler kalp kası, kan veya sinir hücreleri gibi özelleşmiş hücrelere kaynaklık edebilirler. Kök hücreler farklılaşma özelliği olarak kabul edilen bu yetenekleri bakımından totipotent, pluripotent ve multipotent olarak adlandırılan üç gruba ayrılmaktadır.

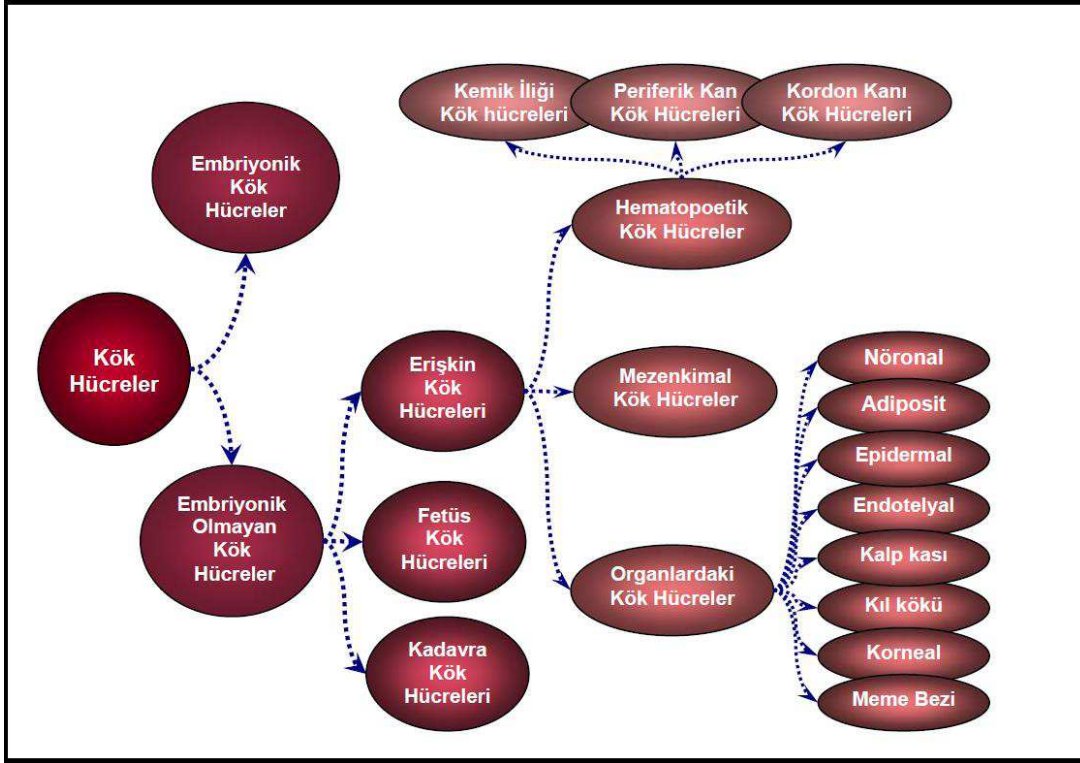
Vücuttaki tüm hücelere dönüşebilecek potansiyele sahip olan, sınırsız farklılaşma özelliği gösteren ilk embriyonel hücreye totipotent hücre denmektedir. Erken embriyonik dönemde 4 hücreden 8 hücreye kadar ki tüm blastomerler totipotenttirler. Bu hücreler, tam bir embriyo ve embriyo dışı yapıları oluşturabilme yeteneğindedirler.

Embriyonik dönemin ilerleyen safhalarında oluşan blastosistin içindeki iç hücre kitlesinden elde edilen hücreler vücudun endoderm, ektoderm ve mezoderm denilen üç embriyonik tabakasından köken alan pek çok farklı hücre çeşidine (yaklaşık 270 çeşit hücre) kaynaklık edebilirler. Bu özelliğe sahip kök hücelere pluripotent hücreler denmektedir.

Gelişimin ilerleyen dönemlerinde (fetal dönemde) hücreler biraz daha özel görevlere sahip olur ve erişkin kök hücelere dönüşürler. Bu erişkin kök hücreler tipik olarak yer aldıkları dokunun hücre tiplerini üretirler. Biraz daha özelleşmiş olan bu kök hücelere multipotent hücreler denmektedir (Karaöz ve Ovalı, 2004).

2.1.1 Kök Hücre Çeşitleri

Kök hücreler elde edildikleri kaynaklara göre; embriyonik gelişim sürecinin erken dönemlerinde blastosistin iç hücre kitlesinden elde edilen embriyonik kök hücreler ve embriyonik olmayan kaynaklardan elde edilen kök hücreler olarak iki ana sınıfa ayrılır. Embriyonik olmayan kök hücreler de dokuya özgün (erişkin) kök hücreler, doğum sonrası dönemdeki (fetal) kök hücreler ve kadavradan elde edilen kök hücreler olarak sınıflandırılırlar (Şekil 2.2.) (Karaöz ve Ovalı, 2004).



Şekil 2.2 Elde edildikleri kaynaklara göre kök hücre sınıflandırması (İnan ve Özbilgin, 2009).

2.1.1.1 Embriyonik Kök Hücreler

Embriyonik kök hücreler (EKH) blastosistin iç hücre kitlesinden elde edilen pluripotent (üç embriyonik tabakadan köken alan pek çok farklı hücre çeşidine kaynaklık edebilen) hücrelerdir ve ilk olarak 3,5 günlük fare blastosistlerinin iç hücre kitlesinden elde edilmişlerdir. Lösemi inhibitör faktör (LIF) varlığında uygun bir besleyici fibroblast tabakaya yerleştirildiklerinde, proliferasyon olarak sonsuza kadar pluripotent kalırlar (Evans and Kaufmann 1981; Martin 1981).

EKH'ler iki çok önemli özelliğe sahiptirler ve bu özellikler sayesinde rejeneratif tıbbın odak noktası haline gelmişlerdir. Bu özellikler; kendini yenileme süreci ile farklılaşmaksızın proliferasyon olma becerisi ve farklılaşma için indüklendiklerinde özelleşmiş hücre türleri oluşturma potansiyelleridir (Smith, 2001).

Oluşturulan ilk insan embriyonik kök hücresi 1998 yılında bir *in vitro* fertilizasyon kliniğinde “kullanılmayan” zigotlardan izole edilmiştir (Thomson et al., 1998). Bu ve bunu izleyen çalışmalarda fare EKH’lerinde olduğu gibi insan EKH’lerde de farklılaşma olmadan kendini yenileme becerisi ve pluripotent bir yapıda oldukları belirtilmiştir.

2.1.1.2 Embriyonik Olmayan Kök Hücreler

Embriyonik olmayan kök hücreler erişkinlerden, fetal kaynaklardan ve kadavradan elde edilen ve multipotent özellikteki kök hücrelerin oluşturduğu sınıftır. Erişkin kök hücreler de kendi arasında;

1. Hematopoietik kök hücreler
 - 1.1. Kemik iliği kök hücreler
 - 1.2. Periferik kan kök hücler
 - 1.3. Kordon kanı kök hücreler
2. Stromal kök hücreler (Mezenkimal kök hücreleri)
3. Organlarda yerleşik diğer erişkin kök hücreler şeklinde sınıflandırılmaktadır (Karaöz ve Ovalı, 2004).

Hematopoietik kök hücreler (HKH) çoğunlukla kemik iliğinde yerleşmiş, sürekli olarak kendilerini yenileyebilen, sınırlı sayıda çoğalma potansiyeline sahip ve kanda bulunan hücre türlerine farklılaşabilen erişkin kök hücrelerdir. Uygun sitokinlerin ve büyüme faktörlerinin etkisi ile hematopoietik kuşağın bütün hücrelerine farklılaşabilirler. HKH’ler CD 45, CD 34 ve CD 14 yüzey belirteçlerini taşırlar (Karaöz ve Ovalı, 2004).

Mezenkimal kök hücreler (MKH) ise ilk kez fetal buzağı serumu içeren kemik iliğinin yayılması sonrasında, fibroblastlara benzeyen, kemik hücrelerine ve adipositlere farklılaşan, adherent hücre kolonilerinin geliştiğini gösteren Fridenshtein tarafından tanımlanmıştır (Koton et al., 2001). Sonraki *in-vivo* ve *in-vitro* çalışmalar sonucunda MKH’ler her üç germ yaprağından köken alan hücre ve/veya dokuları oluşturan multipotent kök hücreler olarak tanımlanmıştır (Karaöz ve Ovalı, 2004).

MKH eldesi için en sık kullanılan kaynak kemik iliğidir. Kollajen I ve IV, laminin ve fibronektin gibi matriks proteinlerini sentezleyen, büyük poligonal ve fibroblast benzeri

koloni oluşturan hücreler olan MKH'ler tipik hemetopietik antijenlerden olan CD 45, CD 34 ve CD 14'ü eksprese etmezler. Kemik iliğinde önemli role sahip olan hiyalüronan ve osteopontin gibi çeşitli bağlayıcılara yönelik bir almaç olan CD 44'ü kuvvetli bir şekilde eksprese etmektedirler (Karaöz ve Ovalı, 2004). Aynı zamanda CD 29, CD 90 ve CD 106 hücre yüzey belirteçlerini yüksek oranda eksprese ettiğı bilinmektedir (Karaöz et al., 2009).

Adipoz, kas, kemik, kıkırdak vb. birçok dokudan kaynaklanan mezenkimal kök hücreler de aynı karakteri taşıyan multipotent hücrelerdir.

Pankreas, diş, beyin, kas, deri, kıl folikülü gibi kaynaklardan elde edilen kök hücreler organlarda yerleşik diğeri erişkin kök hücreler sınıfına girmektedir. Erişkin kök hücrelerin elde edilmesi EKH'lere oranla daha kolay olduğı için gelecekte hücre sel tedavi amacıyla kullanıma daha yakın görülmektedir. Özellikle immün cevabın oluşmasını da engelleyeceğı için otolog kaynaklı erişkin kök hücre tedavisinin tercih edileceğı düşünölmektedir.

Tip 1 diyabet, multiple skleroz (MS) ve romatoid artrit gibi giderek artan ve sıklıkla görölen tüm otoimmun hastalıklar; kesin nedeni bilinmeyen ölümcül bir hastalık olan Amyotrophik lateral skleroz (ALS); çeşitli nedenlere bağı olarak ortaya çıkan tedavisi için canlı bir vericiden nakil gerektiren kalp, karaciğer ve böbrek gibi organların yetmezlikleri; çeşitli seviyelerdeki omurilik hasarı sonucu ortaya çıkan felçler; Alzheimer ve Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıklar; musküler distrofi gibi nöro-musküler dejeneratif hastalıklar gibi birçok hastalık için kök hücreler umut olmuştur.

Erişkin kök hücreler kaynaklandığı dokunun hücrelerine farklılaşmaya daha yatkındırlar. Bu nedenle herhangi bir hastalığın tedavisi için, hasar olan doku veya organdan izole edilen kök hücrelerin kullanılması daha çok tercih edilen bir yöntemdir. Örneğın tip 1 diyabetin tedavisi için pankreatik adacıktan kaynaklanan erişkin kök hücrelerin kullanılması ile insülin üretebilen hücrelerin elde edilmeye çalışıldığı birçok çalışma vardır.

2.2 Diyabet

Pankreas sindirim ve endokrin sisteminde önemli rol oynayan bir salgı organıdır. Pankreas iki ana hücre tipinden oluşmaktadır. Sindirim enzimleri salgılayan eksokrin hücreler ve Langerhans adacıklarında konumlanan, kana hormonları salgılayan endokrin hücreler. Yetişkin bir insan pankreası; yaklaşık olarak bir milyon, yani pankreasın %1-2'sini kaplayan Langerhans adacığından oluşmaktadır. Langerhans adacıkları alfa (α), beta (β) ve delta (δ) isimli üç ana hücreden oluşmaktadır. İnsülin salgılayan β hücreleri adacıkların %75'ini, glukagon salgılayan α hücreleri %25'ini ve somatostatin salgılayan δ hücreleri ise yaklaşık olarak %5'ini oluşturmaktadır. Adacıklarda bulunan bir diğer hücre tipi PP hücreleri ise pankreatik polipeptit salgılayıcılar ve bu polipeptidin işlevi tam olarak bilinmemektedir (Wong, 2011).

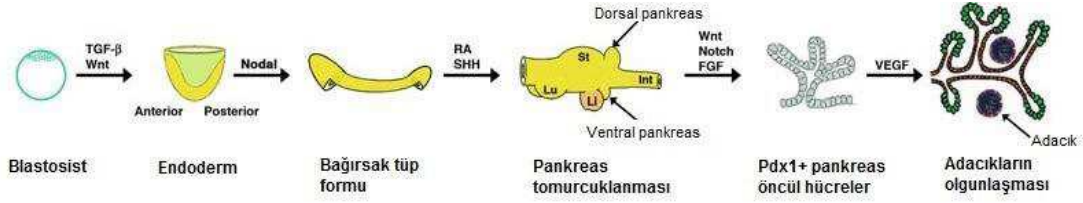
Pankreatik adacıklarda (Langerhans adacıkları) bulunan; β -hücreleri, α -hücreleri, δ -hücreleri birlikte çalışarak normoglisemiyi sağlarlar. İnsülin salınımının yetersiz olduğu veya olmadığı durumlarda hiperglisemi ortaya çıkmaktadır (Kim et al, 2009). Hiperglisemi de göz, böbrek, sinirler, kalp gibi çeşitli organlarda hasara neden olmaktadır. Hiperglisemi sonucu ortaya çıkan bir grup metabolik düzensizlikle oluşan bu hastalığa Diabetes Mellitus (DM) denmektedir (Scobie, 2007).

Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization, WHO) verilerine göre DM'un 2025 yılına kadar 380 milyon insanı etkilemesi beklenmektedir. Dünya üzerindeki toplam insan ölümlerinin %5'inin diyabetten kaynaklandığı ve bunun önümüzdeki on yılda %50 oranında artacağı tahmin edilmektedir.

İki tip diyabet vardır. Tip 1 diyabet (insüline bağımlı diyabet) (T1D) pankreatik β hücrelerinin otoimmün yıkımı sonucu yetersiz insülin salınımı veya insülin yokluğuyla, genellikle ergenlik başlangıcında ortaya çıkar ve hastalar dışarıdan insülin desteğine ihtiyaç duyarlar. Tip 2 diyabet (insüline bağımlı olmayan diyabet) (T2D) ise sistemik insülin direnci ve β hücrelerinin fonksiyon kaybı sonucu, genellikle obeziteyle ve yaşlılıkla ortaya çıkan diyabet tipidir ve hastalar insülin desteğine ihtiyaç duymazlar. Bu tip diyabet, hastaların hayat şartlarını ve yeme alışkanlıklarını değiştirmeleri ile önlenebilir. Tip 1 diyabette ise hücrelerin kendini yenilemesi veya otoimmün sistemin yıkıcı etkisinin engellenmesi gerekmektedir (Mccall et al., 2010; Scobie, 2007; Ricordi et al., 2012).

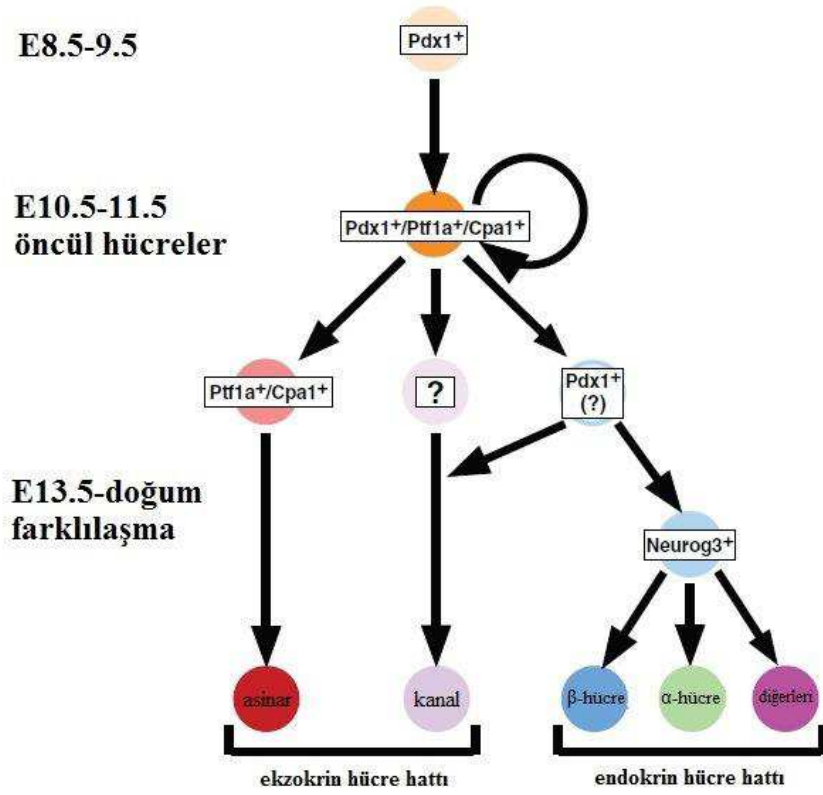
2.2.1 Pankreas gelişim mekanizması

Memeli pankreası embriyonik gelişim sırasında önbağırsağın arka tarafından, ileride baş ve kuyruk kısmını oluşturacak olan ventrale ve dorsale doğru çıkıntı yapan iki kısmın birleşmesiyle oluşur (Şekil 2.3.).



Şekil 2.3 Pankreasın embriyonik gelişim süreci (Hori, 2009).

Fare embriyonik gelişimi sırasında pankreasın ilk kanıtları yaklaşık 8,5'üçüncü (E8,5) günde pankreatik tomurcukları oluşturan hücrelerde homeodomain transkripsiyon faktörü olan Pdx1 (pancreatic and duodenal homeobox gene 1) ekspresyonunun görülmesiyle başlar. Bundan kısa bir süre sonra farklılaşmamış olan bu öncül hücrelerde bHLH (basic helix loop helix) transkripsiyon faktörü olan Ptf1a'nın (pancreas-specific transcription factor 1a) yüksek derecede eksprese olduğu ve aynı zamanda sindirim (asinar) enzimi olan Cpa1 transkripsiyon faktörünün düşük seviyede eksprese olduğu görülmektedir. Tüm olgun pankreatik hücreler bu Pdx1+/Ptf1a+ olan öncül hücrelerden farklılaşmaktadır (Şekil 2.4.). Yapılan bazı çalışmalarda bu genler susturulduğunda pankreas gelişiminin durduğu gösterilmiştir. E13,5'tan doğuma kadar hücre farklılaşması devam etmektedir. bHLH transkripsiyon faktörü olan Neurogenin3 (Ngn3) ekspresyonu adacık hücre hattının oluşacağı progenitörlerde geçici olarak eksprese olarak, endokrin ve ekzokrin hücre hatlarının aynı anda farklılaşmasını başlatır. Cpa1 ekspresyonu ise buradan sonra öncüllerde değil asinar hücrelere spesifik olarak eksprese olmaktadır. Pdx1 ekspresyonu olgun beta hücrelerinde de yüksektir (Murtaugh and Kopinke, 2008).



Şekil 2.4 Pankreasın embriyonik gelişim sürecinin moleküler mekanizması (Murtaugh and Kopinke, 2008).

Endokrin hücre hattının farklılaşmasında notch sinyal yolağı önemli rol oynamaktadır. Notch sinyal yolağında bHLH transkripsiyon faktörü olan NeuroD (neurogenic differentiation) ile Ngn3 direk etkileşim halindedir. NeuroD'nin ve Ngn3'ün fonksiyonunda azalma olması endokrin hücre gelişimini engellemektedir. Böyle bir durumda olgun beta hücresi MafA (musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog A) transkripsiyon faktörünün etkisiyle oluşur (Noguchi, 2010).

FGF (Fibroblast growth factor) sinyal yolağı embriyoda endoderm gelişimi sırasında ön-arka (anterior-posterior) kısımların oluşumunu kontrol etmektedir. Mesoderm tarafından salgılanan FGF2 karaciğer ve akciğerin oluşumunu sağlarken, notokordun

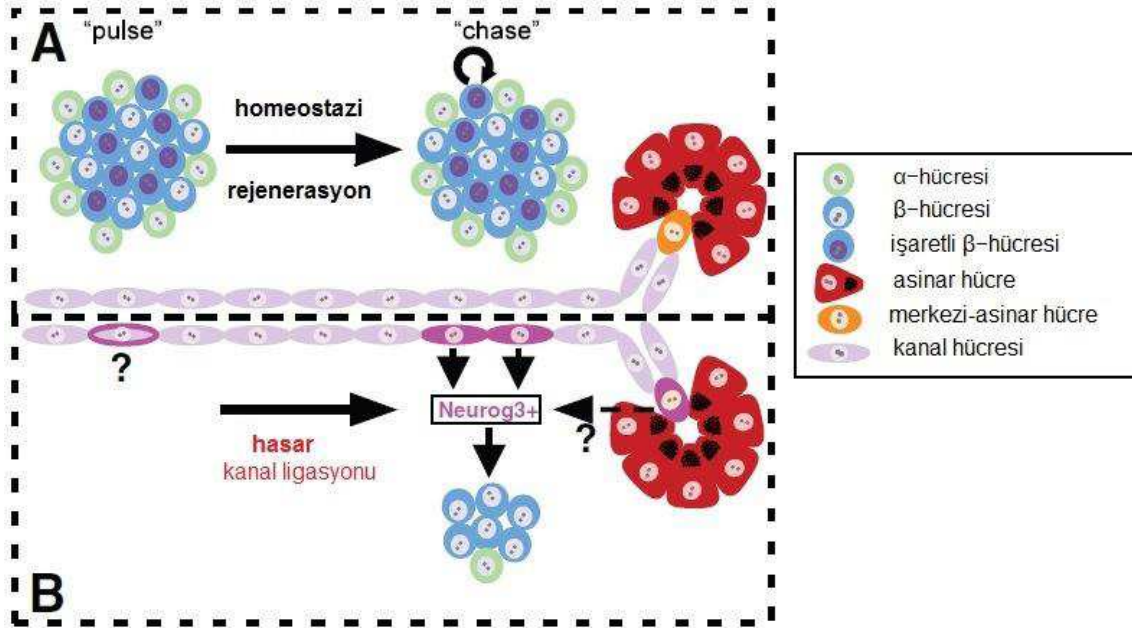
salgıladığı FGF2 sonic hedgehog (SHH) sinyal yolağını baskılayarak pankreas gelişimini desteklemektedir (Liew, 2010).

2.3 Diyabetin Tedavisi ve Kök Hücreler

Diabetes mellitus henüz kesin tedavisi olmayan ve dünya genelinde ciddi etkileri olan bir hastalıktır. Yaklaşık 80 yıl önce insülinin keşfinden sonra diyabetin tedavisinde büyük bir yol kat edilememiştir. Ayrıca pankreas veya adacık nakli dezavantaj ve komplikasyonlara sebep olmasa da uygun donör bulunamaması ve immün ret dolayısıyla tedaviyi sağlamamıştır. Çünkü adacık hücre nakli klinik olarak uygulanan bir yöntem olsa da tedavinin geçici bir süre sağlanabilmesi bu yöntemin yetersiz olmasına neden olmaktadır. Transplantasyon için uygun insan beta hücresi elde etmekte çok zordur. Bu nedenle araştırmacılar yeni tedavi yolları aramaya yönelmiştir. Çeşitli kaynaklardan elde edilen kök hücrelerin insülin üretebilen hücrelere farklılaşması yeni umutlar doğurmuştur (Wong, 2011; Akinci et al., 2012; Ricordi et al., 2012).

Öncül hücrelerin direk olarak veya programlanarak beta hücresine farklılaştırılması için pankreasın ve beta hücrelerinin embriyonik dönemde oluşum mekanizmasının veya hasar sonucu yetişkinlerde nasıl yenilediğinin anlaşılması gerekmektedir (Noguchi, 2010).

Doğum sonrasında pankreasta herhangi bir hasar olmadığı sürece öncül hücrelerden endokrin veya ekzokrin hücre farklılaşması gerçekleşmemektedir. Yapılan çalışmalara bakıldığında yetişkinde pankreas “neogenezi” olarak tanımlanan bir hasar sonucu pankreatik kanal ve asinar hücrelerinin adacık hücrelerine farklılaşmaya başladığı ve Ngn3+ öncül hücrelere dönüştükleri görülmüştür (Şekil 2.5.). Bunu destekleyen iki olay vardır. İlki pankreatik adacıkların doğum sonrasında da artmaya devam etmesi, ikincisi de embriyoda adacık ve öncül hücrelerin kanal yapılarının içinde veya yanında yer almasıdır (Murtaugh and Kopinke, 2008).



Şekil 2.5 Pankreas rejenerasyonu ve neogenezi (Murtaugh and Kopinke, 2008).

2.3.1 Gen Aktarımı ile İnsülin Üreten Hücre Eldesi

Embriyogenez sırasında hücreler sıralı bir farklılaşma dizisi geçirerek vücudu oluşturan yaklaşık 200 farklı hücre tipinden birini oluştururlar. Farklılaşmasını tamamlayan bu hücreler uzun süre stabil bir hal alırlar. Ancak bazen farklılaşmış olan bu hücrelerde, gelişim sırasında hücre farklılaşmasında önemli rol oynayan spesifik bazı transkripsiyon faktörlerinin tekrar eksprese olması sağlanarak farklı bir hücre tipine geri programlanması mümkündür. Bunun gibi bir transformasyon için en az iki yada üç transkripsiyon faktörünün ekspresyonunun artması gereklidir. Direk olarak hedef genin ekspresyonunu sağlamazlar, fakat hücrenin yeni bir gen ekspresyon profiline ulaşmalarını sağlarlar. En bilinen örnek olarak somatik hücrelerin embriyonik kök hücre haline yeniden programlanmasıdır (IPS hücreleri) (Zhou et al., 2008).

Transkripsiyon faktörleri ile direk olarak yeniden hücre programlanması çalışmalarından biri de diyabet tedavisinde transplantasyon için kullanılabilecek olan insülin üreten beta benzeri hücre elde etme üzerinedir (Akinci et al., 2012).

Transkripsiyon faktörleri farklılaşma, çoğalma ve apoptoz gibi biyolojik süreçleri kontrol eden önemli hücre içi moleküllerdir. Kromozom üzerinde yer alan promotör ya da hızlandırıcı (enhancer) bölgelerindeki belli DNA dizilerine bağlanarak genlerin aktive olmalarını sağlarlar. Önceki çalışmalarla pankreas beta hücrelerinin gelişiminde ve fonksiyonlarının yerine getirilmesinde görev alan birçok transkripsiyon faktörü ortaya çıkarılmıştır (Bernardo et al., 2008). Bu faktörlerin doğrudan ya da dolaylı olarak beta hücrelerinin insülin promotör bölgesini uyararak, insülin sentezinde ve bu hücrelere özgün diğer özelleşmiş görevlerinin yerine getirilmesinde etkin rol aldıkları ve özellikle bu faktörlerin insülin-glikoz regülasyonunda önemli görevleri olduğu gösterilmiştir (Andrali et al., 2008).

Yapılan bilimsel çalışmalarla insülin miktarını artıran birtakım transkripsiyon faktörleri tanımlanmıştır: Pdx1, MafA, MafB, NeuroD1, Ngn3, Pax4, Pax6, Sox9, Sox17, Hnf1a, Hnf4a, Hnf6, Isl1, FoxA2, Nkx6.1, Nkx2.2 ve diğerleri (Spence et al., 2009; Odom et al., 2004; Kaneto et al., 2008; Jacquemin et al., 2000; Heremans et al., 2002). Bu moleküller insülin üretimini ve salınımını kontrol eden metabolik yolağın farklı noktalarında görev almaktadır.

Pdx1 (pancreatic and duodenal homeobox factor-1) embriyonik gelişim sırasında pankreasın oluşması için ortaya çıkan öncül hücrelerin en önemli belirteçlerinden biridir. İnsülin sentezini doğrudan kontrol eden ilk tanımlanan faktörlerden biri olan Pdx1 pankreasın onarılmasında, beta hücrelerinden insülinin üretilmesi ile sentezlenmesinde ve kandaki değişen glikoz miktarına cevaben insülin salınım regülasyonunda görev almaktadır (Kaneto et al., 2007).

MafA (musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family A) doğumdan sonra pankreas gelişimi ve beta hücre işlevleri için önemli bir proteindir (Hang and Stain, 2011). Ayrıca Glikokinaz (Gck) ile birlikte kandaki glikoz seviyesine cevap verecek şekilde insülin sentezini kontrol eden anahtar bir moleküldür (Aguayo-Mazzucato et al., 2011).

Ngn3 (neurogenin3) insülin sentezinde rol almakta olup son çalışmalarda pankreas hasar modelleri sonrasında pankreasın onarılmasında, beta hücrelerinin yeniden

oluşmasında ve proliferasyonunda görev aldıkları gösterilmiştir (Bonner-Weir and Weir, 2005; Xu et al., 2008).

2008 yılında Zhou ve Ark.'larının Nature'da yayınlanmış çalışmasında Ngn3, Pdx1 ve MafA genleri birlikte ekzokrin hücrelerine aktararak insülin salgılayan hücreler elde edilmiştir (Zhou et al., 2008).

Embriyonik dönemde pankreatik tomurcukların oluşmasında önemli görevi olan Pdx1, endokrin öncül hücre belirteci olan Ngn3 ve beta hücre olgunlaşmasında görevli MafA genlerinin kullanılmasıyla yapılan bir başka çalışmada fare ekzokrin pankreasında yüksek ekspresyonunun sağlanması halinde STZ (streptozotocin) ile diyabet modeli oluşturulmuş farelerde insülin pozitif hücrelerin üretildiği gösterilmiştir. Bu üç faktörü içeren adenovektörün karaciğer hücreleri ile yapılan bir çalışmada ise hücrelerin insülin pozitif ve glikoz hassasiyeti olan hücrelere dönüştüğü gösterilmiştir (Akinci et al., 2013).

Pax4 (paired box gene 4) pankreas beta hücresi gelişiminde görev alan, Nkx2.2 ile birlikte çalışarak öncül hücrelerin beta hücresine farklılaşmasını tetikleyen bir transkripsiyon faktörüdür (Wang et al., 2004; Lock and Tzanakakis, 2007). Pankreas beta hücresinin fonksiyonlarının yerine getirilmesinde önemli görevlerinin yanında aktivin A ve betasellülin varlığında erişkin sıçan dokularında ifadesi artarak beta hücre kütlelerinde artışa sebep olduğu da gösterilmiştir (Brun et al., 2004). Pax4 ekspresyonu Pax6'yi indüklemesiyle Pdx1'in yol açabileceği alfa hücre farklılaşmasını bloke edeceğini ve beta hücre farklılaşmasının verimini artırdığı bildirilmiştir (Ritz-Laser et al., 2002). Cdk4 ve c-Myc genlerini uyararak beta hücresi proliferasyonunu artırdığı gösterilmiştir (Brun ve Gauthier, 2008). Pax4 ektopik olarak uzun süreli eksprese edildiğinde Pdx1'i uyararak insülin sentezini artırmasının yanında NF-kappa B transkripsiyon faktörünü baskılayarak ve Bcl2 seviyesini artırarak beta hücrelerinin apoptoza gitmesini engellediği bulunmuştur (Hu He et al., 2011; Brun and Gauthier, 2008). Bu sayede T1D'de olduğu gibi bağışıklık sisteminin beta hücrelerine saldırıp onları yok etmelerinin önüne geçilebileceği önerilmiştir. Yapılan bir çalışmada MKH'lere Ngn3 ve Pax4 genleri aktarılmış ve farklılaşma görülmüştür. Pdx1 ekspresyonu artmış ancak hücrelerin bir kısmı alfa bir kısmı ise beta hücrelerine farklılaştığı görülmüştür. İnsülin salınımında bir artış olmuş olsa da beta hücresi farklılaşma verimi düşük olmuştur. MafA ve C-peptit ekspresyonlarını farklılaşmış hücrelerde gözlemlenememiştir (Tang et al., 2011).

