

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

İNSÜLİN GEN NAKLİNİN DİYABETİK HAYVAN
MODELLERİNDE TERAPÖTİK ETKİSİNİN
BELİRLENMESİ

YUNUS EMRE EKŞİ

DOKTORA TEZİ

2019-ANTALYA

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

İNSÜLİN GEN NAKLİNİN DİYABETİK HAYVAN
MODELLERİNDE TERAPÖTİK ETKİSİNİN
BELİRLENMESİ

YUNUS EMRE EKŞİ

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Salih ŞANLIOĞLU

Bu tez TDK-2018-2833 proje numarası ile Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi ve 215S820 proje numarası ile Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından desteklenmiştir.

“Kaynakça gösterilerek tezinden yararlanılabilir”

2019-ANTALYA

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

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

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Salih ŞANLIOĞLU
Akdeniz Üniversitesi



Üye : Prof. Dr. Mustafa Kemal BALCI
Akdeniz Üniversitesi



Üye : Prof. Dr. Fahri UÇAR
Akdeniz Üniversitesi



Üye : Doç. Dr. Atıl BİŞGİN
Çukurova Üniversitesi



Üye : Doç. Dr. Banu MANSUROĞLU
Yıldız Teknik Üniversitesi



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

Prof. Dr. Narin DERİN
Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

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

Yunus Emre EKŞİ



Tez Danışmanı
Prof.Dr. Salih ŞANLIOĞLU



TEŞEKKÜR

Doktora eğitim sürecimde, tüm bilgi ve deneyimi ile, en zor koşullarda dahi, her zaman yanımda olan, sevgi ve desteğini esirgemedi paylaşan kıymetli danışman hocam Sayın Prof.Dr. Salih ŞANLIOĞLU'na,

Tüm süreçlerdeki karşılıksız paylaşımları ve destekleri sebebiyle Sayın Prof. Dr. Ahter D. ŞANLIOĞLU'na,

Tez sürecinde deneylerin her aşamasındaki katkı ve emeklerinin varlığı için başta Elif Özgecan ŞAHİN ve Fulya ERENDOR olmak üzere tüm ekip arkadaşlarıma,

Girişimsel hayvan deneylerinde tecrübesiyle yanımda olup yardımını esirgemeyen Erol NİZAMOĞLU'na,

Sevgi ve sabırla verdikleri destekleri için Sağlık Bilimleri Enstitüsü çalışanları Turhan TAT, Burhan ÇAKMAZ, Cihan POLAT'a,

Bugünlere gelmemi sağlayan, yaşantım boyunca yanımda olup her an desteklerini arkamda hissettiğim sevgili annem Nuriye EKŞİ ve kardeşlerim başta olmak üzere geniş ve güzel ailemin tüm fertlerine,

Sevgiyle, sabırla ve bitmek tükenmek bilmeyen bir enerjiyle her koşulda koşulsuz yanımda olan değerli eşim Dr. Öğr. Üyesi Durkadın DEMİR EKŞİ'ye,

Ve son olarak hayata geldiği günden itibaren varlığının bize mutluluk ve neşe getirdiği, en sıkıntılı anlarımızda bile bize mutluluk veren sevgili oğluşum Hüseyin Bertuğ EKŞİ'ye,

en içten dileklerle teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Amaç: Tip 1 Diyabet (T1DM), insülin eksikliğine yol açan pankreas beta hücrelerinin otoimmün yıkımı ile karakterize bir hastalıktır. Glukoz ile regüle edilen insülin gen ekspresyonunun sağlanması, gün içindeki glukoz seviyesi değişimleriyle korele bir cevabın oluşması ve günde birden fazla insülin enjeksiyonunun önüne geçilmesi gen tedavi çalışmalarının ana konusudur. Diğer hücre tipleriyle karşılaştırıldığında, pankreas beta hücreleri, proinsülinin kontrollü transkripsiyonu ve translasyonu, glukoz duyarlı bir sisteminin olması, prohormon konvertaz ekspresyonu ve regüle edilen bir sekretuar sinyal yolağına sahip olması gibi benzersiz özelliklere sahiptir. Beta hücresi olmayan hücre tiplerine insülin geninin verilmesi başarılı sonuçlar veremediğinden, bu çalışmada pankreas beta hücresine özgü insülin gen ekspresyonunu sağlamak için Multisite Gateway Teknolojisi kullanılarak insülin promotörü kontrolünde proinsülin geni içeren bir lentiviral vektör (LentiINS) oluşturmayı amaçladık.

Yöntem: İnsülin gen naklinin T1DM diyabet hayvan modelinde ve ayrıca CRISPR&Cas9 aracılı oluşturulan insülin nakavt (KO) pankreas beta hücre hattında terapötik potansiyelini test etmek için Gateway teknolojisi kullanılarak insülin promotörü (LentiINS) kontrolü altında insülin genini eksprese eden yeni bir lentiviral vektör yapıldı.

Bulgular: HIV temelli LentiINS gen tedavi vektörünün intraperitoneal uygulaması plazma glukozunu düşürerek T1DM'li Wistar sıçanların glukoz toleransını arttırdı. STZ enjeksiyonu sonrasında diyabetik sıçanlar ağırlık kaybederken LentiINS enjekte edilen sıçanlarda ağırlık kaybı gözlenmedi. Tekrar insülin gen ekspresyonu sağlanan insülin nakavt pankreas beta hücrelerinin STZ indüklü diyabetik modellerin böbrek kapsülü altına transferiyle bu hayvanlarda plazma kan glukoz seviyesinde düşüş gözlemlendi.

Sonuç: Lentivirus aracılı gen aktarımı yoluyla insülin promotörü kontrolünde insülin gen ekspresyonunun sağlanması, diyabette doğrudan pankreası hedef alan yeni bir terapötik strateji olarak karşımıza çıkmaktadır.

Anahtar Kelimeler: insülin, lentivirus, tip 1 diyabet, crispr

ABSTRACT

Objective: Type 1 diabetes (T1DM) is characterized by autoimmune destruction of pancreatic beta cells leading to insulin deficiency. Achieving glucose regulated insulin gene expression by gene therapy is a great area of interest to meet the demand for fluctuating daily glucose levels and necessary to avoid multiple daily injections of insulin. Compared to other cell types, pancreatic beta cells possess unique features such as controlled transcription and translation of proinsulin, presence of glucose-sensing machinery, prohormone convertase expression, and a regulated secretory pathway. Since previous insulin gene delivery to non-beta cell types did not produce successful results, a new lentiviral vector (LentiINS) with insulin promoter hooked up to proinsulin encoding gene was generated using Multisite Gateway Technology to sustain pancreatic beta cell-specific insulin gene expression.

Method: A novel lentiviral vector expressing insulin gene under the control of insulin promoter (LentiINS) was constructed using Gateway technology to test its therapeutic potential in T1DM animal model of diabetes as well as in CRISPR&Cas9 mediated insulin knockout (KO) pancreatic beta cell line.

Results: Intraperitoneal delivery of HIV-based LentiINS gene therapy vector resulted in lowering of fasting plasma glucose and improved glucose tolerance of Type 1 diabetic Wistar rats. While diabetic rats exhibited weight loss following STZ injection, LentiINS injected rats retained normal body weight. Reconstitution of insulin gene expression in insulin knock out pancreatic beta cell line resulted in lowering of plasma blood glucose following beta cell transfer under kidney capsule in STZ induced diabetes.

Conclusion: Insulin promoter directed insulin gene expression via lentivirus mediated gene delivery represents a new therapeutic strategy directly targeting pancreas for the treatment of diabetes..

Key words: insulin, gene therapy, type 1 diabetes, crispr

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
TABLOLAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR	xii
1. GİRİŞ	1
1.1. Tip 1 Diyabet ve İnsülin Gen Nakli	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. İnsülin ve Diyabet	3
2.2. Diyabette İnsülin Gen Tedavisinin Yeri ve Önemi	6
2.3. Pankreatik Beta Hücrelerine Gen Naklinde Uygulanan Yöntemler	11
2.4. Lentivirus Aracılı İnsülin Gen Nakli Stratejisi	14
2.5. İnsülin Gen Tedavi Stratejisinin Terapötik Etkinliğini Ölçmek İçin Programlanabilir Nükleazlarla İnsülin Eksikliği Olan Beta Hücre Hattı Oluşturma	19
3. GEREÇ ve YÖNTEM	21
3.1. Lentiviral Vektörlerin Oluşturulması	21
3.1.1. Giriş Vektörlerinin Hazırlanması	21
3.1.2. İnsan İnsülin Peptidi kodlayan Lentiviral Ekspresyon Plazmidinin Eldesi	23
3.1.3. Lentiviral İnsülin Ekspresyon Vektörü ile Lentivirus Paketleme Plazmidlerinin Doğrulanması, Üretim ve Saflaştırma İşlemleri	24
3.1.4. Lentivirusların Üretimi ve Titrasyonu	25
3.1.5. LentiINS Viral Vektörlerinin Ekspresyon Özelliklerinin Belirlenmesi	28

3.2. ELİSA Analizleri	28
3.3. Düşük Doz Çoklu STZ İndüklü Tip 1 Diyabetik Hayvan Modeli Oluşturma ve Lentivirus Uygulamaları	29
3.4. İmmünohistokimyasal Analizler	30
3.5. CRISPR/Cas9 Aracılı Fare İnsülin Genlerinin Min6 Hücre Hattında Nakavt Edilmesi	30
3.5.1. Plasmid Vektörler	30
3.5.2. Hücre Kültürü ve Transfeksiyon	31
3.5.3. Min6 Hücrelerinin Antibiyotik Hassasiyet Testleri	33
3.5.4. İnsülin Gen Ekspresyonunun İnsülin Nakavt Hücrelere Lentiviral Vektörler ile Geri Kazandırılması	34
3.5.5. İnsülin Gen Replasman Yönteminin İn vivo Olarak Değerlendirilmesi	35
3.6. İstatistiksel Analizler	36
4. BULGULAR	37
4.1. İnsan Proinsülin Proteini Kodlayan 3. Nesil Lentiviral Plazmid Vektörlerin Geliştirilmesi	37
4.2. LentiINS Virus Transdüksiyonu İn vitro Ortamda Pankreatik Beta Hücrelerine Özgü İnsülin Ekspresyonu Sağladı	40
4.3. Tip 1 Diyabetik Hayvan Modellerinde Pankreasa Yönelimli Lentiviral İnsülin Gen Tedavisinin Teröpatik Etkinliği	41
4.3.1. İntraperitoneal LentiINS Enjeksiyonu Diyabetik Hayvanlarda Açlık Ve Tokluk Kan Glukoz Düzeylerini Anlamlı Oranda Düşürdü	41
4.3.2. İntraperitoneal LentiINS Enjeksiyonu Diyabetik Hayvanlarda Kilo Kaybını Engelledi	42
4.3.3. İntraperitoneal LentiINS Enjeksiyonu Diyabetik Hayvanların Glukoz Toleransını Düzeltti	43
4.3.4. Gen Nakli Yapılan Gruplarda İmmünohistokimyasal Analizler	44
4.3.5. İnsülin Gen Nakli Yapılan Deneklerde Serum İnsülin Seviyesi	46

4.4. CRISPR&Cas9 Genom Modifikasyon Sistemi ile Oluşturulan İnsülin Nakavt Beta Hücrelerinde İnsülin Gen Tedavisinin Etkinliğinin Belirlenmesi	46
4.4.1. İns1KO ve İns2KO Hücrelerinin Oluşturulması	46
4.4.2. İns1KO ve İns2KO Hücrelerini Seçilimi	50
4.4.3. İnsülin Protein Ekspresyon Analizleri	52
4.4.4. İnsülin Negatif İns2KO Hücre Hattının Lentiviral Vektörlerle Transdüksiyonu	53
4.4.5. LentiINS Vektörü İle Enfekte Olmuş İnsülin Nakavtı Yapılan Pankreatik Hücrelerin Tip 1 Diyabette Terapötik Etkinliği	55
5. TARTIşMA	57
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	60
KAYNAKLAR	61
ÖZGEÇMİş	68

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 3.1	Plazmid vektörler için kesim reaksiyonu bilgileri	25
------------------	---	----



ŞEKİLLER DİZİNİ

- Şekil 2.1** İnsan insülin molekülünün moleküler yapısı. PC: Prohormon Konvertaz kesim bölgeleri. 4
- Şekil 2.2.** Hızlı (Lispro, Aspart, Glulizin) ve uzun etkili (Glarjin, Detemir ve Degludek) insülin analoglarının moleküler yapısı. 5
- Şekil 2.3.** İnsan proinsülin kodlayan peptidler. Üstteki peptid yalnızca beta hücrelerinde, barsak K, L hücreleri ve bazı endokrin hücrelerde sentezlenen prohormon konvertazlar (PC) tarafından kırılabilen insan proinsülin sekansını içerir. Alttaki peptid ise tetrabazik fürin endopeptidaz kesim bölgelerini içeren sonradan değiştirilmiş insan proinsülin sekansını temsil eder. 9
- Şekil 2.4.** Gen tedavi klinik denemelerinde başarıyla kullanılan viral vektörler. 12
- Şekil 2.5.** Pankreatik beta hücresinin yerine geçebilecek ideal hücrenin özellikleri. GLUT2 ve glukokinaz hücrenin glukoz sensörü olarak fonksiyon görür. Bunun yanında, beta hücre taklitçisinin regüle edilebilir bir sekretuar yolak içermesi, sitoplazmada insülin depolaması ve uyarımla bunu salması gerekmektedir. Glukagon Benzeri Peptid 1 (GLP-1), Vazoaktif İntestinal Peptit (VİP) ve Pitüiter Adenilat Siklaz Aktive Edici Polipeptide (PACAP) yanıt verebilmek için ilgili reseptörleri sentez edebilmelidir. Resimde ayrıca glukoz indüklü insülin salınımına aracılık eden anahtar moleküller de gösterilmiştir. Kısaca özetlemek gerekirse, kan şeker seviyesi 5,5 mM ve üzeri olduğunda glukoz beta hücrelerine GLUT2 taşıyıcıları aracılığıyla girerek, GK tarafından fosforillenir. Glikoliz ATP/ADP oranını arttırarak K kanallarının (K⁺ Ch) aktivasyonunu sağlar ve sonuçta membran depolarizasyonu

gerçekleşir. Kalsiyum kanallarının açılması (Ca²⁺ Ch) hücre içine kalsiyum dolmasına sebebiyet verir ve böylece insülin salınımı gerçekleşir. İncretin etkili moleküller (GLP-1, VIP ve PACAP) G protein interaktif reseptörler (GPCR) aracılığıyla glukoz indüklü insülin sekresyonunu arttırmaları.

17

Şekil 3.1. Gateway teknolojisi ile insan insülin promotorlu lentiviral insülin ekspresyon vektörünün (pLENTI-IPINS) oluşturulması: (A)TOPO/TA klonlama reaksiyonu ile attL4 ve attR1 bölgelerinin ucunda Topoizomeras-I enzimi ile bağlı olarak yerleşmiş halde bulunan 3' timidin nükleotidleri, PZR ürünü lineer minimal insülin promotor sekansında Taq polimeraz enziminin eklenmesiyle açığa çıkan Adenin nükleotidleri ile bağlanarak insülin promotor bölgesi içeren giriş vektörleri (pENTR5'IP) oluşur, (B) Multisite Gateway teknolojisi kullanılarak insülin promotor kontrolü altında insülin geni kodlayan lentiviral ekspresyon vektörleri, LR Clonase II Plus enzimi varlığında attL4xattR4, attR1xattL1, attL2xattR2 rekombinasyon reaksiyonları ile insülin promotorlu (pENTR5'IP) ve proinsülin sekanslı giriş vektörlerindeki (pENTRINS) genler destinasyon vektörüne aktararak pLENTI-IPINS ekspresyon vektörü elde edilmiş olur.

24

Şekil 3.2. Silindirik hücre kültürü şişelerinde Lentiviral Gen Tedavi Vektör Üretim Yönteminin akış diyagramı; 1)Hücre kültürü petrilerini kaplamış olan 293T/17 hücrelerinin silindirik hücre kültürü şişelerine ekim aşamasını ve hücrelerin yüzeye tutunabilmesi için şişelerin 24 saat süreyle 0,3 rpm hızda dönme aşamasını 2) Yüzeye tutunan hücrelerin verimli lentiviral vektör üretimi için gereken hücre sayısına ulaşması için besiyeriyle daha fazla temasını sağlamak amacıyla şişelerin 16 saat süreyle 1 rpm hızda dönme aşamasını 3) Lentiviral vektör yapısını oluşturacak olan 4 farklı

plazmidin HBS ve CaCl_2 kullanılarak biraraya getirilmesi aşamasını 4) Hazırlanan plazmid karışımının silindirik hücre kültürü şişelerine aktarım aşamasını ve lentiviral vektör partiküllerinin oluşması için 72 saat süreyle 1 rpm hızda döndürülme aşamasını 5) Viral vektör partikülleri içeren hücre süpernatantının ultrasantrifüj tüplerine aktarılarak süpernatantların altında süroz tabakasının oluşturulma aşamasını 6) Hazırlanan tüplerin ultrasantrifüj cihazına yerleştirilerek saflaştırılma aşamasını 7) Ultrasantrifüj sonrası tüplerin dibine çöken lentiviral partiküllerin süpernatant kısmından uzaklaştırılarak elde edilmesi aşamasını ifade etmektedir. 27

Şekil 3.3. İnsülin nakavt Min6 hücre hattı geliştirme stratejisi basamakları 32

Şekil 3.4. Min6 hücrelerinin puromisin hassasiyeti 33

Şekil 3.5. Min6 hücrelerinin blastisidin hassasiyet noktasını belirlemek için denenen dozlar 34

Şekil 3.6. İns2KO hücrelere LentiINS transdüksiyonunda takip edilen basamaklar 35

Şekil 4.1. pLENTI- IpIns vektörlerinin RFLP ve Sanger dizileme metodları ile doğrulanması: (A) LentiINS vektör haritası, (B) LentiINS vektörü enzim kesim agaroz jel görüntüsü, (C) PZR reaksiyonu ürününün agaroz jel görüntüsü, (D) Blast sonucunun ekran görüntüsü 38

Şekil 4.2. A) Lentivirus oluşturmada kullanılan paketleme plazmidlerinin yapılarını ve doğrulama için kullanılan restriksiyon enzimleri ile kesim noktalarını gösterir haritalar (B) restriksiyon kesim reaksiyonlarının agaroz jel görüntüleri (M: marker, 1: AflIII

Linearize Gag/pol plazmidi, 2:Gag/pol EcoRI kesim reaksiyonu, 3: XhoI Linearize Rev plazmidi, 4: Rev XhoI&AflIII kesim reaksiyonu, 5: NotI Linearize VSVG plazmidi, 6:VSVG EcoRI kesim reaksiyonu) 39

Şekil 4.3. LentiINS transdüksiyonu sonrası insülin ekspresyon düzeyleri. (A) 293T İnsan embriyonik böbrek hücrelerinde (B) Min6 pankreatik beta hücre hatlarında (One-Way ANOVA, $p<0.0001$). 40

Şekil 4.4. Lentivirus aracılı insülin promotorlu proinsülin gen nakli sonrası grupların açlık ve tokluk kan glukoz düzeyleri (2 way ANOVA testi $p<0.0001$) 41

Şekil 4.5. Lentiviral enjeksiyon sonrası diyabetik hayvanların ağırlık değerleri (A), yüzde ağırlık kayıpları (B) (2 way ANOVA $p<0.0071$) 42

Şekil 4.6. Tip 1 diyabetik deneklerin LentiINS ve LentiLacZ gen nakli sonrası glukoz tolerans eğrileri. One-way ANOVA, Tukey's ($p<0.0001$) 43

Şekil 4.7. LentiINS ve LentiLacZ enjeksiyonu sonrası pankreas, karaciğer, dalak, böbrek dokularına ait insülin ekspresyon profilleri 45

Şekil 4.8. Gen naklinin serum insülin seviyesi üzerine etkisi (One Way ANOVA ve Tukey. Kontrol vs LentiLacZ, $p<0.05$; Kontrol vs. LentiINS, $p<0.0023$) 46

Şekil 4.9. İkili transfeksiyon ardından 24, 48, 72 ve 96. saatlerde Min6 hücrelerindeki GFP ve RFP ekspresyon profilleri. 48-49

Şekil 4.10. İkili trasfeksiyonun ardından 96. saatte hücre morfolojileri 50

Şekil 4.11. İns1KO ve İns2KO hücrelerinin seçilimi 51

Şekil 4.12. Grupların insülin içeriklerinin western blot görüntüsü 52

Şekil 4.13. Blastisidin seleksiyonu sonrasında transdüksiyon verimlilikleri 54

- Şekil 4.14.** Tek doz STZ indüklü hiperglisemik hayvan modeli için doz demesi kan glukoz düzeyleri (A) ve survival verileri (B) 55
- Şekil 4.15.** Böbrek kapsülü altına hücre aktarımı sonrası grupların kan glukoz değerleri 56



SİMGELER ve KISALTMALAR

AAV	:	Adeno-associated virus
cAMP	:	Cyclic adenosine monophosphate
Cas9	:	CRISPR bağlantılı protein 9
CMV	:	Sitomegalovirus
CRISPR	:	RNA aracılı kümelenmiş düzgün aralıklı palindromik tekrar dizileri
EF1-α	:	Elongasyon faktör 1-alfa
EMA	:	Avrupa Tıp Ajansı
G6Ptaz	:	Glukoz 6 fosfataz
GFP	:	Yeşil floresan protein
GK	:	Glukokinaz
GLUT2	:	Glukoz taşıyıcı-2
HDR	:	Homolog rekombinasyon
HIP	:	İnsan insülin promotörü
IDF	:	Uluslararası Diyabet Federasyonu
IGF	:	İnsülin-benzeri büyüme faktörü
KO	:	Nakavt
LentiINS	:	İnsülin peptidi kodlayan lentiviral vektör
LentiLacZ	:	Beta-galaktozidaz kodlayan lentiviral vektör
MLV	:	Moloney murine leukemia virus
NOD	:	Non-obez Diyabetik
PACAP	:	Pituitary adenilat siklaz-aktifleştirici peptid
PC	:	Prohormon konvertaz
PEPCK	:	Fosfoenolpiruvat karboksilaz
rAAV	:	Rekombinant AAV
RFP	:	Kırmızı floresan protein
STZ	:	Streptozotosin
T1DM	:	Tip 1 Diyabet
T2DM	:	Tip 2 Diyabet

1. GİRİŞ

1.1. Tip 1 Diyabet ve İnsülin Gen Nakli

Diyabet; bağışıklık ve genetik mekanizmaların birlikte rol oynadığı metabolik abnormaliteler ile karakterize pandemik bir hastalıktır. Langerhans adacıklarındaki beta hücrelerin otoimmün yıkımıyla karakterize insülin bağımlı şeker hastalığı Tip 1 diyabet (T1DM) olarak bilinir. T1DM tedavisinde insülin enjeksiyonu oldukça yaygın olarak kullanılmasına rağmen bu tedavi metodu ideal kan şekeri kontrolünü tam olarak sağlayamadığı için hastaların nefropati, nöropati ve retinopati gibi kronik komplikasyonları zamanla geliştirmelerini engelleyemez. T1DM tedavisinde uygulanan pankreas organ nakli ve pankreas adacık transplantasyonunun klinik yaygınlığı, pankreas organ donörü bulma güçlüğü sebebiyle ciddi oranda kısıtlanmıştır. Bu nedenle pek çok insan hastalığı için umut vaad eden yeni bir tedavi şekli olan gen tedavisinin alternatif bir terapi metodu olarak T1DM tedavisi için de geliştirilmesi gündeme gelmiştir.

Nitekim, Tip 1 diyabet hastalarının hepsi, Tip 2 Diyabet hastalarının (T2DM) çoğunluğu, hastalığın ilerleyen dönemlerinde beta hücre kaybına bağlı olarak zaman içinde insüline bağımlı hale geldiğinden, gen transfer vektörleri aracılığıyla insülin gen aktarımı; diyabetik hastalarda endojen insülin sentez profilini taklit edebilecek potansiyel terapötik bir yaklaşımdır. Bu nedenle, insülin gen terapisinin ana hedefleri, hedef dokularda insülin gen ekspresyonunun sağlanabilmesi, periferik dokulara glukoz alımının artırılması, glukagon sekresyonunun baskılanması ve hipergliseminin azaltılabilmesi için hepatik glukoz üretiminin inhibe edilmesi olarak tanımlanabilir (Bansal ve Wang, 2008). Dolayısıyla insülin gen terapisi, hastalarda en azından bazal plazma insülin gereksiniminin karşılanabilmesi için gerekli çözümü sağlayabilir (Marcin ve ark., 2011). Bunun yanında insülin gen nakli ile, T1DM hastalarında metabolik stabilite için esansiyel olan rezidüel beta hücre fonksiyonunun korunması ve zamanla artırılması da mümkün olabilir. Ayrıca, diyabetik hastalarda C-peptid yararlı etkiler göstermesine rağmen, regüler insan insülini ve insülin analoglarında C-peptid olmadığından, Tip 1 diyabet hastalarında C-peptidin insülin preparatlarına dahil edilip edilmemesi gerekliliği konusunda bilim camiasında bir kargaşa yaşanmaktadır. Tip 2 diyabet hastalarının erken evrelerinde C-peptid seviyesinde bir artış gözlenmesi ilk başlarda bu konuda bir tereddüt doğmasına

sebebiyet vermişti. Bugün için C-peptidin bir insülin belirteci olmaktan öte, diyabetik hastalarda böbrek ve sinir fonksiyonlarını arttırdığı, esansiyel organlara kan akışını sağladığı belirlenmiştir (Kamiya ve ark., 2009). Dolayısıyla insülin gen nakli yalnızca insülin ihtiyacını karşılamak için değil, aynı zamanda şu anda T1DM hastalarının insülin preparatlarında olmayan C-peptid gereksinimini karşılayarak diyabet komplikasyonlarının gelişiminin engellenebilmesi açısından gerekli olabilir.

Sunulan projemizde önerilen insülin gen nakli çalışmasında; T1DM deney hayvan modelinde sadece bazal insülin ihtiyacını değil, aynı zamanda gün içerisinde değişen kan glukoz düzeylerine cevap verebilecek (özellikle yemek sonrası-postprandial glukoz düzeyi) yeni bir insülin gen nakli vektörü oluşturduk (LentiINS). Bu amaçla insan insülin promotorlu doğal proinsülin kodlayan DNA dizileri, güvenilirliği ve etkinliği klinik denemelerde kanıtlanmış 3. jenerasyon lentiviral vektörlere aktarıldı. İnsan insülin promotor kullanımı hem glukoz yanıtı oluşturmada, hem de insülin gen sentezini pankreatik beta hücrelerine özgün kılmak için gerekliydi.

Sonrasında oluşturulan LentiINS vektörünün terapötik etkinliği T1DM sıçanlarda test edildi. Bu amaçla, LentiINS vektörünün T1DM hastalığının gelişimini önlediği ve gelişen T1DM bulgularını geri döndürdüğü belirlendi. Bunun yanı sıra, deneklerde bazal insülin düzeyleri ve postprandial insülin seviyeleri glukoz tolerans testleriyle açığa çıkarıldı. Ayrıca LentiINS vektörünün etkinliği CRISPR&Cas9 sistemi ile oluşturulan, insulin ekspresyonu olmayan pankreatik beta hücre hatlarında test edildi. LentiINS vektörü bu hücrelerde insulin ekspresyonunun geri kazanımını sağladı. Hücrelerin diyabetik hayvanların böbrek kapsülü altına aktarılması terapötik etki gösterdi.

Sonuç olarak bu projede daha önce denenmemiş yaklaşımlarla yeni geliştirilen insülin gen nakli metodunun insülin enjeksiyonlarına oranla daha iyi yarar sağladığını ve Tip 1 diyabete deneysel bazda bir çözüm getirebileceğimizi belirledik.

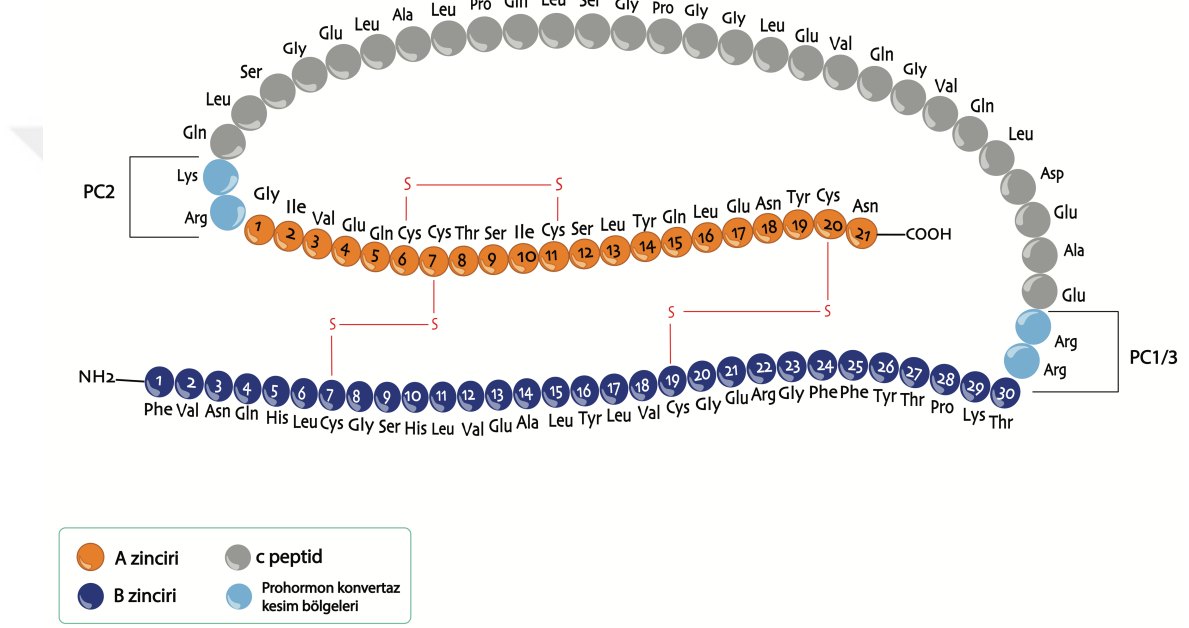
2. GENEL BİLGİLER

2.1. İnsülin ve Diyabet

Diyabet; insülin yetmezliği ve/veya karaciğerden glukoz sekresyon artışına bağlı olarak gelişen kan şekerinin yüksekliği ile karakterize metabolik bir hastalıktır. Uluslararası Diyabet Federasyonu (IDF) verilerine göre 2017 yılı itibarıyla diyabetli hasta sayısı 425 milyona ulaşmıştır (Federation, 2017). Diyabetli hasta sayısının 2045 yılında 630 milyona ulaşması öngörülmektedir. Bu da bir sonraki jenerasyonda diyabetli hasta sayısında %55 artış olacağına işaret eder. Tüm bunların dışında 352 milyon kişide de glukoz tolerans bozukluğu tespit edilmiştir. Bu kişiler gerçekte diyabet hastalığı geliştirmeye yatkınlığı olan bireyleri temsil eder. Diyabetli hastalar genelde 40-59 yaş aralığında olup, bunların %80'i düşük ya da orta gelirli ülkelerde yaşamaktadır. Sadece 2017 yılında 5.1 milyon kişi, diyabet hastalığı sebebiyle hayatını kaybetmiştir. Bu da her 6 saniyede bir kişinin ölümü demektir. 2017 yılı itibarıyla diyabet hastalığına karşı yapılan sağlık harcamaları 727 milyar doları bulmuştur (Federation, 2017). Bu nedenle diyabet aynı zamanda ciddi bütçe kayıplara sebebiyet veren bir hastalıktır.

Hiperglisemi ile kendini gösteren insülin yetmezliği hem T1DM hem de T2DM hastalığının ortak özelliği olmasına rağmen, tek bir gen mutasyonuna bağlı olmayıp birbirinden farklı mekanizmalarla pankreatik beta hücrelerinin fonksiyon kaybı sonucu gelişir (Pietropaolo ve ark., 2007). T1DM hastalarının pankreatik beta hücreleri otoimmün reaksiyon sonucu tahrip edildiğinden bu hastalara günlük insülin enjeksiyonu gerekir. Diğer taraftan insülin dirençliliği sonrasında gözlemlenen beta hücre fonksiyon bozukluğu ve beta hücre kaybı T2DM hastalığının karakteristik özelliklerindendir. Bu sebeple T2DM hastalarının çoğun da zaman içinde gelişen insülin yetmezliğine bağlı olarak insülin tedavisi gerekli hale gelir. Erken insülin tedavisinin diyabetin makrovasküler (koroner arter hastalığı, periferik arter hastalığı ve inme) ve mikrovasküler (diyabetik nefropati, nöropati ve retinopati) komplikasyonlarını hafiflettiğine dair deliller olsa da, insülin tedavisinin nasıl başlanıp nasıl yoğunlaştırılacağı konusunda hekimler arasında halen yoğun bir kargaşa söz konusudur. İnsülin molekülü, B zincirlerinin C-terminalleri arasında oluşan H bağı nedeniyle, solüsyonda dimerler oluşturma eğilimindedir (Şekil 2.1). Ortamda çinko iyonlarının varlığı ise, insülin dimerlerini hekzamerler oluşturmaya zorlar.

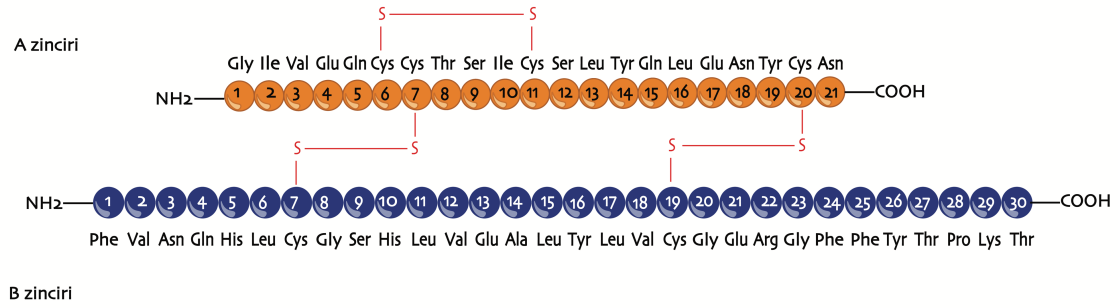
İnsülin monomer ve dimerlerinin kana kolaylıkla karışması, heksamerlerin ise penetrasyonunun zayıf olması, diyabet tedavisi açısından oldukça önemlidir. Örneğin, çinko molekülüne bağlı heksamer içeriği yüksek olan insülin preparatları gerektiği gibi emilemediğinden regüler insan insülini kullanarak (örneğin Humulin R, Novolin R, Velosulin BR, Actrapid) yeterli glisemik kontrol sağlamak çok zordur.



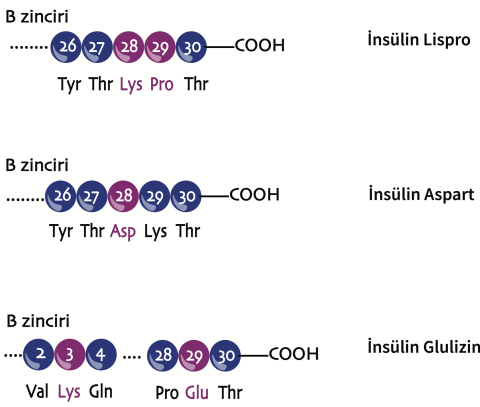
Şekil 2.1. İnsan insülin molekülünün moleküler yapısı. PC: Prohormon Konvertaz kesim bölgeleri.

Subkutan enjeksiyon sonrası, insülin heksamerlerinin kanda emilim için dimer ve monomerlerine ayrılması 60 ile 90 dakika sürer (Ginsberg, 1994). Diyabetik hastalar insülin enjeksiyonlarının zamanlamasını her zaman doğru yapamayabildiğinden, kan glukozu ile insülin konsantrasyonu arasında kolaylıkla uyumsuzluk gelişebilir. Sonuçta yetersiz glukoz kontrolü, hastaları hipoglisemi ve uzun dönemde nöropati, nefropati, ve retinopati gibi diyabet ile ilişkili komplikasyonlara yatkın hale getirir. Buna dayanılarak, bir dizi rekombinant insülin analogu geliştirilmiştir (Hirsch, 2005). Bu çalışmalarda insan insülin dizisinde küçük değişiklikler gerçekleştirilerek rekombinant insülinin ilgili reseptörüne bağlanma ve glukoz kontrol özellikleri iyileştirilmiştir (Şekil 2.2) (A. D. Sanlioglu ve ark., 2013).

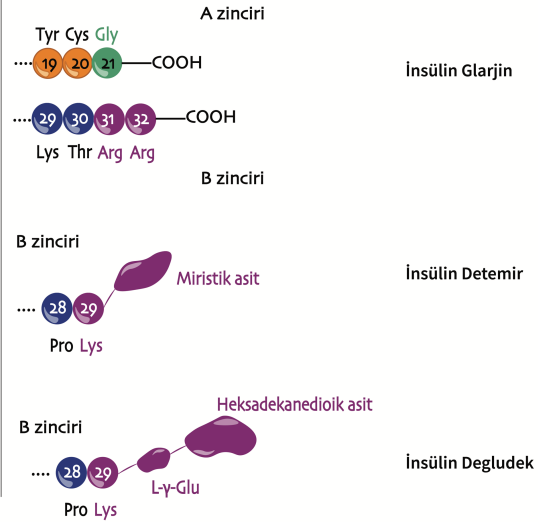
İnsan İnsülin Molekülü



Hızlı Etkili İnsülin Analogları



Uzun Etkili İnsülin Analogları



Şekil 2.2. Hızlı (Lispro, Aspart, Glulizin) ve uzun etkili (Glarjin, Detemir ve Degludek) insülin analoglarının moleküler yapısı.

Bu avantajlarına rağmen, mevcut insülin analogları özellikle yüksek dozlarda kullanıldıklarında fizyolojik bazal insülin sekresyon profilini oluşturmada yetersiz kalmaktadırlar (Heise ve Pieber, 2007). Alternatif olarak, bu ajanlar düşük dozlarda kullanıldıklarında, diyabetik hastalarda 24 saat yeterli insülin düzeyi sağlanamaz (Ashwell ve ark., 2006). Bireyler arasındaki metabolik değişkenlik düşünüldüğünde, insülin analogları kullanan diyabet hastalarında halen optimum düzeyde postprandial insülin seviyelerinin de sağlanabilmesi gerekmektedir. Bu hastalarda optimum glisemik kontrole ulaşılmasında en önemli sorunun tekrarlayan insülin indüklü hipoglisemi olduğu belirlenmiştir (Mohn ve ark., 2005). Buna ek olarak, uzun etki süreli glarjin'in, insan osteosarkom hücre hattının mitotik hızını artırdığı belirlenen insülin-benzeri büyüme faktörü (IGF) reseptörüne afinitesi olduğu saptanmıştır (Kurtzhals ve ark., 2000).

Dolaşımdaki yüksek IGF-1 seviyeleri, solid tümör ve lösemi riski ile ilişkilendirildiğinden, bazı yeni insülin analoglarını kullanan hastalarda kanser riskinin artabileceğinden endişe duyulmaktadır (Hemkens ve ark., 2009). Avrupa Tıp Ajansı (EMA), insülin analogları ve kanser arasındaki potansiyel riski doğrulamamış olmakla birlikte, böyle bir ihtimalin olmadığını da dışlayamamıştır. İnsülin replasman tedavisi ile ilişkili temel problemlerden biri, dışarıdan insülin enjeksiyonu ile endojen olarak pankreatik beta hücrelerinden üretilen doğal insülin salınımına tamamen uyan bir insülin sekresyon profili oluşturmanın neredeyse mümkün olmamasıdır. Bu kısmen, ekzojen olarak verilen insülinin hepatik arter aracılığıyla karaciğere ulaşmadan önce ilk olarak venöz ve pulmoner dolaşıma girme gerekliliğinden kaynaklanır. Bunun aksine, pankreatik beta hücrelerinden salınan insülin portal ven aracılığıyla direkt olarak karaciğere gider. İnsülinin fizyolojik etkilerinin açığa çıkmasının ve en azından insülin dinamiğinin, uygulanış şekline göre farklılık gösterebileceği barizdir.

Günümüzde birçok insülin analogu üretilmesine rağmen yakın tarihli bir meta-analiz, hızlı ve uzun etkili insülin analoglarının glisemik kontrol açısından beklenenin aksine konvansiyonel insüline oranla oldukça az yarar sağladığını göstermiştir. Diyabet bir tek gen hastalığı olmasa da, diyabetin temel sebebi olarak bilinen insülin yetersizliğinin ortadan kaldırılabilmesi için insülin gen transferinin gerçekleştirilmesi, oldukça cazip bir tedavi yaklaşımı olarak ortaya çıkmaktadır (A. D. Sanlioglu, Altunbas, ve ark., 2012).