Son yıllarda insülin salgılayan hücre transplantasyonu, diyabet tedavisinde cerrahi yöntemler arasında ilgi odağı haline gelmiştir. Beta hücresinin yerine kullanılmak üzere bu hücrelerin gelişimi ve çoğalmasında görev alan transkripsiyon faktörlerinin genleri özellikle kök hücre ve hepatositlerde ifade edilmiştir (Minami and Seino, 2008; Meivar-Levy and Ferber, 2010; Karnieli et al., 2007). Bu yolla yapılan ilk çalışmalarda insülin geni mezenkimal kök hücreler de olmak üzere birçok hücre tipine aktarılarak insülin üretimi sağlanmıştır (He et al., 2011; Karnieli et al., 2007; Xu et al., 2007; Lu et al., 2006; Zulewski, 2007; Meivar-Levy and Ferber, 2010; Sahu et al., 2009; Noguchi, 2010). İnsan insülin geninin kemik iliği mezenkimal kök hücrelerine verilerek insülin üreten hücreler elde edilmiş ve sonra bu hücreler diyabet modeli oluşturulmuş farelere verildikten sonra kandaki yüksek şeker seviyesini normal değerlere döndüğü görülmüştür (Xu et al., 2007). Ancak, doğrudan insülin geninin aktarılmasındaki en büyük sorun, hücre transplantasyonu sonrasında zayıf ya da yetersiz glikoz cevabının görülmesidir. İnsülin üreten hücreler ile normal adacık beta hücreleri arasındaki bu önemli fonksiyonel fark, bu hücrelerin tedavi yöntemi olarak kullanılması önündeki en ciddi engeldir. Uyarılmış pluripotent kök hücreler (iPSCs-induced pluripotent stem cells) ve uyarılmış nöronlar (induced neurons) ile yapılan çalışmalarda hücre programlanmasında sadece tek bir transkripsiyon faktörünün yeterli olmadığı birçok moleküler faktörün aynı anda kullanılmasıyla erişkin hücrelerin programlanmasının başarılı olabileceği gösterilmiştir (Kim et al., 2011; Ambasadhan et al., 2011).

3 GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Pankreas Adacık İzolasyonu

8 haftalık Wistar albino cinsi sıçanın abdominal bölgesinde kesi oluşturulduktan sonra pankreas ve bağlantılı olduğu bağırsak kısmı dışarıya çıkartılarak, kanaldan pankreas dokusunun içerisine tek kanülle girilmiştir. 10 mL kollajenaz P (Roche) solüsyonu (1mg/mL) kanaldan enjekte edilerek dokunun şişmesi sağlanmıştır. Kalbinde kesi oluşturularak sakrifiye edilen sıçanın pankreası bağırsak, dalak ve karaciğerin etrafından toplanarak 50 mL falkon tüp içine alınıp buz üzerine alınmıştır. Yaklaşık 15 dakika 37°C su banyosunda tutulan pankreaslar daha sonra %10 Fetal Bovine Serum (FBS) ve %1 penicilin/streptomisin antibiyotiği içeren HBSS solüsyonu ile yıkama işlemine tabi tutulmuştur. Parçalanmış doku 400-450 µm por çaplı çelik elekten süzölmüştür. İstenmeyen doku parçaları dansite-gradient santrifüj yöntemiyle Ficoll kullanılarak düşük devirde 25 dakika (dk) 4°C’de çevrilerek oluşan bulutsu tabaka toplanmıştır. İzole edilen adacıklar glikoz (20 g/L), FBS (%10), antibiyotik (%1) ve glutamin (2 mmol/L) eklenmiş RPMI 1640 besiyerinde standart kültür koşullarında (37°C, %5 CO₂ kontrollü atmosfer) tutularak canlılıkları korunmuştur. İzole edilen adacıkların bir kısmı kök hücre izolasyonu için kullanılırken diğer kısmı genlerin izolasyonu için kullanılmıştır.

3.2 Sıçan Pankreatik Adacık Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre İzolasyonu

Elde edilen pankreatik adacıklardan eksplant yöntemiyle kök hücre (sıçan pankreatik adacık kaynaklı mezenkimal kök hücre; SPA-MKH) izolasyonu yapılmıştır. İzolasyon sonrasında pankreas adacıklarının etkinliği mikroskop altında gözlemlenerek kayıt altına alınmıştır. Sıcaklık ve uygun atmosfer değerleri sağlanmış ortamda, 16 saat ve daha fazla görüntülenme süresi sonunda pankreas adacıklarından hücre çıkışı gözlemlenmiştir. Böylece koloni oluşturacak bu hücrelerin adacık kaynaklı oldukları ve çevre dokulardan kaynaklanmadığı gösterilmiştir.

3.3 sPA-MKH Karakterizasyonu

sPA-MKH'ler kültür kabına yapışma özellikleri sayesinde izole edilmiş ve yapışan hücrelerin morfolojik özellikleri çalışma süresince zıt faz mikroskobu ile incelenmiştir. sPA-MKH'lerin kök hücre özelliği taşıdığını göstermek için çeşitli karakterizasyon analizleri yapılmıştır. İmmunofenotipik özelliklerin belirlenmesi için akım sitometri analizi, immünohistokimyasal işaretleme ve immünfloresan işaretleme çalışmaları gerçekleştirilmiştir. MKH'ler in-vitro farklılaşma kapasitelerinin belirlenmesi için adipojenik ve osteojenik farklılaşmaya alınmıştır.

3.3.1 sPA-MKH'lerin İmmünohistokimyasal Analizi

sPA-MKH'lerin immunositokimyasal yöntemlerle karakterizasyon çalışmaları, P3'te poli-L-lizin kaplı 8 kuyucuklu hücre kültür odacıklarına (Culture-Chamber-slide-8 well) ekilmiş 2×10^5 hücre/kuyucuk ile gerçekleştirilmiştir. Tutunmanın sağlanması için bir gece inkübasyonun ardından immünfloresan tekniklerle, belirlenmiş olan antikor paneli çalışılmıştır.

Hücreler metanolle fiske edilip PBS ile yıkandıktan sonra %1,5 normal blok serum içeren PBS'de 30 dk inkübe edilmiştir. Antibody Diluent ile uygun oranlarında dilue edilen primer antikorlar eklenerek gece boyunca 4°C'de, sonra 2 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. ASMA (Alfa smooth muscle actin), c-fos, desmin, fibronektin ve vimentin gibi MKH'lerin sentezlediği belirteçlerden bazıları boyanmıştır. PBS ile 3 kere 2 dk yıkama işleminden sonra immünfloresan çalışmalar için uygun floresan (FITC, TR) işaretli sekonder antikorla oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiştir. Son aşama olan nükleer boya içeren kapatma medyumunu (UltraCruz Mounting Medium for fluorescence with DAPI) ile kapatıldıktan sonra Floresan mikroskopta (Leica DMI 4000 Microsystems) incelenerek fotoğraflanmıştır.

3.3.2 sPA-MKH'lerin Akım Sitometri ile Analizi

Analizler her alt-kültür işlemi sonrasında (P3'deki) FACS Calibur akım sitometri cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Hücreler tirpsinizasyon işlemi ile kaldırılıp, hücre sayımı yapılarak, yaklaşık olarak 8×10^6 hücre PBS içinde homojenize edilip belirlenen hücre yüzey işaretleyicilerine özel fluoresan izotiyosiyonat (FITC)- ve fikoeritrin (PE)-bağlı monoklonal antikorlar (CD45, CD90, CD44 MHC class I, MHC class II) ve uygun izotip kontrollerinden 10 µl eklenerek inkübe edilmiştir (oda ısısında-karanlıkta-45dk.). İnkübasyon sonrası yıkama solüsyonu (%0.1 sodyum azid içeren PBS) eklenerek santrifüj edilmiş (5 dk. 1780 rpm) ve 400 µl hücre yıkama solüsyonu ile resüspanse edilmiştir. Hazırlanan hücre süspansiyonu FACS Calibur akış sitometri cihazında okutularak, analizi BD Cell Quest TM programı ile gerçekleştirilmiştir. Analiz sonucunda belirlenen yüzey antijenleri %90 ve üzeri ekspresyonu olanlar pozitif kabul edilmiştir.

3.3.3 sPA-MKH'lerin *İn-vitro* Farklılaştırılması

sPA-MKH'lerin kök hücre karakterinde olduğunu belirlemek için in-vitro ortamda adipojenik ve osteojenik yönde farklılaşma çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Adipojenik Farklılaştırma

Kültür kabının cm^2 'sinde 3000 adet hücre olacak şekilde ekilen sPA-MKH'ler; içinde %10 FBS, 0,5 mM isobutyl-methylxanthine, 10^{-6} M dexamethasone, 10 µg/ml insulin, 200 µM indomethacin ve %1 penisilin-streptomisin bulunan MEM kültür medyumunda dört hafta kültüre edilmiştir. Kültür sonrası hücre içi biriken lipidlerin görüntülenebilmesi için Oil Red O histolojik boyaması yapılmıştır. Önce hücreler %4 Paraformaldehit (PFA) (Merck) ile 15 dk. oda ısısında inkübe edilmiştir. Sırasıyla PBS ve distile su ile yıkanan cam slayt üzerindeki hücreler son olarak %60 2-propanol (Sigma-Aldrich) ile 5 dk oda ısısında inkübasyona bırakılarak fiksasyon işlemi yapılmıştır. Oil Red O (Sigma-Aldrich) İsoopropanol ile 0,3 gr/100 ml olacak şekilde stok solüsyon

hazırlanmıştır. Hücreler, 3:2 oranında distile su ile dilue edilen stok solüsyonda 1 saat 37°C’de inkübe edilmiştir. Boyanan hücre içi lipidler mikroskop ile gösterilmiştir.

Osteojenik Farklaşma

Kültür kabının cm²’sinde 3000 adet hücre olacak şekilde ekilen sPA-MKH’ler; 100 nM dexamethasone, 0,05 µM ascorbate-2-phosphate, 10 mM β-glycerophosphate, %1 penisilin-streptomisin ve %10 FBS içeren MEM kültür medyumunda dört hafta boyunca kültüre edilmiştir. Yaklaşık 25 gün sonra Alizarin Red-S (Fluka) histolojik boyaması ile farklılaşmanın pozitifliği gösterilmiştir. Hücreler %70’lik alkol ile 5 dk oda ısısında inkübe edilerek fikse edilmiştir. Hücreler %2’lik 4,0-4,3 pH aralığında hazırlanan Alizarin Red-S ile 45 sn boyanarak hücre içi kalsiyum nodülleri mikroskopta gösterilmiştir.

3.4 Sıçan Pankreatik Adacıktan Genlerin İzolasyonları

Sıçan pankreatik adacıklarından toplam RNA izolasyonu ve cDNA sentezi yapılmıştır. Genlere özel tasarlanan primerlerle, 1050 baz çifti (bp) uzunluğundaki Pax4 (GeneBank Acc. No NM_031799.1), 645bp uzunluğundaki Ngn3 (GeneBank Acc.No NM_021700.1), 1086bp uzunluğundaki MafA (GeneBank Acc.No XM_345846.2) ve 1497bp uzunluğundaki Glikokinaz (GeneBank Acc.No NM_001270849.1) mRNA fragmanları cDNA dizisine çevrildikten sonra polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemiyle çoğaltılmıştır.

3.4.1 RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi

Toplam RNA izolasyonu için High Pure RNA İzolasyon Kiti (Roche) kullanılmıştır. 200 µl PBS solüsyonu içerisinde bulunan adacıklar 400 µl lizis solüsyonu ile 15 saniye vortexlendikten sonra kolonlara yüklenmiştir. 15 dk oda ısısında DNase ile muamele edildikten sonra alkol solüsyonları ile üç kez santrifüj edilerek yıkamaları yapılmıştır. Temiz bir tüpte toplanan RNA’nın konsantrasyonunu belirlemek amacıyla

Picodrop kullanılmıştır. 260 nm ve 280 nm dalga boyunda absorbansları ölçülerek A_{280}/A_{260} oranı ile örneğin saflığı ($>1,9$) ve konsantrasyonu ($\text{ng}/\mu\text{l}$) belirlenmiştir. İzole edilen RNA -80°C 'de muhafaza edilmiştir.

Transcriptor First Strand cDNA Sentez Kiti (Roche) kullanılarak izole edilen toplam RNA'dan cDNA sentezlenmiştir. Sentez reaksiyonu kurulurken bir reaksiyon için RNA miktarı $1 \mu\text{g}$ olacak şekilde hesaplanmıştır. İki temel basamaktan oluşan bu işlemde önce RNA'ya 65°C 'de 10dk boyunca rastgele bölgelerinden primerlerin bağlanması sağlanmıştır. RNA'nın stabil kalması için hemen buza alınarak ters transkripsiyonu sağlayacak enzimi içeren karışım eklenmiştir. 55°C 'de 30 dk, 85°C 'de 5 dk bekletilerek cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. cDNA'lar -20°C 'de muhafaza edilmiştir.

3.4.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ve Agaroz Jelden Genlerin Saflaştırılması

Sentezlenen cDNA'lardan istenen gen bölgelerini çoğaltmak için polimeraz zincir reaksiyonları kurulmuştur. Reaksiyonlarda her gen için özgün olacak şekilde tasarlanmış olan primerler ve hata denetleyen (proof reading) DNA polimeraz kullanılmıştır (Çizelge 3.1.). Denatürasyon (95°C , 5 dk), bağlanma ve uzama (72°C , 1:30 dk) aşamalarından oluşan reaksiyonlar 30 döngü şeklinde gerçekleştirilmiştir. Her gen için primer bağlanma sıcaklıkları farklılık göstermektedir (Çizelge 3.2.). PCR sonrası çoğaltılan genler %1'lik hazırlanan agaroz (Roche) jele 1kb DNA belirteci (Fermentas, EK 1) ile birlikte yüklenmiştir. Jel 100 V 'ta 20 dk yürütülerek görüntüleme cihazıyla (DNR Bio-Imaging Systems) görüntülenmiştir.

Çizelge 3.1. Genlerin çoğaltılması için tasarlanan primerler ve dizileri

Primerler	Açık Adları	Baz Dizilimi (5'-3')
Ngn3-F	Neurogenin3	ACAAGCTTATGGCGCCTCATCCCTTG
Ngn3-R		CGGATCCTCACAAGAAGTCTGAGAACACC
Pax4-F	Paired box gene 4	GAAGCTTATGCAGCAGGACGGTCTC
Pax4-R		CGGATCCTTATGGCCAGTGTAAGTAATAG
MafA-F	Musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family A	GCAAGCTTATGGCTTCAGAACTGGC
MafA-R		GGATCCTCACATGAAAAATTCGGGAGAG
Gck-F	Glucokinase	GCTAAGCTTATGGCTATGGATACTACAAGGTG
Gck-R		GGATCCTCACTGGGCCAGCATG

Agaroz jelde istenen boyutta görülen bantlar kesilerek PCR Clean-up Gel Extraction User Manual NucleSpin Extract II (Macherey Nagel) kiti ile izole edilmiştir. 100 mg jel üzerine 200 µl tampon eklenerek 50°C’de eritilmiştir. Ardından kolonlara yüklenen örnekler etanol içeren yıkama solüsyonları eklenip ardışık santrifüjleme ile DNA’nın jelden ayrılıp filtreye takılması sağlanmıştır. Elüsyon tampon çözelti ile filtreden DNA akıtılarak izolasyon gerçekleştirilmiştir. Klonlama vektörü olarak kullanılacak olan pUC19’da jelde yürütüldükten sonra aynı yöntemle saflaştırılmıştır.

Çizelge 3.2. PCR sırasında gene özgün primerler için bağlanma sıcaklıkları

Primerler	Sıcaklık (°C)
Ngn3 ve Gck	60
Pax4	62
MafA	56

3.5 İzole Edilen Genlerin Restriksiyon Enzimi ile Kesimi ve Klonlama Vektörüne Ligasyonu

Saflaştırılan genler HindIII ve BamHI restriksiyon enzimleri ile 10x Fast Digest tampon çözeltisi (Fermentas) içerisinde 37°C’de 30 dk kesim reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar doğrultusunda Ngn3 ve Pax4 genlerinin Kompotent BL21 suşu (NEB Turbo, New England BioLabs) *Escherichia coli*’de çoğaltılması için klonlama vektörü olarak ampisilin antibiyotiği direnç geni taşıyan pUC19 kullanılmıştır. Genler ve pUC19 vektörü kesim reaksiyonunun ardından agaroz jelde yürütülmüştür. Tekrar jelden saflaştırılan bantların (Ngn3 ve Pax4) T4 DNA ligaz (1 Weiss U/ml; Fermentas) ile 16°C’de bir gece inkübe edilerek genlerin vektöre aktarılması (ligasyon) sağlanmıştır. MafA ve Gck genleri ise pUC57 klonlama vektörü üzerinde GenScript firmasından satın alınmıştır. Ligasyon sonrasında genleri içeren 4 farklı klonlama vektörü elde edilmiştir (Çizelge 3.3.) (EK 2-5).

Çizelge 3.3. Ligasyon sonrası elde edilen klonlama vektörleri

pUC19-Ngn3
pUC19-Pax4
pUC57-MafA (Satın alınmıştır.)
pUC57-Gck (Satın alınmıştır.)

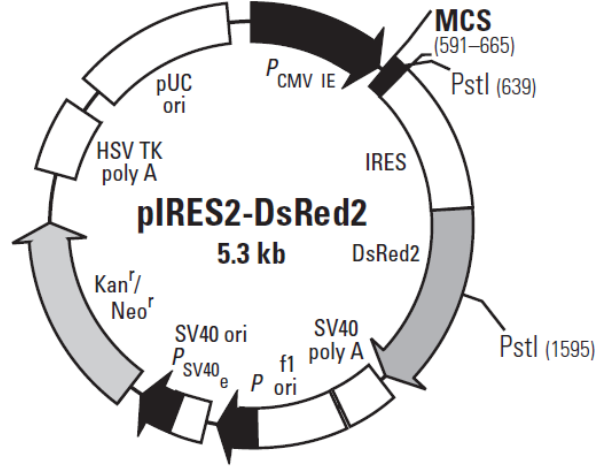
3.6 Transformasyon ve Plazmit İzolasyonu

Transformasyon için genleri içeren klonlama vektörleri elde edildikten sonra kompotent *E. coli* ile bir araya getirilmiş ve 42°C sıcaklıkta 35 sn tutularak vektörlerin bakteriye aktarımı sağlanmıştır. Ampisilin içeren katı besi ortamına ekilen bakterilerin koloni seçimi yapılmıştır. Koloni seçimi sonrası sıvı besi ortamında çok miktarda çoğaltılmış ve bunlardan Nucleospin plasmid kit (Macherey-Nagel) ile plazmit izolasyonu yapılmıştır. Yüksek devirde santrifüj edilen *E. coli* plazmiti açığa çıkaracak olan tampon

çözeltileri ile tekrar çözülerek 11.000g 5 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant kolonlara yüklenmiştir. Yıkama aşamalarının ardından elde edilen plazmitin konsantrasyonu ve saflığı Picodrop ile belirlenmiştir.

3.7 Genin Plazmitten Kesilerek Ekspresyon Vektörüne Aktarılması

Genler izole edilen plazmitlerden kesim (restriksiyon) enzimleri (Ngn3 ve Pax4 genleri HindIII, BamHI ile; MafA geni HindIII/EcoRI ile; Gck geni EcoRI/BamHI ile) yardımıyla çıkartılarak memeli ekspresyon vektör sistemi olan pIRES2-DsRed-Express2'ye (CloneTech, ABD) T4 DNA ligaz ile aktarılmıştır. Vektör memeli hücrelerine aktarıldıktan sonra genlerin eksprese olması için sürekli ekspresyonu sağlayan Sitomegalovirüs (CMV) promotörü içermektedir. İçerdiği IRES (internal ribosome entry site-dahili ribozom giriş bölgesi) dizisi ile gen klonlama bölgesi ve kırmızı floresan genini birbirinden ayırmaktadır. Ligasyon sonrasında takılan genlerin yönü farklı kesim enzimleriyle kontrol edilmiştir. pDsRed-Ngn3 plazmiti PstI restriksiyon enzimi ile, pDsRed-Pax4 plazmiti PstI/BamHI, pDsRed-MafA plazmiti XhoI restriksiyon enzimi ile ve pDsRed-Gck plazmiti PstI restriksiyon enzimi ile kesilmiştir. Dört genin transformasyonu pIRES2-DsRed-Express2 vektörüne ayrı ayrı gerçekleştirilmiş ve genlerin yönü restriksiyon enzim kesimleri ile belirlenmiştir. Transformasyon sonrasında kanamisin/neomisin antibiyotik direnç bölgesi taşıyan vektörü taşıyan *E.coli*'lerin kanamisin antibiyotiği ile seçilimi yapılmıştır.



Şekil 3.1 Ekspresyon vektörü olarak kullanılan pIRES2-DsRed-Express2 haritası.

Seçim sonrası koloniler kanamisin içeren sıvı besi ortamında çoğaltılarak endotoksini elimine edecek şekilde Endotoxin-Free Plasmid DNA Purification (Macherey Nagel) kiti ile plazmit izolasyonu yapılmıştır. Yüksek devirde santrifüj edilerek pelet haline getirilen vektör içeren *E. coli*'ler RNase enzimi ile muamele edildikten sonra lizis yapılarak kolonlara yüklenmiştir. Nötralizasyonun ardından yıkama aşamaları gerçekleştirilerek plazmit DNA'sı elüsyon çözeltisi ile filtrelerden akıtılarak endotoksin içermeyecek şekilde elde edilmiştir.

3.8 Kök Hücelere Genlerin Aktarılması (Elektroporasyon)

Gen aktarımı elektroporasyon yöntemi (Neon Transfeksiyon Sistemi) ile 3.-4. pasajdaki sPA-MKH'lere yapılmıştır. Elektroporasyon aktarım başına 2-3 µg plazmit olacak şekilde 1×10^6 hücreye yapılmıştır. 10 µl hücre-plazmit süspansiyonunda; 990 V, 40 ms ve 2 atım ayarlarında gerçekleştirilmiştir. Dört gen kullanılarak toplam dokuz farklı aktarım tasarlanmıştır. Birden fazla genin aktarımı için ilgili genler ortak transfer (ko-transfer) yöntemiyle aktarılmıştır. Böylece 9 farklı hücre grubu elde edilmiştir (Çizelge 3.4.). Bunlara ek olarak hiç gen aktarılmamış sPA-MKH'leri deneylerde kontrol olarak kullanılmıştır (Grup 10). Aktarımın sonunda hücreler G418 (200 µg/ml; Gibco) antibiyotik

direncine göre seçilmiştir. Hücreler G418 antibiyotiği eklenmiş RPMI Standard besi ortamlarında (%10 FBS, %1 Pen/Strep, % 0,4 G418; 37°C, %5 CO₂) kültüre edilmiştir.

Çizelge 3.4. Hücre Grupları ve Aktarılan Genler

Hücre Grup No.	Vektör Adı	Taşınan Genler
Grup 1	Vektör 1	Ngn3
Grup 2	Vektör 2	MafA
Grup 3	Vektör 3	Pax4
Grup 4	Vektör 4	Pax4+ MafA
Grup 5	Vektör 5	Pax4+ Gck
Grup 6	Vektör 6	Ngn3+ MafA
Grup 7	Vektör 7	Ngn3+ Gck
Grup 8	Vektör 8	Ngn3+ Pax4
Grup 9	Vektör 9	Ngn3+ Pax4+ MafA
Grup 10	-	-

3.9 Gen Aktarılmış Hücrelerin Karakterizasyonu

Gen aktarımı sonrasında hücrelerin kök hücre karakterini taşıyıp taşımadığı çeşitli teknikler ile analiz edilmiştir. Hücre yüzey belirteçleri akım sitometri analizi ile belirlenmiştir. Gen ekspresyon profilleri çeşitli beta hücre ve pankreas adacık belirteçleri ile çalışılarak farklılaşma durumları analiz edilmiştir. Gen aktarımının ardından farklılaşma potansiyelleri göz önüne alınarak beta hücre belirteçleri immünfloresan işaretleme ile görüntülenmiştir. Aktarılan genlerin protein sentezlerini belirlemek için Western blot hibridizasyon analizi gerçekleştirilmiştir.

3.9.1 Gen Ekspresyon Analizi

Aktarılan genlerin kopya sayısını belirlemek ve hücrelerin ekspresyon profilinde oluşan değişiklikleri belirlemek için Real Time-PCR ile analiz edilmiştir.

3.9.1.1 Gen Kopya Sayısı Belirlenmesi

Gen aktarımı sonrası hücrenin içerdiği gen kopya sayısını belirlemek için GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Fermentas) kullanılarak toplam 10 Grup hücre için genomik DNA izolasyonu yapılmıştır. Kültür kabından tripsin ile kaldırılan hücrelerden 1×10^6 ayrılarak PBS ile yıkanmıştır. Kit içeriğinde bulunan lizis solüsyonu ve proteinaz K ile 56°C'de 10 dk muamele edilen hücreler ardından oda ısısında RNase A eklenerek yaklaşık 10 dk daha bekletilmiştir. Açığa çıkarılan genomik DNA sonrasında kolonlara yüklenerek etanol içeren yıkama solüsyonlarıyla yıkama aşamalarına tabi tutulmuştur. Yıkama işlemlerinin ardından Elüsyon tampon çözeltisi ile kolondan akıtılan DNA'ların konsantrasyon ve saflıkları Picodrop ile ölçülmüştür. Ngn3, Pax4, MafA ve Gck genlerinin çoğalmaları Real Time-PCR ile incelenmiş ve Sox2 geni çoğalmasıyla oranlanarak karşılaştırılmıştır.

3.9.1.2 Real-Time PCR ile Kantitatif Analiz

Elde edilen 9 Grup gen aktarılmış ve gen aktarımı yapılmamış kontrol (10. Grup) hücrelerinin farklılaşma oranlarını belirlemek için gen ekspresyonları Real Time-PCR ile analiz edilmiştir. Aktarımı yapılan 4 gen, çeşitli beta hücre ve pankreatik adacık belirteç primerleri (Çizelge 3.5) kullanılarak SYBR içeren master solüsyonu (Roche) ile reaksiyon kurulmuş. Real-Time PCR cihazı (Lightcycler 480, Roche) ile DNA parçalarının çoğalması ölçülmüştür. Kontrol grubu hücrelerinin ekspresyonlarına göre gen aktarılmış olan hücrelerde gen ekspresyon düzeyleri belirlenmiştir.

Çizelge 3.5. Gen ekspresyon profili belirlemede kullanılan primerler ve dizileri

Primerler	Açık Adları	Baz dizimleri 5'-3'
Ins1-F	Insulin 1 (beta hücre belirteci)	GACCTTGGCACTGGAGGTT
Ins1-R		CCAGTTGGTAGAGGGAGCAG
Ins2-F	Insulin 2 (beta hücre belirteci)	CGAAGTGGAGGACCCACA
Ins2-R		TGCTGGTGCAGCACTGAT
Pdx1-F	Pancreatic and duodenal homeobox factor-1 (beta hücre belirteci)	CGTAGTAGCGGGACAACGA
Pdx1-R		CTCCTCGCCCGAGGTTAC
Gcg-F	Glucagon (alfa hücre belirteci)	GGTGAAAGGCCGAGGAAG
Gcg-R		GAGAAGGATCCATCAGCATGT
Sst-F	Somatostatin (delta hücre belirteci)	CTGGAGCCTGAGGATTTGC
Sst-R		CTGCAGCTCCAGCCTCAT
G3PDH-F	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (kontrol)	AGAGAGAGGCCCTCAGTTGCT
G3PDH-R		TGGAATTGTGAGGGAGATGCT

3.9.2 Gen Aktarılmış Hücrelerin Kök Hücre Belirteçlerini Taşımaları (Akım Sitometri)

Gen aktarımı sonrasında hücre karakterinde oluşabilecek değişiklikler akım sitometri ile kök hücre yüzey belirteçleri incelenerek analiz edilmiştir. Gen aktarımının ardından P3 veya P4'teki tripsinizasyon işlemi ile kaldırılmış $1,5 \times 10^6$ hücre PBS ile homojenize edildikten sonra hücre yüzey belirteçlerine özgün FITC ve PE ile bağlı monoklonal antikorlar (CD90, CD29 ve CD45) ve uygun izotip kontroller ile inkübe edilmiştir (Oda ısısında, 45 dk). Yıkamanın ardından ekspresyonları FACS Calibur (BD

Bioscience) akım sitometri cihazında okutularak, BD Cell Quest programı ile incelenerek gen aktarılmamış sPA-MKH'lerine göre değişimleri belirlenmiştir.

3.9.3 Hücre İçi Proteinlerin İncelenmesi

sPA-MKH'lerine yapılan gen aktarımı sonrasında elde edilen 10 hücre Grubunda oluşması beklenen farklılaşmanın hücre içi proteinleri açısından incelenmesi immünfloresan işaretleme ile yapılmıştır. Çeşitli gruplar yapılarak aktarılmış olan Ngn3, Pax4, MafA ve Gck genlerinin hücreler tarafından protein sentezlerini belirleyebilmek için ise Western blot hibridizasyonu yapılmıştır.

3.9.3.1 İmmün Floresan

Aktarılmış olan 4 farklı gen ve beta hücre belirteçlerinden olan insülin, c-Peptit, Pdx1 ve alfa hücre belirteci olan Glukagon (Gcg) sentezi immünfloresan tekniklerle işaretleme yoluyla belirlenmiştir. Böylece hücre grupları arasındaki fark incelenmiştir. Hücre grupları P3'te poli-L-lizin kaplı 8 kuyucuklu hücre kültür odacıklarına (Culture-Chamber-slide-8 well) ekilmiş ve yaklaşık %70 hücre sıklığına ulaşmalarının ardından PBS ile yıkanarak metanolle fikse edilmiştir. Belirlenen primer antikör paneline göre seçilen normal blok serumdan %1,5 hazırlanarak 30 dk oda ısısında inkübe edilmiştir. Uygun oranlarda Antibody Diluent ile hazırlanan primer antikorda gece boyunca 4°C'de, sonra 2 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. PBS ile yıkandıktan sonra uygun floresan (FITC, TR) işaretli sekonder antikörle oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiştir. Son aşama olan nükleer boya içeren kapatma medyumunu (UltraCruz Mounting Medium for fluorescence with DAPI) ile kapatıldıktan sonra Floresan mikroskopta (Leica DMI 4000 Microsystems) incelenerek fotoğraflanmıştır.

3.9.3.2 Western Blot Hibridizasyon

Kültür kabındaki hücreler PBS tampon çözeltisi ile yıkandıktan sonra özel hücre kazıyıcıları (cell scraper) ile kazınarak mekanik olarak kaldırılmıştır. 1500 rpm'de 5 dk santrifüj sonrası pelet üzerine 200 µl M-PER lizis çözeltisi (Thermo Scientific) eklenerek resüspanse edilmiş ve proteinler açığa çıkarılmıştır. 13000g'de 15 dk santrifüj sonrası elde edilen proteinler -80°C'de stoklanmıştır.

Proteinler yükleme tamponu ile 1:2 oranında karıştırılarak 3 dk kaynatılmıştır. %12'lik poliakrilamid jel (seperating jel) ve %4'lük stacking jel hazırlanarak protein örnekleri yüklenmiştir. 200 mA elektroforezde 30dk yürütülen sistemde proteinler moleküler ağırlıklarına göre ayrılmıştır. Elektro-blotting yöntemiyle proteinler bir nitrosellüloz membrana aktarılmıştır (iBlot Nitrosellüloz, Invitrogen). Membranlar TBS solüsyonu (pH 7,6) ile hazırlanan %5'lik süt tozu blok solüsyonu ile gece boyu bloklanmıştır. Her hücre hattı dört farklı gene özgün olacak antikorlar ile boyanmıştır. Bu antikora özgün HRP (Horse Radish Peroxidase) işaretli sekonder antikorla muamele edilmiş ve son aşamada substrat yardımıyla görüntüleme cihazında bu kimyasal ışıltama (kemilüminesans) tespit edilmiştir. BenchMark Pre-Stained Protein Ladder (Life Technologies) belirteç kullanılarak proteinin varlığı ve boyutu kesinleşmiştir (EK 15).