2.2 Diyabette İnsülin Gen Tedavisinin Yeri ve Önemi

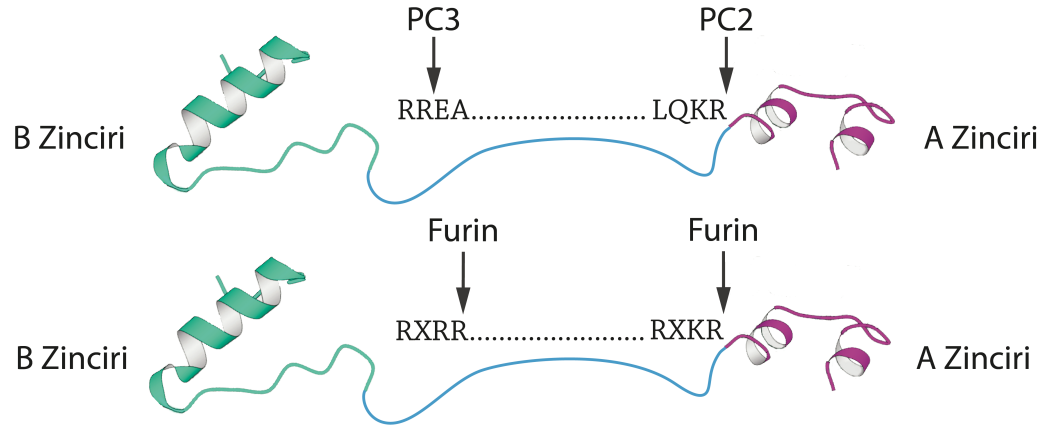
Günümüzde diyabet hastalarının tedavisi için kullanılan insülin analoglarının dışında bunlara alternatif olarak deneysel insülin gen terapi yaklaşımları geliştirilmektedir (Chan ve ark., 2003). Gen aktarımları ex vivo ve in vivo olmak üzere iki farklı yolla yapılabilmektedir. Ex vivo yöntemde hastadan alınan hücreler vücudun dışında laboratuvar ortamında gen nakliyle modifiye edildikten sonra tekrar hastalara nakledilir. In vivo yöntemde ise, gen transfer vektörlerinin farklı yollarla hastalara direkt enjeksiyonu söz konusudur (intravenöz, subkutan, vb.). Basit ve daha uygun olması sebebiyle, in vivo gen terapisi, gen aktarımlarında oldukça tercih edilen bir metottur. Bunun yanı sıra kan glukozunu düşürmeyi hedefleyen gen tedavi yaklaşımları genel olarak glukoz kullanımını

kolaylaştırırken eş zamanlı olarak hepatik glukoz üretimini de inhibe etmeyi amaçlar. Son zamanlarda dışarıdan verilen eksojen insülin ihtiyacını azaltacak yeni insülin tedavi metodlarının geliştirilmesine büyük önem verilmektedir. Bir beta hücre tipi olmayan fare pituiter kortikotrof hücrelerinde (AdT20) proinsülin sentezlemesi, sekretuar granüllerde depolanması ve stimülasyonla insülin salgılaması bu konuda yapılan ilk çalışmalardandır (Moore ve ark., 1983). Nöroendokrin hücreler prohormon konvertaz sentezi (PC1/3 and PC2) ve regüle edilebilir sekretuar yolak içermeleri itibarıyla beta hücrelerine çok benzeseler de, glukokinaz (GK) ve glukoz taşıyıcı-2 (GLUT2) moleküllerini sentezlemediklerinden dolayı pankreatik beta hücreleri gibi bir glukoz yanıtı veremezler. Dahası insülinin etkisini inhibe eden adrenokortikotropik hormon sentezlemeleri nedeniyle bu yaklaşımın diyabet tedavisinde ileri zamanlarda kullanımı uygun görülmemiştir.

Viral vektörleri içeren deneysel ilk insülin gen nakli denemeleri yaklaşık 20 yıl önce yapılmıştır. Sıçan preproinsülin 1 cDNA kodlayan moleney murine leukemia virus (MMLV) tabanlı retroviral vektörün kısmi hepatotektomi yapılmış (%70) sıçan karaciğerine intraportal nakli, %5-10 karaciğer transdüksiyonuna sebebiyet vererek 6 ay boyunca insülin gen sentezi sağlamıştır (Kolodka ve ark., 1995). Bu yöntemde hepatik insülin gen sentezi oldukça az olsa da, gen nakliyle açlık hiperglisemisi, glukojen yıkımı, trigliserid depozisyonu, ketoasidozis ve streptozotosin (STZ)-indüklü diyabetik ölümler hipoglisemiye sebebiyet verilmeden önlenebilmiştir. Ancak karaciğerde sentezlenen insülin, bu organda proinsülini işleyen bir mekanizmanın olmaması sebebiyle daha az aktivite göstermiştir. Ayrıca, PC2 ve PC3 kodlayan adenovirusların karaciğere verilmesi kas hücrelerinde gözlemlenen verilerin tersine karaciğerde etkin proinsülin kırılımına sebebiyet verememiştir (Auricchio ve ark., 2002). Bu durum, PC2 ve PC3 enzim aktivitelerinin karaciğerdeki daimi sekretuar yollarda mevcut proteazlar tarafından baskılanmış olmasından kaynaklanabileceğini düşündürmüştür. Prohormonların aktif formlarına dönüşümünü sağlayan konvertaz enzimlerinden yoksun hepatositlerin aksine, akciğer dokusu prohormon konvertazları doğal olarak sentezleyen bol miktarda nöroendokrin sekretuar hücrelere sahiptir. Bu vesileyle cytomegalovirus (CMV) promotorlu sıçan insülin geninin lipozom aracılı gen nakli metoduyla akciğer hücrelerine verilmesi, alveolar epitelyal hücrelerinde belirgin düzeyde insülin gen sentezi ve

sekresyonu sağlanarak, STZ-indüklü diyabetik farelerde hiperglisemi ve ketoasidozu önleyebilmiştir (Tanaka ve ark., 2004).

Daimi sekretuar yolları aktif olan hücreler; sekretuar peptidleri fürin endopeptidazlar aracılığıyla spesifik amino asitlerinden kırarlar (Vollenweider ve ark., 1995). Bu sebeble, insülin molekülünün BC ve CA birleşim yerlerine yerleştirilen dibazik amino asit sekansları (Arg-X-Lys-Arg) fürin endopeptidazlar tarafından proinsülinin işlenmiş olgun insüline dönüşmesini sağlar (Şekil 2.3). Örneğin, fürin tanıma bölgesi içeren insan insülin cDNA'sıyla geçici olarak transfekte edilen HEK293 ve myoblast hücre hatlarında biyolojik olarak aktif insülin oluşturulması; proinsülinin posttranslasyonel olarak başarılı bir şekilde işlendiğini gösterdi (Groskreutz ve ark., 1994; Simonson ve ark., 1996). Bu bağlamda, rekombinant adenovirus aracılı PC2 veya PC3 aşırı sentezinin sıçan insülinoma hücrelerinde proinsülinin insüline dönüştürmesini kolaylaştırması bu sonuçları destekler niteliktedir (Irminger ve ark., 1996). Hepatositlerin sürekli proinsülin sentezleyerek bunları işlenmiş insüline dönüştürebildiklerini göstermek için H4-II-E hepatosit hücre hattı, dibazik prohormon konvertaz tanıma bölgesinin tetra bazik fürin kesim bölgesine dönüştürüldüğü insan proinsülin cDNA'sı taşıyan replikasyon özüllü adenoviruslarla enfekte edildi (Short ve ark., 1998). Bu viral vektörün farelere enjeksiyonu başlıca karaciğerde insülin gen sentezine yol açarak geçici de olsa diyabet gelişimini durdurdu. Benzer şekilde insan elongasyon faktör 1-alfa (EF1-alpha) promotoruna takılı rat preproinsülin geni taşıyan adenovirusların STZ-indüklü diyabetik sıçanların karaciğerine enjeksiyonu diyabetik hayvanlarda plazma glukagon ve glukoz seviyelerini bariz bir biçimde düşürdü (Dong ve Woo, 2001). Ancak, gen nakli yapılan hayvanlar aç bırakıldıklarında sürekli insülin gen sentezine bağlı olarak bu hayvanların tümünde ciddi düzeyde bir hipoglisemi geliştiği de raporlandı.



Şekil 2.3. İnsan proinsülin kodlayan peptidler. Üstteki peptid yalnızca beta hücrelerinde, barsak K, L hücreleri ve bazı endokrin hücrelerde sentezlenen prohormon konvertazlar (PC) tarafından kırılabilen insan proinsülin sekansını içerir. Altteki peptid ise tetrabazik fürin endopeptidaz kesim bölgelerini içeren sonradan değiştirilmiş insan proinsülin sekansını temsil eder.

Birinci ve ikinci jenerasyon adenoviruslara oranla Adeno Assosiyé Virus (AAV) vektörler çok daha uzun süreli transgen sentezi sağladığından; uzun süreli AAV aracılı insülin gen naklinin etkinliği, CMV promotorlu fûrin tanımalı insan insülin geni taşıyan rAAV vektörler kullanılarak test edildi (Park ve ark., 2005). AAV'nin portal venaya enjeksiyonu STZ indüklü diyabetik sıçanlarda 90 günün üzerinde bir normoglisemi sağladı. Bunlara ilave olarak sürekli insülin sentezinin HbA1c seviyesini düşürerek glukoz toleransını da geliştirdiği bildirildi. Ancak kontrolsüz insülin gen sentezi, tıpkı gen nakliyle insan insülin salınımı yaptırılan fibroblastlarının implantasyon çalışmasında gösterildiği gibi ciddi hipoglisemi geliştirme riski taşır (Falqui ve ark., 1999). Bunu önlemenin bir yolu, insülin gen naklini glukoz kontrollü hücreye özgün promotorlar kullanarak gerçekleştirmektir. Bu durumda, CMV promotorlu daimi insülin gen sentezi deneklerde hipoglisemiden dolayı ölümlere sebebiyet verirken, glukoz kontrollü-karaciğere özgün promotor kullanımının deneklerde yalnızca hafif hipoglisemi oluşturması beklenir. Nitekim, glukozun pankreatik beta hücrelerinde ve hepatositlerde pek çok genin sentezini kontrol etmesi, onu insülin gen sentezinde etkili olabilecek aday (regülatör) moleküllerden biri yapar. Zaten, beta hücreleri ve hepatositler bu hücrelerin farklı kan şeker düzeylerine yanıt vermelerini sağlayan GLUT2 ve GK aktivitelerine de sahiptir. Bunların dışında, glukagon ve siklik AMP

(cAMP) moleküllerinin karaciğerde fosfoenolpiruvat karboksilaz (PEPCK) promotor aktivitesini indüklerken, insülinin PEPCK promotor aktivitesini baskılaması; PEPCK promotorlu fûrin kesim bölgesi içeren proinsülinin, hepatositlerde glukoz kontrollü insülin gen sentezini sağlamak amacıyla kullanılabileceğini göstermiştir. Sonuçta, bu şekilde tasarlanan genin rekombinant adenovirus aracılı sıçan primer hepatosit kültür hücrelerine nakli bu hücrelerde işlenmiş (olgun) insan insülin üretimini sağlamıştır (Lu ve ark., 1998).

Bunların dışında karaciğer hedefli insülin gen nakli çalışmalarında HNF-1, C/EBP ve GIRE DNA elementlerinin kombinasyonlarını içeren yapay promotorların kullanılması, STZ indüklü diyabetik NOD-SCID farelerde glukoz toleransı oluşturarak hipergliseminin düzelmesini sağlamıştır (Han ve ark., 2011). Ancak glukoz tolerans testlerinde normogliseminin sağlanmasında bir gecikme yaşanması, negatif regülatör cevabın yeterli düzeyde sağlanabilmesi için vektör tasarımının daha da iyileştirilmesi gerektiğini göstermiştir. Diğer bir çalışmada PEPCK ve L-PK promotorlarına alternatif olarak kullanılan üzerinde S14 glukoz yanıt elementi (GIRE) taşıyan karaciğere özgün albumin promotorlu fûrin kesim bölgesi insülin geninin adenovirus aracılı olarak karaciğere nakledilmesi; deneklerin açlık kan şekerinde bir düzelmeye sebebiyet vermesine karşın, insülin sentez ve salınımındaki uzun gecikme sebebiyle tokluk hiperglisemisini düzeltemediği bildirilmiştir (Alam ve Sollinger, 2002). Karaciğerde aktif olup ancak insülinle baskılanabilen glukoz yanıtı yeni bir promotor oluşturabilmek için L-PK geninin karbonhidrat regülatör elementlerinin, insülin benzeri büyüme faktörü protein-1 (rIGFBP-1) bazal promotoru önüne yerleştirildiği adenovirus aracılı gen naklini konu alan diğer bir çalışmada; diyabetik sıçanların hem glukoz toleransının ve hem de insülin duyarlılığının artırıldığı, adipokin profilinin de düzeltildiği bildirilmiştir (Thule ve ark., 2006).

Bilindiği üzere, glukoz 6 fosfatın glukozla dönüşümünü katalize eden glukoz 6 fosfataz (G6Ptaz) enzimi aynı zamanda karaciğerden glukoz salınımına sebebiyet veren enzimdir. Diyabet hastalarında karaciğerden aşırı glukoz salınımına sebebiyet vererek açlık hiperglisemisine neden olan G6P'taz geninin promotoru sıçan hepatosit hücre hatlarında insülin gen sentezini yönlendirebilmek amacıyla denendi (Argaud ve ark., 1996). Diyabetik şartlarda oldukça aktif olan ancak insülin tarafından baskılanan G6Ptaz promotorlu insan insülin geninin adenovirus aracılı nakli, insülinin baskılayıcı etkisinden

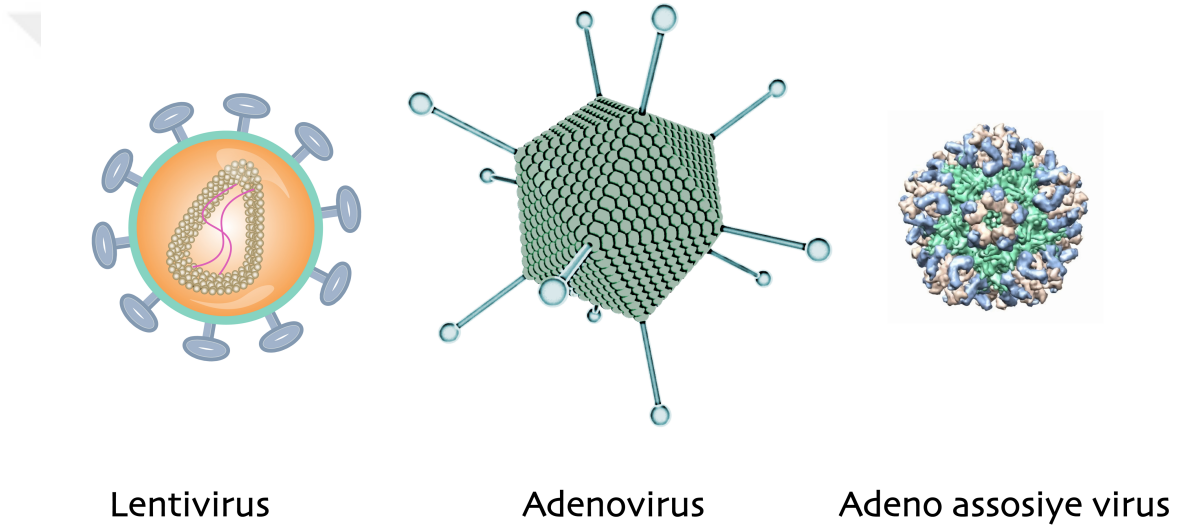
dolayı karaciğerde oldukça düşük insülin gen sentezine sebebiyet verdi (Chen ve ark., 2000). Bu sebeble G6P'taz promotora aldolaz B geninin intronik enhansırları eklenerek oluşturulan hibrit promotorun kullanıldığı diğer bir çalışmada, insülin geninin adenovirus aracılı gen nakli STZ indüklü diyabetik sıçanlarda açlık hipoglisemisine yol açmadan tokluk hiperglisemisini düşürdüğü bildirildi (Chen ve ark., 2000).

Buna karşın, duodenum ve jejunumda bulunan K hücrelerinin, aynen beta hücrelerindeki gibi GK, GLUT2, ve prohormon konvertaz sentez etmeleri dolayısıyla, glukoz kontrollü insülin sentezi ve sekresyonu için ideal hedef hücreler olduğu düşünülmektedir (Dong ve Woo, 2001). K hücrelerine spesifik promotorlar aracılığıyla insan proinsülin gen sentezinin sağlandığı transgenik hayvanların STZ uygulamasına dirençli olması, bu deneklerde beta hücrelerinin yokluğuna rağmen glukoz homeostazının başarılı bir şekilde kontrol edilebileceğini göstermiştir (Cheung ve ark., 2000; Corbett, 2001). Ancak, intestinal epitel hücrelerinin hızlı devinimi dolayısıyla, uzun süreli gen sentezini gerçekleştirebilmek için K hücre progenitör hücreleri hedef alınmalıdır. İntestinal epitel hücre popülasyonunun sadece %1 kadarının enteroendokrin hücrelerden oluşması nedeniyle insülin üretimi için hedeflenebilecek enteroendokrin hücreler henüz izole edilememiş ve tanımlanamamıştır. Bununla beraber, viral vektörlerin kullanıldığı çalışmalarda bu engelin aşılabilmesi yolunda umut verici öncül sonuçlar elde edilmiştir. Örneğin, rAAV2 vektörü, in vitro ortamda enteroendokrin L-hücrelerini (NCI-H716) başarılı bir şekilde transdüksiyona uğratmış ve genetik yapılarını değiştirmiştir. Bu hücreler, bir ko-kültür ortamında çok sayıda enterositin varlığına rağmen (Caco-2 or T84) kontrol edilebilir insülin cevabı sergilemiştir (Tang ve Sambanis, 2004). İnsan insülin geninin kitosan nanopartikülleri içinde lavaj yoluyla gastrointestinal hücrelerine aktarılmasının STZ ile indüklenen diyabetik ratların açlık kan şekerini düşürmesi, bu bulguları destekler niteliktedir (Niu ve ark., 2008).

2.3. Pankreatik Beta Hücrelerine Gen Naklinde Uygulanan Yöntemler

Son zamanlarda diyabette gen terapi yaklaşımları genel olarak, transplantasyon için pankreatik adacıkların ex vivo modifikasyonuna yönelmektedir (Dirice ve ark., 2009). Bunun dışında, beta hücre farklılaşmasını veya insülin gen ekspresyonunu indüklemek amacıyla, ilgili terapötik genin ekspresyonu için genelde karaciğer ve kas dokusu gibi

pankreatik olmayan dokular, hedef organ olarak seçilmiştir (A. D. Sanlioglu, Altunbas, ve ark., 2012). Bununla birlikte pankreatik beta hücrelerine gen transferinde uygulanabilecek birkaç strateji vardır. Lipofeksiyon ve elektroporasyon gibi viral olmayan vektör aktarım sistemlerinde, pankreatik adacıklarda düşük seviyede gen nakil başarısı gözlenirken, viral vektörler kullanıldığında adacıklara oldukça etkin şekilde gen nakli gerçekleştiği belirlenmiştir (Şekil 2.4) (Mahato ve ark., 2003; Ahter Dilsad Sanlioglu ve ark., 2008).



Şekil 2.4. Gen tedavi klinik denemelerinde başarıyla kullanılan viral vektörler.

Adenoviral vektörler, yüksek titrelerde üretilip oldukça iyi transdüksiyon etkinliği gösterirlerken, adacıklardaki endokrin hücrelerin kümelenmiş yapısı dolayısıyla, pankreatik adacıkların iç kısmındaki hücrelere adenovirus aracılı gen aktarımında zorluklar yaşanmaktadır (Leibowitz ve ark., 1999; Dirice ve ark., 2009). Buna ilaveten, pankreatik adacıklara ortak safra kanalından uygulanan adenovirus vektör aracılı in vivo gen transferi işlemleri ile sınırlı ölçüde gen aktarımı sağlandığı bildirilmiştir ((Raper ve DeMatteo, 1996; Taniguchi ve ark., 2003). Ancak, adenovirus vektörlerine karşı konakçının immün yanıtı sonucu oluşan pankreatit dolayısıyla kalıcı gen ekspresyonunun sağlanması zaten mümkün olamamıştır. Hepatik dolaşımın blokajı sonrası gerçekleştirilen sistemik adenovirus enjeksiyonuyla da pankreatik beta hücrelerinin transdüksiyona uğradığı saptanmıştır (Ayuso ve ark., 2004; Ayuso ve ark., 2006). Bunun yanısıra hepatik

arter, portal ven ve dalak arterinin ligasyonu sonrasında çölyak arterine enjeksiyonun fare pankreatik adacıklarının yüksek düzeyde ve etkin biçimde transdüksiyonunu sağladığı ileri sürülmüştür (Mukai ve ark., 2007).

Pankreas beta hücrelerini transdüksiyona uğratabilen vektörler arasında AAV vektörü de vardır (Şekil 2.4). Ancak pankreasa ssAAV'nin direkt enjeksiyonu ile, terapötik etki gösterecek kadar yeterli pankreatik adacık transdüksiyonu gerçekleştirilememiştir (A. Y. Wang ve ark., 2004). Diğer yandan, dsAAV vektörleri, ssAAV vektörlerine kıyasla daha yüksek transdüksiyon etkinliğine sahiptir. C57BL10 farelerin pankreatik adacıklarında, uzun süreli ve güçlü bir gen ekspresyonu sağlamak amacıyla, dsAAV vektörleri kullanılarak üç farklı aktarım yolu (intraperitoneal, intraduktal ve intravenöz) etkinlik açısından birbirleriyle karşılaştırılmıştır (Z. Wang ve ark., 2006). İntravenöz olarak aktarılan dsAAV vektörlerinin birçoğu karaciğer tarafından süzüldüğünden, bu aktarım yönteminde intraperitoneal enjeksiyonla yapılan aktarıma göre 5-10 kat daha az pankreatik transdüksiyon etkinliği gözlenmiştir. Buna rağmen, viral partiküllerin adacık içerisine difüzyonunda kısıtlamalar sebebiyle, intraperitoneal enjeksiyon ile yapılan aktarımda bile, merkezdeki hücrelere kıyasla adacığın periferel bölgesindeki hücrelerin primer olarak transdüksiyona uğradığı belirlenmiştir. İlginç bir şekilde, endoskopik retrograd kolanjiyopankreatografi olarak bilinen klinik tekniğe benzer bir yöntem olan retrograd pankreatik intraduktal aktarım stratejisi ile, intraperitoneal ve intravenöz aktarıma kıyasla pankreasta daha yüksek transdüksiyon etkinliği sağlanmıştır. Bu tekniğin fareler gibi küçük hayvanlarda uygulanması oldukça zor olduğundan, retrograd pankreatik intraduktal gen aktarım yönteminin intraperitoneal enjeksiyona kıyasla klinik uyumluluk ve fizibilite açısından değerlendirilebilmesi için deneysel testlerde sıçanların kullanılması daha iyi bir seçenek olacağı ileri sürülmüştür. Son olarak, pankreatik adacıklara, karaciğer dolaşımının geçici blokajı sağlanarak, intravenöz dsAAV vektör gen aktarımının etkinliği, C57BL10 farelerde test edilmiştir (Z. Wang ve ark., 2006). dsAAV vektörler kullanılarak pankreatik adacıklara yapılan intravenöz gen aktarımında pankreatik adacıklarda eşdağılımlı transgen ekspresyonu sağlandığı belirlenmiştir.