3.10 Endokrin Hücre Farklılaşması

Farklı vektörler aktarılmış olan 8 hücre hattı (Grup 1-6, 8, 9) ve gen aktarılmamış sPA-MKH'ler (Grup 10) endokrin yönde uyarılmak için kuyucuk başına 150.000 hücre olacak şekilde 6 kuyucuklu hücre kültür kaplarına ekilmiştir. Farklılaşma sonunda gerçekleştirilecek immünfloresan boyamalar için kuyucuklara fibonektin kaplı cam slayt'lar yerleştirilmiştir. Gen aktarılmış olan hücreleri kimyasal olarak endokrin yönde farklılaşmaya uyarılmak için kimyasal bir karışım kullanılmıştır. EGF (Epidermal growth factor, 25 ng/ml), Nicotinamide (10mM), Activin-A (2nM), Activin-B (100 ng/ml), Exendin-4 (10 nM), HGF (Hepatocyte growth factor, 100 pM), Pentagastrin (10 nm), FBS (%10) ve Penicilin/streptomisin (%1) G418 (%0,4) (gen aktarılmamış hücre hariç) içeren RPMI 1640 besiyerinde 37°C, %5 CO₂ kontrollü atmosfer kültür koşullarında 14 gün

inkübe edilmiştir. Farklılaşma süresince hücreler arasında oluşan morfolojik farklar mikroskopla takip edilerek fotoğraflanmıştır. Farklılaşma sonunda tüm Grupların hücreleri immünfloresan teknikler ile insülin antikoruyla işaretlenmiş ve Floresan mikroskopta incelenmiştir.

3.11 İstatistiksel analiz

Sonuçların istatistiksel analizleri SPSS 10.0 (SPSS , Chicago, ABD) programı ile yapılmıştır. Veriler eşli t-testi ve çoklu analizler için Newman–Keuls metodu ile test edilmişlerdir. Her deney en az üç kez tekrar edilmiştir. Deney ve kontrol grupları arasındaki fark $p<0,05$ olduğunda anlamlı ve $p<0,01$ olduğunda ileri derece anlamlı olarak ifade edilmiştir.

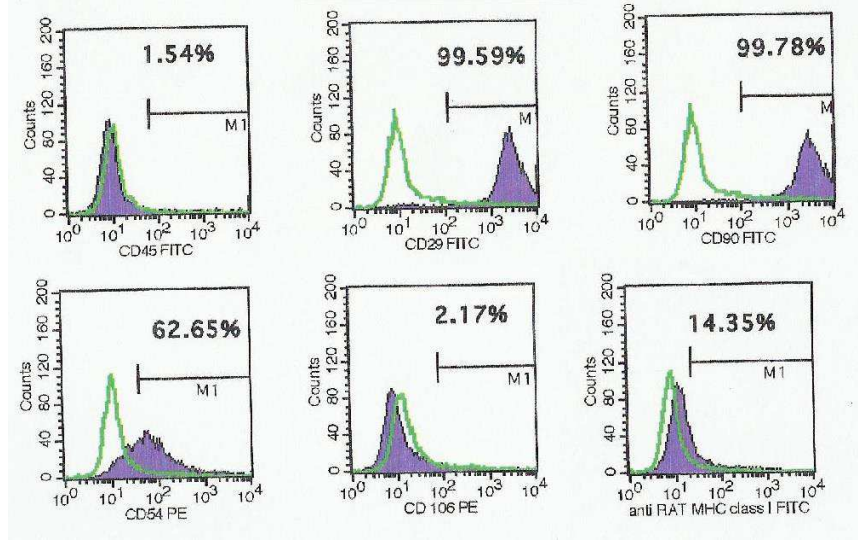
4 BULGULAR

Bu projede, pankreas gelişimi ve insülin üretimi için önem transkripsiyon faktörü genlerinin aktarımı ile insülin üreten beta benzeri hücrelerin elde edilmesi amaçlanmıştır. Bu projede ulaşmak istediğimiz hedeflerden bir tanesi de kimyasal indüklemenin gen aktarılmış hücreler üzerindeki etkisinin ortaya çıkarılmasıdır.

Çalışmada KÖGEM’de yürütülen daha önceki projelerde elde edilen sıçan pankreas adacık kaynaklı kök hücreler kullanılmıştır (Karaöz, 2010a). Bu adacık hücreleri 8 haftalık Wistar albino sıçanlardan eksplant yöntemle elde edilmiştir. İlgili çalışmada elde edilen kök hücrelerin kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelere benzer olduğu ve adipojenik, kondrojenik, nörojenik, miyojenik ve ostejenik hücre tiplerine farklılaştığı gösterilmiştir.

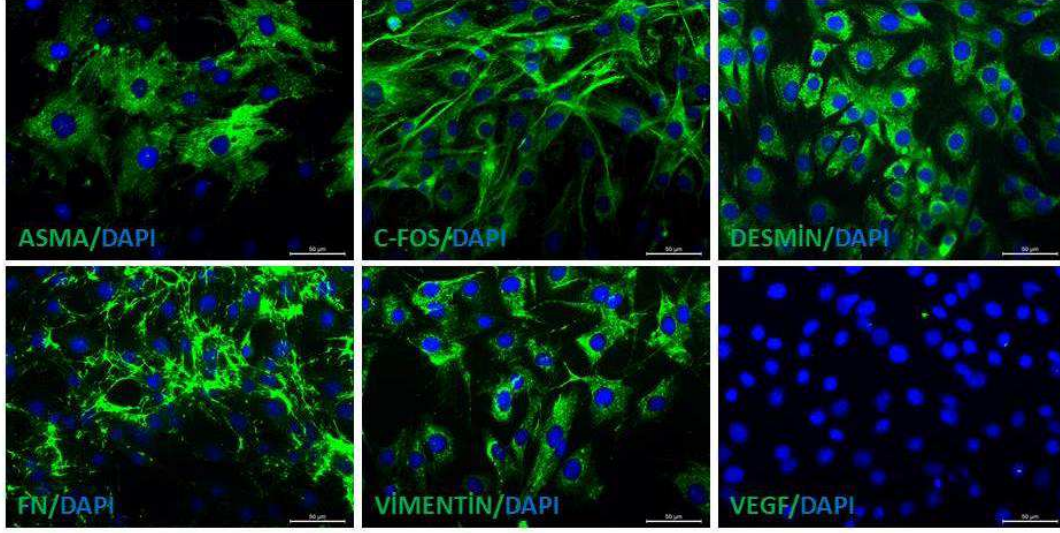
4.1 İzole edilen sPA-MKH’ler ve Karakterizasyonu

Hücreler ilk izole edildiği zaman kök hücre belirteçlerine göre karakterizasyonları tamamlanmış, ancak uzun süre (24 ay) sıvı azotta saklandığından çözüldükten sonra tekrar karakterizasyon çalışması yapılma ihtiyacı duyulmuştur. Bu kapsamda hücreler taşıdıkları yüzey belirteçlerine, kök hücre belirteçlerine ve farklılaşma yeteneğine göre tekrar karakterize edilmiştir.



Şekil 4.1 Sıçan pankreatik adacık kaynaklı kök hücrelerin akım sitometrisi (hücre sayar) ile yüzey belirteçlerinin belirlenmesi.

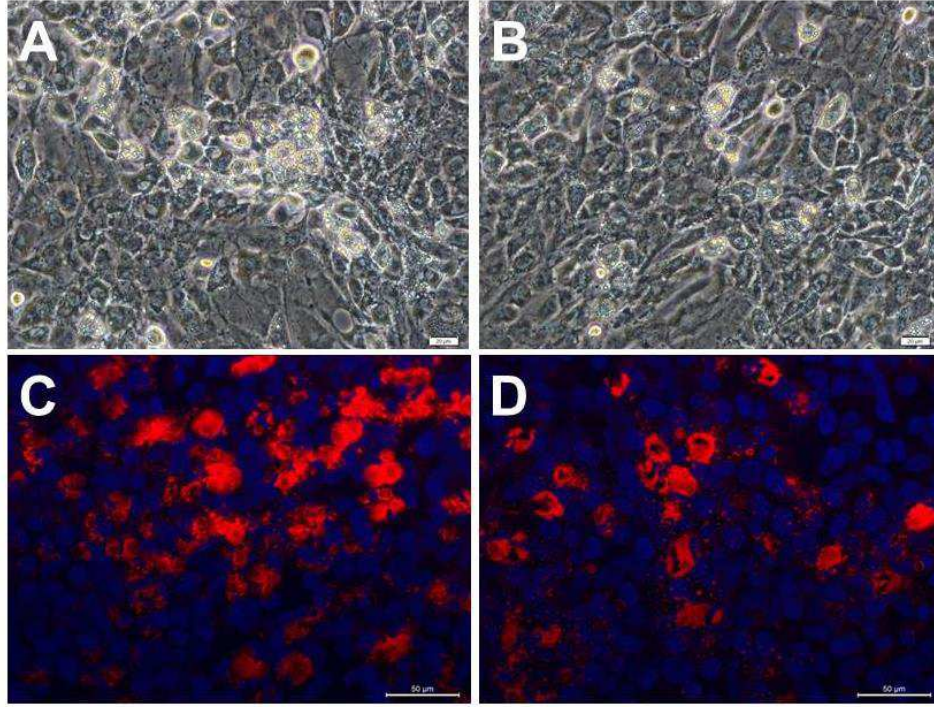
Daha önceki çalışmada pasaj 25'e kadar hücreler belli aralıklarda yüzey belirteçleri incelenmiş ve CD45, CD29 ve CD90 değerleri pasaj 25 için sırasıyla %0,59, %99,91, %65,34 bulunmuştur. Çalışmanın başında hücreler çözüldükten sonra yapılan analizlerde bu değerler sırasıyla %1,54, %99,59, %99,78 olarak bulunmuştur (Şekil 4.1.). Sonuçlar bize hücre çözüldükten sonra kök hücre özelliklerini kaybetmediğini hatta CD90 değerinin %65,34'ten %99,78 değerine yükselmesiyle kök hücre karakterlerinin iyileştiğini göstermiştir.



Şekil 4.2 sPA-MKH'lerin kök hücre belirteçlerine yönelik immünfloresan boyamalar ile gösterilmesi. Hücre çekirdekleri DAPI boyası ile mavi renkte gösterilmiştir. Ölçek çubuğu: 50 µm.

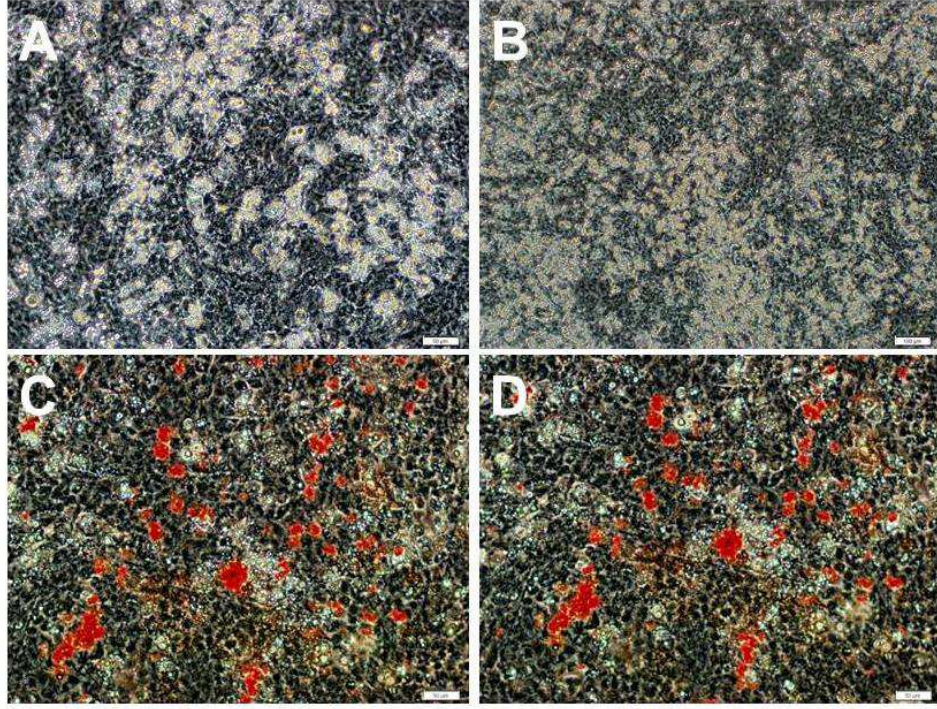
Hücrelerin kök hücre belirteçlerini taşıdığını göstermek için sPA-MKH'ler Alfa Smooth Muscle Actin (ASMA), c-Fos, Desmin, Fibronektin ve Vimentin belirteçlerine göre immünfloresan yöntemle işaretlenmiştir. Bütün belirteçler hücrelerde boyanmıştır ve bu sonuç hücrelerin kök hücre özelliğini taşıdığını göstermektedir. VEGF (vascular endothelial growth factor) boyanması kök hücrelerde negatif çıkmıştır. Bir kök hücre belirteci olmayan VEGF aslında endotel hücre belirtecidir. Bu da hücrelerin saklanma koşullarında farklılaşmadığının bir göstergesidir (Şekil 4.2.).

Kök hücre özelliklerinin belirlenmesinde kök hücrelerin osteojenik ve adipojenik hücre hatlarına farklılaşabilme potansiyelleri incelenmiştir (Şekil 4.3., 4.4.). sPA-MKH'ler kimyasal uyarılma ile adipojenik hücre farklılaşmasına alınarak hücrelerin morfolojisi incelenmiştir (Şekil 4.3. A, B). Dört hafta süren farklılaştırma sonrasında hücrelerin sitoplazmasında yağ taneciklerinin olduğu gözlemlenmiştir. Fiksasyon sonrasında hücrelerdeki bu yağ damlacığı benzeri yapılar Oil-Red-O ile boyanmıştır (Şekil 4.3. C, D). Hücreler içerisinde oluşmuş olan yağ taneciği benzeri yapılar Oil Red-O ile boyanmış olup hücrelerin başarılı bir şekilde adipojenik hücreye farklılaştığı gösterilmiştir.



Şekil 4.3 sPA-MKH'lerin adipojenik hücre farklılaştırması çalışması. Hücreler dört hafta boyunca kimyasal olarak uyarılmıştır. Deney sonunda hücrelerin sitoplazmasında yağ tanecikleri oluşmuştur (A, B). Hücreler sonra Oil-Red-O boyası (kırmızı) ile işleme tabi tutularak yağ taneciklerinin boyanması incelenmiştir (C, D). Hücrelerdeki yaygın kırmızı boyanma adipojenik farklılaşmanın gerçekleştiğine işaret etmektedir. Hücre çekirdekleri DAPI ile mavi renkle gösterilmiştir. Ölçek çubuğu: A, B; 200 µm; C, D 50 µm.

Osteojenik farklılaştırma ile hücrelerin mezenkimal kök hücre karakterini taşıdığı gösterilmiştir. Dört hafta süren farklılaştırma süreci sonrasında hücrelerin içerisinde kalsiyum nodüllerinin oluştuğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.4. A, B). Oluşan bu kalsiyum nodülleri daha sonra Alizerin Red-S ile boyanmıştır (Şekil 4.4 C, D). Pozitif boyanma sPA-MKH'lerin osteojenik hücre hatlarına farklılaşabilme yeteneğine sahip olduğu gösterilmiştir.



Şekil 4.4 sPA-MKH'lerin osteojenik hücre farklılaştırması çalışması. Hücreler dört hafta boyunca kimyasal olarak uyarılmıştır. Süreç sonrasında hücrelerde kalsiyum nodüllerinin olduğu mikroskopik incelemelerle (A, B) ve Alizerin Red-S boyaması (C, D) gösterilmiştir. Ölçek çubuğu: A-D 200 µm.

Kök hücrelerin üç farklı yöntemle incelenerek kök hücre özelliklerini kaybetmedikleri ve hatta mezenkimal kök hücre karakterine daha yakın bir özellik kazandığı gözlemlenerek, sPA-MKH'ler bu çalışmanın devamında gen aktarım çalışmaları için kullanılmıştır.

4.2 Genlerin Çoğaltılması ve Klonlama Vektörüne Aktarılması

Ngn3, Pax4, MafA ve Gck genlerinin izolasyonları için sıçan pankreasından adacık izole edilmiştir (Şekil 4.5.). Adacık izolasyonu kollajenaz P (Roche) kullanılarak

gerçekleştirilmiştir. Elde edilen 200-300 pankreas adacığı daha sonra PBS ile yıkanarak toplam RNA izolasyonu yapılmıştır.

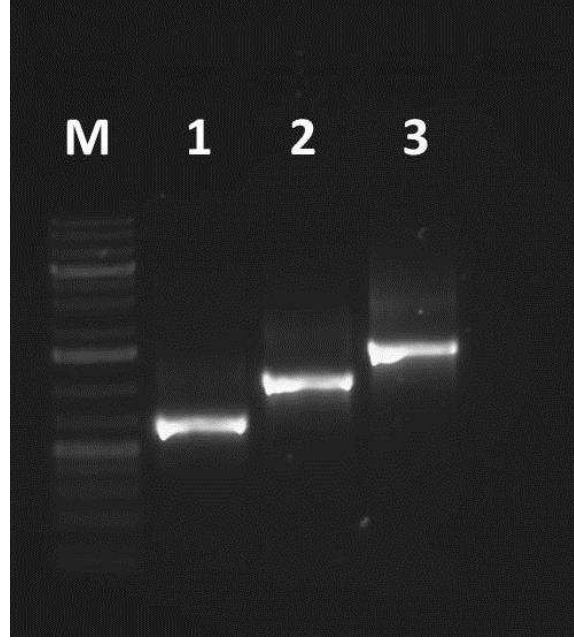


Şekil 4.5 Sıçan pankreas adacık izolasyonu.

Elde edilen toplam RNA spektrofotometrede 260nm/280nm dalga boyu ölçümleri ile konsantrasyonları ve saflıkları belirlenerek aynı gün cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen cDNA'lerden 4 gen PCR yöntemi ile çoğaltılmıştır.

4.2.1 Ngn3, Pax4, MafA, Gck genlerinin PCR ile Çoğaltılması

cDNA havuzu kullanılarak 4 genin hata denetleyen (proof reading) DNA polimeraz ile çoğaltılması belirtilen ilgili primerler ile gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.1.). Ngn3, Pax4 ve Gck genleri PCR yöntemi ile başarılı bir şekilde çoğaltılmışken MafA geni elde edilememiştir (Şekil 4.6.) Çoğalan genler ilgili geni kesmeyeceğı bilinen restriksiyon kesim enzimleri (HindIII, BamHI) ile inkübe edilmiştir. Ngn3 ve Pax4 genleri kesilmemiş olarak kalmışken, Gck geninin kesildiğı görülmüştür. Bu sonuç ile çoğaltılmış olan Gck geninin spesifik olmadığı (başka bir gen olduğu) düşünülmüş ve bu noktadan itibaren MafA ve Gck genleri GenScript firmasından satın alınmıştır.



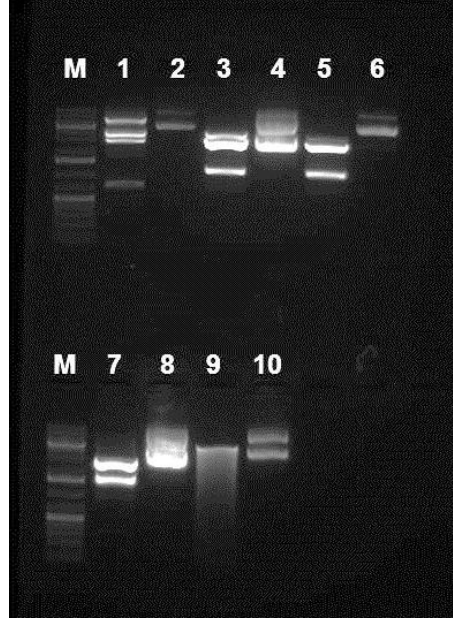
Şekil 4.6 Ngn3, Pax4 ve Gck genlerinin PCR ile çoğaltılması sonucu agaroz jel görüntüsü. M; DNA belirteci, 1; Ngn3 geni, 2; Pax4 geni, 3; Gck geni.

Hata denetleyen (proof reading) DNA polimeraz ile çoğaltılmış olan Ngn3 ve Pax4 DNA fragmanları pUC19 klonlama vektörüne aktarılmıştır. Klonlama sonrasında Ngn3 ve Pax4 genleri *E.coli*'de ampisilin antibiyotik dirençliliğine karşı taranmıştır. Elde edilen koloniler çoğaltılmıştır. MafA ve Gck genleri firmadan pUC57 vektörü üzerinde tedarik edilmiştir.

4.2.2 Vektörün Tasarlanması

Genler klonlama vektörlerine takıldıktan sonra çoğaltılarak ekspresyon vektörü üzerine aktarılmıştır. Çalışmada ekspresyon vektörü olarak pDsRed Express2 (CloneTech) kullanılmıştır. Plazmit sürekli ekspresyonu sağlayan CMV promotoru içermektedir.

İçerdiği IRES (internal ribosome entry site-dahili ribozom giriş bölgesi) dizisi ile gen klonlama bölgesi ve kırmızı florasan genini birbirinden ayırmaktadır.



Şekil 4.7 Ekspresyon vektörüne ilgili gen aktarılması sonrasında kesim öncesi ve kesim sonrası plazmitlerin agaroz jel üzerinde incelenmesi. M, DNA belirteci; 1, pDsRed-Ngn3 (HindIII/BamHI); 2, pDsRed-Ngn3(kesilmemiş); 3, pDsRed-Pax4 (HindIII/BamHI); 4, pDsRed-Pax4 (kesilmemiş); 5, pDsRed-MafA (HindIII/ EcoRI); 6, pDsRed-MafA (kesilmemiş); 7, pDsRed-Gck (EcoRI/BamHI); 8, pDsRed-Gck (kesilmemiş); 9, pDsRed (HindIII/BamHI); 10, pDsRed (kesilmemiş).

Ngn3 ve Pax4 genleri HindIII ve BamHI restriksiyon kesim enzimleri kullanılarak pDsRed üzerine aktarılmıştır. MafA geni pUC57 üzerinde bulunduğundan dolayı ekspresyon vektörünün klonlama bölgesi dikkate alınarak EcoRI ve HindIII restriksiyon enzimleri ile kesilmiştir. Gck geni aynı doğrultuda bu sefer EcoRI ve BamHI restriksiyon enzimleri ile kesilmiştir. Saflaştırmalar sonrasında elde edilen DNA fragmanları pDsRed'e aktarılmıştır. E.coli'de çoğaltıldıktan sonra genin varlığı plazmit üzerinde gösterilmiştir (Şekil 4.7.).

Ekspresyon vektörüne takılan genlerin vektörün promotorüne göre doğru yönde olması önemli olduğundan restriksiyon enzim kesimiyle elde edilen plazmitler kesilmiş ve böylelikle genlerin yönleri kontrol edilmiştir. Bu amaçla pDsRed-Ngn3 plazmiti PstI restriksiyon enzimi ile, pDsRed-Pax4 plazmiti PstI/BamHI, pDsRed-MafA plazmiti XhoI restriksiyon enzimi ile ve pDsRed-Gck plazmiti PstI restriksiyon enzimi ile kesilmiştir. Çıkan sonuçlar ile doğru yönde takıldıysa çıkması gereken bant boyutları karşılaştırılmıştır. Doğru sonuçları veren koloniler seçilerek hücre aktarım çalışmalarına başlanmıştır.

Hücre aktarım öncesinde plazmitler E.coli'de çoğaltıldığı için yüksek oranda endotoksin içermektedir. Bu toksinin ortamdan uzaklaştırılması için Endotoxin Free Plasmid izolasyon kiti (MN) kullanılmıştır. Elde edilen plazmitlerin konsantrasyonları spektrofotometrede ölçülmüştür (Çizelge 4.1.).

Çizelge 4.1. Endotoksinden temizlenmiş plazmitlerin spektrofotometrede ölçülen değerleri

pDsRed-Ngn3	138,6 ng/ μ l
pDsRed-Pax4	128,1 ng/ μ l
pDsRed-MafA	138,1 ng/ μ l
pDsRed-Gck	135,4 ng/ μ l

4.3 Gen Aktarılmış Hücrelerin Karakterizasyonu

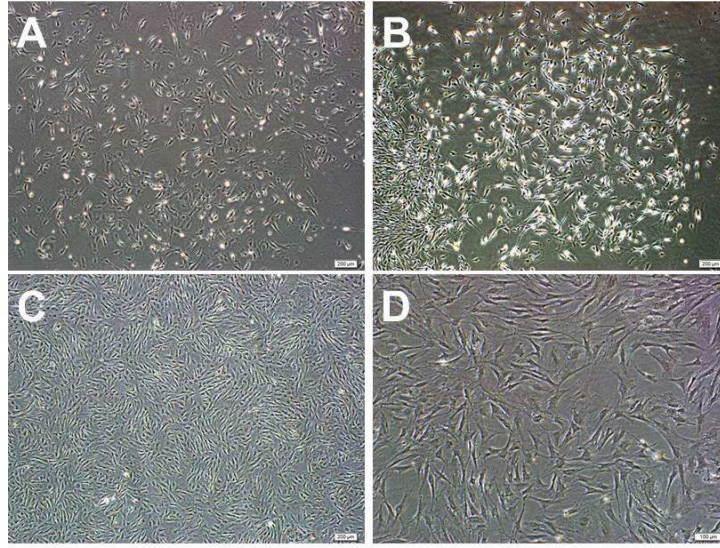
sPA-MKH'lere (1×10^6) 2-3 μ g plazmit olacak şekilde karıştırılarak elektroporasyon yöntemiyle genler aktarılmıştır. 24 saat sonra hücreler G418 antibiyotiğine karşı seçilmiştir. Yaklaşık olarak dört hafta süren seçim sonrasında hücreler incelenmeye alınmıştır.

Hücrelerin insülin üreten beta benzeri hücrelere dönüşmesi için Ngn3, Pax4 ve MafA genleri aktarılmıştır. MafA beta hücrelerinin glikoz cevabını düzenleyen bir faktör olduğundan MafA geni aktarılmayan örneklerde Glikokinaz geni aktararak glikoz cevabı oluşturulmak istenmiştir. 4 gen kullanılarak toplamda 9 farklı grup oluşturulmuştur (Çizelge 3.4.).

Birden fazla gen içeren grup hücrelerine ilgili genler ortak transfer (ko-transfer) yöntemiyle aktarılmıştır. Bu şekilde 9 farklı hücre grubu elde edilmiştir. Bunlara ek olarak hiç gen aktarılmamış sPA-MKH'leri deneylerde kontrol olarak kullanılmıştır (grup 10).

4.3.1 Hücre Morfolojileri

Hücreler antibiyotik seçimi sonrasında 1×10^6 hücre sayısına ulaştıktan sonra pasaj 0 (P0) olarak adlandırılmıştır. Şekil 4.8.'de 1. grup (Ngn3) hücrelerinin P0 ve P1'deki görüntüleri verilmiştir. Kültür sırasında hücrelerde belirgin bir morfolojik fark görülmemiştir.

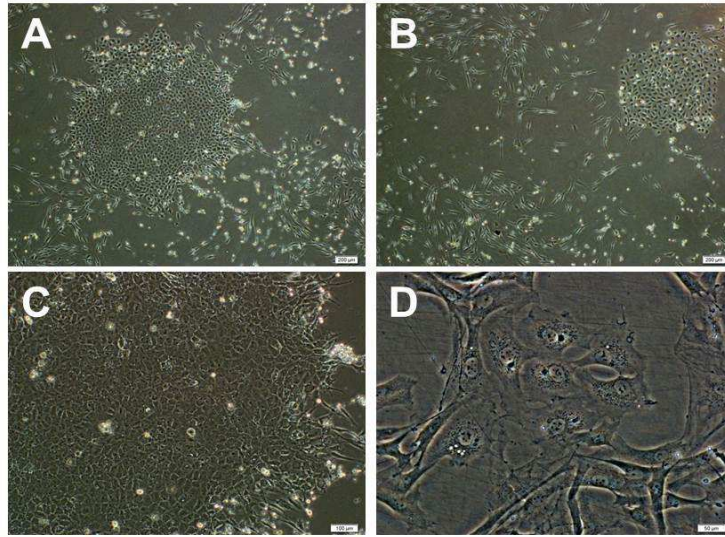


Şekil 4.8 Grup 1 (Ngn3) hücrelerinin gen aktarımı sonrasında mikroskop altındaki görüntüleri. A, B, C P0; D P1. Ölçek çubuğu: A-C 200 μm , D 100 μm .

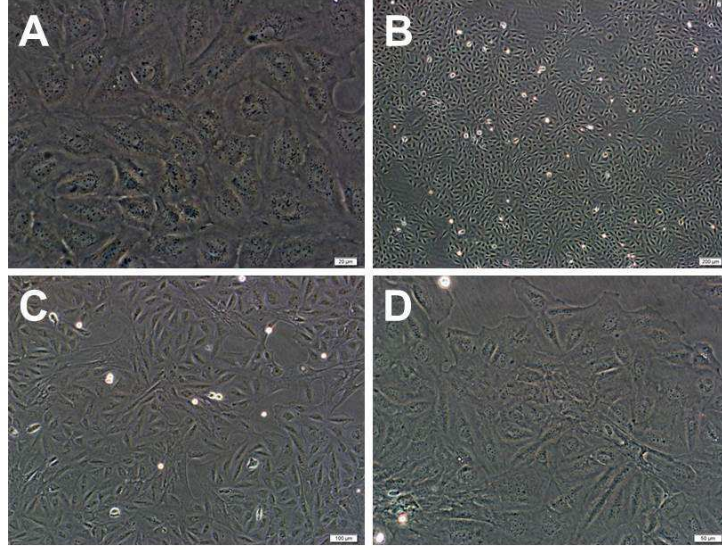
Grup 2 hücreleri (MafA) gen aktarımı sonrasında farklı morfolojilere sahip hücre tiplerinin karışımı olduğu görülmüştür (Şekil 4.9.). Bu hücreler temelde mezenkimal kök hücre morfolojisine sahip ince uzun yapıdaki hücreler ile epitel hücre görünümüne sahip küçük ama sık konumlanan hücre kolonilerinin oluştuğu gözlemlenmiştir. İlerleyen pasajda

(P3) heterojen yapıdaki bu hücre topluluğu değişerek epitel görünüme sahip (G418 direnci gösteren) hücrelerin kültür ortamında baskın geldiği görülmüştür (Şekil 4.10.).

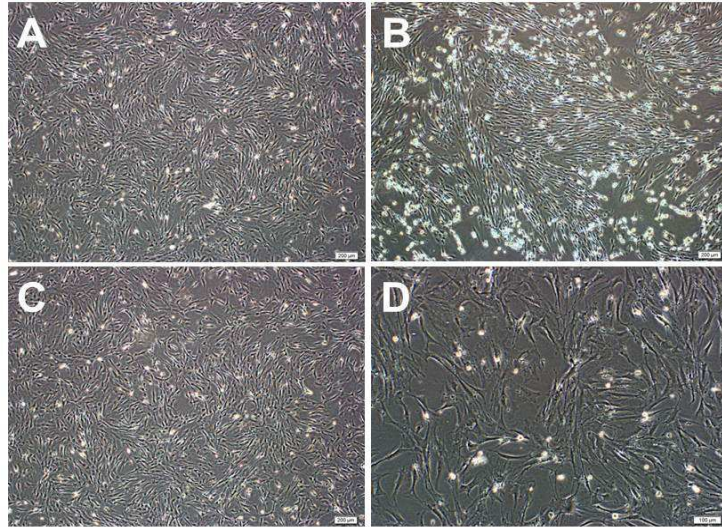
Pax4 geni aktarılmış grup 3 hücrelerinin normal kültür koşulları altında olağan mezenkimal kök hücre morfolojisini sergilediği görülmüştür (Şekil 4.11.). Ancak bu hücreler aynı kültür kabında ileri hücre sıklığına kadar (konfluensi) kültürü devam ettirildiğinde diğer hücre tiplerinden farklı olarak hücrelerin bir araya gelerek topaklar oluşturduğu gözlemlenmiştir. Bu hücre toplulukları pankreas adacık benzeri bir görünüm sergilemektedir (Şekil 4.12.).



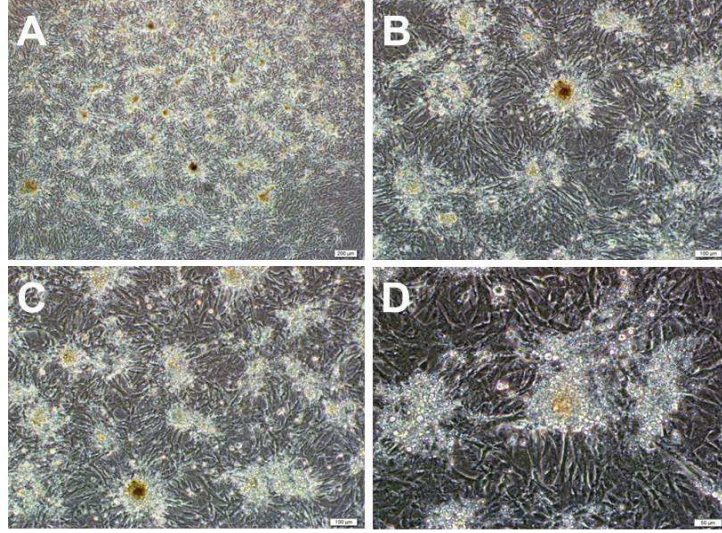
Şekil 4.9 Grup 2 (MafA) hücrelerinin gen aktarımı sonrasında mikroskop altındaki görüntüleri. Kültürde çok çeşitli hücre morfolojileri görülmekle beraber epitel görünüme sahip hücrelerin varlığı dikkat çekicidir. A, B, C P0; D P1. Ölçek çubuğu: A, B 200 μm , C 100 μm D 50 μm .



Şekil 4.10 Grup 2 (MafA) hücrelerinin gen aktarımı sonrası ilerleyen pasajda epitel hücre görünümüne sahip hücrelerin kültür ortamında baskın duruma geçtiği gözlemlenmiştir. A-D P3. Ölçek çubuğu: A 20 µm, B 200 µm, C 100 µm D 50 µm.

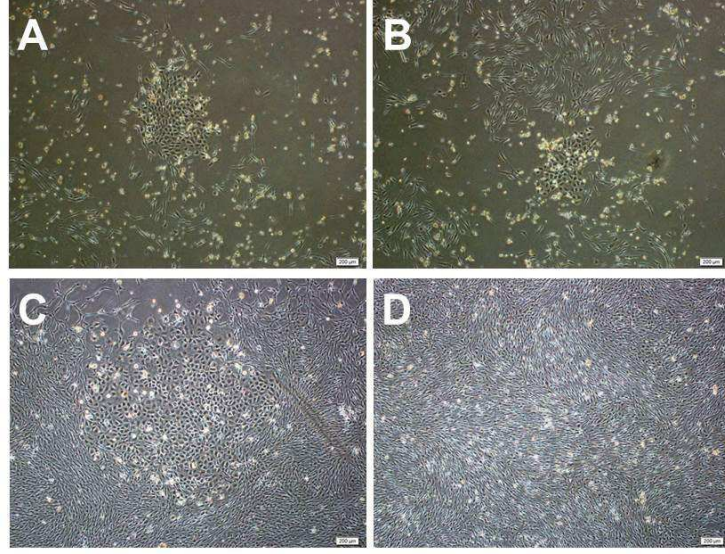


Şekil 4.11 Grup 3 (Pax4) hücrelerinin gen aktarımı sonrasında mikroskop altındaki görüntüleri. A-D P0. Ölçek çubuğu: A-C 200 µm, D 100 µm.

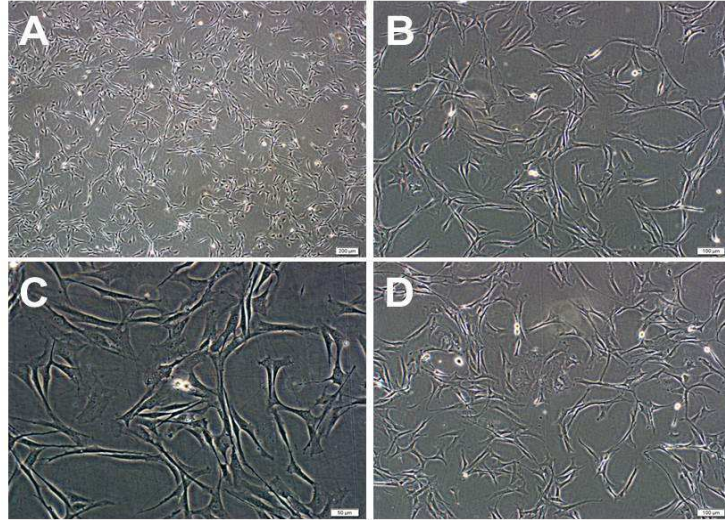


Şekil 4.12 Grup 3 (Pax4) hücrelerinin gen aktarımı sonrasında mikroskop altındaki 21. gün görüntüleri. Hücrelerin çoğalarak oluşturdukları sıkışık ortamda bir araya gelerek pankreas adacık benzeri hücre kitlelerini oluşturduğu gözlemlenmiştir. A-D P0. Ölçek çubuğu: A 200 μm , B, C 100 μm , D 50 μm .

Grup 4 hücreleri (Pax4-MafA) gen aktarımı sonrasında karışık hücrelerden oluşmuş olup Grup 2 hücrelerine benzer şekilde mezenkimal kök hücre ve epitel hücre morfolojilerine sahip hücrelerden oluştuğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.13.). İlerleyen pasajlarda Grup 2 hücrelerinden farklı olarak Grup 4 hücreleri mezenkimal kök hücre morfolojisi sergilemeye başlamıştır (Şekil 4.14.). Grup 2 ve Grup 4 hücrelerinin diğer hücre tipleriyle karşılaştırıldığında göreceli olarak hızlı çoğaldıkları gözlemlenmiştir.

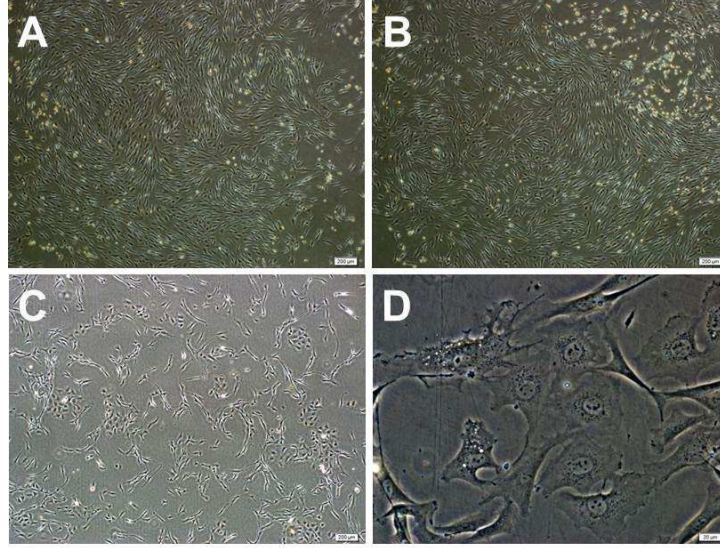


Şekil 4.13 Grup 4 (Pax4-MafA) hücrelerinin gen aktarımı sonrasında mikroskop altındaki görüntüleri. Mezenkimal kök hücre ve epitel hücre benzeri morfoloji sergileyen hücreler kültür ortamında gözlemlenmiştir. A, B P0 11. gün; C, D P0 18. gün. Ölçek çubuğu: A-D 200 μ m.



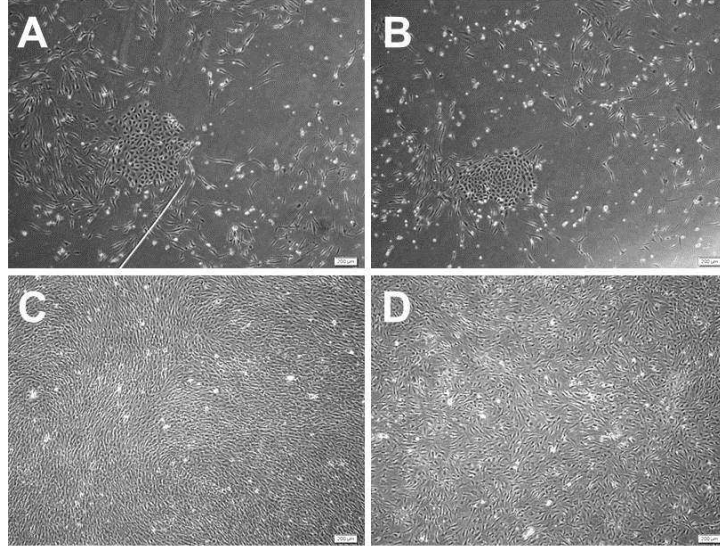
Şekil 4.14 Grup 4 (Pax4-MafA) hücrelerinin erken pasajdaki epitel görünümünü sonraki pasajlarda kaybettiği gözlemlenmiştir. A-D P1. Ölçek çubuğu: A 200 μ m, B, D 100 μ m, C 50 μ m.

Pax4-Gck genleri aktarılmış 5. Grup hücreler karışık bir hücre morfolojisi sergilemiş olup ilerleyen pasajlarda epitel hücre benzeri hücrelerin ortaya çıktığı görülmüştür (Şekil 4.15.).

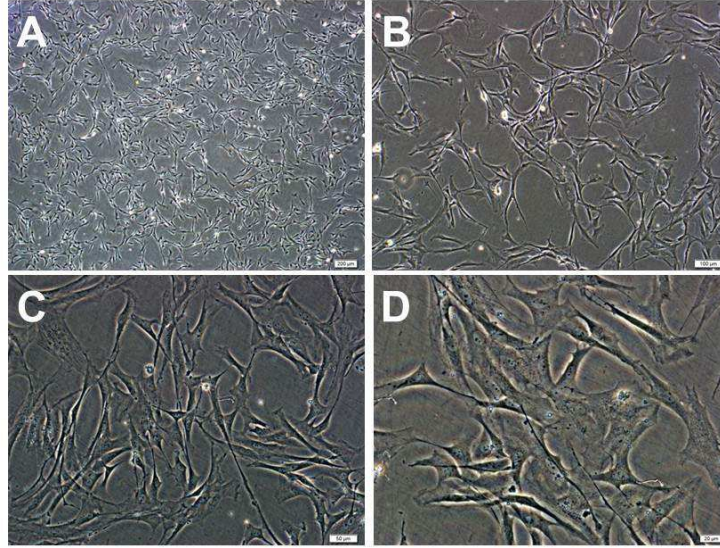


Şekil 4.15 Grup 5 (Pax4-Gck) hücrelerinin gen aktarımı sonrasında mikroskop altındaki görüntüleri. A, B P0, C, D P1. Ölçek çubuğu: A-C 200 μ m, D 20 μ m.

6. Grup hücreler (Ngn3-MafA) MafA geni içeren diğer hücre grupları gibi kültür ortamında epitel görünümlü hücrelerin oluştuğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.16.). İlk pasajda ortaya çıkan epitel görünümlü hücreler hızlı çoğalarak kültür ortamında baskın geldiği (Şekil 4.16. C, D) ancak bir sonraki pasajda bu tip hücrelerin tamamen ortadan kaybolduğu ve yerine mezenkimal kök hücre morfolojisine sahip hücrelerin geçtiği gözlemlenmiştir (Şekil 4.17.). Epitel mezenkimal geçişine (EMT) benzer bir durum sergilemektedir.

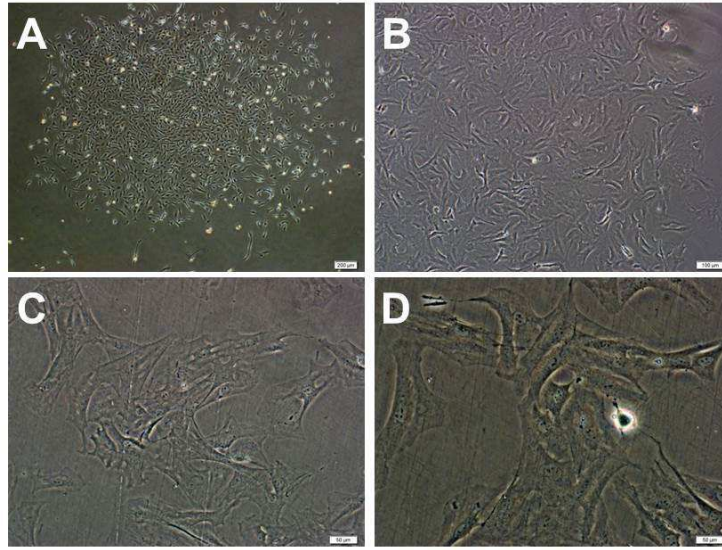


Şekil 4.16 Grup 6 (Ngn3-MafA) hücrelerinin gen aktarımı sonrasında epitel hücre ve mezenkimal kök hücre benzeri görüntüleri. A, B P0 11. gün, C, D P0 18. gün. Ölçek çubuğu: A-D 200 μ m.

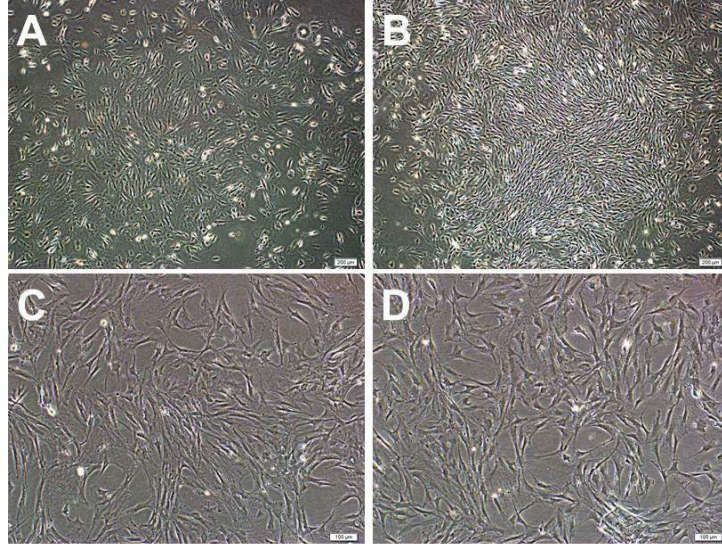


Şekil 4.17 Grup 6 (Ngn3-MafA) hücrelerinin gen aktarımı sonrası ilerleyen pasajda epitel görünümlü hücrelerin kültür ortamında bulunmadığı gözlemlenmiştir. A-D P1. Ölçek çubuğu: A 200 μ m, B 100 μ m, C 50 μ m, D 20 μ m.

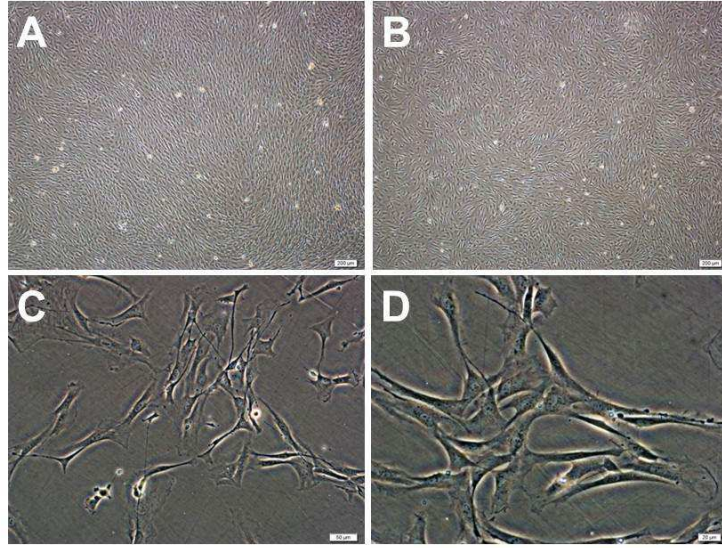
Grup 7 (Ngn3-Gck), Grup 8 (Ngn3-Pax4) ve Grup 9 (Ngn3-Pax4-MafA) hücrelerinin gen aktarımı sonrasındaki kültürlerinde mezenkimal kök hücre morfolojisinden farklı hücre tipleri gözlemlenmemiştir. (Şekil 4.18-20). Grup 7 hücresi elde ettiğimiz diğer hücreler ile kıyaslandığında oldukça yavaş bir çoğalma eğilimi izlemekteydi. Bu yavaş çoğalma sonraki analizler için gerekli olan yüksek hücre sayılarına ulaşmamıza olanak vermediğinden ve hücre farklı bir hücre görünümü sergilemediğinden dolayı sonraki bazı analizlere bu hücre hattı eklenmemiştir.



Şekil 4.18 Grup 7 hücrelerinin gen aktarımı sonrasında mikroskop altındaki görüntüleri. A P0 11. Gün, B P0 18. Gün, C, D P1. Ölçek çubuğu: A 200 μ m, B 100 μ m, C, D 50 μ m.



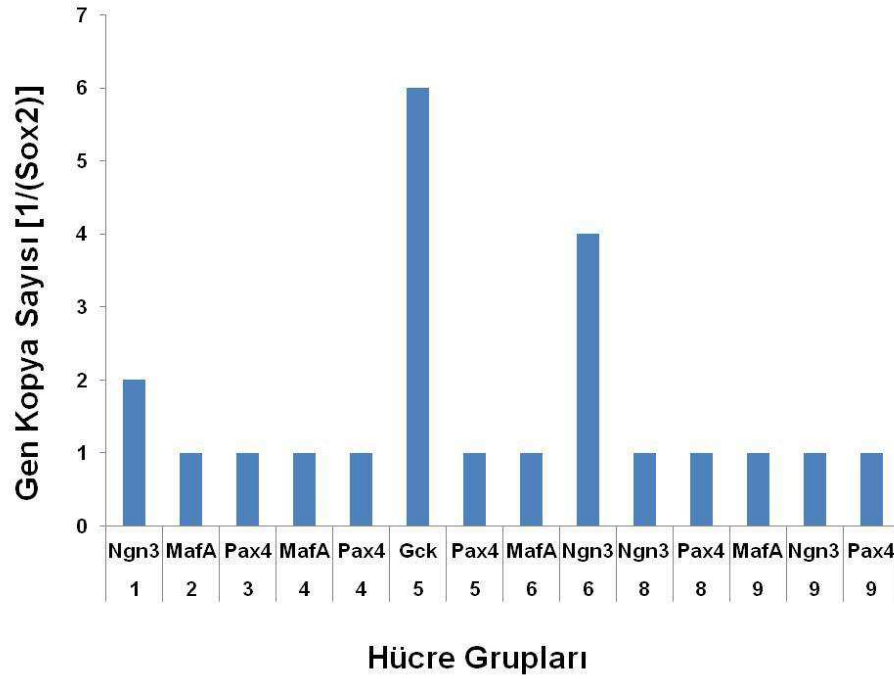
Şekil 4.19 Grup 8 hücrelerinin gen aktarımı sonrasında mikroskop altındaki görüntüleri. A, B P0; C, D P1. Ölçek çubuğu: A, B 200 μm , C, D 100 μm .



Şekil 4.20 Grup 9 hücrelerinin gen aktarımı sonrasında mikroskop altındaki görüntüleri. A, B P0; C, D P1. Ölçek çubuğu: A, B 200 μm , C 100 μm , D 20 μm .

4.3.2 Gen Kopya Sayısı

Hücrelerin gen kopya sayılarını belirlemek için genomik DNA izolasyonu sonrasında Real-Time PCR ile Ngn3, Pax4, MafA ve Gck genlerinin çoğalmaları incelenerek ve Sox2 geni ile karşılaştırılmıştır (Şekil 4.21.). Hücrenin genomuna giren genlerin sayısı çoğunlukla tek kopya olarak gerçekleştiği görülmüştür. Sadece Grup 1 ve 6 hücrelerine entegre olan Ngn3 geni kopya sayısı sırası ile 2 ve 4 olarak hesaplanmıştır. Ayrıca Grup 5 hücrelerinde var olan Gck gen kopya sayısı 6 olarak hesaplanmıştır. Bütün hesaplanan değerler hücrenin kendi genleri hesaplamadan çıkartılarak bulunmuştur. Sonuçlar hücrenin kendi Sox2 gen kopya sayısı temel alınarak oranlanmıştır.

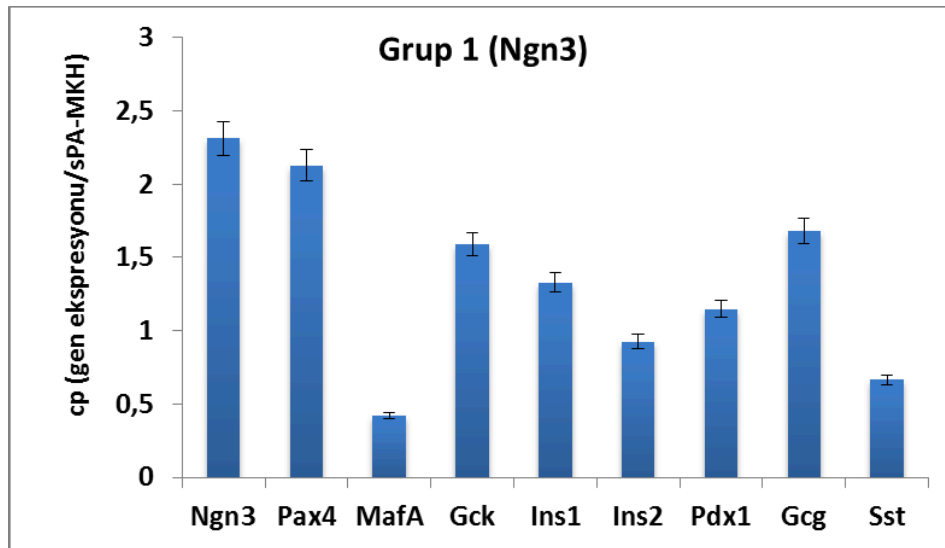


Şekil 4.21 Hücrenin genomuna girmiş aktarılan genlerin kopya sayıları. Genom üzerinde bulunan gen kopya sayısı hesaplanırken hücrenin kendi gen kopya sayısı çıkarılmıştır.

4.3.3 Gen Ekspresyon Analizi

Gen aktarımı sonrasında hücrelerin kimyasal uyarı olmadan farklılaşma oranını belirlemek için bir takım pankreas adacık belirteçlerinin gen ekspresyonuna bakılmıştır. Ngn3, Pax4, MafA ve Gck genlerinin ifadesi hesaplandığı gibi farklılaştırma için önemli olan Ins1, Ins2 ve Pdx1 (beta hücre belirteci); Glukagon (Gcg: alfa hücre belirteci); ve Somatostatin (Sst; delta hücre belirteci) genlerinin miktarı Real-Time PCR ile belirlenmiştir.

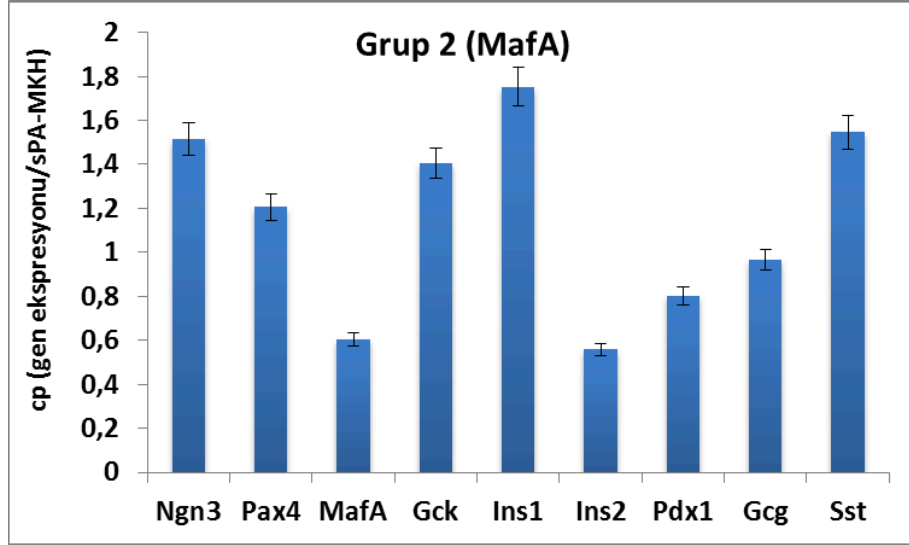
Ngn3 geni aktarıldıktan sonra sPA-MKH'lerinde Ngn3 geni ekspresyonu 2 kattan daha fazla artmış olup, Pax4, Gck ve Ins1 genlerinin ekspresyonu arttığı görülmüştür. Buna karşın Gcg ekspresyonu da 1,5 kat artmıştır (Şekil 4.22.).



Şekil 4.22 Grup 1 (Ngn3) hücrelerinin gen aktarılmamış olan (Grup 10) hücrelere göre pankreas adacık belirteç genlerinin hücre içi ekspresyonundaki değişimi. Gen ifadesindeki değişimler katlar şeklinde belirtilmiştir.

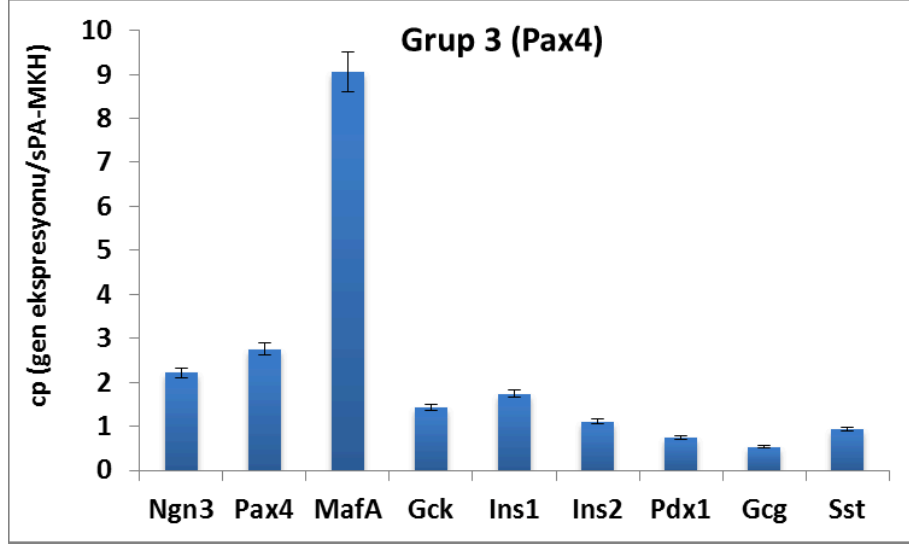
Önemli bir beta hücre belirteci olan MafA geni ektopik olarak ifade edildiğinde Ngn3, Gck ve Ins1 genlerinde ekspresyonlar artmış olup delta hücre belirteci olan Sst geni

ekspresyonu da yaklaşık 1,6 kat artmıştır (Şekil 4.23.). İlginç olarak MafA ekspresyonu gen aktarılmamış olan hücreye göre yarı yarıya azalmıştır. Ektopik olarak üretilen MafA geni geri besleme etkisiyle hücrenin kendi ifade ettiği ciddi oranda düşürmüştüğü görülmüştür.

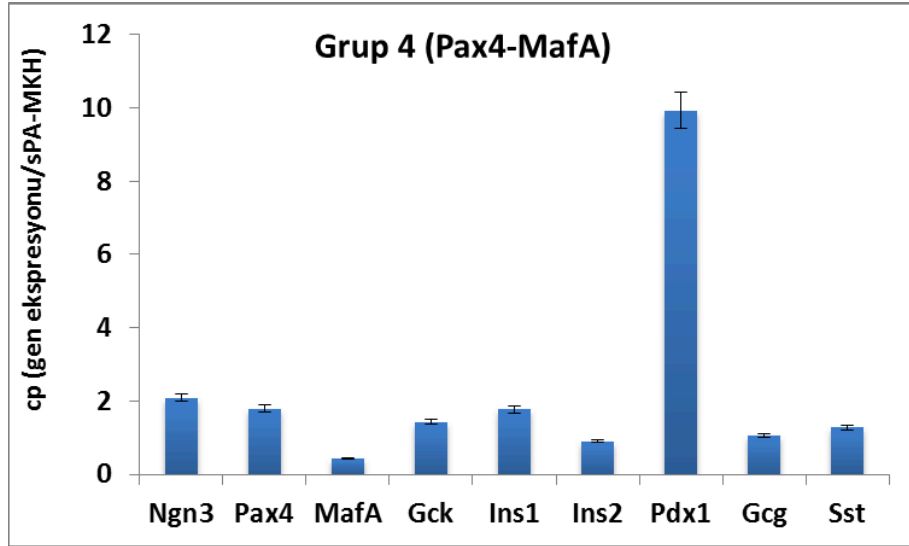


Şekil 4.23 Grup 2 (MafA) hücrelerinin gen aktarılmamış olan (Grup 10) hücrelere göre pankreas adacık belirteç genlerinin hücre içi ekspresyonundaki değişimi. Gen ifadesindeki değişimler katlar şeklinde belirtilmiştir.

Pax4 geni aktarılmış hücrelerde MafA ekspresyonu kuvvetli bir şekilde arttığı, yaklaşık 9 kat, gözlemlenmiştir (Şekil 4.24.). Bu durum 2. Grup hücrelerde gözükken durumla tezat yaratmaktadır.



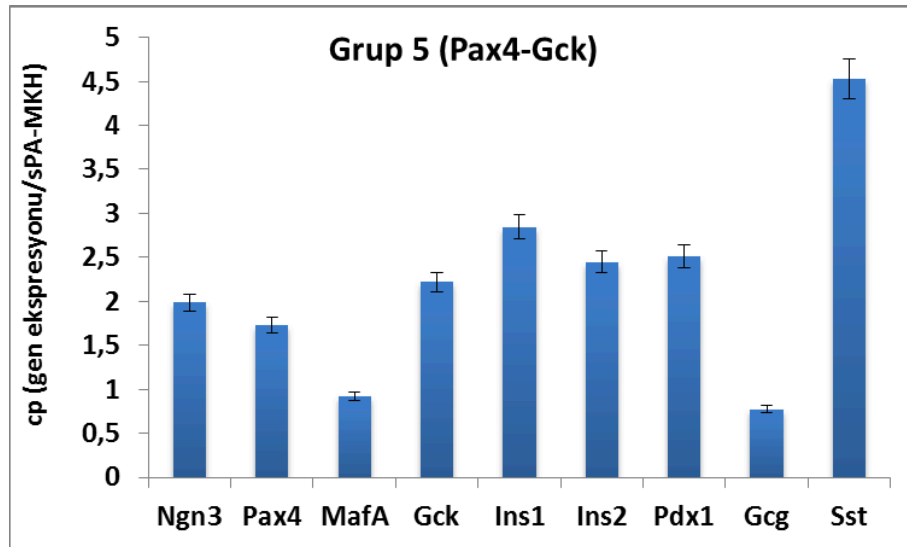
Şekil 4.24 Grup 3 (Pax4) hücrelerinin gen aktarılmamış olan (Grup 10) hücelere göre pankreas adacık belirteç genlerinin hücre içi ekspresyonundaki değişimi. Gen ifadesindeki değişimler katlar şeklinde belirtilmiştir.



Şekil 4.25 Grup 4 (Pax4-MafA) hücrelerinin gen aktarılmamış olan (Grup 10) hücelere göre pankreas adacık belirteç genlerinin hücre içi ekspresyonundaki değişimi. Gen ifadesindeki değişimler katlar şeklinde belirtilmiştir.

Pax4-MafA geni aktarılmış 4. Grup hücrelerinin gen ekspresyon profiline bakıldığında Pdx1'in 10 kattan fazla arttığı görüldü. Grup 3 hücreleri (yalnız Pax4 aktarılmış) ile karşılaştırıldığında 4. Grup hücrelerde MafA ekspresyonu ciddi oranda baskılanmıştır (Şekil 4.25.). Grup 2 hücreleri ile karşılaştırıldığında bu baskılanmanın MafA'nın ektopik ekspresyonundan kaynaklanabileceği varsayılabilir.