AAV ve adenovirusların dışında, retroviruslara oranla lentiviral vektörlerin in vitro kültür ortamında pankreas beta hücrelerini daha iyi transdüksiyona uğrattıkları bildirilmiştir

(Şekil 2.4) (Giannoukakis ve ark., 1999; Leibowitz ve ark., 1999). Ayrıca lentiviral vektörlerle ex vivo ortamda transdüksiyona uğratılan pankreatik adacıkların in vivo transplantasyon sonrasında transgen ekspresyonunu uzun süre muhafaza ettikleri de gösterilmiştir (Gallichan ve ark., 1998). Veziküler Stomatit Virus G protein (VSV-G) psödotiplenirilmiş HIV tabanlı lentiviral vektörlerin murine lökemi virusu, Ebola, kuduz ve Mokola virus glikoproteinleri ile psödotiplenirilmiş lentiviral vektörlere oranla in vitro kültür ortamda insan adacıklarına daha iyi gen nakli yapabildikleri belirlenmiştir (Kobinger ve ark., 2004). Bunlara ek olarak, ex vivo lentivirus transdüksiyonunun pankreatik adacıkların yapısına ve fonksiyonuna zarar vermediği de saptanmıştır (He ve ark., 2006). Tüm bunlara rağmen pankreas adacıklarını hedefleyen lentivirus aracılı in vivo deneysel gen nakil çalışmaları adenoviruslar ve AAV vektörlerinde yapıldığı gibi henüz denenmemiş olup, bu deneylerin bir an önce başlatılması gerekmektedir.

2.4 Virus Aracılı İnsülin Gen Nakli Stratejisi

İnsülin gen tedavisinin esas amacı; hücreleri genetik olarak manipüle ederek insülinin sentezlenmesini, depolanmasını ve sekresyonunu sağlamak olsa da, mevzu bahis insülin gen transfer sistemi; tedavinin başarısını arttıracak bir takım anahtar özelliklere de sahip olmalıdır. İlk olarak sistem hedef organa etkin bir biçimde gen aktarımı yapabilmelidir. İkincisi, hedef organ GLUT2 ve GK gibi glukoz duyarlılık sistemini içermeli ve proinsülini insüline dönüştüren gerekli biyokimyasal enzimleri (prohormon konvertazları) içinde barındırmalıdır. Üçüncüsü, hedef hücreler depolama özelliğinin yanında glukoz ile regüle edilebilir sekretuar bir yolağa sahip olmalıdır. Dördüncüsü ve en sonuncusu da, insülin transgeninin transkripsiyonu hiperglisemiyle başlamalı ve hipoglisemiyle sonlandırılmalıdır. Etkili bir gen transfer metodu için gerekli şartlar düşünüldüğünde, insülin gen transfer denemelerinde hem viral hem de viral olmayan gen nakil metodlarının test edildiğini görmekteyiz.

Plazmid gibi viral olmayan vektörler viral vektörlere oranla çok daha düşük immünojenik yanıt oluşturmaları sebebiyle daha az yan etkilere sahip olmalarına rağmen, terapötik etkinliğin devamı için tekrarlayan uygulamalar gerektirir. Viral vektörlerin (Şekil 2.4) viral olmayan vektörlere oranla gen transfer etkinlikleri tartışmasız çok daha yüksektir (Wong ve ark., 2010). Bunlar arasında Adeno Associated Virus (AAV) en popüler

vektörler arasında yer almaktadır. Özellikle yüksek dozlarda oldukça immünojenik ve toksik olan ilk jenerasyon adenoviruslara oranla AAV toksisiteye sebebiyet vermeden uzun süreli gen sentezi sağlama açısından yararlıdır (S. Sanlioglu ve ark., 2001; Doerschug ve ark., 2002). Ancak rekombinant AAV (rAAV), yabani tip AAV gibi kendini 19. insan kromozomundaki spesifik bir bölgeye entegre edebilen bölgeye özgü integrasyon özelliğinden yoksundur (S. Sanlioglu ve ark., 1999; S. Sanlioglu ve Engelhardt, 1999). Ayrıca 4.7 kb' den daha büyük transgenleri taşıma özelliğine sahip değildir (S. Sanlioglu, Benson, & Engelhardt, 2000; S. Sanlioglu, Benson, Yang, ve ark., 2000). rAAV'nin karaciğer transdüksiyon etkinliği oldukça düşük olduğundan, rAAV aracılı insülin gen naklinin karaciğerdeki etkinliğini arttıran pek çok farklı yöntemler denenmiştir. Örneğin, kalsiyum fostat veya polietilenimin (PEİ) ajanlarının rAAV vektörleriyle karışımı rAAV aracılı insülin gen naklinin karaciğerdeki etkinliğini arttırmasına rağmen, bu ajanlar membran hasarına yol açarak hücrelerde apoptozise sebebiyet verdikleri belirlenmiştir (Yang ve Chao, 2003; Hsu ve Yang, 2005). Ayrıca rAAV tarafından kodlanan transgenler vücuda verilmiş yoluna bağlı olarak immünojenik olabilirler (Brockstedt ve ark., 1999). Bu sebeple tedavi etkinliğini kısıtlayacak AAV vektörlerine karşı gelişebilecek immün yanıtı kontrol altına alabilmek için hastaların ayrıca immün baskılayıcı ilaç kullanmaları da gerekebilir. Diğer taraftan yardımcı bağımlı ya da gutless adenoviruslar olarak bilinen 4. jenerasyon adenoviruslar üzerlerinde hiçbir viral gen taşımadıkları için antijenik özellikleri düşük olup büyük genleri üzerlerinde rahatlıkla taşıyacak kapasiteye sahiptirler (Palmer ve Ng, 2005). Bu vektörlerin in vivo transdüksiyon etkinlikleri oldukça iyi olup, uzun süreli transgen sentezi yapabilirler. Ancak yüksek dozda (titrede) üretilmemeleri ve üretilmelerinin oldukça zor olması bu vektörlerin klinik kullanımlarını kısıtlayacak niteliktedir.

Mevcut viral vektörler arasında güvenlik, etkinlik ve uzun süreli gen sentezi düşünüldüğünde lentiviral vektörler en uygun gen nakil araçları gibi görünmektedir (H. M. Tasyurek, Altunbas, ve ark., 2018a; H. M. Tasyurek, Altunbas, ve ark., 2018b). Sadece bölünen hücreleri enfekte edebilen ve kanser oluşturma potansiyeli olan retroviruslara oranla hem bölünen hem de bölünmeyen hücreleri enfekte edebilme özellikleri ve güvenli olmaları nedeniyle lentiviruslar aslında bir tercih sebebidir (Zhang ve ark., 2001). Lentivirus aracılı insülin gen nakli çalışmaları henüz başlangıç aşamasındadır. Örneğin,

CMV promotorlu f rin kesim bölgeli insan insülin geni taşıyan lentivirusların terapötik etkinliği otoimmün diyabetik ve STZ-diyabetik ratlarda test edilmiştir (Elsner ve ark., 2012). Düşük doz lentivirus uygulanan hayvanlarda bir yıl kadar normogliseminin sağlanması, somatik gen nakli yoluyla endokrin olmayan hücrelerden (karaciğer) salınan insülinin diyabeti geri d n   t rebileceğine işaret etmektedir. Insülin gen naklinde kaydedilen bu gelişmeler en azından bu yöntemin hastaların basal insülin ihtiya ını uzun süre karşılayabilecek düzeye geldiğini göstermektedir. Bu çalışmada olduğu gibi furin kesim bölgeleri kullanarak beta h creesi olmayan hücrelerde (karaciğer) proinsülinin insüline d n   t r lmesi ba arılsa da, insülin gen sentezini ve sekresyonunu gün içerisinde sürekli değişen metabolik ihtiya a göre ayarlayabilmek halen ba lı başına halledilmesi gereken en önemli sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. Ayrıca bu çalışmada olduğu gibi insülin gen sentezi için CMV gibi sürekli aktif viral orijinli promotorlar kullanmak deneklerde insüline bağlı hipoglisemi riskini ciddi düzeyde arttıracaktır. Nitekim söz konusu çalışmada insülin sentezi için seçilen hedef organ karaciğer olduğundan pankreas beta hücrelerine yönelik bir hedefleme de söz konusu olmamıştır.

Proinsülinin kontrollü transkripsiyonu ve translasyonu, regüle edilebilir bir sekretuar yol ve endüktif sekresyon, pankreatik beta hücrelerinin belirgin en temel özelliklerindendir ( ekil 2.5) (H. M. Tasyurek, Altunbas, Balci, ve ark., 2014). Hepatositlerde GK ve GLUT2'den oluşan bir glukoz algılama mekanizması bulunsa da, bu hücrelerde regüle edilebilir sekretuar bir yolak bulunmamaktadır. Buna ek olarak, nöro-endokrin hücrelerin sekretuar granüllerde insülin depolama yeteneği ve regüle edilebilir bir sekretuar yolağı olmasına rağmen glukoz algılama mekanizmalarından yoksundurlar. Bu nedenle, ne hepatositler ne de nöroendokrin hücreler, beta hücrelerinin yerine geçebilecek onların fonksiyonlarını taklit edebilecek hücreler değillerdir. Ayrıca, beta h creesi yerine geçebilecek hücrenin ideal olarak, glukoz varlığında postprandial insülin sekresyon yanıtında önemli olan GLP-1 reseptörlerini sentez etmesi de beklenmektedir (M. H. Tasyurek, Altunbas, Canatan, ve ark., 2014). Bunun dışında, metabolik stres altında glukoz metabolizmasının PACAP ve VIP tarafından indüklenen metabolik yollar aracılığıyla kontrolü için nöronal bir girdi de gereklidir (A. D. Sanlioglu, Karacay, ve ark., 2012). En önemlisi, insülinin, sitoplazmada mevcut olan sekretuar granüllerin boşaltılması ile, beta

aktivasyona bağlı insülin sekresyonu, dakikalar değil saatler sonra gerçekleşmektedir. İnsülin, salınmadan önce beta hücreleri içindeki sekretuar granüllerde depolandığından, gen aktarımı yoluyla fizyolojik olarak kontrol edilen insülin üretiminin başarılması için, bu granüllerden insülin sekresyonunun regölasyonu da gereklidir. Dolayısıyla, insülin sekresyonunun direkt kontrolü, transkripsiyonel yolla kan glukozunun kontrolünden daha hızlı bir ayar sağlar (Rivera ve ark., 2000). Bu da şu an için başlıca pankreas beta hücrelerinde var olan bir mekanizmadır.

Bunun dışında, preproinsülin mRNA'sının yarı ömrü, gerçek beta hücrelerinde 24 saat, beta hücrelerinin yerine geçme potansiyeli olan temsili hücrelerde ise 6 saat kadardır. Benzer şekilde transkripsiyonel inhibisyonla insülin sentezinin sonlandırılması yine oldukça yavaş gerçekleşen bir süreçtir. Her halükarda sinyalin sonlanmasını takiben insülin sekresyonunun da dakikalar içinde durması beklenmektedir. Preproinsülin mRNA'sının stabilitesi ve işlenmesinin kontrolünde beta hücrelerine spesifik faktörler rol aldığından, preproinsülin cDNA'sı kodlayan gen tedavi vektörleri, beta hücrelerinin yerine geçme potansiyeli olan temsili hücrelerde arzu edilen düzeyde regölator kontrolün gerçekleşebilmesi için yukarıda belirtilen tüm durumlar göz önüne alınarak dikkatlice tasarlanmalıdır.

Tüm bu durumlar göz önüne alındığında; insan insülin promotorlu (transkripsiyonel hedefleme) doğal proinsülin sekanslı lentiviral vektörlerin geliştirilmesi ve bu vektörle pankreas adacıklarına spesifik gen aktarımının test edilmesi projemizin ana özelliklerini oluştırdı.

Projemizin genel bilgiler kısmında açıkca belirtildiği gibi pankreatik adacıkların in vitro ortamda lentiviral vektörlerle transdükte edilebildiği gösterilse de, adenoviral vektörler ve AAV vektörleriyle yapıldığı gibi lentiviral vektörlerle in vivo pankreas dokusunu hedefleyen gen nakil çalışmaları henüz yapılmamıştır.

Gen aktarımı için hangi yöntemin seçileceği bir kenara bırakılırsa, insülin üreten pankreatik beta hücrelerine spesifik yüksek transgen ekspresyonu sağlamak ve özellikle pankreasın asiner hücrelerine transgen ekspresyonunu engellemek için insülin promotorunun kullanımı gereklidir. İnsan insülin promotorunun (HIP) transkripsiyon

faktörleri ile etkileşiminde glukoz düzeyinin anahtar rol oynadığı bilinmektedir. Bu sayede HIP kontrolündeki bir genin sentez seviyesi ortamdaki glukoz miktarına cevap olarak arttırılabilmekte ya da azaltılabilmektedir. 1980 yılında Bell ve arkadaşları tarafından insan insülin geni sekanslanmış ve promotor bölgesi de dahil olmak üzere bir plazmide kopyalanmıştır (Bell ve ark., 1980). Sonrasında birçok farklı grup tarafından yapılan çalışmalar insülin promotorunun fonksiyonel kısımlarının belirlenebilmesini sağlamıştır ve nitekim fonksiyonel insan insülin promotor dizisi S99616 erişim kodu ile NCBI veri tabanına kaydedilmiştir.

2.5. İnsülin Gen Tedavi Stratejisinin Terapötik Etkinliğini Ölçmek İçin Programlanabilir Nükleazlarla İnsülin Eksikliği Olan Beta Hücre Hattı Oluşturma

Yakın zamanda keşfedilen, doğada bakteriyel bir savunma sistemi olarak işlev gören RNA aracılı kümelenmiş düzgün aralıklı palindromik tekrar dizileri (CRISPR) ve CRISPR ilişkili protein 9 (Cas9) sistemi (CRISPR&Cas9) günümüzde en güncel gen modifikasyon yöntemlerinden biridir. Cas9 enzimi çeşitli değişikliklere uğratarak ve etkin bir dizi proteinlerle de füzyon edilerek birçok amaca yönelik olarak kullanılmaktadır. Cas9 enzimi, hedeflenen bölgeye gen insersiyonu/delesyonu, DNA düzeyinde gen susturma, rastlantısal mutasyon oluşturma gibi çalışmalarda doğal formunda, nükleaz aktivitesi giderilmiş formuna (dCas9) KRAB proteini bağlanarak DNA hasarına sebebiyet vermeden hedef genin geçici olarak baskılanması (CRISPRi) amacıyla, dCas9'a transkripsiyon aktive edici proteinler (VP64, p65, MS2, Rta, HSF2 gibi) çeşitli yaklaşım ve kombinasyonlarla (Suntag, VPR, SAM sistemleri gibi) bağlanarak gen aktivasyonu veya gen ekspresyon düzeylerinin arttırılması amacıyla (CRISPRa) sıklıkla kullanılmaktadır. Bunlara ek olarak son yıllarda baz düzenleme amacıyla baz düzenleyici proteinlerle, kromozom üzerinde ilgili bir bölgeyi gözlemleyebilmek amacıyla GFP gibi floresan proteinlerle birlikte kullanılmaktadır. Geliştirilen bir diğer sistem ile kromozomların nükleer organizasyonları, 3 boyutlu olarak geçişi ve indüklenebilir bir şekilde yeniden düzenlenebilmektedir (CRISPR GO)(EKŞİ ve ŞANLIOĞLU, 2019). Bu özellikleriyle CRISPR&Cas9 teknolojisi aracılı genom düzenlemesi, spesifik genotiplerin etkisini incelemek ve diyabetik sendromlara sebebiyet veren genetik değişimlere sahip hastalık modellerin geliştirilmesi noktasında da güçlü olanaklar sağlamaktadır.

Gimenez ve ark. CRISPRa teknolojisini kullanarak normal koşullarda promotor bölgesinde yüksek metilasyon nedeniyle insülin ekspresyonu bulunmayan HEK239T hücrelerinde 21 gün boyunca insülin ekspresyonu sağlamışlardır (Giménez ve ark., 2016). Aynı çalışmada tip 1 diyabetik hastalardan elde edilen fibroblast hücrelerinde de insülin ekspresyonu sağlanmıştır. Lin ve ark., CRISPR&Cas9 sistemini kullanarak insanlarda T1DM gelişimi ile yüksek oranda ilişkilendirilen protein fosfataz non-reseptör tip 22 (PTPN22) geninin bir allelik varyantını (PTPN22^{R620W}) NOD farelerde oluşturdular (Lin ve ark., 2016). Neticede PTPN22^{R620W} varyantını taşıyan NOD farelerde insüline karşı otoimmün antikor seviyelerinin yükseldiği ve T1DM penetransının arttığı gözlenmiştir (Lin ve ark., 2016). Bir diğer çalışmada Xu ve ark., β hücre metabolizmasında etkin EPAC2 geninin fonksiyonlarının anlaşılabilmesi için Min6 pankreatik hücre hatlarında Epac2 genini CRISPR&Cas9 sistemi ile nakavt ettiler. Epac2 nakavt hücrelerde hızlı cAMP oluşumu, hücre içi insülin miktarında artış ve bazal insülin salınımında yükselme tespit edilmiştir. Bununla beraber glukoz duyarlı insülin salınımının bozulduğu gözlenmiştir (Xu ve ark., 2018).

T1DM otoimmün aracılı pankreatik β hücrelerinin yıkımı ile karakterize olmakla beraber beta hücrelerinin tamamıyla yok olmadıkları bilinmektedir. Oluşturulan model organizmalar T1DM hastalık modeli olarak başarılı sonuçlar verse de virus aracılı insan insülin gen nakil vektörlerinin etkiliklerinin tam olarak anlaşılması konusunda yetersiz kalmaktadır. Bu noktada oluşturduğumuz insülin gen nakil vektörlerinin (LentiINS) etkinliğinin tam olarak incelenebilmesi için yalnızca insülin eksikliğine sahip bir pankreatik beta hücre geliştirilmesi gerekmektedir. Projemizde bu amaca yönelik olarak Min6 fare pankreatik beta hücre hattında insülin genini CRISPR&Cas9 sistemi ile nakavt hale getirip devamında, oluşturduğumuz insülin gen tedavi vektörleri ile bu hücrelerde insülin ekspresyonunu yeniden sağlayarak endojen insülin ekspresyonunun bulunmadığı bir durumda insülin gen tedavisinin etkinliğinin daha iyi anlaşılması da ek olarak hedeflenmiştir.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Lentiviral Vektörlerin Oluşturulması

3.1.1 Giriş Vektörlerinin Hazırlanması

İnsan İnsülin geninin açık okuma çerçevesini içeren plazmid (Invitrogen, IOH7334) Invitrogen ORF Klon kütüphanesinden temin edildi. İNS ORF plasmidlerinin izole edilmesinden sonra, insülin kodlayan geni taşıyan lentiviral vektörlerin oluşturulması amacıyla (LentiINS) Gateway Teknolojisi (Invitrogen) kullanıldı. İnsülin promotorlu proinsülin sekanslı lentiviral vektör oluşturmak için öncelikli olarak insan insülin plazmidinden (phins300, Prof. Dr. Graeme Bell'in hediyesi, University of Chicago, Chicago, Illinois 60637) insülin promotorunun polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile çoğaltılması ve pENTR 5'-TOPO vektörünün içerisine TOPO reaksiyonu ile klonlanması gerçekleştirildi (Şekil 3.1). Restriksiyon analizi sonrasında, promotor giriş yönünün doğrulanması için GW1 ve GW3 primerleri kullanılarak 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Perkin Elmer) cihazında sekanslama reaksiyonu gerçekleştirildi. Sonrasında pENTRins (insülin geni taşıyan giriş vektörü), pENTR5'İp (insülin promotoru taşıyan promotor giriş vektörü) ve pLentiİ6.4/R4R2/V5-DEST destinasyon vektörü "The ViraPower™ HiPerform™ Promoterless Gateway® Expression System" kiti kullanarak multisite gateway reaksiyonu gerçekleştirilerek insülin promotorlu insülin kodlayan ekspresyon plazmid vektörü oluşturuldu (pLentiINS) (Şekil 3.1.). Aynı yöntemle gen nakli uygulamalarında in vitro ve in vivo deneylerde lentiviral kontrol vektörü olarak beta galaktosidaz kodlayan LentiLacZ ekspresyon vektörü, LV-Lac plazmidi (Addgene plazmid 12108) kullanılarak elde edilmiştir. Lentiviral transfer plazmidlerindeki genlerin (klonların) varlığı ve oryantasyonu diagnostik restriksiyon enzim kesim analizleriyle, sekans dizileri de ABI Prism 310 Genetic Analyzer kullanılarak DNA sekans analizleriyle teyit edildi. İnsan insülin geni açık okuma çerçevesini içeren giriş vektör plazmidi (pENTRIns) (Invitrogen, Ultimatehorf Clone ID IOH7334) kanamisin dirençli bakteriler içerisine transforme edilmiş halde bakteri stoğu olarak tedarik edildi. İnsan insülin minimal promotor sekansı sentetik çift zincirli DNA olarak İDT firmasına (İowa City, İA, ABD) sentezlettirildi. Promotorun giriş vektörüne klonlanması için TOPO TA teknolojisi kullanıldı. Bu teknolojiye kullanılan vektörün attL4 ve attR1 bölgelerinin ucunda 3'

timidin nükleotidlerine Topoizomeraz-I enzimi bağlıdır. Tirozin nükleotidine enzim, fosfotirozil bağı aracılığıyla bağlanır. Ortamda Adenin nükleotidleri açıkta bulunan bir lineer DNA'nın varlığında; Adenin nükleotidleri ile Timin nükleotidlerinin bağlanması sonucu fosfotirozil bağı kırılır. Bu şekilde sentetik olarak sentezletirilmiş çift zincirli lineer DNA zincirinin giriş vektörüne klonlanması gerçekleşir. Bu doğrultuda TA klonlamaya uygun olacak şekilde, promotor sekansının iki ucuna serbest adenin nükleotidleri yerleştirilerek tasarlanan dizi 398 baz çifti uzunluğunda olup sekansı aşağıda verilmiştir.

hINS_Mini_Promoter sequence :

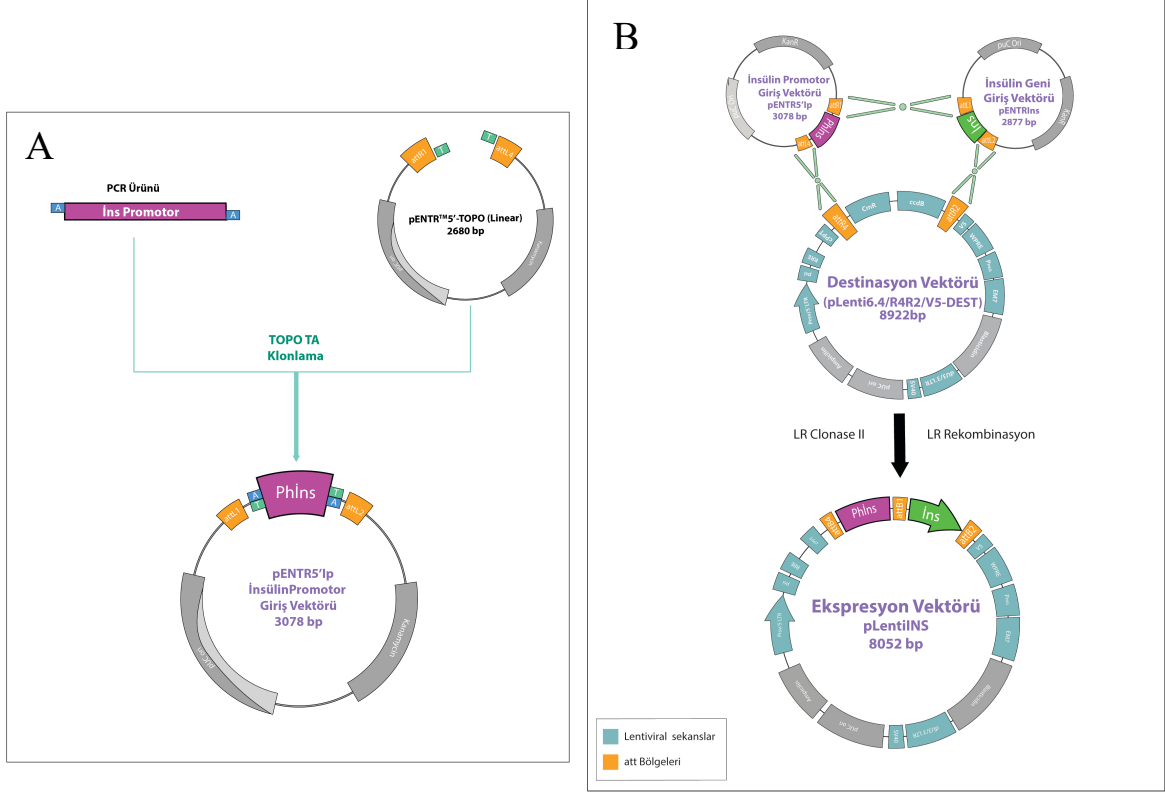
```
ACAGCAGCGCAAAGAGCCCCGCCCTGCTGCCTCCAGCTCTCCTGGTCTAATG
TGGAAAGTGGCCCAGGTGAGGGCTTTGCTCTCCTGGAGACATTTGCCCCCAG
CTGTGAGCAGGGACAGGTCTGGCCACCGGGCCCCTGGTTAAGACTCTAATG
ACCCGCTGGTCCTGAGGAAGAGGTGCTGACGACCAAGGAGATCTTCCCACA
GACCCAGCACCCAGGGAAATGGTCCGGAAATTGCAGCCTCAGCCCCCAGCCA
TCTGCCGACCCCCTTACCCCAGGCCCTAATGGGCCAGGCGGCAGGGGGTTGAC
AGGTAGGGGAGATGGGCTCTGAGACTATAAAGCCAGCGGGGGCCAGCAGC
CCTCAGCCCTCCAGGACAGGCTGCATCAGAAGAGGCCA
```

Liyofilize olarak tedarik edilen minimal insülin promotörü dizisi Tris-EDTA tamponunda sulandırıldıktan sonra dizinin 5' ve 3' uçlarına serbest adenin nükleotidlerinin eklenmesi için Taq polimeraz enzimi yardımıyla adenilasyon reaksiyonu kuruldu. Çift zincirli sentetik DNA üzerine, dATP, PZR tamponu, MgCl₂ ve Taq polimeraz eklenerek hazırlanan karışım 30 dakika süreyle 70 °C'de 9800 Fast Thermal Cycler cihazında inkübe edildi. İnkübasyon sonunda buz üzerine alınan reaksiyon pENTR 5'-TOPO-TA Cloning Kit (Invitrogen K591-20) yardımıyla giriş vektörüne klonlandı. Bu işlem sonrasında elde edilen giriş vektörleri (pENTR5'Ip) bakterilere transforme edildi ve kanamisin içeren LB besiyerinde üretildi. Bakteri stokları -80 °C'de saklandı. Elde edilen bakteri kolonilerinden yapılan plazmid izolasyonu sonrasında enzim kesim ve DNA dizilime reaksiyonları gerçekleştirildi.

İnsan insülin geni açık okuma çerçevesini kodlayan giriş vektörünü (pENTRIns) içeren bakteriler ve minimal insülin promotor sekansını kodlayan giriş vektörünü (pENTR5'Ip) içeren bakteriler ayrı ayrı sıvı besiyerinde üretildikten sonra Qiagen Plazmid Mega Kit (Qiagen, Cat.No: 12183) yardımıyla plazmid izolasyonu yapılarak giriş vektörleri elde edildi ve -20 °C'de saklandı (Şekil 3.1-A).

3.1.2. İnsan İnsülin Peptidi kodlayan Lentiviral Ekspresyon Plazmidinin Eldesi

Giriş vektörlerinin elde edilmesini takiben lentiviral ekspresyon vektörünün oluşturulması amacıyla Virapower Hiperform Promoterless Gateway Expression Kit (İnvitrogen, A11145) kullanıldı. Her iki giriş vektöründe klonlanacak gen bölgelerinin etrafında bulunan özel att bölgelerinin yardımıyla; minimal insülin promotor sekansı ve insülin gen açık okuma çerçevesi sekansı; vektöre lentiviral özellikler kazandıran esansiyel elementleri üzerinde taşıyan destinasyon vektörüne multi-site LR rekombinasyon reaksiyonu ile klonlandı. Bunun için giriş vektörleri (pENTRIns, pENTR5'Ip) ve destinasyon vektörü (pLENTİ6.4/R4R2/V5-DEST) LRClonase II Plus enzimi ile karıştırılarak 25 °C'de bir gece boyunca inkübe edildi (Şekil3.1-B). İnkübasyonu takiben proteinaz K eklenen karışım *E.coli* bakteri hücrelerine transforme edildi. Transformasyon sonrasında ampisilin pozitif agar petrilere yayma ekim yapılarak, petrilere bir gece süreyle 37 °C 'de inkübe edildi. Ertesi günü agar petrilere üzerinde üreyen bakteri kolonileri seçilerek mini kültürde çoğaltıldı ve donduruldu.



Şekil 3.1. Gateway teknolojisi ile İnsan insülin promotorlu lentiviral insülin ekspresyon vektörünün (pLentiINS) oluşturulması: (A)TOPO/TA klonlama reaksiyonu ile attL4 ve attR1 bölgelerinin ucunda Topoizomeraz-I enzimi ile bağlı olarak yerleşmiş halde bulunan 3' timidin nükleotidleri, PZR ürünü lineer minimal insülin promotor sekansında Taq polimeraz enziminin eklenmesiyle açığa çıkan Adenin nükleotidleri ile bağlanarak insülin promotor bölgesi içeren giriş vektörleri (pENTR5'Ip) oluşur, (B) Multisite Gateway teknolojisi kullanılarak insülin promotor kontrolü altında insülin geni kodlayan lentiviral ekspresyon vektörleri, LR Clonase II Plus enzimi varlığında attL4xattR4, attR1xattL1, attL2xattR2 rekombinasyon reaksiyonları ile insülin promotorlu (pENTR5'Ip) ve proinsülin sekanslı giriş vektörlerindeki (pENTRIns) genler destinasyon vektörüne aktararak pLentiINS ekspresyon vektörü elde edilmiş olur .

3.1.3. Lentiviral İnsülin Ekspresyon Vektörü ile Lentivirus Paketleme Plazmidlerinin Doğrulaması, Üretim Ve Saflaştırma İşlemleri

Çoğaltılan bakteri kolonilerinden doğru ekspresyon plazmidlerini içerenlerin bulunması için Qiagen Plasmid Mini Kit (Qiagen, Cat. No: 12125) ile yapılan plazmid izolasyonu sonrasında restriksiyon enzim kesimleri gerçekleştirildi. AflIII ve XhoI enzimleri ile yapılan ikili kesimde beklenen bantları veren kolonilerin konfirme edilmesi amacıyla DNA dizi analizi gerçekleştirildi. Bu amaçla, insülin promotor bölge içerisinden ve V5 epitopu içerisinden olmak üzere ileri ve geri primerler tasarlandı. Önce PZR reaksiyonu ile 881 baz çifti uzunluğunda kalıp DNA çoğaltıldı. Daha sonra BigDye Terminator v3.1

Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Cat No: 4337455) yardımıyla sekans reaksiyonu kuruldu. Dizi analizinde kullanılan ileri ve geri primer sekansları şu şekildedir:

İleri Primer: 5' ACA GCA GCG CAA AGA GCC 3'

Geri Primer: 5' ACC GAG GAG AGG GTT AGG GAT 3'

Doğru olduğu belirlenen kolonilerden büyük ölçekte bakteri üretimi yapılarak Qiagen Plasmid Mega Kit (Qiagen, Cat. No: 12183) yardımıyla plazmid izolasyonu yapıldı ve (LentiINS) ekspresyon vektörleri elde edildi.

Lentiviral partiküllerin oluşturulabilmesi için gerekli olan, gag/pol (pMDLg/pRRE (HIV-1 pGag-Pol 12251), rev (pRSV-Rev 12253) ve vsv-g (pMD2.G (pVSV-G 12259)) plazmidleri 3ml LB Broth Lennox (Merck) besiyeri içerisinde çoğaltılan bakteri kolonilerinden koloni doğrulama amacı ile QIAprep Spin Miniprep Kit kullanılarak izole edildi. Ardından Tablo 3.1'de belirtildiği şekilde her bir plazmidin enzim kesim reaksiyonu FastDigest Green Buffer (Thermo Fisher, Cat. Number: B72) kullanılarak gerçekleştirildi.

Tablo 3.1. Plazmid vektörler için kesim reaksiyonu bilgileri

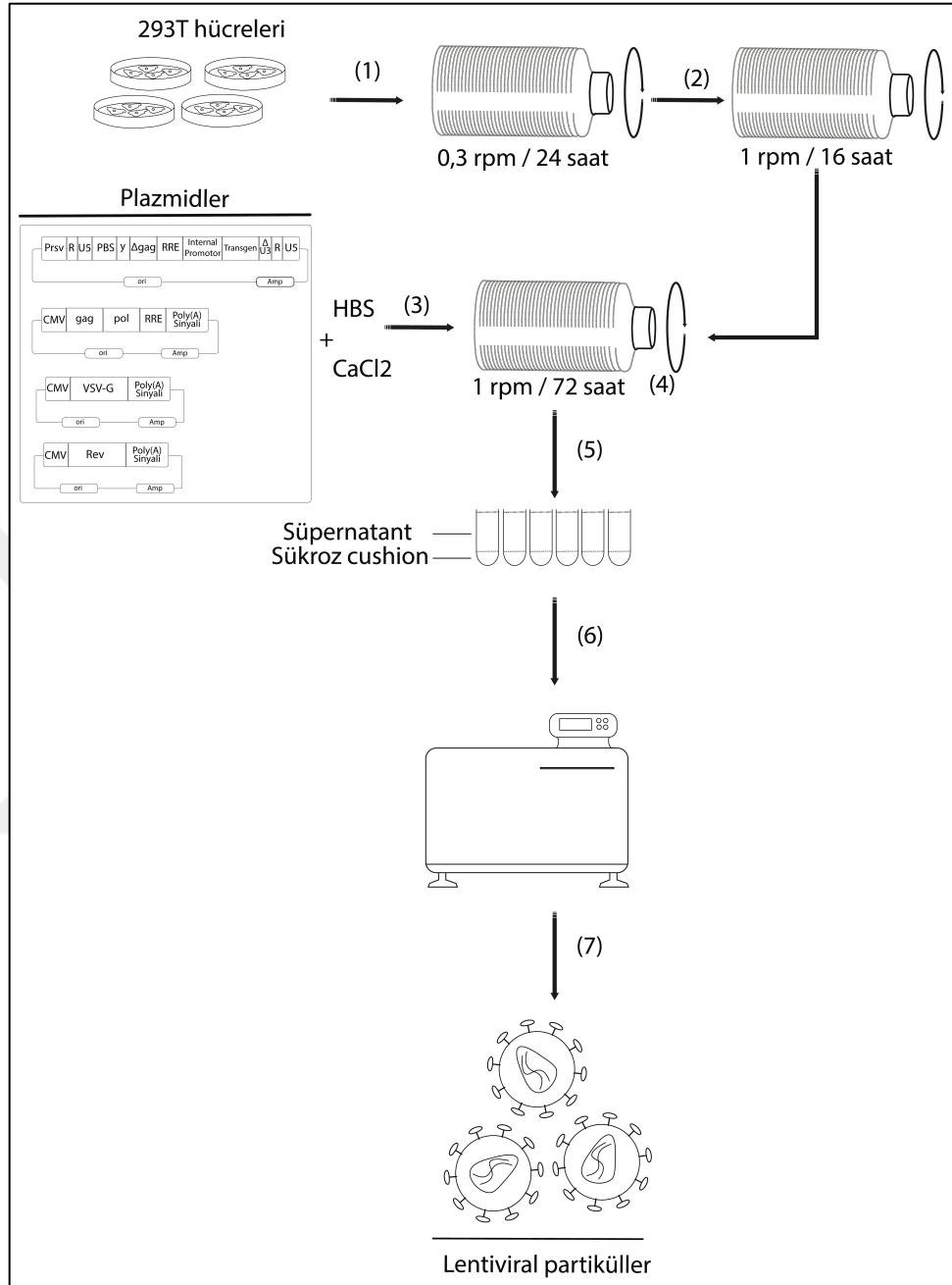
Plazmid	Plazmid büyüklüğü (bp)	Kullanılan kesim enzimi		Beklenen ürün (bp)
		Linearizasyon	Doğrulama	
LentiINS	8052	Yapılmadı	AflII&XhoI	3556, 2516, 1880
VSVG	5822	NotI	EcoRI	4154, 1668
Gag/pol	8890	AflII	EcoRI	4335, 4154, 401
Rev	4180	XhoI	AflII&XhoI	3556, 624

3.1.4. Lentivirusların Üretimi ve Titrasyonu

Lentiviral vektörlerin üretimi için, ilk olarak 293T hücreleri %10 FBS, %1 Pen+Strep içeren DMEM (4.5 g/L D-glucose, 4 mM L-glutamine, sodium pyruvate) besiyerinde, CellStar® T-175 cm² flaklarda (Cat No: 660175, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Germany) çoğaltıldı. Daha sonra hücreler, 1700 cm² yüzey alanına sahip tırtıklı dönen şişelere (Cell Master™ roller bottles Cat No: 681 062, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Germany), her birine 8x10⁷ 293T hücre olacak şekilde pasajlandı.

24 saat süreyle 0.3 rpm hızda döndürülerek şişe iç yüzeyine yapışması sağlanan 293T hücreleri, ek olarak 12-16 saat süreyle 1 rpm hızda HERAcell 240i CO₂ inkübatörde (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) inkübasyona bırakıldı. pLentiINS ekspresyon plazmidi, paketlenme plazmidleriyle belirli oranlarda karıştırıldıktan sonra dönen şişelerde üreyen 293T hücrelerine kalsiyum fosfat yöntemiyle DNA transfeksiyonu gerçekleştirildi. Transfeksiyondan 8 saat sonra besiyeri aspire edilerek, 200 ml %10 FBS, %1 Pen+Strep içeren hasat besiyeri (OPTI-MEM, Invitrogen) hücrelere eklenerek 2.5 gün süreyle 1 rpm'de, 37 °C, %5 CO₂'li inkübatörde lentiviral vektör üretiminin gerçekleşmesi sağlandı. Viral süpernatant, 2,000g'de 15 dakika süreyle yapılan santrifüj yardımıyla ve ardından 0.45 µm filtreden geçirilerek hücre debrisinden arındırıldı. Konsantre edilmemiş virus solüsyonu 6 farklı ultrasantrifüj tüpüne (polyallomer ultracentrifuge tubes, Beckman Coulter, Cat No.326823) her birine 30 ml olacak şekile dağıtılarak süroz gradient (cushion) yöntemi ile 25,000 rpm'de +4 °C'de 2 saat 30 dakika süreyle Beckman Coulter Optima L-90 K ultrasantrifüj cihazında ultrasantrifüje tabi tutuldu. Süpernatantların aspire edilmesinin ardından her bir tüpe 100 µl HBSS eklenerek tüplerin ağzı parafilmlelenerek bir gece süreyle +4 °C'de beklemeye bırakıldı. Ertesi gün pelletler pipetaj yardımıyla yeniden süspanse edilerek mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı. Bu işlemler Şekil 3.2'de şematik olarak belirtilmiştir. Viral stoklar 50-100 µl olarak alikotlandıktan sonra titrasyon öncesinde -80 °C'de muhafaza edildi.

Konsantre edilmiş lentivirus stokları, titrasyon öncesi -80 °C'de en az 24 saat süreyle saklandı. HT1080 hücreleri (ATCC® CCL-121™) 50,000 hücre/kuyu olacak şekilde transdüksiyondan bir gün önce 24 kuyulu petrilere ekildi. Lentiviral stokların çözdürülmesinden sonra HT1080 hücreleri, (6µg/ml) polybrene varlığında, artan miktarlarda (10⁻⁴, 10⁻², 1, 2, 4, 8 µl) lentivirus ile transdükte edildi. Transdüksiyondan bir gün sonra besiyeri 500 µl polybrene'siz DMEM ile değiştirildi. Lentivirus ile transdükte edilmiş HT1080 hücreleri 2 gün daha 37°C'de %5 CO₂'li inkübatörde inkübe edildi.



Şekil 3.2. Silindirik hücre kültürü şişelerinde Lentiviral Gen Tedavi Vektör Üretim Yönteminin akış diyagramı; 1)Hücre kültürü petrilerini kaplamış olan 293T/17 hücrelerinin silindirik hücre kültürü şişelerine ekim aşamasını ve hücrelerin yüzeye tutunabilmesi şişelerin 24 saat süreyle 0,3 rpm hızda dönme aşamasını 2) Yüzeye tutunan hücrelerin verimli lentiviral vektör üretimi için gereken hücre sayısına ulaşması için besiyeriyle daha fazla temasını sağlamak amacıyla şişelerin 16 saat süreyle 1 rpm hızda dönme aşamasını 3) Lentiviral vektör yapısını oluşturacak olan 4 farklı plazmidin HBS ve CaCl₂ kullanılarak biraraya getirilmesi aşamasını 4) Hazırlanan plazmid karışımının silindirik hücre kültürü şişelerine aktarım aşamasını ve lentiviral vektör partiküllerinin oluşması için 72 saat süreyle 1 rpm hızda döndürülme aşamasını 5) Viral vektör partikülleri içeren hücre süpernatantının ultrasantrifüj tüplerine aktarılarak süpernatantların altında sükroz tabakasının oluşturulma aşamasını 6) Hazırlanan tüplerin ultrasantrifüj cihazına yerleştirilerek saflaştırılma aşamasını 7) Ultrasantrifüj sonrası tüplerin dibine çöken lentiviral partiküllerin süpernatant kısmından uzaklaştırılarak elde edilmesi aşamasını ifade etmektedir.