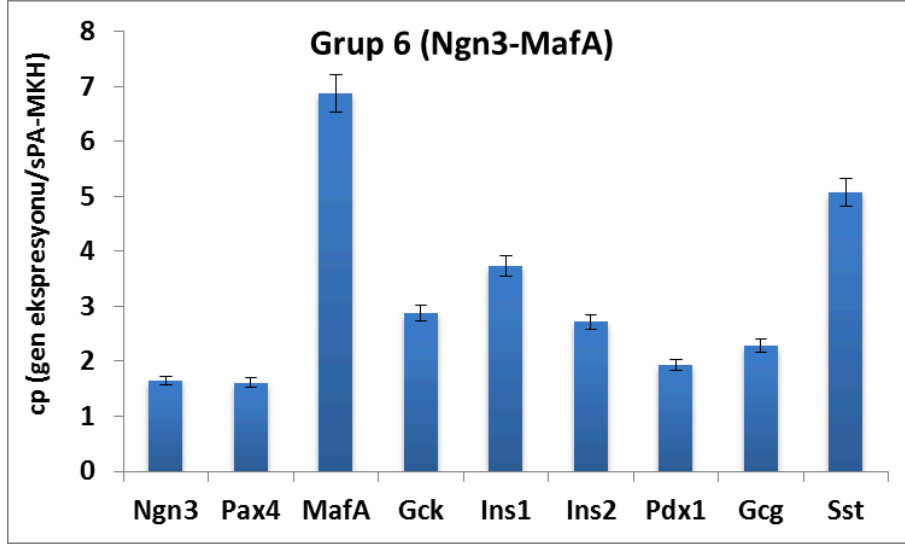
Ins1, Ins2, Pdx1 ve Sst genlerinin görece kuvvetle arttığı Grup 5 hücrelerinde görülmüştür (Şekil 4.26.). Grup 4 hücrelerine göre MafA geni yerine Gck geni eksprese eden bu hücreler mezenkimal kök hücreyi delta hücresi yönüne doğru farklılaştırdığı söylenebilir.



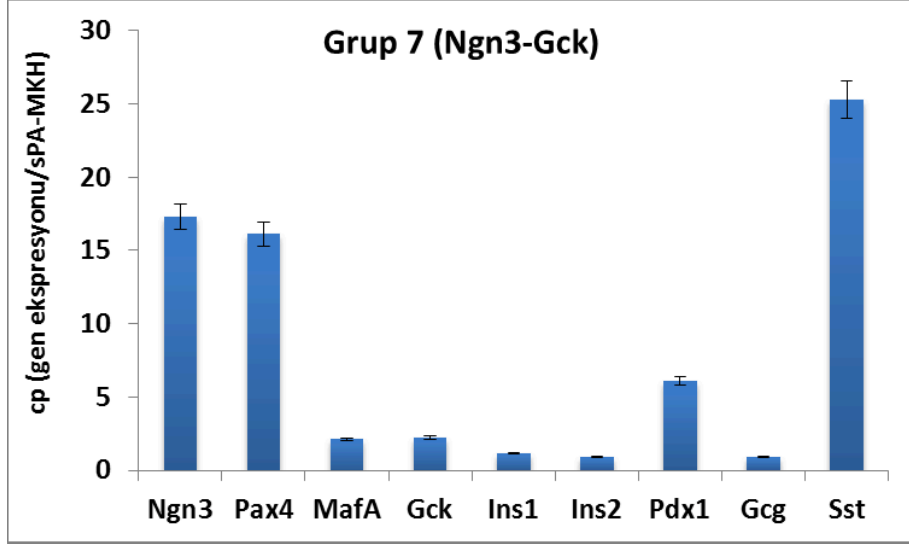
Şekil 4.26 Grup 5 (Pax4-Gck) hücrelerinin gen aktarılmamış olan (Grup 10) hücelere göre pankreas adacık belirteç genlerinin hücre içi ekspresyonundaki değişimi. Gen ifadesindeki değişimler katlar şeklinde belirtilmiştir.

MafA gen ekspresyonunun kuvvetli olarak arttığı bir diğer hücre hattı Ngn3-MafA geni aktarılmış olan Grup 6'dır (Şekil 4.27.). Yaklaşık 9 kat ekspresyon artışı gözlemlediğimiz sadece Pax4 geni aktarılmış Grup 3 hücrelerine nazaran Grup 6

hücrelerindeki MafA ekspresyonu yaklaşık 7 kat artmıştır. Bunun yanı sıra Sst ekspresyonu da 5 kattan fazla artmıştır. Ngn3 ve MafA geni aktarılmış 1. ve 2. Grup hücreleri ile karşılaştırıldığında MafA geninin ekspresyonunda düşme beklenirken artış başka bir gen ekspresyonu düzenleyici mekanizmasının varlığını ortaya koymaktadır. Sst ekspresyonu ise 6. Grupta 2. Grup hücrelerine göre çok daha fazla artmıştır.



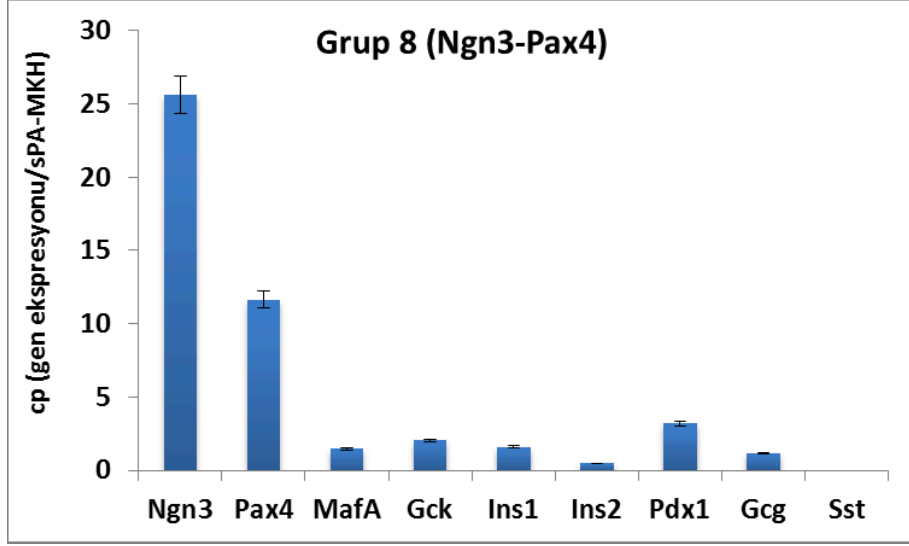
Şekil 4.27 Grup 6 (Ngn3-MafA) hücrelerinin gen aktarılmamış olan (Grup 10) hücrelere göre pankreas adacık belirteç genlerinin hücre içi ekspresyonundaki değişimi. Gen ifadesindeki değişimler katlar şeklinde belirtilmiştir.



Şekil 4.28 Grup 7 (Ngn3-Gck) hücrelerinin gen aktarılmamış olan (Grup 10) hücelere göre pankreas adacık belirteç genlerinin hücre içi ekspresyonundaki değişimi. Gen ifadesindeki değişimler katlar şeklinde belirtilmiştir.

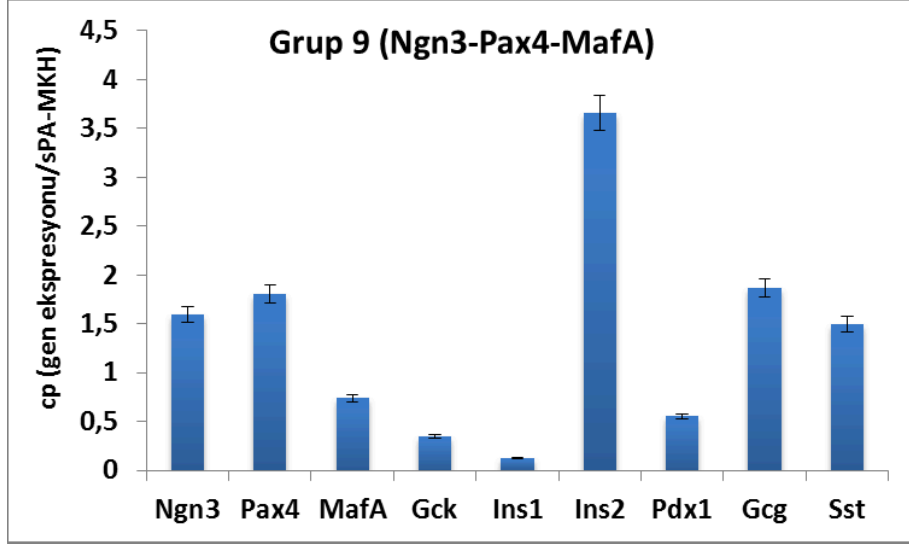
Ngn3'ün Gck ile birlikte olan ekspresyonunda tek başına eksprese olduğu Grup 1 hücrelerine göre Ngn3 ve Pax4 ekspresyonları 15 kattan fazla arttığı gözlemlenmiş olup Sst geni ekspresyonu Gck'nın ifade edildiği diğer bir hücre hattı olan 5. Grup hücelere benzer olarak arttığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.28.). Ancak bu sefer Gck ekspresyonu sayesinde Sst ekspresyonu 25 kat artmıştır. Bu bulgu bize Gck'nın hücre içindeki ekspresyonunun kök hücreyi delta hücre benzeri bir hücreye farklılaştırdığını işaret etmektedir. Bu etki özellikle Ngn3 ekspresyonu varlığında daha kuvvetli olmaktadır.

Ngn3 ve Pax4 genleri tek başlarına ifade edildiğinde hücre içerisinde kendi ekspresyonunu fazla arttırmazken aynı anda kök hücrede eksprese edildiğinde bu sefer Ngn3 ekspresyonu 25 kat ve Pax4 ekspresyonu 11,6 kat arttığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.29.). Grup 8 hücrelerinde ayrıca Pdx1 ekspresyonunun 3 kat arttığı gözlemlenmiştir. Buna karşın Ins1 ve Ins2 değerlerinde çok fazla artmadığı ve Sst ekspresyonu hiç gözlemlenmemiştir.



Şekil 4.29 Grup 8 (Ngn3-Pax4) hücrelerinin gen aktarılmamış olan (Grup 10) hücelere göre pankreas adacık belirteç genlerinin hücre içi ekspresyonundaki değişimi. Gen ifadesindeki değişimler katlar şeklinde belirtilmiştir.

3 genin aktarıldığı 9. Grup hücreleri diğer tüm hücrelerden farklı olarak Ins2 genini çok kuvvetli olarak ifade etmiş olup Ins1 geninin ekspresyonunu baskıladığı görülmüştür (Şekil 4.30.). İnsandaki insülin gen ürününün eşleniği olan Ins2'deki artış hücrenin sağlıklı bir beta hücre farklılaşmasına ulaşıldığını işaret edebilir. Ins1 transkripsiyon ürününün sıçanlarda fazla eksprese edildiğinde diyabetin gelişimini desteklediği bildirilmiş olup 9. Grup hücrelerde ekspresyon düşmesi sağlıklı beta hücre farklılaşmasını destekleyen bir olgudur.



Şekil 4.30 Grup 9 (Ngn3-Pax4-MafA) hücrelerinin gen aktarılmamış olan (Grup 10) hücelere göre pankreas adacık belirteç genlerinin hücre içi ekspresyonundaki değişimi. Gen ifadesindeki değişimler katlar şeklinde belirtilmiştir.

4.3.4 Gen Ekspresyonu Sonrasında Hücrelerin Kök Hücre Belirteçlerini Taşımaları (Akım Sitometrisi)

Gen aktarımı sonrasında hücrelerin kök hücre özelliklerini taşıdığını kontrol etmek için hücrelerin sahip olduğu yüzey belirteçleri akım sitometri ile analiz edilmiştir. CD90, CD29 ve CD45 ekspresyonları incelenmiş olup gen aktarılmamış SPA-MKH'lerine göre değişimler anlaşılacak istenmiştir. Hücre analizlerinin geneline bakıldığında CD29 ve CD90 ifade eden hücre sayılarında bir azalma gözlemlenmediği gibi, negatif olan CD45 ekspresyonunda artmadığı tespit edilmiştir. Bu bize gen aktarımı sonrasında hücrelerin halen kök hücre özelliklerini taşıdığına işaret etmektedir (EK 6-14).

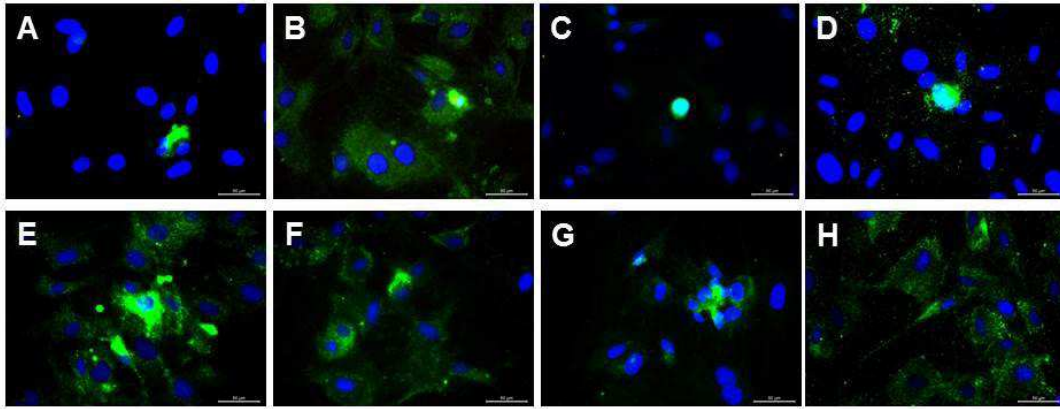
4.3.5 Hücre İçi Proteinlerin İncelenmesi

Kimyasal uyarılma öncesinde gen aktarılmış olan hücrelerin protein ifadeleri immünfloresan ve Western blot hibridizasyon yöntemleri ile gösterilmiştir.

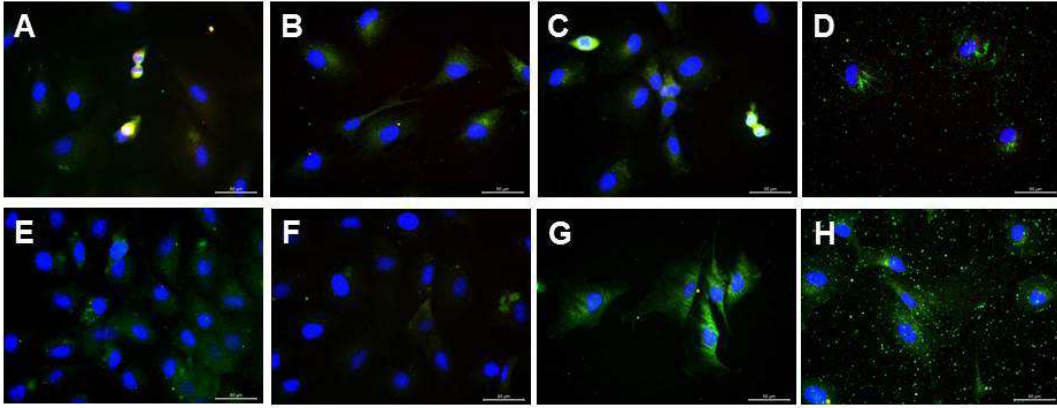
4.3.5.1 İmmün Flüoresan

1. Grup hücre hattında Pax4 ekspresyonu beklendiği gibi artmıştır (Şekil 4.31.). Literatürdeki kaynaklara göre Pax4 ve Ngn3 genleri karşılıklı olarak birbirlerinin gen ekspresyonlarını desteklemektedirler. İnsülin ve c-Peptit üretimi hücrelerde görülsede gen ekspresyon analizlerine paralel olarak alfa hücre belirteci olan Gck proteini varlığı belirgindir. Grup 2 hücrelerinde diğer hücrelerden farklı olarak belirgin olarak Pdx-1 boyanması kuvvetli olmuştur (Şekil 4.32.-G). Bu aynı zamanda hücrede insülin üretimini de olumlu yönde etkilemiştir (Şekil 4.32.-E). Pax4 gen ifadesi 3. Grup hücrelerde Ngn3 protein miktarını 1. Grup hücrelerdekine benzer şekilde artırmıştır (Şekil 4.33.-A). Gen ekspresyonuna göre MafA gen ifadesi yüksek bir değere sahipken boyamalarda belirgin olarak görülmemektedir (Şekil 4.33.-C). Pdx-1 boyanması 4. Grup hücrelerde gen ekspresyon analizlerindeki benzer bir kuvvette olmamasına rağmen boyanmıştır ve beklendiği gibi artan Pdx-1 proteini insülin üretimi üzerinde olumlu etkisi gözlemlenmiştir (Şekil 4.34.). c-Peptit boyanması insülin üretiminin var olduğunun iyi bir göstergesidir (Şekil 4.34.-F). Glikokinaz miktarının yüksek olması bu hücrelerin glikoz miktarına yanıt verecek işlevselliğe sahip olduğuna işaret etmektedir (Şekil 4.34.-D). İnsülin üretiminin 5. Grup hücrelerde yüksek olmasını beklerken boyanmanın çok iyi olmadığı görülmektedir (Şekil 4.35.-E). Ancak c-Peptit miktarı hücrelerde görülmekte ve insülin miktarının da eş olarak yüksek olmasını gerektirmektedir (Şekil 4.35.-F). Sebebi çok net olmamakla beraber insülin miktarının yüksek olması beklenmektedir. Glikokinaz boyanması da hücrelerde görülmektedir (Şekil 4.35.-D). Real Time PCR analizlerine uygun olarak gen ekspresyonu yüksek olan proteinler 6. Grup hücrelerde boyanması görülmüştür. Pdx-1 boyanması beklenenden kuvvetli iken insülin boyanması zayıf kalmıştır (Şekil 4.36.-E,G). Glukagon bu hücrelerde boyanması beklendiği gibi görülmektedir (Şekil 4.36.-H). MafA geni ekprese edilmesine rağmen hücre çoğalmasının hızlı olmamasının bir sebebi Pdx-1

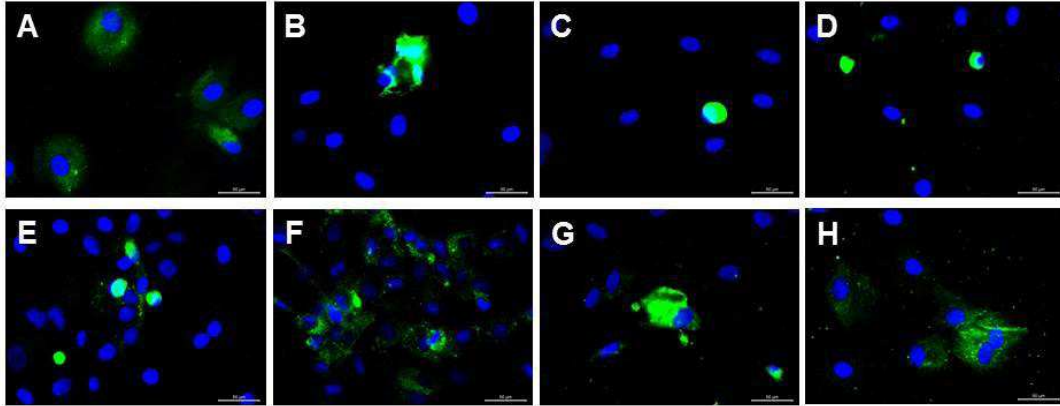
seviyesinin yüksek olabileceği varsayımı bu bulgu ile desteklenmektedir. Ngn3/Glikokinaz genleri aktarılmış 7. Grup hücrelerde bütün boyamalarda zayıf kalmıştır (Şekil 4.37.). Belirgin olmasa da glikokinaz proteini varlığı gen ekspresyon analizlerinden beklendiği gibi görülmektedir (Şekil 4.37.-D). Gen aktarılmamış kontrol hücrelerinde (sıçan pankreas adacık kaynaklı kök hücreler) Pax4 ve Pdx-1 proteinleri boyanmış olmasına rağmen boyamalar kuvvetli değildir. (Şekil 4.40.-B,G). Üç genin aktarıldığı 9.Grup hücrelerinde Western blot hibridizasyon analiz sonuçlarına uygun olarak belirgin bir Ngn3, Pax4, Pdx-1 ve c-Peptit proteini varlığı boyamalarla gösterilmiştir (Şekil 4.39.-A,B,F,G). Yaygın olmamakla beraber Glukogon pozitif hücreler bölgesel olarak boyamalarda görülmüştür (Şekil 4.39-H). Ngn3 ve Pax4 genlerinin birlikte aktarıldığı 8. Grup hücrelerde MafA, insülin, c-peptit ve Pdx1 proteinlerini az da olsa eksprese ettiği boyamalar sonucunda görülmüştür (Şekil 4.38.).



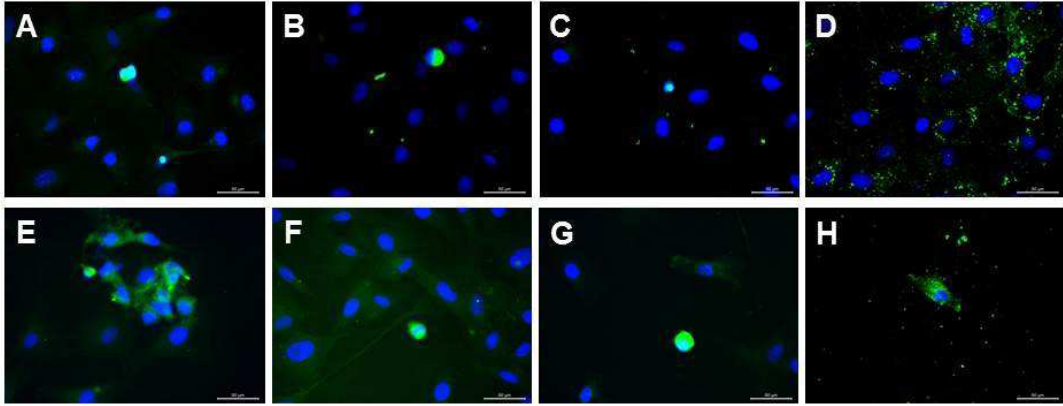
Şekil 4.31 Gen aktarımı sonrasında 1.Grup (Ngn3) hücrelerinin beta hücre ve diğer adacık hücre belirteçlerine yönelik immünfloresan boyanması. Hücrelerin çekirdekleri DAPI ile mavi renkte gösterilmiştir. Belirteç proteinleri yeşil renk ile işaretlenmiştir: A, Ngn3; B, Pax4; C, MafA; D, Glikokinaz; E, İnsülin; F, c-Peptit; G, Pdx-1; H,Glukagon. Ölçek çubuğu: 50 µm.



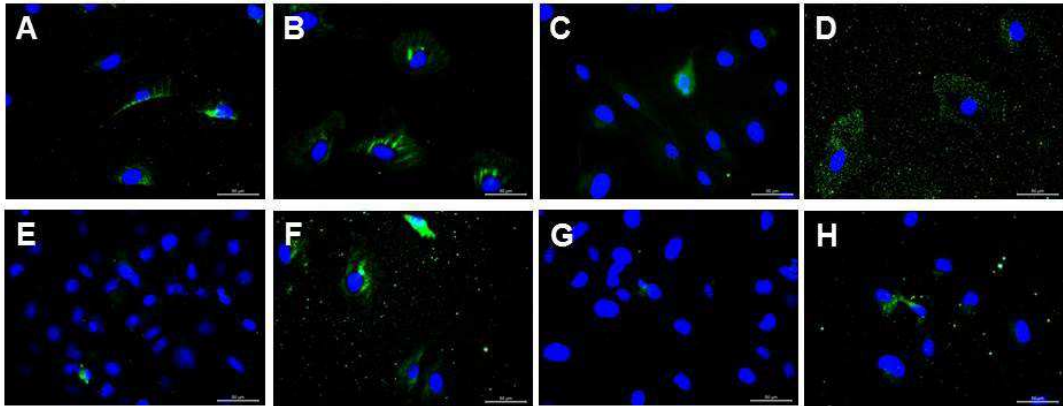
Şekil 4.32 Gen aktarımı sonrasında 2. Grup (MafA) hücrelerinin beta hücre ve diğer adacık hücre belirteçlerine yönelik immünfloresan boyanması. Hücrelerin çekirdekleri DAPI ile mavi renkte gösterilmiştir. Belirteç proteinleri yeşil renk ile işaretlenmiştir: A, Ngn3; B, Pax4; C, MafA; D, Glikokinaz; E, İnsülin; F, c-Peptit; G, Pdx-1; H, Glukagon. Ölçek çubuğu: 50 µm.



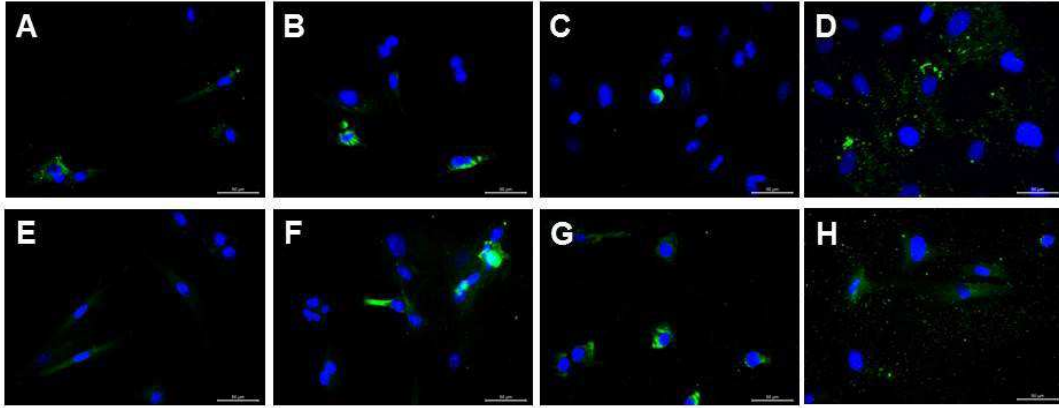
Şekil 4.33 Gen aktarımı sonrasında 3. Grup (Pax4) hücrelerinin beta hücre ve diğer adacık hücre belirteçlerine yönelik immünfloresan boyanması. Hücrelerin çekirdekleri DAPI ile mavi renkte gösterilmiştir. Belirteç proteinleri yeşil renk ile işaretlenmiştir: A, Ngn3; B, Pax4; C, MafA; D, Glikokinaz; E, İnsülin; F, c-Peptit; G, Pdx-1; H, Glukagon. Ölçek çubuğu: 50 µm.



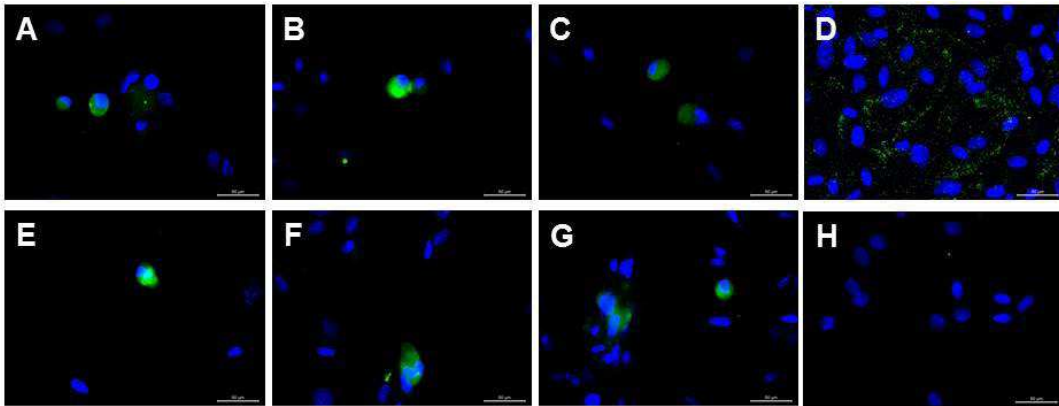
Şekil 4.34 Gen aktarımı sonrasında 4. Grup (Pax4-MafA) hücrelerinin beta hücre ve diğer adacık hücre belirteçlerine yönelik immünfloresan boyanması. Hücrelerin çekirdekleri DAPI ile mavi renkte gösterilmiştir. Belirteç proteinleri yeşil renk ile işaretlenmiştir: A, Ngn3; B, Pax4; C, MafA; D, Glikokinaz; E, İnsülin; F, c-Peptit; G, Pdx-1; H, Glukagon. Ölçek çubuğu: 50 µm.



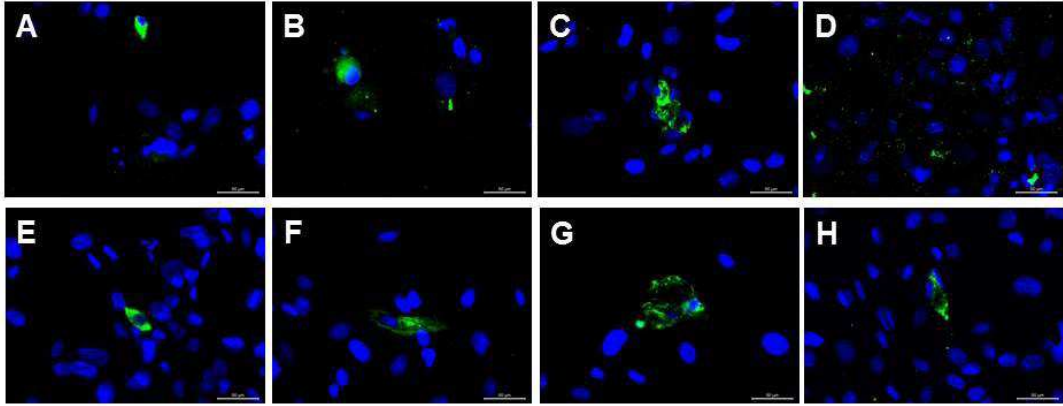
Şekil 4.35 Gen aktarımı sonrasında 5. Grup (Pax4-Gck) hücrelerinin beta hücre ve diğer adacık hücre belirteçlerine yönelik immünfloresan boyanması. Hücrelerin çekirdekleri DAPI ile mavi renkte gösterilmiştir. Belirteç proteinleri yeşil renk ile işaretlenmiştir: A, Ngn3; B, Pax4; C, MafA; D, Glikokinaz; E, İnsülin; F, c-Peptit; G, Pdx-1; H, Glukagon. Ölçek çubuğu: 50 µm.



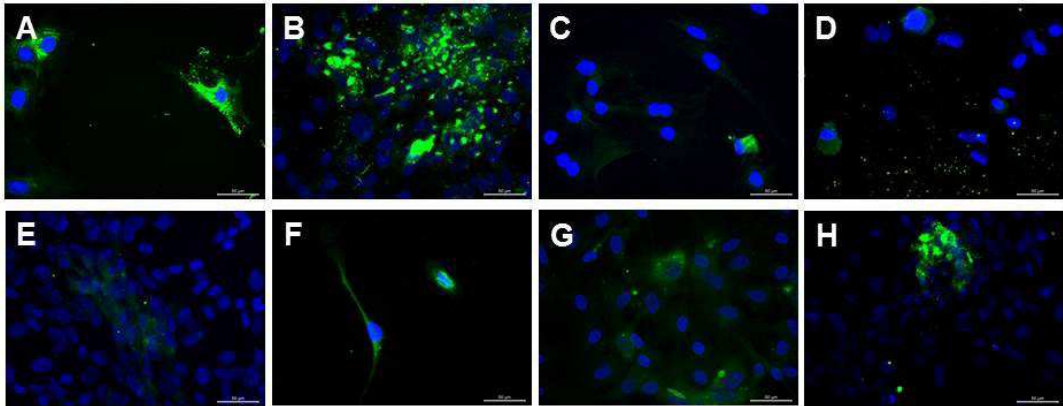
Şekil 4.36 Gen aktarımı sonrasında 6. Grup (Ngn3-MafA) hücrelerinin beta hücre ve diğer adacık hücre belirteçlerine yönelik immünfloresan boyanması. Hücrelerin çekirdekleri DAPI ile mavi renkte gösterilmiştir. Belirteç proteinleri yeşil renk ile işaretlenmiştir: A, Ngn3; B, Pax4; C, MafA; D, Glikokinaz; E, İnsülin; F, c-Peptit; G, Pdx-1; H, Glukagon. Ölçek çubuğu: 50 µm.