Transdüksiyonun 3. gününde besiyeri uzaklaştırıldı ve 100 µl/kuyu liziz tamponu kuyulara eklendi. Lizatların 96 °C’de 2dk inkübe edilmesinin ardından örnekler 14,000 rpm’de 2 dk süreyle santrifüjlendi. Örnekler, reaksiyon kurulana kadar buz üzerinde bekletildi ve -20°C’de saklandı.

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

3.1.5. LentiINS Viral Vektörlerinin Ekspresyon Özelliklerinin Belirlenmesi

LentiINS vektörlerinden in vitro koşullarda insülin sentezlendiğini ve salındığını gösterebilmek için 293T insan böbrek ve beta hücre spesifik pankreas hücre (Min6 hücre hattı; Prof. Dr. Jun-ichi Miyazaki, M.D., Ph.D.’nin hediyesi, Yamadaoka, Suita, Osaka, Japonya) hatlarını kullanarak lentiviral vektörlerle transdüksiyon sonrası immünohistokimyasal deneyler ve ELİSA analizleri gerçekleştirildi. Bunun için hücreler 24 kuyulu petrilere her bir kuyuya 50,000 hücre olacak şekilde ekilip 24 saat 37 °C’de inkübe edildi. Daha sonra hücreler artan dozlarda lentivirus ile polybrene varlığında enfekte edilip besiyeri değiştirilmeden 24 saat inkübasyona bırakıldı. Transdüksiyondan yaklaşık 72 saat sonra, LentiINS vektörleriyle transdükte edilmiş hücrelerin süpernatantlarındaki insülin seviyeleri, enzim immünoassay kiti (Insülin Human ELİSA kit, Abcam, ab100578) yardımıyla belirlendi.

3.2 ELİSA Analizleri

İn vitro test için, LentiINS ile transdükte edilmiş Min6 hücreleri glukoz indüklenmesinin ardından insülin ELİSA testi gerçekleştirildi. Bunun için Min6 hücreleri 96 kuyulu petrilere her bir kuyuda 1×10^5 Min6 hücresi olacak şekilde ekildikten sonra bir gece

inkübe edildi. Daha sonra Min6 hücreleri artan MOI oranlarında (5, 25 ve 100) LentiINS ile polybrene varlığında transdükte edildi. Transdüksiyondan bir gün sonra besiyeri 250 µl polybrensiz DMEM ile değiştirilip bir hafta süreyle Min6 hücreleri 37°C, %5 CO₂'li ortamda inkübe edildi. Daha sonra süpernatantlar ELİSA analizlerinde kullanmak üzere toplanıp ve -20°C'de saklandı. Glukoz indüklü insülin salınım testini gerçekleştirmek için, lentivirus ile transdükte edilmiş Min6 hücreleri PBS ile yıkandıktan sonra glukozsuz Krebs Ringer Buffer'da (KRB) 5 dakika bekletildi. Sonrasında tüm kuyular 2.8 mM glukoz içeren KRB tamponunda 30 dakika 37 °C'de preinkübasyona bırakıldıktan sonra hücreler üzerindeki sıvılar uzaklaştırılıp hücreler glukozsuz KRB ile yıkandı. Daha sonra hücrelere 0, 2.8 veya 25 mM glukoz içeren farklı KRB tamponlarından 250 µl eklenip hücreler 1 saat süreyle 37 °C'de inkübe edildi. Süre sonunda süpernatantlar toplanıp -20 °C'de saklandı. Daha sonra bu süpernatantlarda salınan insülin miktarının tespiti için Ultra Sensitive Mouse insülin ELİSA kit (CrystalChem, Cat No: 90080) ile ELİSA gerçekleştirildi. Gen nakli yapılan deneklerdeki serum insülin seviyeleri de ELİSA ile ölçülerek (Abcam ab100578) diyabetik olmayan kontrol deneklerle karşılaştırıldı.

3.3. Düşük Doz Çoklu STZ İndüklü Tip 1 Diyabetik Hayvan Modeli Oluşturma ve Lentivirus Uygulamaları

8 haftalık 16 adet erkek Wistar sıçana 5 gün boyunca günlük 30mg/kg STZ sitrat tamponu içerisinde çözdürülerek 300 µl enjeksiyon hacmi ile intraperitoneal olarak uygulandı. Kan glukoz seviyeleri sıçanların kuyruk veninden alınan kanda AccuCheck Kompakt Glukometre (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) yardımıyla ölçüldü. AccuCheck Kompakt cihazının ölçüm aralığı 10-500 mg/dL olup, 500 mg/dL'den büyük olan her ölçüm 'Hi' göstergesi vermektedir. Bu sebeple 'Hi' olarak okunan değerler 500 mg/dL olarak kaydedildi. STZ enjeksiyonunu takiben, kan glukoz seviyeleri ve olası ağırlık kayıpları periyodik (STZ sonrası 3.gün, 5.gün, 7.gün, 10. gün ve sonrasında haftada 1 defa şeklinde) olarak ölçüldü, 5.gün sonunda 250 mg/dL değer üzerinde kan glukoz ölçümü veren sıçanlar diyabetik olarak değerlendirildi. Tokluk glukoz ölçümleri, sıçanların farklı saatlerde farklı beslenme alışkanlıkları dolayısıyla gerçekleştirebilecek değişikliklerin elimine edilmesi amacıyla, öğleden sonra ilk saatlerde sıçanların tamamen tok oldukları saatlerde yapıldı. STZ enjeksiyonundan sonra 5. günde diyabetik olduğu tespit edilen

erkek Wistar sıçanların bir grubuna LentiLacZ (n=8), diğer grubuna da LentiINS (n=8) vektörleri 10e10 TU dozunda intraperitoneal olarak enjekte edildi.

3.4. İmmünohistokimyasal Analizler

Hayvan sakrifikasyonları anestejik/analjezik (ketamin/ksilazin) uygulaması altında etik kurallara uyularak gerçekleştirildi. Çıkarılan pankreas, karaciğer, dalak ve böbrek dokuları ilk olarak %4'lük formaldehit çözeltisinde 24 saat fiksasyona bırakıldı. Süre sonunda 2 saat akan suyun altında fazlalık fiksatifin uzaklaştırılması gerçekleştirildi. Ardından dokular sırasıyla %70, %80 ve %90 alkol çözeltilerinde 24'er saat ve %100'lük saf etanolde 3 saat bekletildi. Son olarak 9 dakika ksilol içerisinde bekletildikten sonra parafin içerisine gömüldü. Mikrotom kullanılarak hayvanların parafine gömülü pankreas, dalak, karaciğer ve böbrek dokularından 4 µm kalınlığında seri kesitler elde edildi. Elde edilen dokularda insülin spesifik immünohistokimyasal boyamalar insülin monoklonal antikor (Santacruz İnsülin antibody 2D11-H5) kullanılarak gerçekleştirildi.

3.5. CRISPR/Cas9 Aracılı Fare İnsülin Genlerinin Min6 Hücre Hattında Nakavt Edilmesi

3.5.1. Plazmid Vektörler

Fare insülin genlerinin (İnsülin I-İnsülin II) susturulması (Knockout:KO) için gerekli CRISPR&Cas9 sistemine sahip plazmidler (nakavt plazmidler) ; İnsülin I CRISPR/Cas9 KO Plasmidi (m2) : sc-421139-KO, İnsülin II CRISPR/Cas9 KO Plasmidi (m2): sc-421140-KO ile İnsülin I ve İnsülin II gen bölgelerinde hedeflenen çift zincirli kırık noktalarına homoloji gösteren homolog rekombinasyon tamir plazmidleri (HDR plazmidler); İnsülin I HDR Plasmidi (m2) : sc-421139-HDR-2, İnsülin II HDR Plasmidi (m2) : sc-421140-HDR-2 Santa Cruz şirketinden temin edildi. Ayrıca üzerinde hedef gözetmeyen gRNA içeren CRISPR/Cas9 negatif kontrol plazmid (CRISPR/Cas9 Plasmidi: sc-418922) de Santa Cruz firmasından temin edildi.

Nakavt plazmidler, hedef gen bölgelerinde çift zincirli kırık oluşmasını sağlayacak cBH promotörü (chicken beta actin hybrid) kontrolünde Cas9 kodlayıcı dizi ile Cas9 enziminin ilgili bölgeye hedeflenmesini sağlayacak U6 promotörü kontrolünde tek gRNA (rehber (guide) RNA) dizilerine sahiptirler. Bunların yanı sıra seçim markırı olarak GFP (green

fluorescent protein) kodlayıcı dizisi 2A peptit dizisi yardımıyla cBH promotörü kontrolüne verilerek Cas9 enzimi ile GFP proteininin tek promotör ile eksprese edilmesi sağlanmış, bu sayede transfeksiyon etkinliğinin kontrolü ile beraber Cas9 enziminin ekspresyonunun kontrolü de mümkün hale getirilmiştir.

HDR plazmidleri Efl α promotörü kontrolünde koekspresyon gösteren transfeksiyon kontrolü olarak Red Fluorescent Protein (RFP) dizisi ve memeli hücreleri için seleksiyon markırı olarak Puromisin kodlayıcı dizi içermektedir.

3.5.2 Hücre Kültürü ve Transfeksiyon

Transfeksiyon için gerekli solusyonlar (Plasmid Transfection Medium: sc-108062 Transfection Reagent: sc-395739) Santa Cruz şirketinden temin edilerek üretici tarafından önerilen protokol (http://datasheets.scbt.com/protocols/CRISPR_protocol.pdf) ile Min6 hücrelerine (pasaj 32) transfekte edildi. Transfeksiyon aşamasında Min6 hücreleri;

1. Mock: Herhangi bir plazmid transfekte edilmeyen
2. CRISPR Kontrol: CRISPR Kontrol + HDR I-II; Hedef gözetmeyen gRNA içeren CRISPR plazmidi ile HDR plazmidlerin her ikisi aynı anda transfekte edilen
3. İns1KO: CRISPR KO İns I + İns I HDR; İnsülin I geni KO ve İnsülin I HDR plazmidleri transfekte edilen
4. İns2KO: CRISPR KO İns II + İns II HDR; İnsülin II geni KO ve İnsülin II HDR plazmidleri transfekte edilen

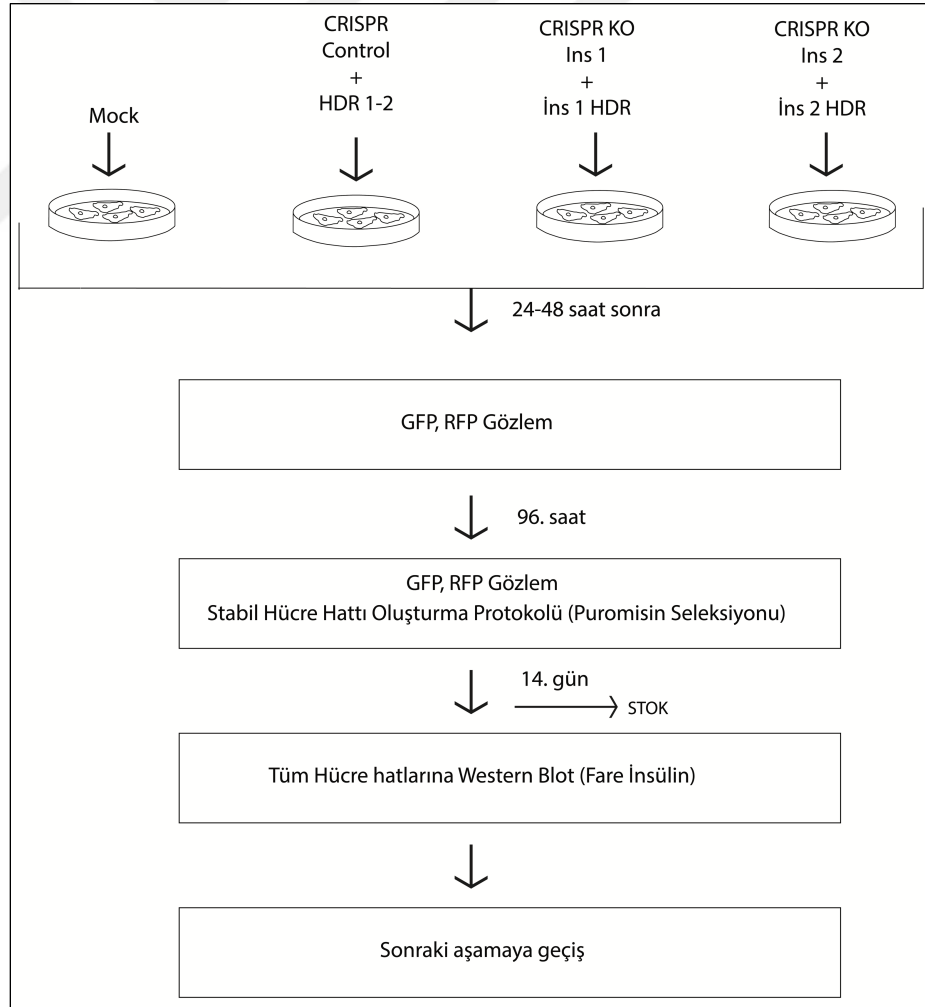
şeklinde 4 gruba ayrıldı.

Transfeksiyon sonrası GFP ve RFP ışımları floresan mikroskobu ile 96. saate kadar takip edildi. Ardından seri pasajlama ve stok alma (pasaj 36, pasaj 37, pasaj 38) işlemleri gerçekleştirildi.

Min6 hücrelerinin puromisin hassasiyet miktarını belirlemek amacıyla 6 kuyucuklu petri kablarına kuyu başına 2×10^5 hücre olacak şekilde Min6 (pasaj 38) hücre ekimi yapıldı ve hücre yoğunluğu %60'a ulaştığında besiyerlerine 10 farklı konsantrasyonda (0.4, 0.6, 1.2,

1.6, 1.8, 2, 2.8, 3.4, 4.4, 5.5 $\mu\text{g/ml}$) puromisin antibiyotiği eklendi. Bir kuyu kontrol olarak antibiyotik eklenmeden devam ettirildi. Promisin eklenmesinden itibaren her iki günde bir besiyerleri aynı oranlar ile değiştirilerek 6 gün boyunca deneye devam edildi. Hücre canlılıkları ve yaşayan hücre miktarları ışık mikroskobu altında incelendi.

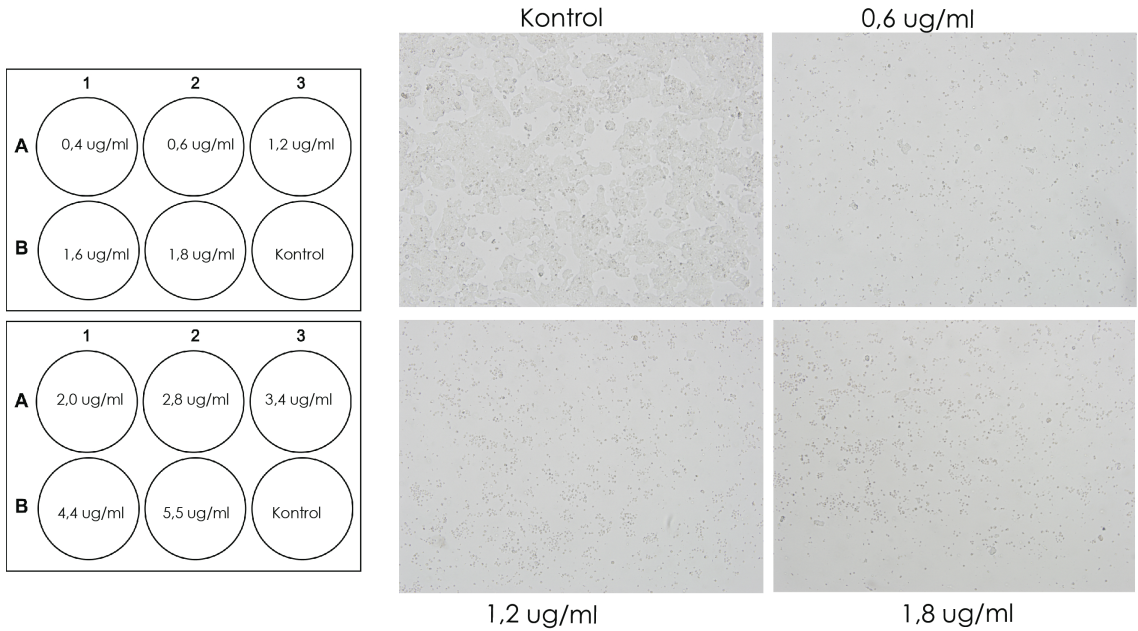
Ardından deney grupları (Mock, CRISPR Kontrol, İns1KO, İns2KO) hücrelerinin besiyerlerine Min6 hücreleri için belirlenen miktarda puromisin antibiyotiği her iki günde bir yenilenerek eklendi. Deney 14 gün devam ettirilerek nakavt hücrelerin saflaştırma işlemi gerçekleştirildi. Ardından nakavt hücrelerin (İns1KO, İns2KO) insülin ekspresyon profilleri western blot ile belirlendi. Pozitif kontrol olarak Min6 hücreleri kullanıldı. Bu aşamalar Şekil 3.3’de şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 3.3. İnsülin nakavt Min6 hücre hattı geliştirme stratejisi basamakları

3.5.3. Min6 Hücrelerinin Antibiyotik Hassasiyet Testleri

Stabil RFP ekspresyonu gözlenen İns1KO ve İns2KO hücreleri, RFP geni ile beraber aktarılan puromisin geni sayesinde puromisin dirençliliği de kazanmış durumdadırlar. Bu sayede besiyeri içerisine puromisin antibiyotiği eklenerek transfeksiyonun ve/veya entegrasyonun başarısız olduğu hücrelerin temizlenerek KO hücrelerin saflaştırılması mümkün hale gelmiş oldu. Bunun için ilk olarak Min6 hücrelerinin tamamını 3-5 gün içerisinde öldüren minimum puromisin miktarı (puromisin hassasiyet miktarı) belirlendi. Bunun için 9 farklı konsantrasyonda puromisin her birinde 2×10^5 hücre ekili kuyucuklardaki besiyerlerine, besiyerleri ve aynı oranlardaki puromisin antibiyotiği her 2 günde bir yenilenerek 6 gün boyunca eklendi. Neticede, Min6 hücreleri için puromisin hassasiyet miktarı $1,8 \mu\text{g/ml}$ olarak belirlendi (Şekil 3.4). Benzer şekilde İnsülinKO hücrelere insülin ekspresyonunun yeniden kazandırılmasını sağlayacak LentiINS plazmid vektörleri de blastisidin direnç geni taşımaktadır. Lentivirus transdüksiyonu sonrası yeniden insülin ekspresyon özelliğine sahip hücrelerin seçilimi blastisidin antibiyotiği ile sağlandı. Bunu yapabilmek 11 farklı konsantrasyonda blastisidin antibiyotiği Min6 hücrelerinde denendi (Şekil 3.5). Neticede, Min6 hücrelerinin blastisidin hassasiyet dozu $4 \mu\text{g/ml}$ şeklinde belirlendi.



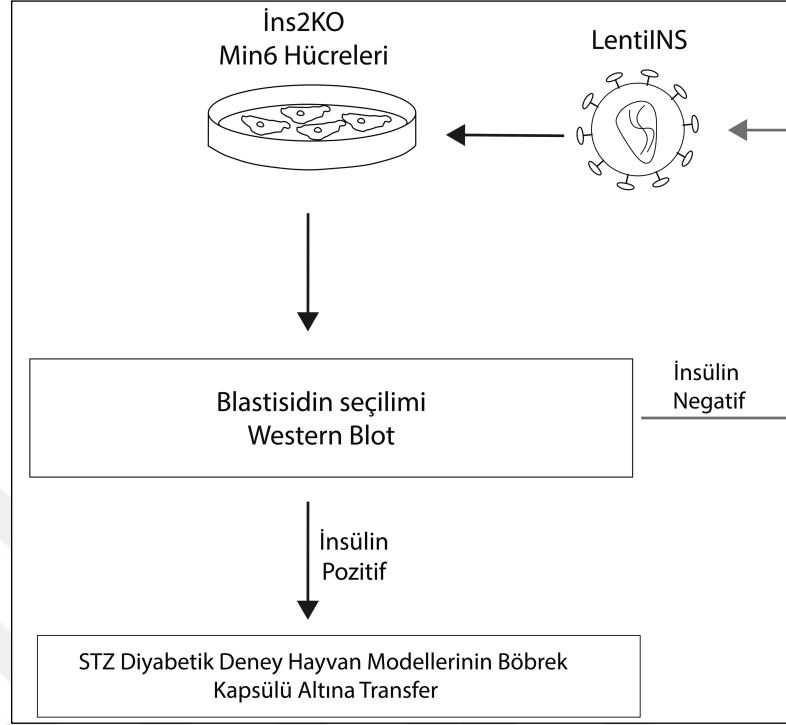
Şekil 3.4 Min6 hücrelerinin puromisin hassasiyeti

	1	2	3	4
A	1 ug/ml	2,5 ug/ml	4 ug/ml	5 ug/ml
B	6 ug/ml	7 ug/ml	8 ug/ml	9 ug/ml
C	11 ug/ml	13 ug/ml	15 ug/ml	Kontrol

Şekil 3.5 Min6 hücrelerinin blastisidin hassasiyet noktasını belirlemek için denenilen dozlar

3.5.4. İnsülin Gen Ekspresyonunun İnsülin Nakavt Hücrelere Lentiviral Vektörler ile Geri Kazandırılması

Elde edilen insülin nakavt hücrelere (İnsKO2) 6 kuyucuklu petri kaplarına kuyu başına 2×10^5 hücre olacak şekilde ekildi. Ertesi gün değişken oranlarda (1, 10, 25, 50, 100, 250 MOI) LentiINS viral vektörü, damlama yöntemiyle hücrelerin üzerine bırakıldı. Transdüksiyon sonrası 3. günde hücrelerin üzerindeki besiyerleri çekildi. PBS ile yıkandıktan sonra yeni besiyeri eklenip besiyerlerine 4 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonunda blastisidin antibiyotiği eklendi. Her 2 günde bir besiyerleri 4 $\mu\text{g/ml}$ blastisidin eklenerek değiştirildi. Bu şekilde 6 gün boyunca işlem devam ettirildi. Viral vektör aracılı transdüksiyon sonrasında aktarılan insülin geninin ekspresyonu Western blot ile teyit edildi. Bu aşamalar Şekil 3.6’da şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 3.6. İns2KO hücelere LentiINS transdüksiyonunda takip edilen basamaklar

3.5.5. İnsülin Gen Replasman Yönteminin İn vivo Olarak Değerlendirilmesi

Mutlak insülin eksikliğine sahip bir deney hayvan modeli geliştirmek amacıyla 8'er Wistar sıçana tek doz 65, 70 ve 80 $\mu\text{g/kg}$ STZ verilerek doz denemesi gerçekleştirildi. Hayvanların kan glukoz düzeyleri ve ağırlıkları 3., 7., 10., 14., 21., 30. günlerde ölçülerek takip edildi. Süre sonunda kullanılacak STZ dozu 65 mg/kg olarak belirlendi. Ardından erkek Wistar sıçanlar 8 haftalıkken alınarak 4 farklı grup oluşturuldu. Bunlar:

1. STZ Kontrol: Diyabetik olup herhangi bir tedavi uygulanmayacak grup (n=6)
2. Min6: İnsülin eksikliği olup böbrek kapsülü altına Min6 hücreleri aktarılan grup (n=6)
3. LentiLacZİns2KO: İnsülin eksikliği olup böbrek kapsülü altına, LentiLacZ transdüksiyonu yapılan Min6 hücreleri aktarılan grup (n=6)
4. LentiINSİns2KO: İnsülin eksikliği olup böbrek kapsülü altına, insülin gen tedavisi yapılan Min6 hücreleri aktarılan grup (n=6)

Tüm gruplarda diyabet sitrat buffer içerisinde 65 mg/kg STZ intraperitoneal olarak verilerek indüklendi. Ardından 3., 7., 10., 15., 30. günlerde kan glukoz düzeyleri ve ağırlıklar takip edildi. Süre sonunda kan glukoz düzeyleri 300 mg/dl ve üzerinde olan hayvanlar mutlak beta hücre kaybına sahip model deney hayvanı olarak değerlendirildi. Hücre aktarımında her gruptan ortalama 10e6 hücre kullanıldı. LentiINS ve LentiLacZ hücreleri 100MOI virus verilen hücrelerden seçilerek aktarıldı.

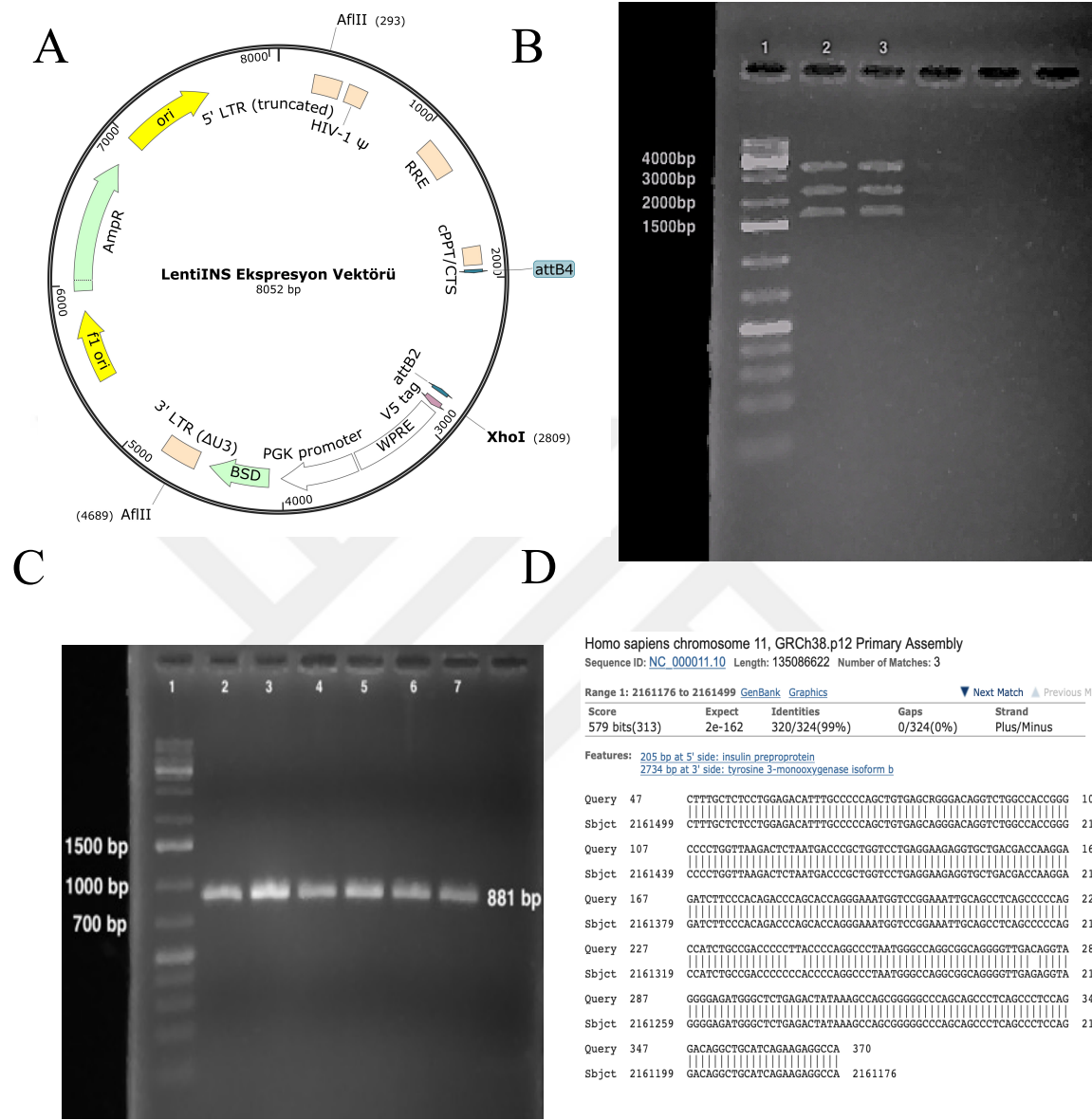
3.6. İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analizler GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) kullanılarak gerçekleştirildi. İstatistiksel analizler yapılırken, normal dağılım gösteren bağımsız iki grup arasındaki farkın değerlendirilmesi için Student's T test, normal dağılım göstermeyen bağımsız iki grubun arasındaki farkın belirlenmesi için Mann Whitney U testi kullanıldı. İki'den çok bağımsız grup söz konusu olduğundaysa, Shapiro Wilk testi ile Gaussian dağılıma uygunluk test edilecek, eğer normal dağılım söz konusu ise tek yönlü varyans analizi (One Way ANOVA), normal dağılım gözlenmiyorsa Kruskal Wallis varyans analizi kullanılarak istatistiksel değerlendirmeler gerçekleştirildi. Bağımlı değerlerde ise (örneğin glukoz tolerans testlerindeki kan şeker ölçümleri): 1) Gaussian dağılım gösteren iki grubun varlığı durumunda "iki eş arası fark testi", 2) Gaussian dağılım gözlenmeyen iki grubun varlığında "Wilcoxon eş testi", 3) Gaussian dağılım gösteren ikiden fazla grubun varlığında "tekrarlı ölçümler varyans analizi" ve 4) Gaussian dağılım göstermeyen ikiden fazla grubun varlığında "Friedman Testi" kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık eşik değeri $p = 0,05$ olarak kabul edildi. STZ enjeksiyonu sonrasında deneklerin sağkalım oranları Kaplan Meier testiyle analiz edildi.

4.BULGULAR

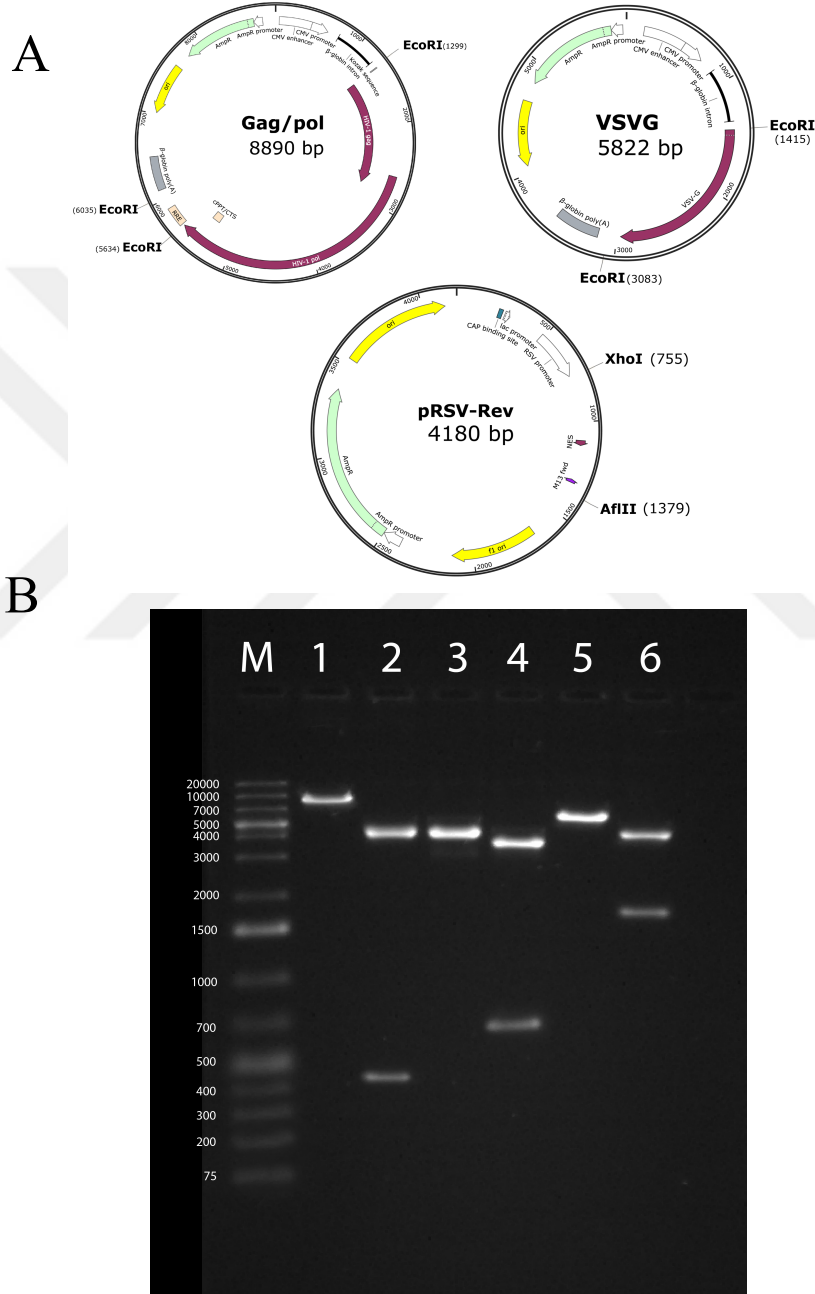
4.1. İnsan Proinsülin Proteini Kodlayan 3. Nesil Lentiviral Plazmid Vektörler Vektörlerin Geliştirilmesi

Oluşturulan minimal insülin promotorlu insan proinsülin kodlayıcı diziye taşıyan lentiviral ekspresyon vektörünün (Şekil 4.1-A), AflII&XhoI ikili restriksiyon kesim reaksiyonu sonrasında transgeni içeren plazmidlerin beklenen boyutları (3556 bp, 2516 bp, 1880 bp) izolasyonu gerçekleştirilen 16 koloni arasından 2'sinde elde edildi (Şekil 4.1-B). Restriksiyon reaksiyonu ile doğrulanan kolonilerden dizileme reaksiyonu için gen klonlama bölgesini içine alacak şekilde tasarlanan primerler kullanılarak yapılan PZR reaksiyonu sonrasında beklenen 881bp uzunluğundaki ürün başarı ile elde edildi (Şekil 4.1-C). Sanger dizileme sonrası minimal insülin promotoru ve insan proinsülin sekansının başarılı bir şekilde doğru yön ve sırada klonlandığı GRCh38.p12 referans genomu kullanılarak NCBI Blast programı yardımıyla ve elektroforegramlardan ileri ve geri yönlü okumalarla teyit edilerek doğrulandı (Şekil 4.1-D). Tüm bu sonuçlar doğrultusunda minimal insülin promotor bölgesi kontrolünde insan insülin geni kodlayan lentiviral ekspresyon plazmidleri başarıyla üretildi.



Şekil 4.1. LentiINS vektörlerinin RFLP ve Sanger dizileme metodları ile doğrulanması: (A) LentiINS vektör haritası, (B) LentiINS vektörü enzim kesim agaroz jel görüntüsü, (C) PZR reaksiyonu ürününün agaroz jel görüntüsü, (D) Blast sonucunun ekran görüntüsü

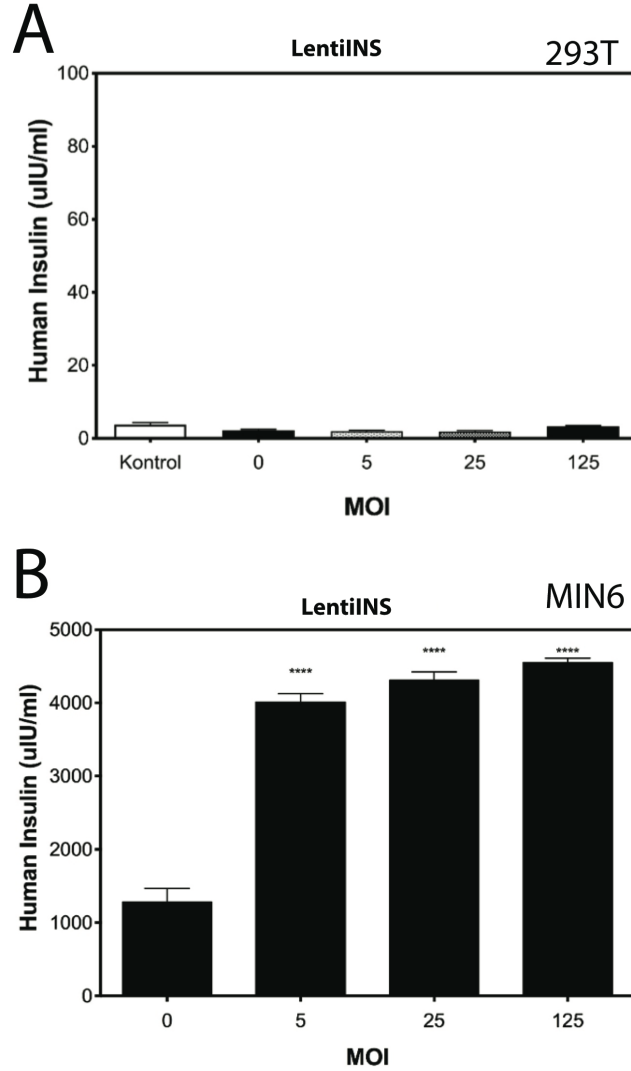
LentiINS ve Lenti_LacZ lentiviruslarının eldesi için gerekli Gag/pol, VSVG ve Rev paketleme plazmidlerinin üretim ve saflaştırma işlemlerinin ardından Tablo 3.1’de belirtildiği şekilde enzim kesim reaksiyonu ile doğrulamaları gerçekleştirildi (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. (A) Lentivirus oluşturmada kullanılan paketleme plazmidlerinin yapılarını ve doğrulma için kullanılan restriksiyon enzimleri ile kesim noktalarını gösterir haritalar (B) restriksiyon kesim reaksiyonlarının agaroz jel görüntüleri (M: markır, 1: AflII Linearize Gag/pol plazmidi, 2:Gag/pol EcoRI kesim reaksiyonu, 3: XhoI Linearize Rev plazmidi, 4: Rev XhoI&AflII kesim reaksiyonu, 5: NotI Linearize VSVG plazmidi, 6:VSVG EcoRI kesim reaksiyonu)

4.2. LentiINS Virus Transdüksiyonu İn vitro Ortamda Pankreatik Beta Hücrelerine Özgü İnsülin Ekspresyonu Sağladı

LentiINS ile artan MOI değerlerinde transdükte edilen 293T hücrelerinde insülin gen sentezi saptanmadı (Şekil 4.3-A). LentiIp-INS viruslarının artan konsantrasyonlarda (5, 25 ve 125 MOI) Min6 pankreatik beta hücre hattına transdüksiyonu ile virus konsantrasyonuna bağlı olarak insülin gen sentezinin de arttığı belirlendi (Şekil 4.3-B) (One-Way ANOVA, $p<0.0001$).

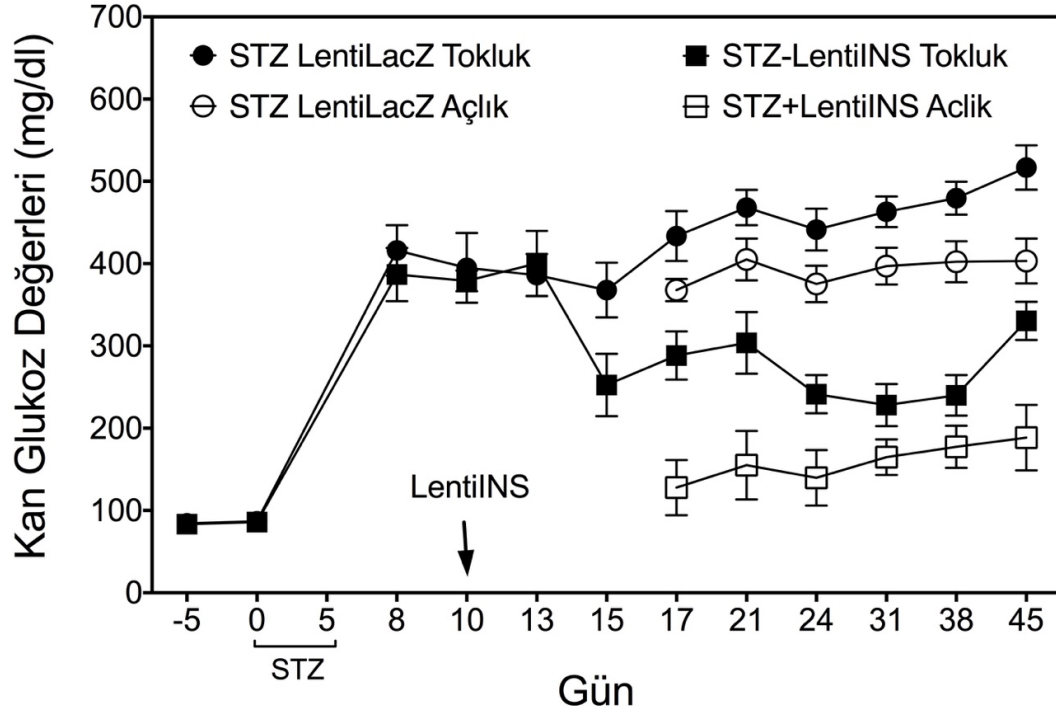


Şekil 4.3. LentiINS transdüksiyonu sonrası insülin ekspresyon düzeyleri. (A) 293T İnsan embriyonik böbrek hücrelerinde (B) Min6 pankreatik beta hücre hatlarında (One-Way ANOVA, $p<0.0001$).