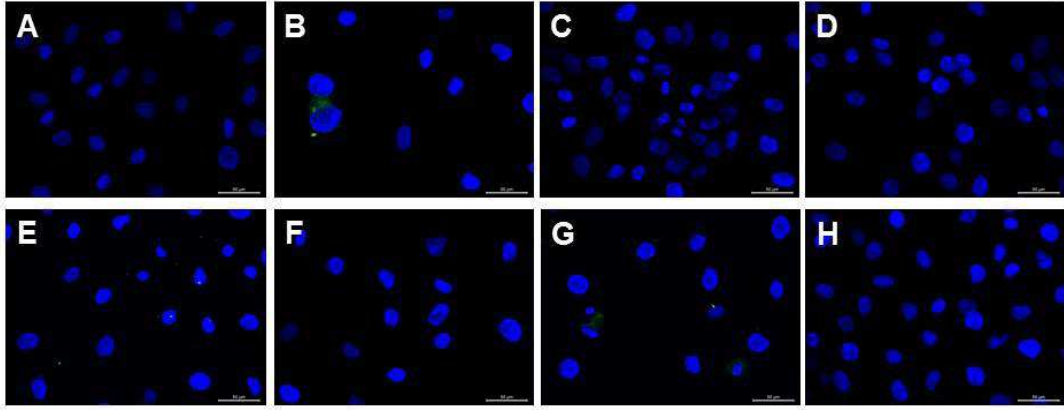
Şekil 4.37 Gen aktarımı sonrasında 7. Grup (Ngn3-Gck) hücrelerinin beta hücre ve diğer adacık hücre belirteçlerine yönelik immünfloresan boyanması. Hücrelerin çekirdekleri DAPI ile mavi renkte gösterilmiştir. Belirteç proteinleri yeşil renk ile işaretlenmiştir: A, Ngn3; B, Pax4; C, MafA; D, Glikokinaz; E, İnsülin; F, c-Peptit; G, Pdx-1; H, Glukagon. Ölçek çubuğu: 50 µm.



Şekil 4.38 Gen aktarımı sonrasında 8. Grup (Ngn3-Pax4) hücrelerinin beta hücre ve diğer adacık hücre belirteçlerine yönelik immünfloresan boyanması. Hücrelerin çekirdekleri DAPI ile mavi renkte gösterilmiştir. Belirteç proteinleri yeşil renk ile işaretlenmiştir: A, Ngn3; B, Pax4; C, MafA; D, Glikokinaz; E, İnsülin; F, c-Peptit; G, Pdx-1; H, Glukagon. Ölçek çubuğu: 50 µm.



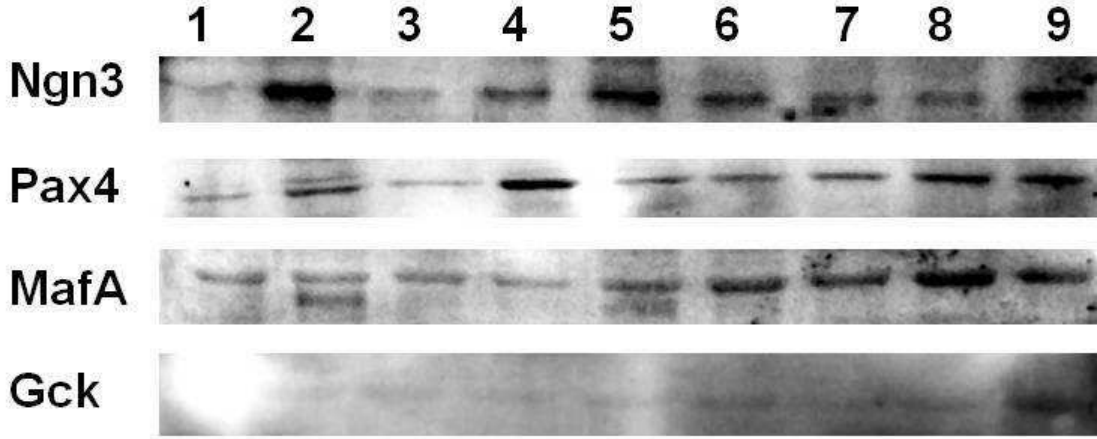
Şekil 4.39 Gen aktarımı sonrasında 9. Grup (Ngn3-Pax4-MafA) hücrelerinin beta hücre ve diğer adacık hücre belirteçlerine yönelik immünfloresan boyanması. Hücrelerin çekirdekleri DAPI ile mavi renkte gösterilmiştir. Belirteç proteinleri yeşil renk ile işaretlenmiştir: A, Ngn3; B, Pax4; C, MafA; D, Glikokinaz; E, İnsülin; F, c-Peptit; G, Pdx-1; H, Glukagon. Ölçek çubuğu: 50 µm.



Şekil 4.40 Gen aktarılmamış 10. Grup (Kontrol) hücrelerin beta hücre ve diğer adacık hücre belirteçlerine yönelik immünfloresan boyanması. Hücrelerin çekirdekleri DAPI ile mavi renkte gösterilmiştir. Belirteç proteinleri yeşil renk ile işaretlenmiştir: A, Ngn3; B, Pax4; C, MafA; D, Glikokinaz; E, İnsülin; F, c-Peptit; G, Pdx-1; H, Glukagon. Ölçek çubuğu: 50 µm.

4.3.5.2 Western Blot Hibridizasyon

Hücrelerde aktardığımız genlerin ürünleri olan proteinleri görebilmek için Western blot analizi gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.41.). Sonuçlar bize proteinlerin ekspresyonlarının var olduğunu ve gen ekspresyon analizlerinde olduğu gibi farklı miktarlarda üretildiğini göstermektedir. Ngn3, Pax4 ve MafA genleri proteinleri kuvvetli olarak ifade edilirken Gck proteini ifadesinin zayıf olduğu gözlemlenmiştir.



Şekil 4.41 Western blot hibridizasyon analizi sonucu. 1:1.Grup, 2: 2.Grup, 3: 3.Grup, 4: 4.Grup, 5: 5.Grup, 6: 6.Grup, 7: 7.Grup, 8: 8.Grup, 9: 9.Grup. Hücrelere aktarılan genlere bağlı olarak hücrenin kendi genlerinin ekspresyonlarının arttığı gözlemlenmiştir.

4.4 Endokrin Hücre Farklılaşması

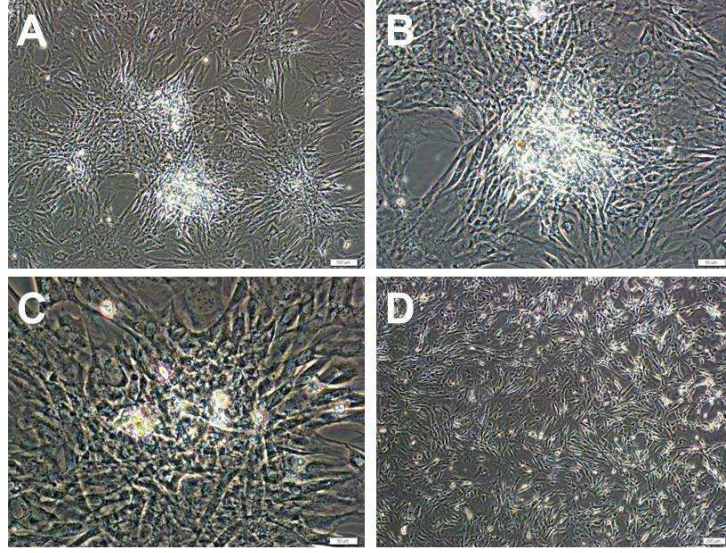
Hücreler kimyasal indükleme ile 14 gün boyunca farklılaştırmaya alınmıştır. Gen aktarımı gerçekleşmiş hücrelerin bu işlem ile endokrin hücreye doğru farklılaşabilme yetenekleri incelenmek istenmiştir. Aktarılan farklı genlerin/gen gruplarının hücre üzerindeki etkileri farklı olmuştur. Kimyasal indüklemenin bu hücreler üzerindeki etkisi ve olgun beta hücre benzeri hücreye farklılaşması araştırılmak istenmiştir. Bu amaçla EGF (Epidermal growth factor), Nicotinamide, Activin-A, Activin-B, Exendin-4, HGF (Hepatocyte growth factor), Pentagastrin kimyasalları belli oranda karıştırılarak hücreler 14 gün boyunca farklılaştırmaya alınmış ve hücrelerdeki değişimler analiz edilmiştir.

Ngn3-Gck geni aktarılmış Grup 7 hücrelerinin yavaş çoğalması ve pankreas adacık delta hücresi benzeri bir karakter sergilediği için endokrin farklılaşmaya alınmamıştır.

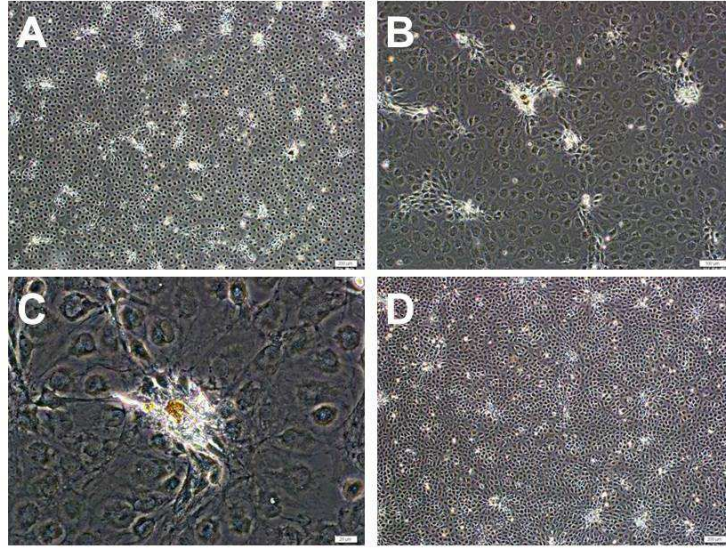
4.4.1 Kimyasal Uyarılma Sonrası Morfolojik Görünüm

Kimyasal indüklemeye alınmamış olan Grup 3 hücreleri kültür ortamında hücre sıklığına bağlı olarak adacık benzeri yapılar oluşturmuşlardı. Farklılaşmaya alındıktan sonra Grup 2, 3 ve 4. hücrelerin pankreas adacık benzeri hücre kitleleri oluşturduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.43., 4.44., 4.45.). Grup 5 hücrelerinin de diğerleri kadar olmasa da bu tip bir davranış gösterdiği görülmüştür (Şekil 4.46.). Ancak Pax4 geninin bulunduğu diğer hücre gruplarında (Grup 8 ve 9) bu tür bir oluşum görülmemiştir (Şekil 4.48. ve 4.49.). MafA ve Pax4 genleri aktarılmış hücrelerin (Grup 2-5) farklılaşma sonrasında adacık benzeri yapılar oluşturma yeteneği var iken hücrede Ngn3 geni aktarılmış olanlarda bu tip bir yapılanmanın baskılandığı görülmüştür (Şekil 4.42. ve 4.47.). Grup 8 ve Grup 9 hücrelerinin daha az adacık benzeri yapı oluşturmalarının nedeni Ngn3 ekspresyonu olma ihtimali vardır. Nitekim Ngn3 ve MafA genlerinin aynı anda aktarıldığı hücre grubu (Grup 6) adacık benzeri bir hücre kitlesi oluşumu görülmemiştir. Hiç gen aktarılmamış olan Grup 10 hücrelerin (Kontrol) endokrin farklılaşmaya alındığında adacık benzeri yapı oluşturmadığı gözlemlenmiştir.

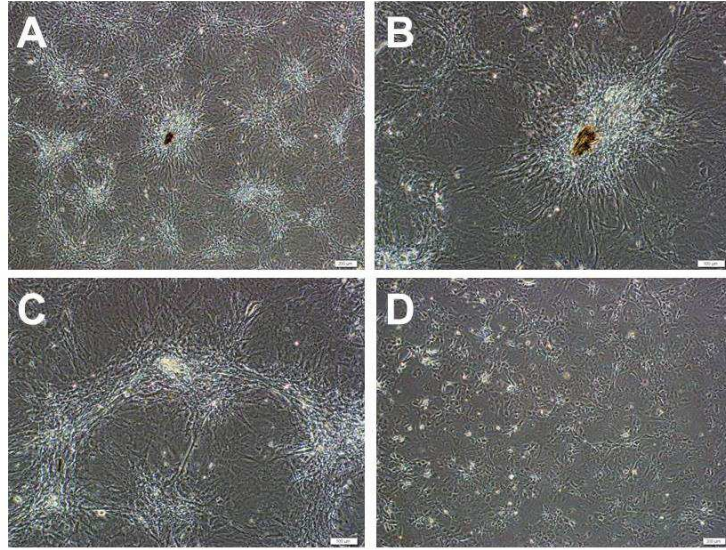
Grup 2 (MafA) ve Grup 3 hücreleri (Pax4) kültürde adacık benzeri yapıları oluşturduğu görülmüştür. Ancak her iki genin aynı anda bulunduğu Grup 4 hücreleri (Pax4-MafA) bu oluşumların daha verimli ve kültür yüzeyinde yaygın olduğu gözlemlenmiştir.



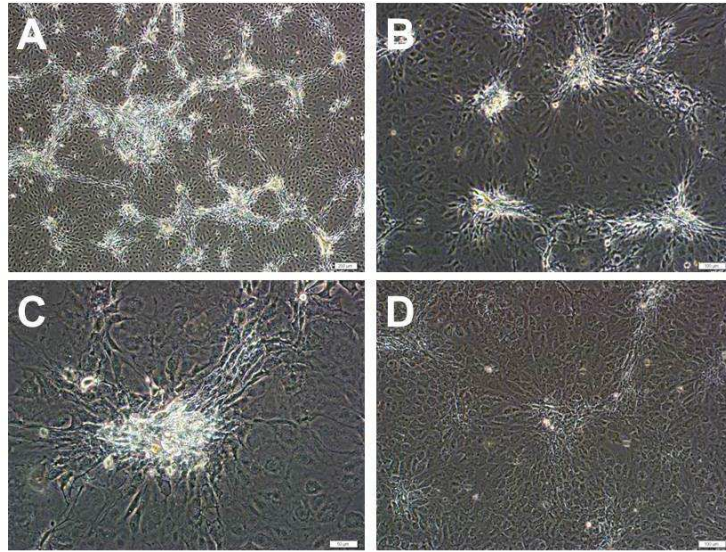
Şekil 4.42 Endokrin farklılaşma sonrasında 1. Grup (Ngn3) hücrelerin kültürdeki görünüşleri. A, B, C endokrin farklılaşma 14.gün; D, kontrol (farklılaştırmaya alınmamış) 14. gün. Ölçek çubuğu: A, D 200 μm ; B, 100 μm ; C, 50 μm .



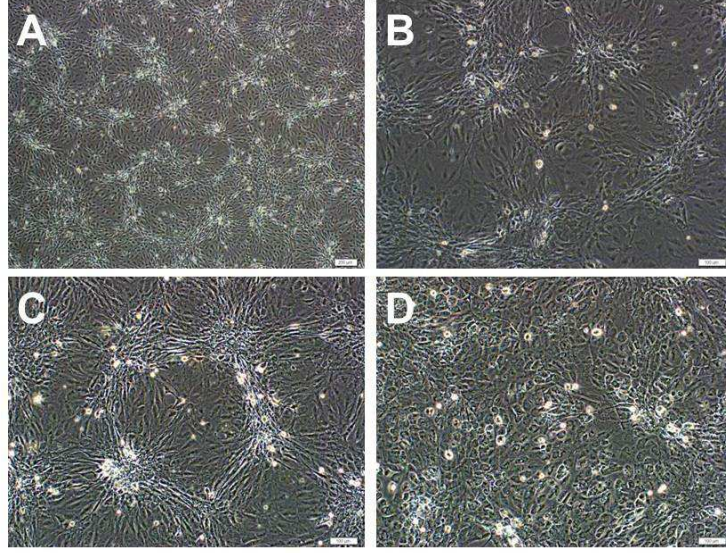
Şekil 4.43 Endokrin farklılaşma sonrasında 2. Grup (MafA) hücrelerin kültürdeki görünüşleri. A, B, C endokrin farklılaşma 14.gün; D, kontrol (farklılaştırmaya alınmamış) 14. gün. Ölçek çubuğu: A, D 200 μm ; B, 100 μm ; C, 20 μm .



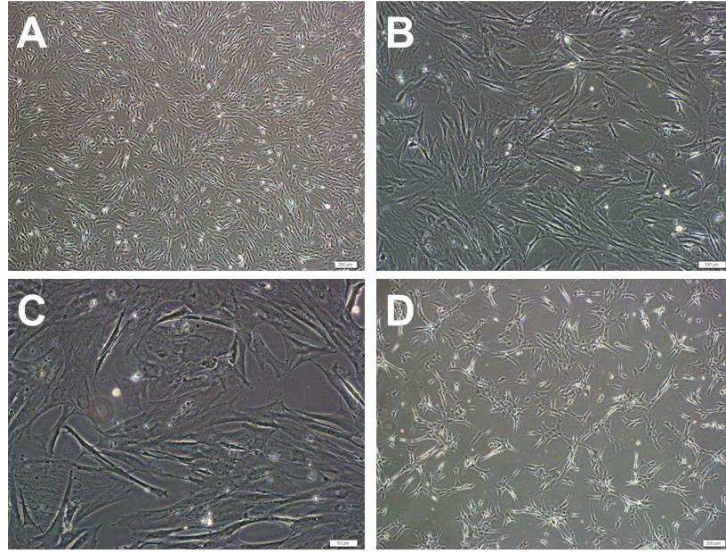
Şekil 4.44 Endokrin farklılaşma sonrasında 3. Grup (Pax4) hücrelerin kültürdeki görünüşleri. A, B, C endokrin farklılaşma 14.gün; D, kontrol (farklılaştırmaya alınmamış) 14. gün. Ölçek çubuğu: A, D 200 µm; B, C 100 µm.



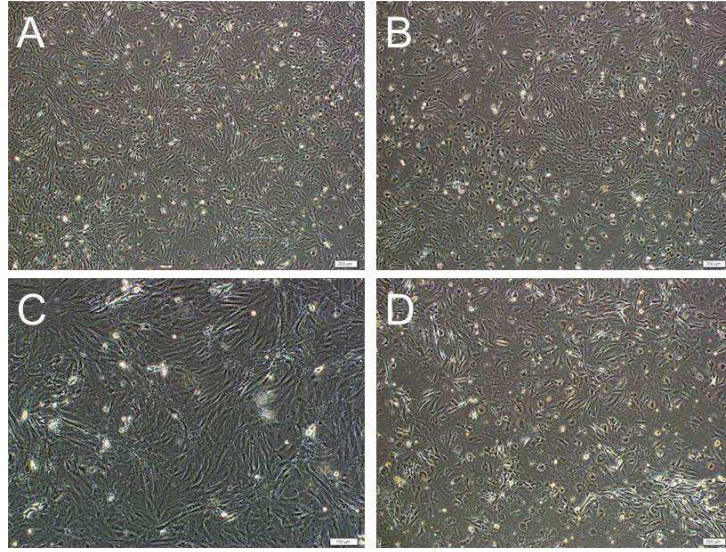
Şekil 4.45 Endokrin farklılaşma sonrasında 4. Grup (Pax4-MafA) hücrelerin kültürdeki görünüşleri. A, B, C endokrin farklılaşma 14.gün; D, kontrol (farklılaştırmaya alınmamış) 14. gün. Ölçek çubuğu: A, 200 µm; B, D 100 µm; C 50 µm.



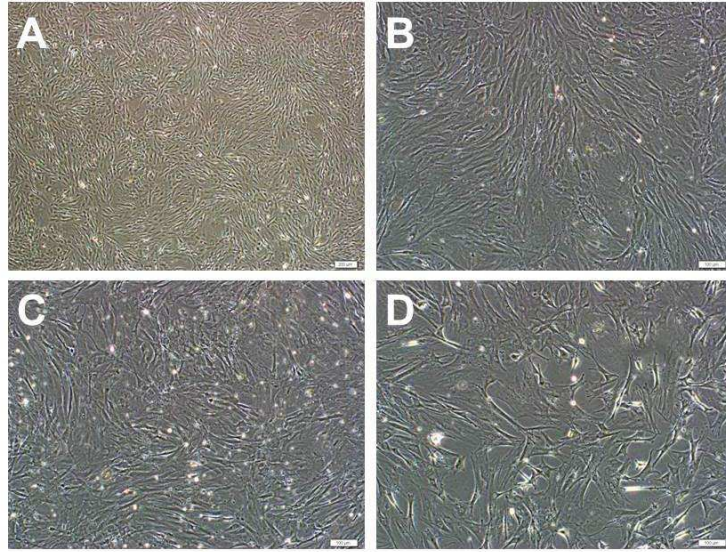
Şekil 4.46 Endokrin farklılaşma sonrasında 5. Grup (Pax4-Gck) hücrelerin kültürdeki görünüşleri. A, B, C endokrin farklılaşma 14.gün; D, kontrol (farklılaştırmaya alınmamış) 14. gün. Ölçek çubuğu: A, 200 μm ; B, C, D 100 μm .



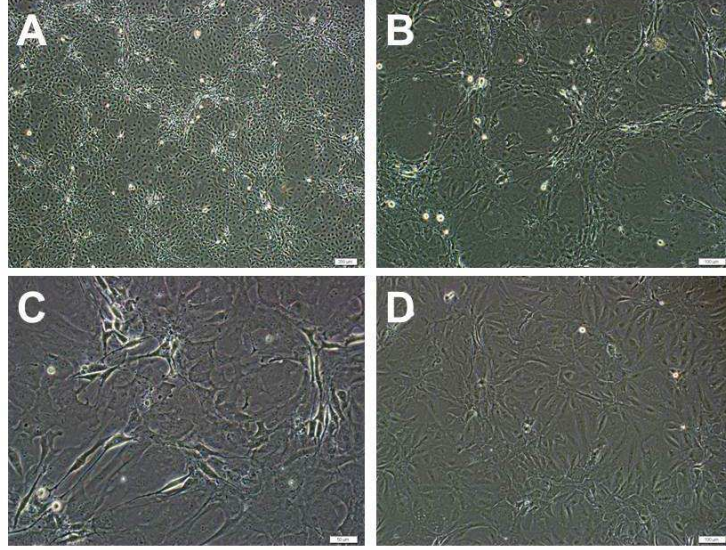
Şekil 4.47 Endokrin farklılaşma sonrasında 6. Grup (Ngn3-MafA) hücrelerin kültürdeki görünüşleri. A, B, C endokrin farklılaşma 14.gün; D, kontrol (farklılaştırmaya alınmamış) 14. gün. Ölçek çubuğu: A, D 200 μm ; B, 100 μm ; C, 50 μm .



Şekil 4.48 Endokrin farklılaşma sonrasında 8. Grup (Ngn3-Pax4) hücrelerin kültürdeki görünüşleri. A, B, C endokrin farklılaşma 14.gün; D, kontrol (farklılaştırmaya alınmamış) 14. gün. Ölçek çubuğu: A, B, D 200 μ m; C, 100 μ m.



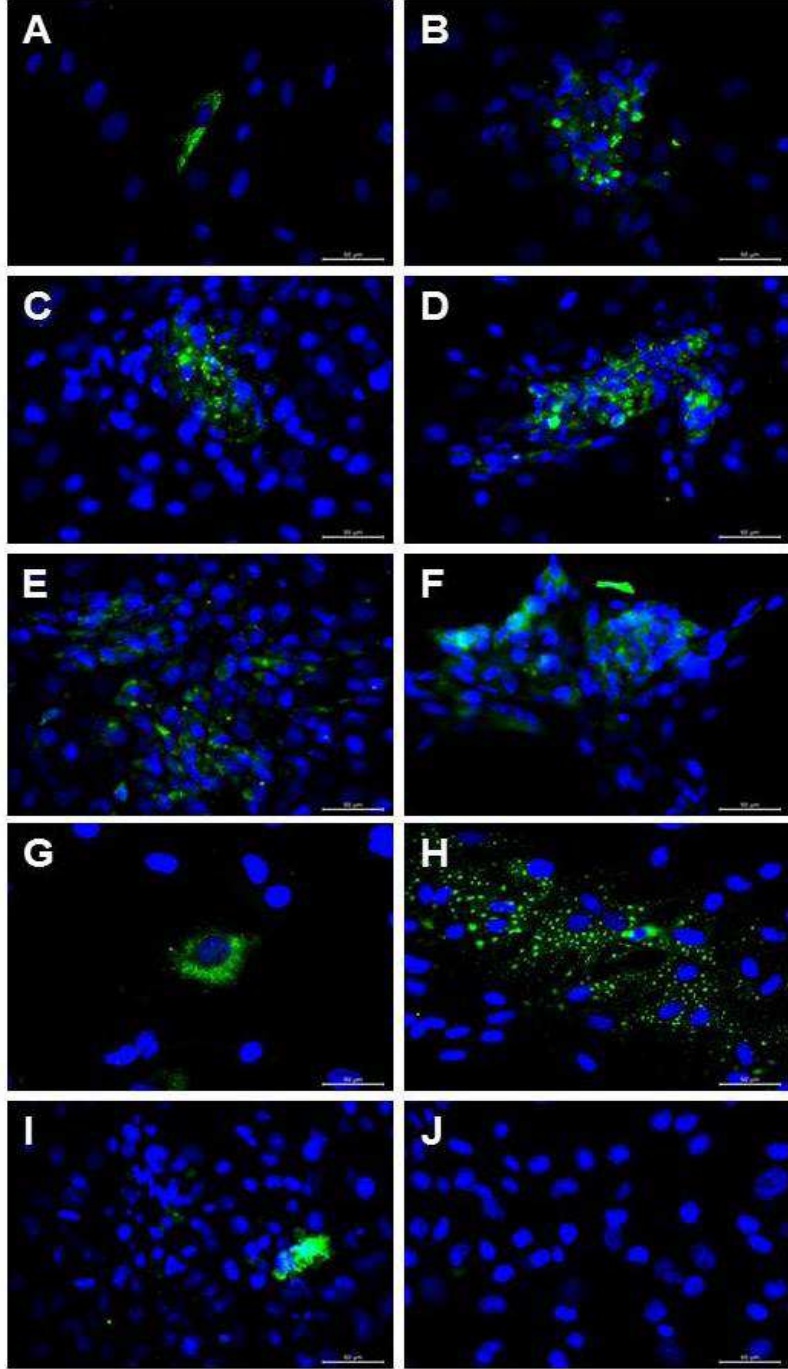
Şekil 4.49 Endokrin farklılaşma sonrasında 9. Grup (Ngn3-Pax4-MafA) hücrelerin kültürdeki görünüşleri. A, B, C endokrin farklılaşma 14.gün; D, kontrol (farklılaştırmaya alınmamış) 14. gün. Ölçek çubuğu: A, 200 μ m; B, C, D 100 μ m.



Şekil 4.50 Endokrin farklılaşma sonrasında 10. Grup (Kontrol) hücrelerin kültürdeki görünüşleri. A, B, C endokrin farklılaşma 14.gün; D, kontrol (farklılaştırmaya alınmamış) 14. gün. Ölçek çubuğu: A 200 μm ; B, D 100 μm ; C 50 μm .

4.4.2 Beta Hücre Belirteçlerinin İfadesi (İmmünfloresan)

Farklılaşma sonrasında hücrelerdeki insülin üretimini belirlemek için hücreler fiksasyon sonrasında insüline karşı immünfloresan boyanmıştır (Şekil 4.51.). Boyanma sonuçları yaygın bir insülin üreten hücre farklılaşmasını göstermemektedir. Tek gen aktarılan hücrelerin insülin üretiminin çok fazla olmadığı görülmüştür. Ancak üç gen aktarıldığı Grup 9 hücrelerinin insülin üretimi diğer hücre gruplarına nazaran daha fazla olduğu ve hücre içerisinde insülin granüllerine benzer yapıların varlığı gözlemlenmiştir (Şekil4.51.-H). Bu bulgu bize Ngn3-Pax4-MafA genleri aktarılmış hücrelerin beta hücresine en yakın farklılaşan hücre tipi olduğunu göstermektedir. Ancak bu hücre grubu kültür ortamında adacık benzeri yapı oluşturmamıştır. Bu yapıyı en iyi oluşturan 4. Grup hücrelerin insülin üretimine bakıldığında oldukça iyi olduğu ama 9. Grup hücre kadar yüksek olmadığı gözlemlenmiştir. 4. Grup hücreleri incelendiğinde insülin üretiminin en fazla adacık benzeri yapı içerisindeki hücrelerde olduğu görülmüştür (Şekil 4.51.-D).

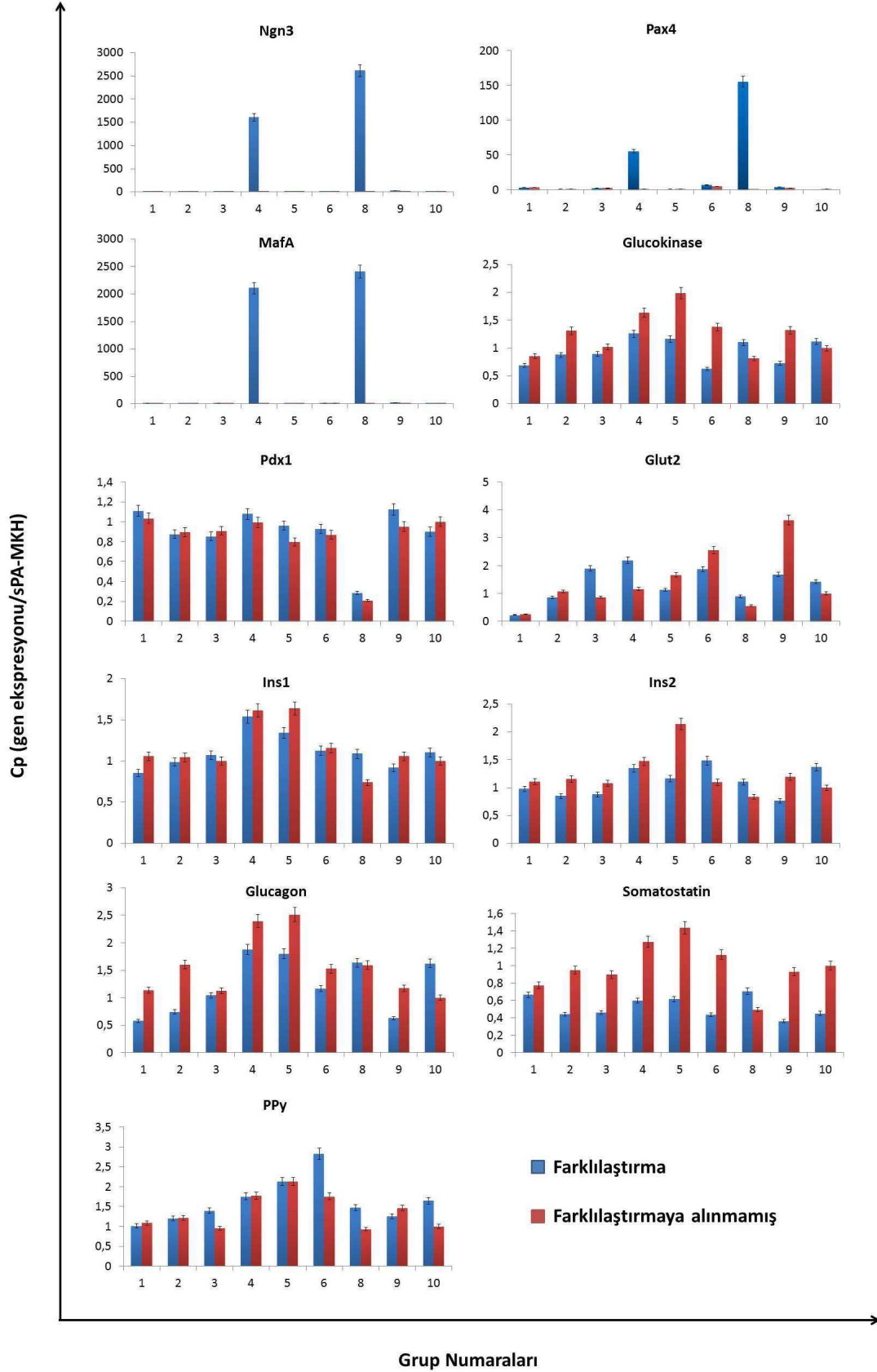


Şekil 4.51 Endokrin farklılaşmaların İnsülin boyaması. Gen aktarılmış hücrelerin kimyasal indükleme ile endokrin farklılaşması sonrası insüline (yeşil) karşı immünfloresan boyanmıştır. Çekirdekler DAPI boyaması ile mavi renkte gösterilmiştir. A, Grup 1; B, Grup 2; C, Grup 3; D, Grup 4; E, Grup 5; F, Grup 6; G, Grup 8; H, Grup 9; I, Grup 10 (Gen aktarılmamış); J, Grup 10 farklılaştırmaya alınmamış. Ölçek çubuğu 50µm.

4.4.3 Gen Ekspresyon Analizi

Hücreler farklılaşmaya alındıktan sonra bir takım pankreas adacık belirteç genlerindeki değişimler incelenmiştir (Şekil 4.52.). İlk dikkatimizi çeken Ngn3, Pax4 ve MafA genlerinin 4. ve 8. Grup hücrelerde çok fazla arttığıdır. Ngn3 ekspresyonu 4. ve 8. Grup hücreleri için sırasıyla 1600 ve 2600 kat, Pax4 55 ve 155 kat, MafA 2100 ve 2400 kat arttığı görülmüştür. Bu bulgu bu hücrelerin farklılaştırma ortamına karşı çok fazla tepki verdiği farklılaşmayla birlikte gen ekspresyonunun çok fazla arttığı görülmüştür. Ancak bu artış Gck, Ins1, Ins2, Pdx1 ve Glut2 ekspresyonlarını çok ciddi değiştirmemiştir. Bu yüzden Ngn3, Pax4 ve MafA gen ifadelerindeki artış hücrenin olgun beta hücre özelliği kazandırdığı konusunda büyük şüpheler uyandırmaktadır. Ins1 ve Ins2 değerleri 4. ve 5. Grup hücrelerde farklılaşma öncesinde yüksek iken farklılaşma sonrasında düştüğü görülmüştür. Bu bize gen ekspresyonunun Ins1 ve Ins2 değerlerini yükselttiğini ve beta hücre özelliği kazandırdığını ancak farklılaşmanın bu dönüşüm üzerinde olumsuz etki yarattığını göstermiştir. Gen aktarılmamış 10. Grup hücre incelendiğinde farklılaşma prosedürünün endokrin hücre farklılaşması süreci üzerine olumlu etki yarattığı görülmektedir. Gcg ve Sst genlerine bakıldığında farklılaşma prosedürünün hücreler üzerinde alfa ve delta hücrelerine farklılaşma potansiyelini düşürdüğü gözlemlenmiştir. Pankreatik polipeptit (PP) hücre farklılaşması özellikle Grup 6 hücrelerinde ve kısmen Grup 8 hücrelerinde gözlemlenmiştir.

Daha önce beta hücre farklılaşma potansiyeli yüksek olduğu belirlenen 4. ve 9. Grup hücreleri incelendiğinde Pdx1 geni ekspresyonu dışında farklılaşmanın bütün genler üzerinde olumsuz etki yarattığı görülmüştür. Yalnız Grup 4 hücreleri Glut2 ekspresyonunu hücre farklılaşması sonrasında daha fazla ifade etmişlerdir. Bu hücrelerin uyarılma sonrasında alfa, delta ve PP hücrelerine farklılaşma yönelimi düşmüştür. Beta hücre farklılaşması ise uyarılma sonrasında ciddi oranda değişmemiş ya da çok az düşmüştür. Bu tablo bize gen aktarımının olgun beta hücrelerine farklılaşması kısmen yeterli olduğu ve kimyasal uyarılmanın olgun beta hücrelerine farklılaşmasını desteklemediğini göstermektedir.



Şekil 4.52 Endokrin farklılaşmaya yönlendirdikten sonra gen aktarılmış hücrelerin pankreas adacık hücre belirteçleri genlerinin ekspresyon analizi. 1:1. Grup, 2: 2. Grup, 3: 3. Grup, 4: 4. Grup, 5: 5. Grup, 6: 6. Grup, 7: 7. Grup, 8: 8. Grup, 9: 9. Grup 10: 10. Grup. Farklılaşmaya alınan hücreler mavi renkte, farklılaşmaya alınmamış hücreler de kırmızı renkte gösterilmiştir. Gen ifadesindeki değişimler katlar şeklinde belirtilmiştir. Değerler gen aktarılmamış ve farklılaştırılmamış hücreye göre oranlanmıştır.

5 TARTIŞMA

Bu projede pankreas adacıklarından elde ettiğimiz mezenkimal kök hücreler kullanılarak birbirinden farklı özelliklere sahip insülin salgılayan beta benzeri hücre elde edilmiştir. Gen aktarımı ve kimyasal uyarılma ile farklı tipte hücreler elde edilerek incelenmiştir. Bu yaklaşımlar ile hücrelerin gen aktarımına ve farklılaştırma ortamına göstermiş olduğu tepki ortaya çıkarılmıştır. Bu çalışma ile hali hazırda kullanılan farklılaştırma prosedürlerinin eksik olan yanlarına işaret edilmiştir.

Mezenkimal kök hücrelerin endoderm hücre tabakasına ait bir hücre tipi olmadığından beta hücre farklılaşmasının başarılı bir şekilde tamamlanmasının zor olduğu gösterilmiştir. Pankreas dokusunda bulunan diğer hücrelerin, örneğin pankreas kanal hücreleri, daha verimli bir şekilde beta hücresi oluşturduğu bildirilmiştir (Li et al., 2010). Bu çalışmada gen aktarımının yeterli olamaması göz önüne alınarak işlem farklılaştırma prosedürü ile desteklenerek daha verimli yönelim hedeflenmiştir. Ancak elde ettiğimiz bulgular hücrelerin bir kısmının farklılaşmaya verimli bir şekilde gittiğini göstermektedir. Farklılaşmayan hücreler ise halen mezenkimal kök hücre özelliğini gösterdiğinden doku içerisinde bulunması literatürde de belirtildiği gibi çevresindeki diğer hücelere destekleyici ve anti-apoptotik etki gösterecektir (Karaoz et al., 2010b; Sims and Evans-Molina, 2012).

Bir takım kimyasallar kullanılarak pankreas alfa hücrelerinin beta hücrelerine farklılaşması için birçok yöntem geliştirilmiştir. Bu kimyasallar hücre içerisindeki bazı sinyal yollarının uyarılmasıyla farklı hücelere dönüşümü sağlamayı hedeflemektedir. Tek bir transkripsiyon faktörünün, örneğin Arx (Aristaless-related homeobox), yüksek oranda ifadesi ile beta hücresinin alfa hücresine dönüşmesi gözlemlendiği gibi (Spijker et al., 2013), Pdx1, Ngn3 ve MafA faktörlerinin ifadesi ile asinar hücrelerinin beta hücrelerine dönüştüğü gösterilmiştir (Zhou et al., 2008). Öncül hücreler ya da kök hücrelerin farklılaşmaya doğru bir eğilimi olsa da alfa hücreleri gibi olgun hücrelerin beta hücrelerine farklılaştığı da gözlemlenmiştir. Pax4 geninin alfa hücrelerinde ektopik ifadesi ile beta hücrelerine dönüştüğü bildirilmiştir (Collombat et al., 2009). Ancak bu hücreler beta hücre karakteri göstermişlerse de insülin salınım miktarları beklenenin çok altında kalmıştır.

Kimyasal uyarılma temel bir yaklaşım olmasına karşın gen aktarımı ile sinyal yollarının uyarılması farklılaşma için önemlidir. Bizim çalışmamızda kimyasal uyarılma birçok hücre hattında işe yaradıkça üç gen aktarılan hücre grubu (9. Grup) kimyasal uyarıya karşı tepkisiz kalmıştır. Bu da gen aktarımının farklılaşma için yeterli bir yöntem olduğunu göstermektedir. Hücrenin kendi gen ekspresyonları ile kendiliğinden farklılaşmanın mümkün olduğu bilinmektedir. Özellikle pluripotent karaktere sahip erişkin kök hücrelerin beta benzeri hücrelere farklılaştığı bilinmektedir (Sims and Evans-Molina, 2012).

Yetişkin dokularda bulunan MKH'ler multipotent, immünmodülatör ve yenileyici özellikleri sayesinde doku hasarı ve immün hastalıklar gibi birçok hastalığın tedavisi için araştırılmaktadır. Tip 1 diyabetin tedavisi için yapılan birçok çalışmada mezenkimal kök hücreler adacıklara destek olması için birlikte nakledilmektedir. Klinik öncesi çalışmalar adacık ve MKH'lerin birlikte nakledilmesi ile (kotransplantasyon) nakledilen adacıkların canlılıklarının korunduğunu, normoglisemi için daha az beta hücreye ihtiyaç duyulduğunu ve glikoz hassasiyetinin arttığını göstermektedir.

Birçok çalışma MKH'lerin etki mekanizmalarını anlama üzerine yapılmaktadır. En önemli etkilerinden olan immünmodülatör etkisi allojenik adacıklarla MKH'lerin birlikte uygulandığı çalışmalarda T hücre aktivasyonunu geciktirmesiyle ve böylece adacıkların hayatta kalma süresini arttırmasıyla gösterilmiştir. T hücre proliferasyon ve fonksiyonu, dendritik hücre olgunlaşması ve doğal öldürücü hücre proliferasyonu MKH'ler tarafından üretilen birçok faktörün etkisi ile baskılanmaktadır. Bu immün sistem hücreleri tarafından üretilen interferon gamma, granülosit-makrofaj koloni stimüle edici faktör- α , tümör nekrozis faktör ve monosit kemoatraktan protein-1 gibi proinflamatuvar sitokinlerin salgılanmasını MKH'lerden salınan faktörlerin engellediği gösterilmiştir. Ayrıca MKH'ler düzenleyici T hücrelerini uyararak ve IL-10 (interlökin-10) gibi anti-inflamatuvar sitokinlerin salgılanmasını sağlayarak nötrofil ve B hücrelerinin farklılaşmalarını ve fonksiyonlarını düzenlemektedir. Böylece antijen spesifik sitotoksosite ve inflamasyondan kaçışı sağlamaktadır.

MKH'lerin bir diğer önemli avantajı yeni adacıklar için vasküler ağ oluşumunu desteklemesidir. Yalnızca adacıkların nakledildiği çalışmalarda karşılaştırıldığında MKH'lerle birlikte yapılan nakillerde adacık çevresindeki damarlanmada önemli oranda artış görülmektedir. Kotransplantasyon modellerinde VEGF (vascular endothelial growth factor), IL-6, IL-8, HGF (hepatocyte growth factor) ve TGF- β (transforming growth factor-

β) gibi anjiyojenik faktörlerin salınımı ile damarlanma oranının erken başladığı ve arttığı tespit edilmiştir. Ayrıca MKH'ler tarafından salgılanan matriks elemanları da önceden var olan ekstraselüler matriksin yıkımını sağlayarak endotelial hücrelerin adacıklara göç edebilmesini kolaylaştırmaktadır.

Tüm bunların yanında MKH'ler adacıkların izolasyon ve nakil sırasında maruz kaldığı hipoksik ve inflamatuvar etkilerden korunmasını sağlayacak olan antiapoptotik etkiye sahiptirler. Sıçan adacıkları ve kemik iliği kaynaklı MKH'ler ile yapılan *in-vitro* kokültür çalışmasında hipoksik koşullarda yükselen genlerin ekspresyonunun düştüğü ve insülin salınımında glikoz hassasiyetinin arttığı görülmüştür. MKH'ler ile kokültürü yapılan STZ ile muamele edilmiş sıçan adacıklarının apoptoz oranının düştüğü, insülin salınımında glikoz hassasiyetlerinin arttığı gösterilmiştir. MKH besi ortamında nakil öncesi 48 saat kültüre edilen insan adacıklarının *in-vivo* denemesinde diyabetli hayvanlarda kan şekeri değerleri düzenlenmiş ve adacıkların erken ölümleri engellenmiştir (Sims and Evans-Molina, 2012).

Yayınlanmış olan birçok çalışmada ilgili üç gen (Ngn3, Pax4, MafA) farklı hücrelere aktararak beta hücre benzeri insülin salgılayan hücre elde edilmek istenmiştir ve kısmen başarılı olmuştur. Bu çalışmalara genel olarak bakıldığında farklı hücre tiplerinin, farklı zaman ve kimyasal uyarılmaların kullanılması nedeni ile karşılaştırmak ve hangi yöntemin daha iyi olduğunu anlamayı güçleştirmektedir. Bu çalışma ile aralarındaki en iyi yöntemi ortaya çıkartmak amaçlanmıştır.

KÖGEM'de yapılan ve pankreas adacıklarından elde edilen kök hücreleri inceleyen çalışmada hücrelerin insülin salgılayan hücreler olduğu, endokrin hücre farklılaşması sonrasında insülinin yanı sıra glukagon ve somatostatin proteinlerinin üretildiği gösterilmiştir (Karaoz et al., 2010a). Bu çalışmada kullandığımız hücreler ilgili çalışmada belirtilen hücrelerin aynısıdır. Hücreler çözüldükten sonra incelenmiş ve dondurma-çözme sonrasında bu hücrelerin halen mezenkimal kök hücre özellikleri taşıdıkları gösterildi. Bu hücreler izole edildikleri kaynak doku hücrelerine farklılaştırılmaya çalışılarak daha verimli bir farklılaşma elde edilmesi hedeflenmiştir. Nitekim KÖGEM'de yürütülen başka bir çalışmada adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin insülin salgıladıkları gösterilmiş, ancak hayvan deneyleri ile hipergliseminin kontrol altına alınmasında başarılı olunamadığı gösterilmiştir (Karaoz et al., 2013). Bu da hücrelerin alındığı kaynağa bağlı

olarak farklılaşma sonrasında kazanacağı özelliklerin farklı etkileneceğine işaret etmektedir.

Ngn3 transkripsiyon faktörü beta hücrelerinde insülin sentezlenmesi için temel faktörlerden biri olduğu bildirilmiştir. Ancak beta hücre neogenezinde Ngn3'ün olumsuz etkileri olduğu bildirilmiştir. Ngn3 geni erken tavuk endoderm hücrelerini glukogon ve somatostatin üreten hücrelere farklılaştırdığı daha önce rapor edilmiştir (Grapin-Botton et al., 2001). Ngn3 geninin ektopik ifadesi fare kök hücrelerinin alfa hücresi karakteri kazandırdığı önceki çalışmalarda gösterilmiştir (Blyszczuk et al., 2003). Ancak oluşan bu alfa hücre benzeri yapılarda ek olarak Pax4 gen ifadesi sağlandığında beta hücre karakterlerini de gösterdiği rapor edilmiştir (Collombat et al., 2009; Wang et al., 2004). Ngn3 geni aktardığımız 1. Grubun literatürde yer alan bilgilere paralel olarak Gcg ekspresyonunu (alfa hücre belirteci) arttırdığı bu çalışmada görülmüştür. Benzer olarak Ngn3-Gcg genleri aktarılmış hücrelerde (Grup 7) belirgin bir delta hücresine doğru yönelme görülmüştür. Pax4 geninin yokluğunda gen aktarılmış olan hücrelerin beta hücre özelliklerinden çok farklı karakterler sergiledikleri görülmüştür. İlginç olarak Ngn3-MafA geni aktarılmış (Grup 6) hücrelerinin kültürü sırasında önce MafA+ hücrelerde gözlemlediğimiz epitel benzeri bir karakter kazandığı, ancak sonra bu özelliklerini kaybederek tekrar mezankimal görünümüne döndüğü gözlemlenmiştir. Bu EMT (epithelium mesenchymal transition; epitel mezankimal geçişi) benzeri durum pankreas adacık hücrelerinin gelişiminde de bildirilmiştir (Peck, 2004). EMT olgusu Ssh (Sonic Hedgehog) sinyal yolağı ile yakından ilişkili bir süreçtir (Xu et al., 2012). Pdx1 ekspresyonunun düşük olduğu 6. Grup hücrelerinde Ssh yolağı aktivitesi kuvvetli olup EMT'yi desteklemesi olasıdır.

Öncül hücre içerisinde Ngn3 ekspresyonu hücre dışı Notch ligandlarını (delta, serrate, jagged) aktive ederek çevresindeki Notch almaçlarını uyarmaktadır. Bu uyarı hücrelerde Hes1 genini ifade ettirerek Ngn3'ün ekspresyonunu baskılamakta ve endoderm öncül hücrelerini beta hücresine doğru farklılaştırmaya yönlendirmektedir. TGF-beta ve Notch sinyal yollarının pankreas gelişiminde oynamış olduğu önemli rolleri ile Ngn3 ekspresyonu böylelikle baskılanarak beta hücre farklılaşmasına doğru öncül hücreler gelişim sırasında yönlendirilmektedir. Ancak Ngn3'ün olmadığı durumlarda bu hücrelerde Pax4 ekspresyonu da görülmediğinden adacık neogenezinde yeri önemlidir (Murtaugh, 2007). Bu sebepten ötürü 3. Grup hücrelerde Pax4 geni aktarımı ile MafA ekspresyonu oldukça yükselmiştir. Ancak gerekli uyarının devamı sağlanamadığından dolayı bu hücre

hattı başarılı bir beta hücre farklılaşmasına gidememiştir. Buna karşın 9. Grup hücrelerde MafA geni aktarılmasıyla Ngn3 ekspresyonu kontrol altına alınmıştır. 4. Grup hücrelerde Ngn3 ve Pax4 geni beraber aktarılmasıyla beta hücre karakterine sahip olmayan hücrelere farklılaşması beklenirken bu durum gözlemlenmemiştir. Bunun sebebi de hücrelerdeki Pdx1 ekspresyonu fazla olmasıyla Ssh sinyal yolağının baskılanmasıyla açıklanabilir (Servitja and Ferrer, 2004).

Pax4 (paired box gene 4), pankreas beta hücresi gelişiminde görev aldığı bilinmekte olup Nkx2.2 ile birlikte çalışarak öncül hücrelerin beta hücresine farklılaşmasını tetiklediği bildirilmiştir (Wang et al., 2004; Lock and Tzanakakis, 2007). Pankreas beta hücresinin fonksiyonlarının yerine getirilmesinde önemli görevlerinin yanında aktivin A ve betasellülin varlığında erişkin sıçan dokularında ifadesi artarak beta hücre kütlelerinde artışa sebep olduğu da gösterilmiştir (Brun et al., 2004). Pax4 ekspresyonu Pax6'yi indüklemesiyle Pdx1'in yol açabileceği alfa hücre farklılaşmasını bloke edeceğini ve beta hücre farklılaşmasının verimini artırdığı bildirilmiştir (Ritz-Laser et al., 2002). Bu çalışmada Pax4 geni aktarılmış olan hücreler kimyasal indükleme öncesinde gen ekspresyonları incelendiğinde daha verimli endokrin farklılaşmasına teşvik ettiği görüldü. Özellikle MafA geni ile birlikte adacık benzeri hücre kitlelerinin oluşumu ve görece yüksek insülin sentezine olanak vermiştir. Literatürdeki bilgilere paralel olarak Pdx1 geninin yüksek olduğu 4. Grup hücrelerdeki alfa hücre belirteci olan Gcg geninin ifadesi baskılanmış ve böylelikle alfa hücresine doğru farklılaşma engellenmiştir. Nitekim Pdx1'in yüksek olduğu bir diğer hücre hattı Grup 7 hücreleri (Ngn3-Gcg) belirgin oranda Sst eksprese ederek delta hücre farklılaşmasına doğru yöneldiği görüldü. Pax4 geni ekspresyonunun Cdk4 ve c-Myc genleri uyarılarak beta hücresi proliferasyonunu artırdığı gösterilmiştir (Brun and Gauthier, 2008). Pax4 ektopik olarak uzun süreli eksprese edildiğinde Pdx1'i uyararak insülin sentezini artırmasının yanında NF-kB transkripsiyon faktörünü baskılayarak ve Bcl2 seviyesini artırarak beta hücrelerinin apoptoza gitmesini engellediği bulunmuştur (Hu He et al., 2011; Brun and Gauthier, 2008). Bu çalışmada Pax4 geni içeren hücrelerin kültürü sırasında ölü hücrelerin az görüldüğü ve apoptoza karşı daha dirençli olduğu görülmesi Bcl2 seviyesini arttırmasıyla açıklanabilir.

Pax4 geni ekspresyonunun 7. ve 8. Gruplarda çok ciddi oranda arttığı gözlemlenmiştir. Bu durum sadece Pax4 geni aktarılmış olan hücrelerde görülmemektedir. Grup 7 ve 8 hücreleri ortak olarak Ngn3 geni aktarılmış hücre gruplarından olup Ngn3 ekspresyonunun Pax4 üzerinde arttırıcı etkisi olduğu görülmüştür. Ancak bu durum MafA

geni ekspresyonu ile değişmektedir. MafA geni hem Pax4 hem de Ngn3 geni üzerinde baskılayıcı bir etki yaratarak ekspresyonlarını sınırlandırmıştır. Nitekim üç genin de aktarıldığı 9. Grup hücrelerinde Ngn3 ve Pax4 genleri fazla artmamıştır.

Pax4 geni aktarılmış hücrelerin başka bir belirgin özelliği ise adacık benzeri yapılar oluşturmalarıdır. Pax4 gen ifadesinin pankreas adacıkları içerisindeki artışını takiben yapı içerisindeki beta hücre sayısını arttırdığı ve adacık boyutlarının büyümesine yol açtığı bildirilmiştir (Collombat et al., 2009). MafA geni ile Pax4 geni aynı hücrede ifade edildiğinde adacık benzeri yapıların boyutlarında ve sayılarında ciddi artışlar görülmüştür. Bu da MafA'nin doğrudan adacık benzeri yapının oluşmasında etkili olmadığı ancak Pax4 ile birlikte sinerjik etki göstererek adacıkları oluşturabileceği sonucuna varılabilir.

MafA ekspresyonu görülen hücre kültürlerinde belirgin oranda epitel karakterli hücrenin sayısında artış görülmüştür. Normalde beta hücre farklılaşması ve çoğalması üzerinde önemli etkileri olan bu transkripsiyon faktörünün epitel karakter kazandırdığı daha önce bildirilmemiştir. MafA ekspresyonu sadece insülin pozitif pankreas hücrelerinde görülmüş olup glukagon ve somatostatin hücrelerinin gelişiminde ifade edilmediği bildirilmiştir (Matsuoka et al., 2004). Gelişim sırasında Nkx6.1 geni ile birlikte epitel hücrelerinde ifade edildiğinde bu hücrelerin insülin üreten hücrelere farklılaştığı ve beta hücre neogenezine dahil olduğu bildirilmiştir.

MafA geni aktardığımız hücre hatlarında MafA ekspresyonu oldukça sınırlı kalmıştır. Bu bulgu bize MafA ekspresyonunun hücre içerisinde geri besleme ile kendi gen ekspresyonunu baskıladığını göstermektedir. Buna karşın ortamda Ngn3'ün varlığında bu etki azalmaktadır. Tek başına Pax4 geni ekspresyonu MafA ekspresyonunu desteklerken diğer genler ile birlikte bu ekspresyonu fazla arttıramadığı görülmüştür. Üç genin aktarıldığı hücre grubunda (Grup 9) MafA ekspresyonunun fazla artmadığı görülen hücre hatlarından bir tanesidir. Bu durum bize şu ana kadar ortaya çıkartılmış olan farklılaşma mekanizmasında daha önce tanımlanmayan bir faktörün/proteinin varlığına işaret edebilir.

SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Yapılan tez çalışmasında gen aktarımı ile elde edilen hücre gruplarının beta benzeri insülin üreten hücreye farklılaşması için endokrin yönde kimyasal olarak uyarılması gerçekleştirilmiştir. Sonuçta elde edilen hücrelerin gen ekspresyon profiline göre hücrelerin pankreatik adacıkta bulunan endokrin hücrelere benzer olduğu görülmüştür.

Özellikle Ngn3, Pax4 ve MafA genlerinin ortaklaşa pankreas adacık kaynaklı mezenkimal kök hücrelere aktarımı sonrasında hücre grupları arasında en ileri derecede ve beta hücreleri özelliklerine en yakın hücre hattı elde edilmiştir. Bu hücrelerde insülin granülleri immün boyamalar ile gösterilmiştir. Tek basamaklı uyarılma ile bu hücrelerin daha ileri farklılaşması gözlemlenememesi gen aktarımını kimyasal uyarılmayı kapsadığı gözlemlenmiştir. Bu hücre hattının daha ileri bir farklılaşma için literatürde tanımlanmamış başka uyarıcılara gerekli olduğu ortaya konmuştur.

Tek basamaklı farklılaşma yöntemiyle uyarılması hücreler için yetersiz kalmış olduğu görülmüştür. Birbirinden farklı karaktere sahip olan bu hücre grupları içinden beta hücre belirteçlerini taşıdığı düşünülenlerin seçilerek tek basamaklı uyarılma yerine birkaç adımda gerçekleştirilebilecek kimyasal yönlendirme ile insülin üretebilen hücre elde edilebilir.

MafA geninin mezenkimal kök hücreler içerisinde ifade edilmesiyle epitel hücre karakteri sergileyen hücrelerin oluştuğu gözlemlenmiştir. Ancak bu dönüşüm Pax4 geni ifadesi ile desteklenirken Ngn3 geninin ekspresyonu ile engellenmesi Ngn3 geninin beta hücre farklılaşmasında önemli bir düzenleyici protein olduğunu göstermiştir. İleriki çalışmalarda bu genin kontrollü ifadesinin sağlanması ya da protein etkinliğinin kontrollü inhibisyonu ile beta hücre farklılaşma verimi üzerindeki etkileri incelenebilir.

Glikokinaz (Gck) gen ifadesi hücrelerde sağlanması ile glikoz hassasiyetini artıracak ve kontrollü insülin salınımını kontrol eden proteinlerin ifadelerinin hücrelerde artırması hedeflenmiştir. Ancak bu olgu mezenkimal kök hücrelerde gözlemlenememiştir. Bu genin aktarımının beta hücre farklılaşması üzerinde belirgin bir etki yaratmadığı deneylerle gösterilmiştir.

İlerleyen çalışmalarda hücrelerin etkisi diyabetli deney hayvan modellerinde nakledilerek araştırılabilir. İmmün reddin önlenmesi için nakil öncesi bu hücreler mikroenkapsülasyon yöntemiyle adacık benzeri yapılar oluşturularak ve zar ile kaplanarak etkilerinin daha açık bir şekilde ortaya çıkması sağlanabilir. Diyabetli deneklerde normoglisemi sağlandığı takdirde olası hücresel tedavi için kullanılabilir bir yöntem ortaya çıkarılmış olacaktır.

KAYNAKLAR

- Aguayo-Mazzucato C., Koh A., El Khattabi I., Li WC., Toschi E., Jermendy A., Juhl K., Mao K., Weir G., C., Sharma A., Bonner-Weir S. (2011) MafA expression enhances glucose-responsive insulin secretion in neonatal rat beta cells. *Diabetologia*, 54(3):583-93.
- Akinci E., Banga A., Greder LV., Dutton JR., Slack JM. (2012) Reprogramming of pancreatic exocrine cells towards a beta (β) cell character using Pdx1, Ngn3 and MafA. *Biochem J.*, 442(3):539-50.
- Akinci E., Banga A., Tungatt K., Segal J., Eberhard D., Dutton JR., Slack JMW. (2013) Reprogramming of Various Cell Types to a Beta-Like State by Pdx1, Ngn3 and MafA. *PLoS ONE*, 8(11): e82424.
- Ambasudhan R., Talantova M., Coleman R., Yuan X., Zhu S., Lipton SA., Ding S. (2011) Direct reprogramming of adult human fibroblasts to functional neurons under defined conditions. *Cell Stem Cell*, 9, 113-8.
- Andrali SS., Sampley ML., Vanderford NL., Ozcan S. (2008) Glucose regulation of insulin gene expression in pancreatic β -cells. *Biochem J.*, 415(1):1-10.
- Bernardo AS., Hay CW., Docherty K. (2008) Pancreatic transcription factors and their role in the birth, life and survival of the pancreatic cell. *Mol Cell Endocrinol.*, 294(1-2):1-9.
- Blyszczuk P., Czyz J., Kania G., Wagner M., Roll U., St-Onge L., Wobus AM. (2003) Expression of Pax4 in embryonic stem cells promotes differentiation of nestin-positive progenitor and insulin-producing cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(3):998-1003.
- Bonner-Weir S., Weir GC. (2005) New sources of pancreatic beta-cells. *Nat Biotechnol.*, 23, 857-61.
- Brun T., Franklin I., St-Onge L., Bignon-Laubert A., Schoenle EJ., Wollheim CB., Gauthier BR. (2004) The diabetes-linked transcription factor PAX4 promotes beta-cell proliferation and survival in rat and human islets. *J Cell Biol.*, 167(6): 1123-35.
- Brun T., Gauthier BR. (2008) A focus on the role of Pax4 in mature pancreatic islet beta-cell expansion and survival in health and disease. *J Mol Endocrinol.*, 40, 37-45.
- Collombat P., Xu X., Ravassard P., Sosa-Pineda B., Dussaud S., Billestrup N., Madsen OD., Serup P., Heimberg H., Mansouri A. (2009) The ectopic expression of Pax4 in the mouse pancreas converts progenitor cells into alpha and subsequently beta cells. *Cell*, 138(3):449-62.
- Evans MJ., Kaufmann MH. (1981) Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292, 154-156.
- Grapin-Botton A., Majithia AR., Melton DA. (2001) Key events of pancreas formation are triggered in gut endoderm by ectopic expression of pancreatic regulatory genes. *Genes and Development*, 15:444-454.

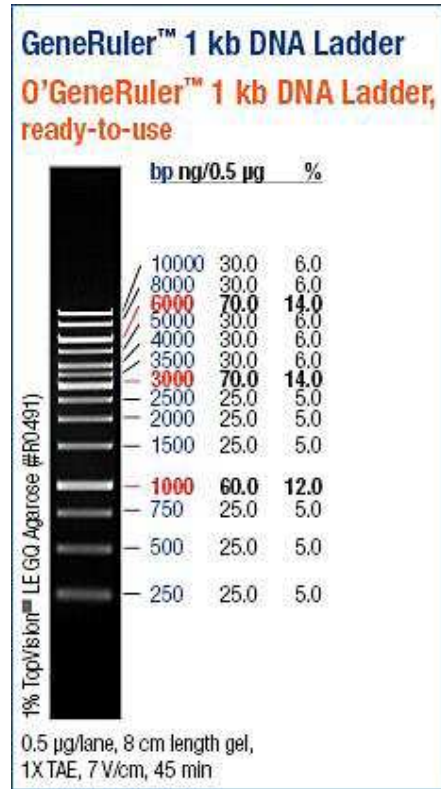
- Hang Y., Stein R. (2011) MafA and MafB activity in pancreatic β cells. *Trends Endocrinol Metab*, 22(9):364-73.
- He D., Wang J., Gao Y., Zhang Y. (2011) Differentiation of PDX1 gene-modified human umbilical cord mesenchymal stem cells into insulin-producing cells in vitro. *Int J Mol Med*, 28, 1019-24.
- Heremans Y., Van De Casteele M., in't Veld P., Gradwohl G., Serup P., Madsen O., Pipeleers D., Heimberg H. (2002) Recapitulation of embryonic neuroendocrine differentiation in adult human pancreatic duct cells expressing neurogenin 3. *J Cell Biol.*, 159, 303-12.
- Hori Y.. (2009) Insulin-producing cells derived from stem/progenitor cells: therapeutic implications for diabetes mellitus. *Med Mol Morphol.*, 42(4):195-200.
- Hu He KH., Lorenzo PL., Brun T., Jimenez Moreno CM., Aeberhard D., Vallejo Ortega J., Cornu M., Thorel F., Gjinovci A., Thorens B., Herrera PL., Meda P., Wollheim CB., Gauthier BR. (2011) In vivo conditional Pax4 overexpression in mature islet β -cells prevents stress-induced hyperglycemia in mice. *Diabetes*, 60, 1705-15.
- İnan S., Özbilgin K. (2009) Sağlıkta Birikim, Cilt 1 Sayı 5.
- Jacquemin P., Durviaux SM., Jensen J., Godfraind C., Gradwohl G., Guillemot F., Madsen OD., Carmeliet P., Dewerchin M., Collen D., Rousseau GG., Lemaigre FP. (2000) Transcription factor hepatocyte nuclear factor 6 regulates pancreatic endocrine cell differentiation and controls expression of the proendocrine gene ngn3. *Mol Cell Biol.*, 20, 4445-54.
- Kaneto H., Miyatsuka T., Kawamori D., Matsuoka TA. (2007) Pleiotropic Roles of PDX-1 in the Pancreas. *Rev Diabet Stud.*, 4(4):209-25.
- Kaneto H., Miyatsuka T., Kawamori D., Yamamoto K., Kato K., Shiraiwa T., Katakami N., Yamasaki Y., Matsuhisa M., Matsuoka TA. (2008) PDX-1 and MafA play a crucial role in pancreatic beta-cell differentiation and maintenance of mature beta-cell function. *Endocr J.* 55, 235-52.
- Karaoz E., Aksoy A., Ayhan S., Sarıboyacı AE., Kaymaz F., Kasap M. (2009) Characterization of mesenchymal stem cells from rat bone marrow: ultrastructural properties, differentiation potential and immunophenotypic markers. *Histochem Cell Biol.*, 132(5):533-46.
- Karaoz E., Ayhan S., Gacar G., Aksoy A., Duruksu G., Okçu A., Demircan PC., Sarıboyacı AE., Kaymaz F., Kasap M. (2010a) Isolation and characterization of stem cells from pancreatic islet: pluripotency, differentiation potential and ultrastructural characteristics. *Cytotherapy*, 12: 288–302.
- Karaoz E., Genc ZS., Demircan PC., Aksoy A., Duruksu G. (2010b) Protection of rat pancreatic islet function and viability by coculture with rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Cell Death and Disease*, 1, e36.
- Karaoz E., Okcu A., Ünal ZS., Subasi C., Sağlam O., Duruksu G. (2013) Adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells efficiently differentiate into insulin-producing cells in pancreatic islet microenvironment both in vitro and in vivo. *Cytotherapy*, 15(5):557-70.
- Karaöz E., Ovalı E. (2004) Kök Hücreler. Türkiye: Derya Kitapevi.
- Karnieli O., Izhar-Prato Y., Bulvik S., Efrat S. (2007) Generation of insulin-producing cells from human bone marrow mesenchymal stem cells by genetic manipulation. *Stem Cells*, 25, 2837-44.
- Kim A., Miller K., Jo J., Kilimnik G., Wojcik P., Hara M. (2009) Islet architecture A comparative study. *Islets*, 1:2, 129-36.
- Kim J., Lengner CJ., Kirak O., Hanna J., Cassady JP., Lodato MA., Wu S., Faddah DA., Steine EJ., Gao Q., Fu D., Dawlaty M., Jaenisch R. (2011) Reprogramming of postnatal neurons into induced pluripotent stem cells by defined factors. *Stem Cells*, 29, 992-1000.

- Koton DN, Ma BY, Cardosa WV, Sanderson EA, Summer RS, Williams MC, Fine A. (2001) Bone marrow-derived cells as progenitor of lung epithelium. *Development*, 128:5181-5188.
- Li WC., Rukstalis JM., Nishimura W., Tchipashvili V, Habener JF., Sharma A., Bonner-Weir S. (2010) Activation of pancreatic-duct-derived progenitor cells during pancreas regeneration in adult rats. *Journal of Cell Science*, 123, 2792-2802.
- Liew CG. (2010) Generation of Insulin-Producing Cells From Pluripotent Stem Cells: From the Selection of Cell Sources to the Optimization of Protocols. *Rev Diabet Stud.*, 7(2):82-92.
- Lock LT., Tzanakakis ES. (2007) Stem/Progenitor cell sources of insulin-producing cells for the treatment of diabetes. *Tissue Eng.*, 13(7):1399-412.
- Lu Y., Wang Z., Zhu M. (2006) Human bone marrow mesenchymal stem cells transfected with human insulin genes can secrete insulin stably. *Ann Clin Lab Sci*, 36, 127-36.
- Martin GR. (1981) Isolation of a Pluripotent Cell Line From Early Mouse Embryos Cultured in Medium Conditioned by Teratocarcinoma Stem Cells. *Developmental Biology*, Vol 78, 12 7634-7638.
- Matsuoka TA., Artner I., Henderson E., Means A., Sander M., Stein R. (2004) The MafA transcription factor appears to be responsible for tissue-specific expression of insulin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(9):2930-3.
- Mccall MD., Toso C., Baetge EE., Shapiro AMJ. (2010) Are stem cells a cure for diabetes? *Clinical Science*, 118, 87-97.
- Meivar-Levy I., Ferber S. (2010) Adult cell fate reprogramming: converting liver to pancreas. *Methods Mol Biol*, 636, 251-83.
- Minami K., Seino S. (2008) Pancreatic acinar-to-beta cell transdifferentiation in vitro. *Front Biosci*, 13, 5824-37.
- Murtaugh LC. (2007) Pancreas and beta-cell development: from the actual to the possible. *Development*, 134(3):427-38.
- Murtaugh LC., Kopinke D. (2008) Pancreatic stem cells. <http://www.stembook.org/node/471>
- Noguchi H. (2010) Pancreatic Stem/Progenitor Cells for the Treatment of Diabetes. *Rev Diabet Stud.*, 7(2):105-11.
- Odom DT., Zizlsperger N., Gordon DB., Bell GW., Rinaldi NJ., Murray HL., Volkert TL., Schreiber J., Rolfe PA., Gifford DK., Fraenkel E., Bell GI., Young RA. (2004) Control of pancreas and liver gene expression by HNF transcription factors. *Science*, 303, 1378-81.
- Ricordi C., Inverardi L., Domínguez-Bendala J. (2012) From cellular therapies to tissue reprogramming and regenerative strategies in the treatment of diabetes. *Regen Med.*, 7(6 Suppl):41-8.
- Ritz-Laser B., Estreicher A., Gauthier B. R., Mamin A., Edlund H., Philippe J. (2002) The pancreatic beta-cell-specific transcription factor Pax-4 inhibits glucagon gene expression through Pax-6. *Diabetologia*, 45, 97-107.
- Sahu S., Tosh D., Hardikar AA. (2009) New sources of beta-cells for treating diabetes. *J Endocrinol*, 202, 13-6.
- Scobie IN. (2007) *Atlas of Diabetes Mellitus*. UK: INFORMA
- Servitja JM., Ferrer J. (2004) Transcriptional networks controlling pancreatic development and beta cell function. *Diabetologia*, 47(4):597-613.
- Sims E. and Evans-Molina C. (2012) Stem Cells as a Tool to Improve Outcomes of Islet Transplantation. *Journal of Transplantation*, Volume 2012, Article ID 736491.

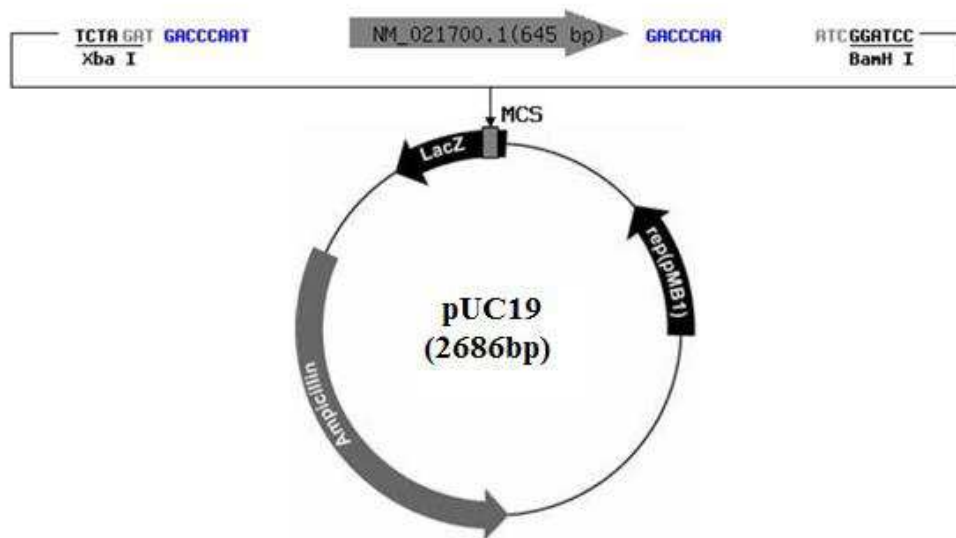
- Smith AG. (2001) Embryo-derived stem cells: of mice and men. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 17, 435–462.
- Spence JR., Lange AW., Lin SC., Kaestner KH., Lowy AM., Kim I., Whitsett JA., Wells JM. (2009) Sox17 regulates organ lineage segregation of ventral foregut progenitor cells. *Dev Cell.*, 17, 62-74.
- Spijker HS., Ravelli RBG., Mommaas-Kienhuis AM., Apeldoorn AAV., EngelseMA., Zaldumbide A., Bonner-Weir S., Rabelink TJ., Hoeben RC., Clevers H., Mummery CL., Carlotti F., Koning EJP. (2013) Conversion of Mature Human β -Cells Into Glucagon-Producing α -Cells. *Diabetes*, Vol 62, No. 7, 2471-2480.
- Tang XL., Xiao R., Wang YX., He M., Xie T., Zhang C., Liu SJ. (2011) Neurogenin 3 and Paired box gene 4 promote PDX1-induced differentiation of mesenchymal stem cells into pancreatic secretory cells. *Beijing Da Xue Xue Bao*, 43:421-6.
- Thomson JA., Itskovitz-Eldo J., Shapiro SS., Waknitz MA., Swiergiel JJ., Marshall VS., Jones JM. (1998) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 282, 1145–1147.
- Wang J., Elghazi L., Parker SE., Kizilocak H., Asano M., Sussel L., Sosa-Pineda B. (2004) The concerted activities of Pax4 and Nkx2.2 are essential to initiate pancreatic beta-cell differentiation. *Dev Biol.*, 266(1):178-89.
- Wong RSY. (2011) Extrinsic Factors Involved in the Differentiation of StemCells into Insulin-Producing Cells: An Overview. Hindawi Publishing Corporation *Experimental Diabetes Research*, Vol 2011, 406182.
- Xu J., Zhu MY., Lu YH., Lu Y., Wang ZW. (2007) Treatment of type 1 diabetes by transplantation of bone-derived mesenchymal stem cells expressing human insulin gene: experiment with mice. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 87, 2557-60.
- Xu X., D'Hoker J., Stangé G., Bonn e S., De Leu N., Xiao X., Van de Casteele M., Mellitzer G., Ling Z., Pipeleers D., Bouwens L., Scharfmann R., Gradwohl G., Heimberg H. (2008) Beta cells can be generated from endogenous progenitors in injured adult mouse pancreas. *Cell*, 132, 197-207.
- Xu X., Zhou Y., Xie C., Wei SM., Gan H., He S., Wang F., Xu L., Lu J., Dai W., He L., Chen P., Wang X., Guo C. (2012) Genome-wide screening reveals an EMT molecular network mediated by Sonic hedgehog-Gli1 signaling in pancreatic cancer cells. *PLoS One*, 7(8):e43119.
- Zhou Q., Brown J., Kanarek A., Rajagopal J., Melton DA. (2008) In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to β -cells. *Nature*, Vol 455, 627-632.
- Zulewski H. (2007) Stem cells with potential to generate insulin-producing cells in man. *Swiss Med Wkly*, 137, 60S-67S.

EKLER

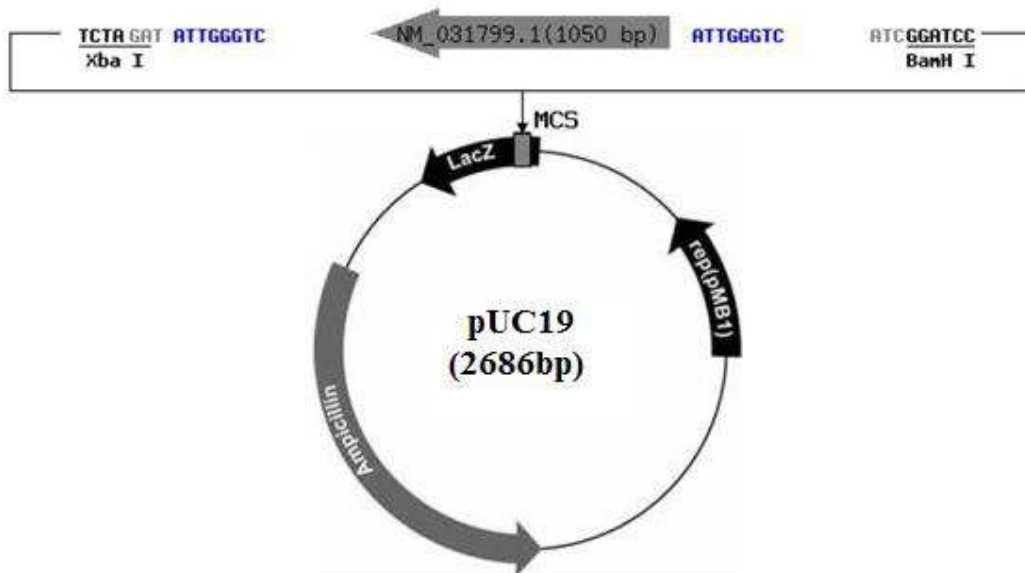
EK 1. Agaroz jel elektroforezinde kullanılan belirteç



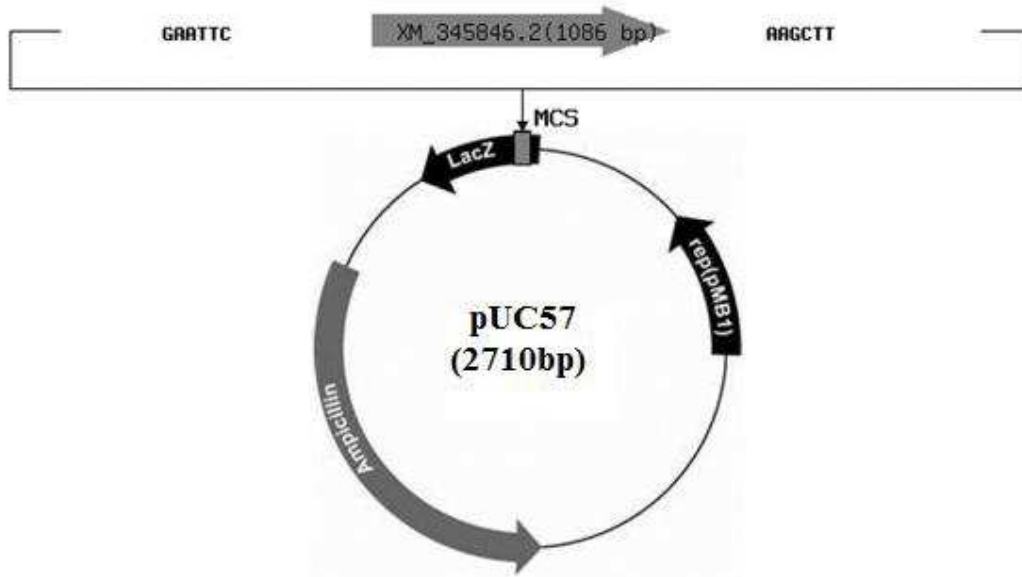
EK 2. pUC19-Ngn3



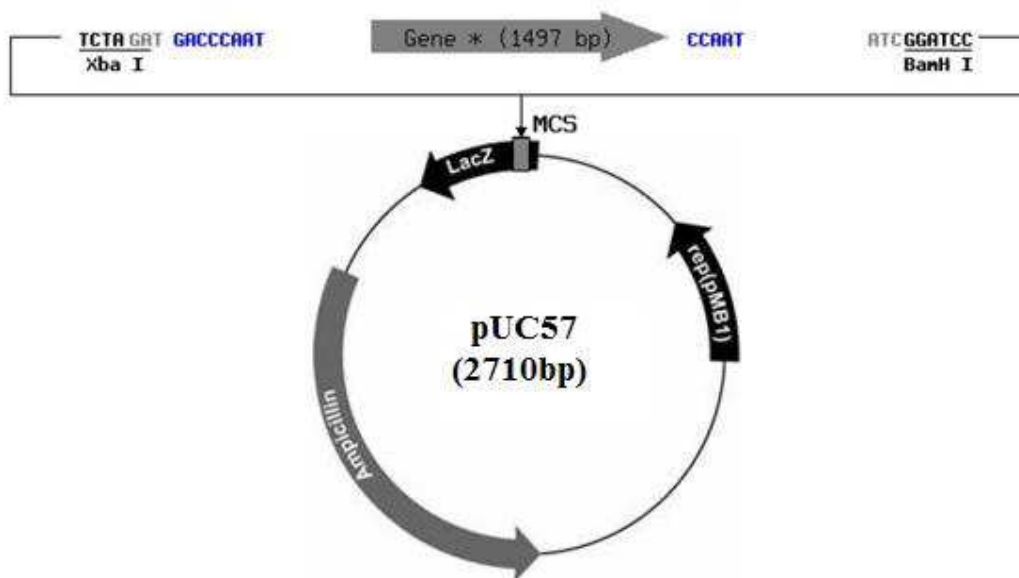
EK 3. pUC19-Pax4



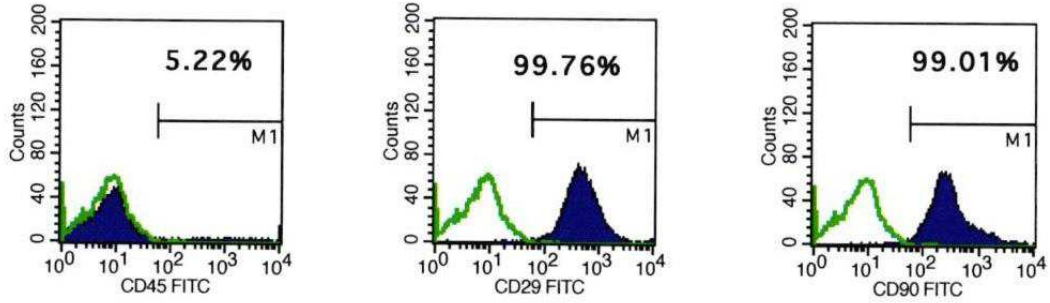
EK 4. pUC57-MafA



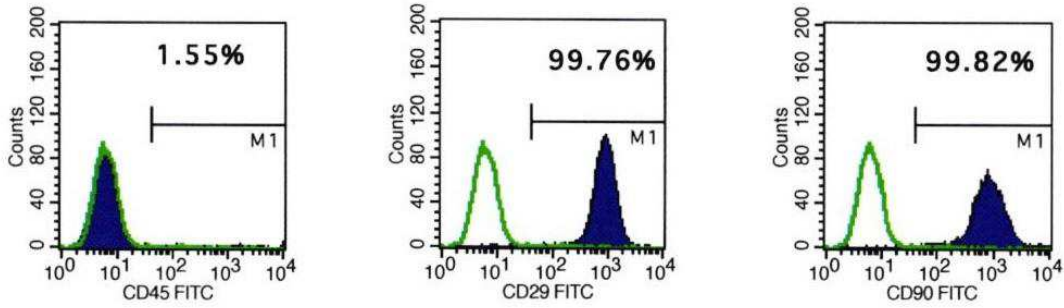
EK 5. pUC57-Gck



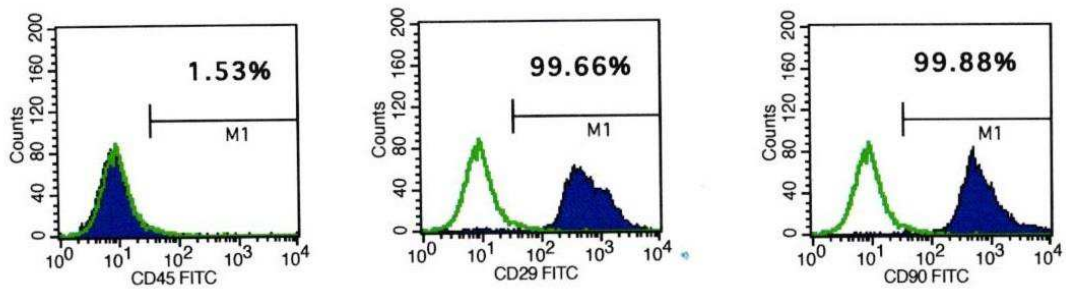
EK 6. Ngn3 geni aktarımı sonrası sPA-MKH'lerin (Grup 1) akım sitometri analizi



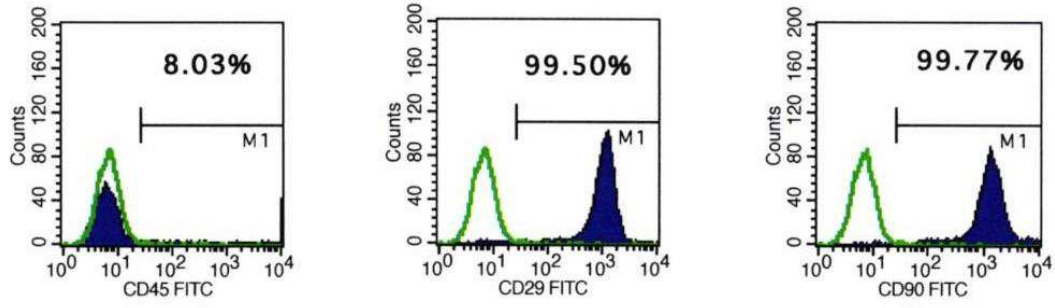
EK 7. MafA geni aktarımı sonrası sPA-MKH'lerin (Grup 2) akım sitometri analizi



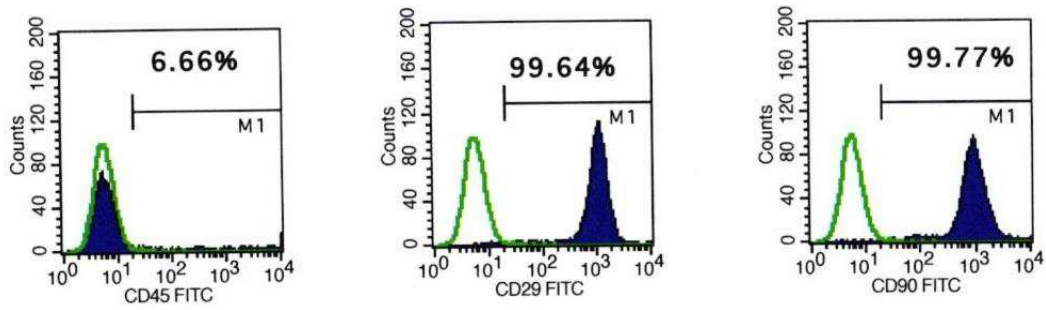
EK 8. Pax4 geni aktarımı sonrası sPA-MKH'lerin (Grup 3) akım sitometri analizi



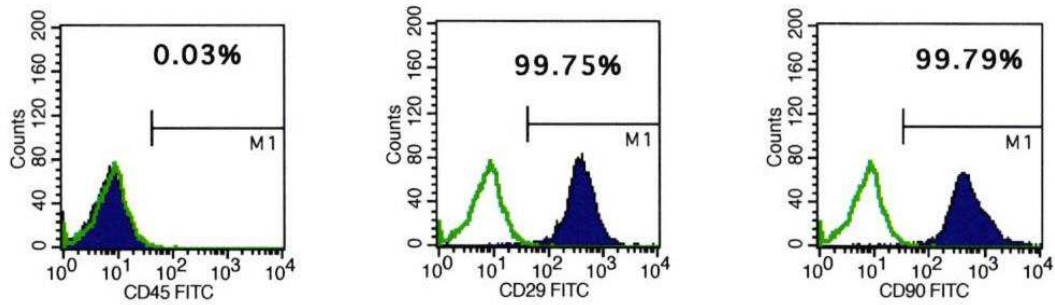
EK 9. MafA-Pax4 geni aktarımı sonrası sPA-MKH'lerin (Grup 4) akım sitometri analizi



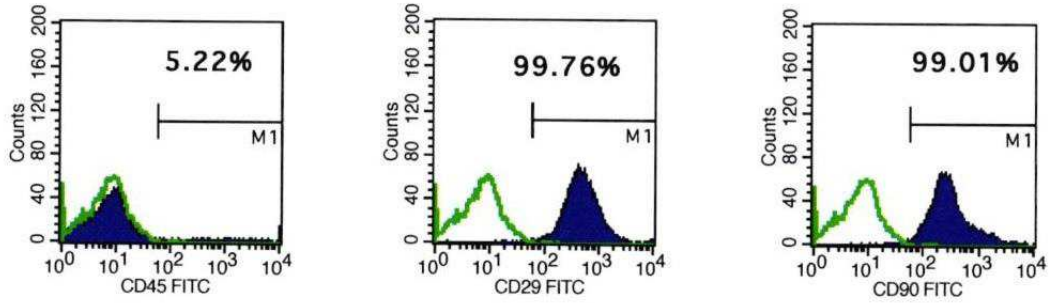
EK 10. Pax4-Gck geni aktarımı sonrası sPA-MKH'lerin (Grup 5) akım sitometri analizi



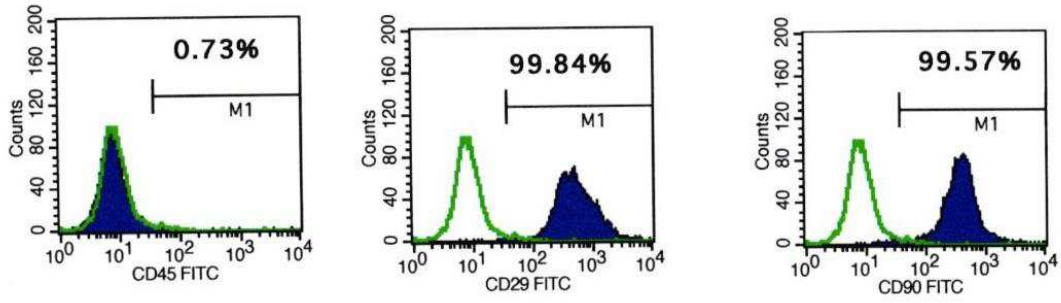
EK 11. Ngn3-MafA geni aktarımı sonrası sPA-MKH'lerin (Grup 6) akım sitometri analizi



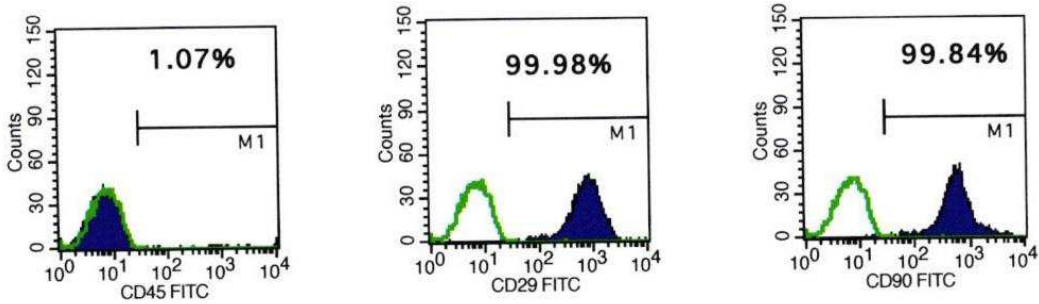
EK 12. Ngn3-Gck geni aktarımı sonrası sPA-MKH'lerin (Grup 7) akım sitometri analizi



EK 13. Ngn3-Pax4 geni aktarımı sonrası sPA-MKH'lerin (Grup 8) akım sitometri analizi



EK 14. Ngn3-Pax4-MafA geni aktarımı sonrası sPA-MKH'lerin (Grup 9) akım sitometri analizi



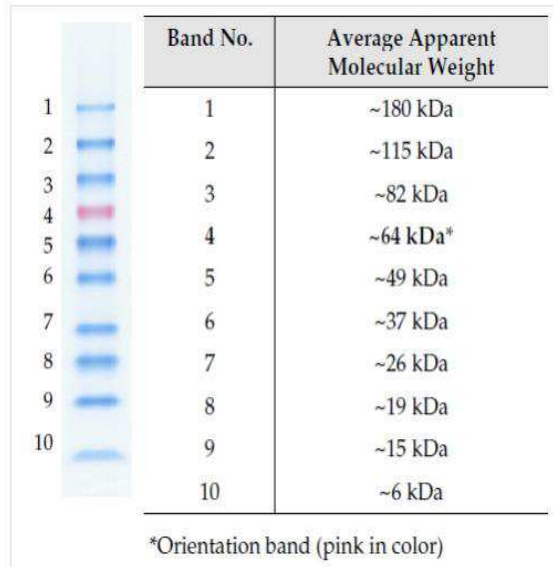
EK 15. Western blot hibridizasyonunda kullanılan belirteç

novex[®]
by *life* technologies™

BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder

Cat. no. 10748-010 Size 2 × 250 µL Store at -30°C to -10°C

Pub. Part no. 10748010.pps MAN0000876 Rev. Date: 14 October 2011



ÖZGEÇMİŞ

Bireysel Bilgiler

Adı Soyadı: Ayşegül BAĞLAR

Doğum yeri ve tarihi: Karamürsel-18.08.1988

Uyruğu: T.C.

Medeni Durumu: Bekar

Çalıştığı kurum: Kocaeli Üniversitesi

İletişim Adresi: 4 Temmuz Mah. 1112. Sok. Bağlar Apt. Kat:1 Karamürsel/KOCAELİ

Telefon: 05395797272

E-posta adresi: aysegulbaglar@gmail.com

Eğitimi (tarih sırasına göre):

08/2011- Devam ediyor

Yüksek Lisans

Kocaeli Üniversitesi, Kök Hücre Anabilim Dalı, Kök Hücre ve Doku Yenilenmesi Programı-Kocaeli/TÜRKİYE

09/2006-06/2011

Lisans

Anadolu Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Eskişehir/TÜRKİYE

09/2002-06/2011

Lise

Karamürsel Anadolu Lisesi,
Kocaeli/TÜRKİYE

Mesleki Deneyimi

09/2012- Devam ediyor

Araştırma Görevlisi

Kocaeli Üniversitesi, Kök Hücre Anabilim Dalı, Kök Hücre ve Doku Yenilenmesi Programı-Kocaeli/TÜRKİYE

Yabancı dili: İngilizce

Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

Kök Hücre ve Hücreyel Tedaviler Derneği

Bilimsel Etkinlikler

Aldığı burslar

Pankreatik Adacık Neogenezinden Sorumlu Genlerin (MafA, Ngn3, Pax4) Öncül Kök Hücrelere Aktarılmasıyla Fonksiyonel İnsülin Üreten Hücrelerin Eldesi ve Doku Mühendisliği Yaklaşımı (TÜBİTAK, Proje No: 112S125).

Projeleri

Pankreatik Adacık Neogenezinden Sorumlu Genlerin (MafA, Ngn3, Pax4) Öncül Kök Hücrelere Aktarılmasıyla Fonksiyonel İnsülin Üreten Hücrelerin Eldesi ve Doku Mühendisliği Yaklaşımı (TÜBİTAK, Proje No: 112S125).

Ulusal Bilimsel Etkinliklerde Sözlü Bildiriler

BağlarA, Duruksu G, Karaöz E. Pax4 Geni Aktarılmış Pankreatik Adacık Kaynaklı Kök Hücrelerin Endokrin Hücre Yönünde Farklılaşma Potansiyeli. 1. Uluslararası Katılımlı Kök Hücre ve Hücreyel Tedaviler Kongresi, PP-30, S-04, 20-23 Mart 2014, Kocaeli.

Ulusal Bilimsel Etkinliklerde Poster Bildirileri

BağlarA, Duruksu G, Karaöz E. Pankreatik Adacık- ve Adipoz Doku- Kaynaklı Kök Hücrelerin Endokrin Hücre Yönünde Farklılaşma Potansiyellerinin Karşılaştırılmalı Olarak İncelenmesi. 4. Kök Hücre Sempozyum, 20 Aralık 2013, İstanbul.

Uluslararası Bilimsel Etkinliklerde Poster Bildirileri

Bağlar A, Duruksu G and Karaoz E. The effect of Pax4 gene expression on the differentiation of pancreatic islet and adipose tissue derived stem cells into insulin

producing cells. Tissue Engineering and Regenerative Medicine (TERMIS-EU), 10-13 July 2014, Italy.

Baglar A, Duruksu G, Karaöz E.Improvement of Differentiation Efficiency into Insulin-Secreting Cells by Ngn3 and Pax4 Expression. Tissue Engineering and Regenerative Medicine (TERMIS-EU), 17-20 June 2013, Turkey.