4.3. Tip 1 Diyabetik Hayvan Modellerinde Pankreasa Yönelimli Lentiviral İnsülin Gen Tedavisinin Teröpatik Etkinliği

4.3.1. İntraperitoneal LentiINS Enjeksiyonu Diyabetik Hayvanlarda Açlık Ve Tokluk Kan Glukoz Düzeylerini Anlamlı Oranda Düşürdü

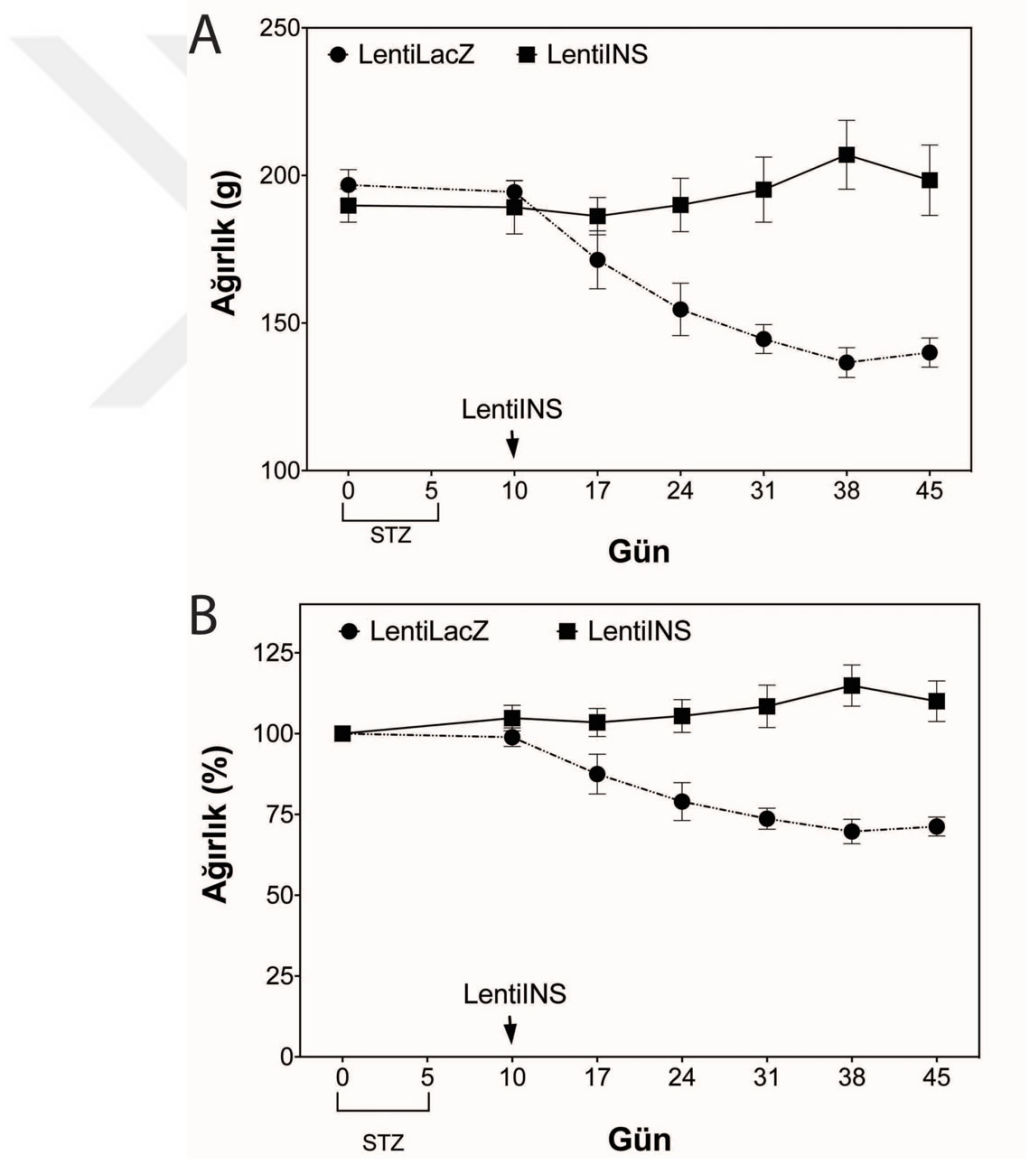
5 gün ard arda 30 mg/kg STZ enjeksiyonuyla diyabetik yapılan Wistar sıçanlar STZ sonrası 5. günde 2 gruba ayrılarak, LentiINS (n=8) veya LentiLacZ (n=8) gen nakli gerçekleştirildi. Deney gruplarına ait kan glukoz düzeyleri periyodik olarak 45.güne kadar takip edildi. Neticede lentivirus aracılı insülin promotorlu proinsülin gen naklinin diyabetik Wistar sıçanlarda hem açlık hem de tokluk kan şekerini başarılı bir şekilde düşürdü. 2 way ANOVA analiz testi LentiLacZ ve LentiINS vektörleri alan gruplar arasında hem açlık hem de tokluk kan şekerleri arasında istatistiksel bir farklılığın olduğunu göstermektedir ($p<0.0001$) (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. Lentivirus aracılı insülin promotorlu proinsülin gen nakli sonrası grupları açlıkve tokluk kan glukoz düzeyleri (2 way ANOVA testi $p<0.0001$)

4.3.2. İntraperitoneal LentiINS Enjeksiyonu Diyabetik Hayvanlarda Kilo Kaybını Engelledi

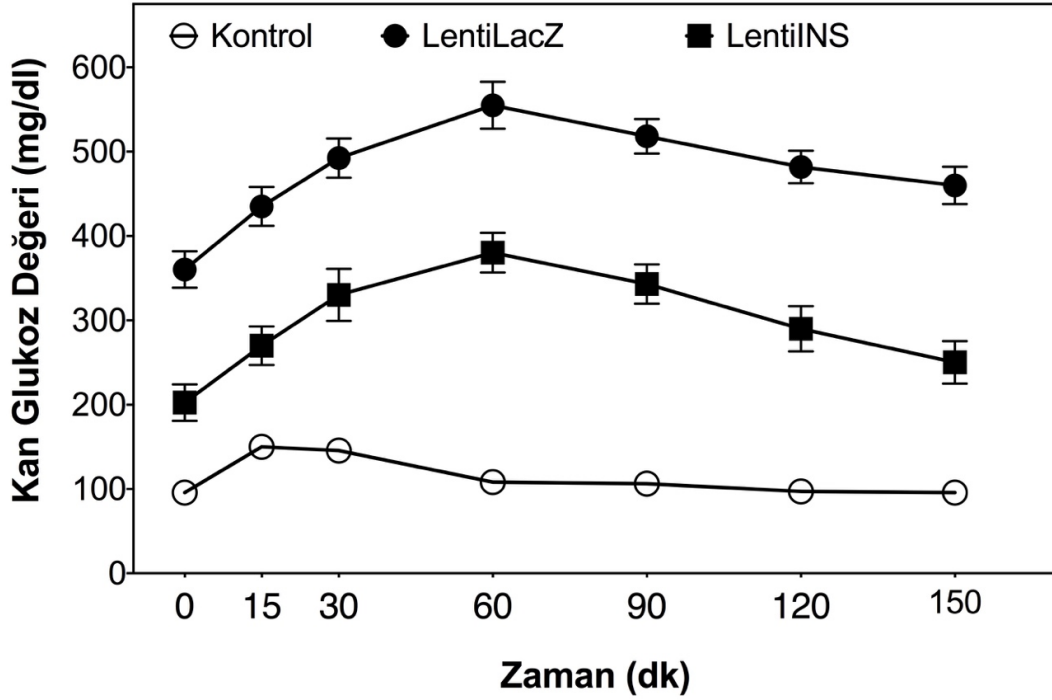
LentiINS enjeksiyonu diyabetik deneklerin kilo kaybını önledi. Gen nakli yapılan deneklerin vücut ağırlıkları (gram olarak) Şekil 4.5. Panel A’da, % ağırlık kaybı ise Şekil 4.5. Panel B’de sunulmuştur. Gen nakli sonrası ve öncesinde deneklerin vücut ağırlıkları periyodik olarak ölçüldü. 2 way ANOVA testi gruplar arasında 24 gün ve sonrasında (gen naklinden 2 hafta sonra) istatistiksel bir farkın olduğunu göstermektedir ($p<0.0071$).



Şekil 4.5. Lentiviral enjeksiyon sonrası diyabetik hayvanların ağırlık değerleri (A), yüzde ağırlık kayıpları (B) (2 way ANOVA $p<0.0071$)

4.3.3. İntraperitoneal LentiINS Enjeksiyonu Diyabetik Hayvanların Glukoz Toleransını Düzeltti

5 gün ard arda 30 mg/kg STZ enjeksiyonuyla diyabetik yapılan Wistar sıçanlar STZ sonrası 5. günde 2 gruba ayrılarak, LentiINS veya LentiLacZ gen nakli gerçekleştirildi. Gen nakli sonrasında 4. hafta sonunda deneklere intraperitoneal yolla 2g/kg dozunda glukoz enjeksiyonları yapıldı. Y ekseninde kan glukoz değerleri, X ekseninde ise zaman eğrisi dakika olarak verilmiştir. One-way ANOVA ve arkasından yapılan Tukey's çoklu karşılaştırma testi, her 3 grup arasında anlamlı bir farklılığın olduğunu gösterdi ($p<0.0001$) (Şekil 4.6).

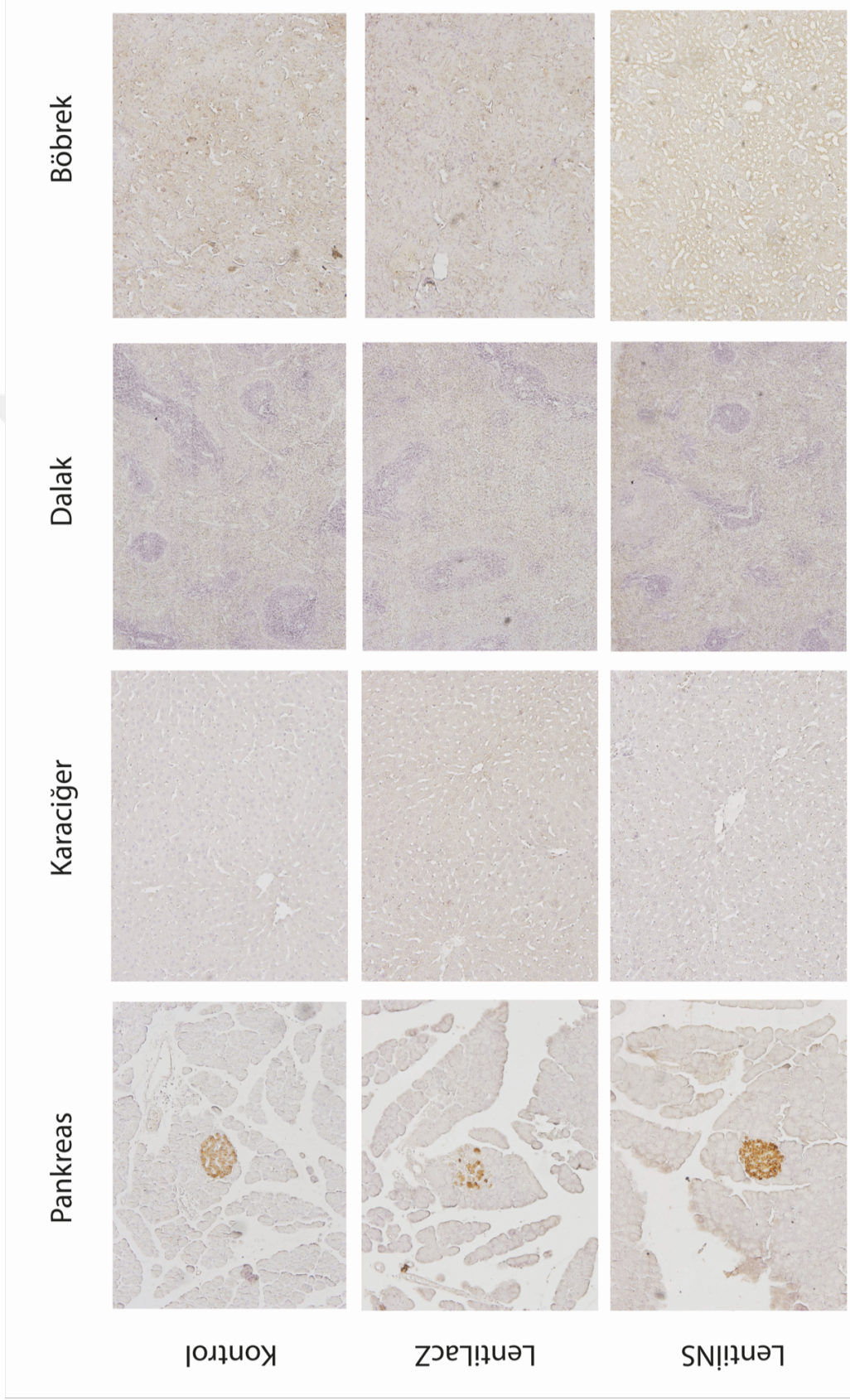


Şekil 4.6. Tip 1 diyabetik deneklerin LentiINS ve LentiLacZ gen nakli sonrası glukoz tolerans eğrileri. One-way ANOVA, Tukey's ($p<0.0001$)

4.3.4. Gen Nakli Yapılan Gruplarda İmmünohistokimyasal Analizler

Sakrifiye edilen grupların (Kontrol: Diyabetik olmayan Wistar sıçanlar, LentiLacZ: Çoklu düşük doz STZ uygulanan ve LentiLacZ aktarılan Wistar sıçanlar, LentiINS: Çoklu düşük doz STZ uygulanan ve LentiINS aktarılan Wistar sıçanlar) pankreas, karaciğer, dalak ve böbrek dokularında yapılan immünohistokimyasal insülin boyaması neticesinde, LentiLacZ alan hayvanların pankreatik adacık yapılarının kontrol grubuna göre bozulduğu ve insülin üreten pankreatik beta hücrelerinin azaldığı gözlemlendi. Bu durum çoklu düşük doz STZ uygulaması alan diyabetik hayvanlarda LentiLacZ enzeksiyonunun terapötik bir etkisinin olmadığını gösterdi. LentiINS alan hayvanların pankreas dokuları incelendiğinde ise kan glukoz değerlerindeki azalma ve glukoz toleranslarındaki iyileşme ile uyumlu bir şekilde insülin pozitif boyanan alanların ve adacık yapılarının kontrol grubuna benzer olduğu gözlemlendi.

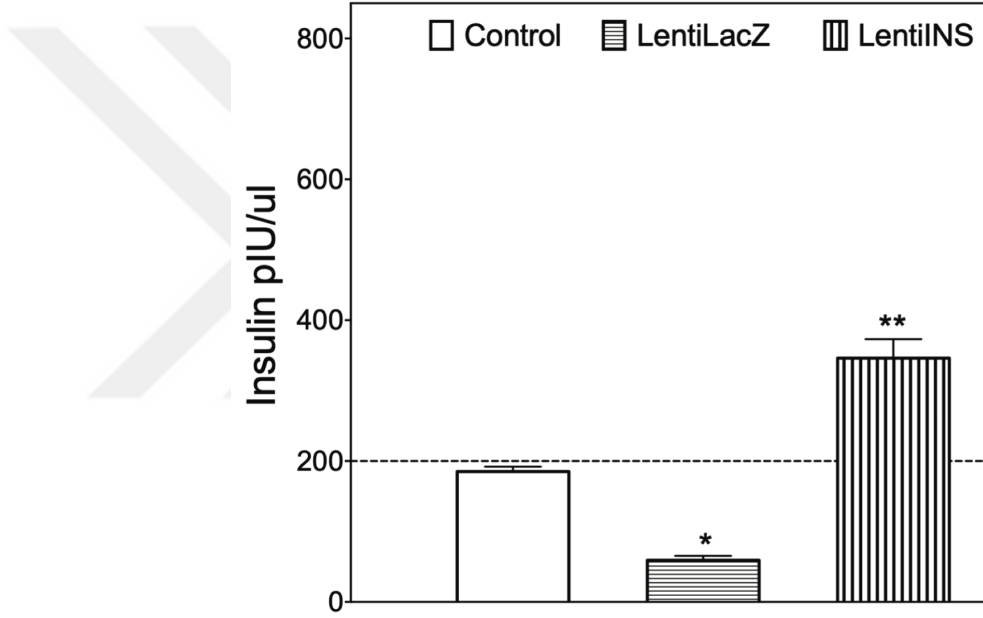
İntraperitoneal lentivirus enjeksiyonu sonrasında in vivo lentiviral vektör dağılımlarının çoktan aza doğru karaciğer, dalak, pankreas, böbrek şeklinde olduğu bildirilmiştir (H. M. Tasyurek, Eksi, ve ark., 2018). Bu bilgi de göz önünde bulundurularak gruplara ait diğer dokulardaki insülin profilleri incelendi. Tüm grupların incelenen pankreatik asiner ve diğer dokularında (karaciğer, dalak, böbrek) herhangi bir insülin pozitif boyamaya rastlanılmadı. Bununla beraber LentiINS alan hayvanların başta karaciğer ve dalak dokularında olmak üzere pankreatik adacık harici diğer dokularda insülin boyamasına rastlanılmamış olması LentiINS vektörlerinin (incelen dokular çerçevesinde) in vitro deneylerle paralel olarak in vivo ortamda da pankreatik beta hücrelerine özgü ekspresyon gösterdiğini kanıtladı. Bu, LentiINS vektörlerinin adacık ve insülin sentezleyen pankreatik beta hücreleri üzerindeki terapötik etkinliğini göstermektedir (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. LentiINS ve LentiLacZ enjeksiyonu sonrası pankreas, karaciğer, dalak, böbrek dokularına ait insülin ekspresyon profilleri

4.3.5 İnsülin gen nakli yapılan deneklerde serum insülin seviyesi

Gen naklinin serum insülin seviyesi üzerine etkisi LentiINS (n=8), LentiLacZ (n=8) vektör enjeksiyonu ve PBS verilen Kontrol (n=5) sıçanların kan serumlarındaki insülin seviyeleri. LentiLacZ verilen diyabetik hayvanlarda serum insülin seviyesi oldukça azalırken, LentiINS verilen deneklerde kontrol gruba oranla yaklaşık 2 kat arttığı belirlenmiştir (Şekil 4.8). İstatistiksel analiz One Way ANOVA ve Tukey Çoklu Karşılaştırma Testi (Kontrol vs LentiLacZ, $p<0.05$; Kontrol vs. LentiINS, $p<0.0023$)



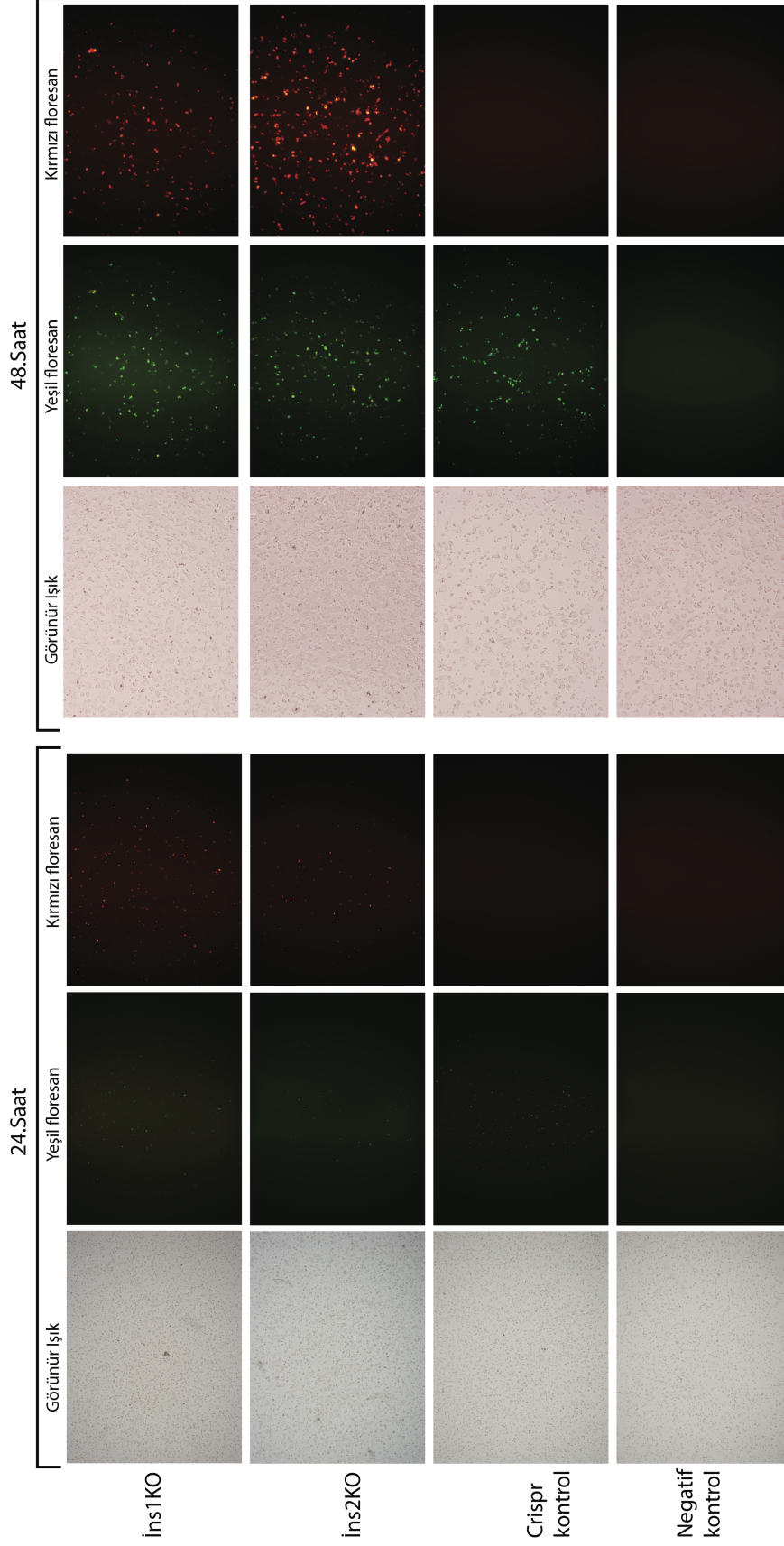
Şekil 4.8. Gen naklinin serum insülin seviyesi üzerine etkisi (One Way ANOVA ve Tukey. Kontrol vs LentiLacZ, $p<0.05$; Kontrol vs. LentiINS, $p<0.0023$)

4.4. CRISPR&Cas9 genom modifikasyon sistemi ile oluşturulan insülin nakavt beta hücrelerinde insülin gen tedavisinin etkinliğinin belirlenmesi

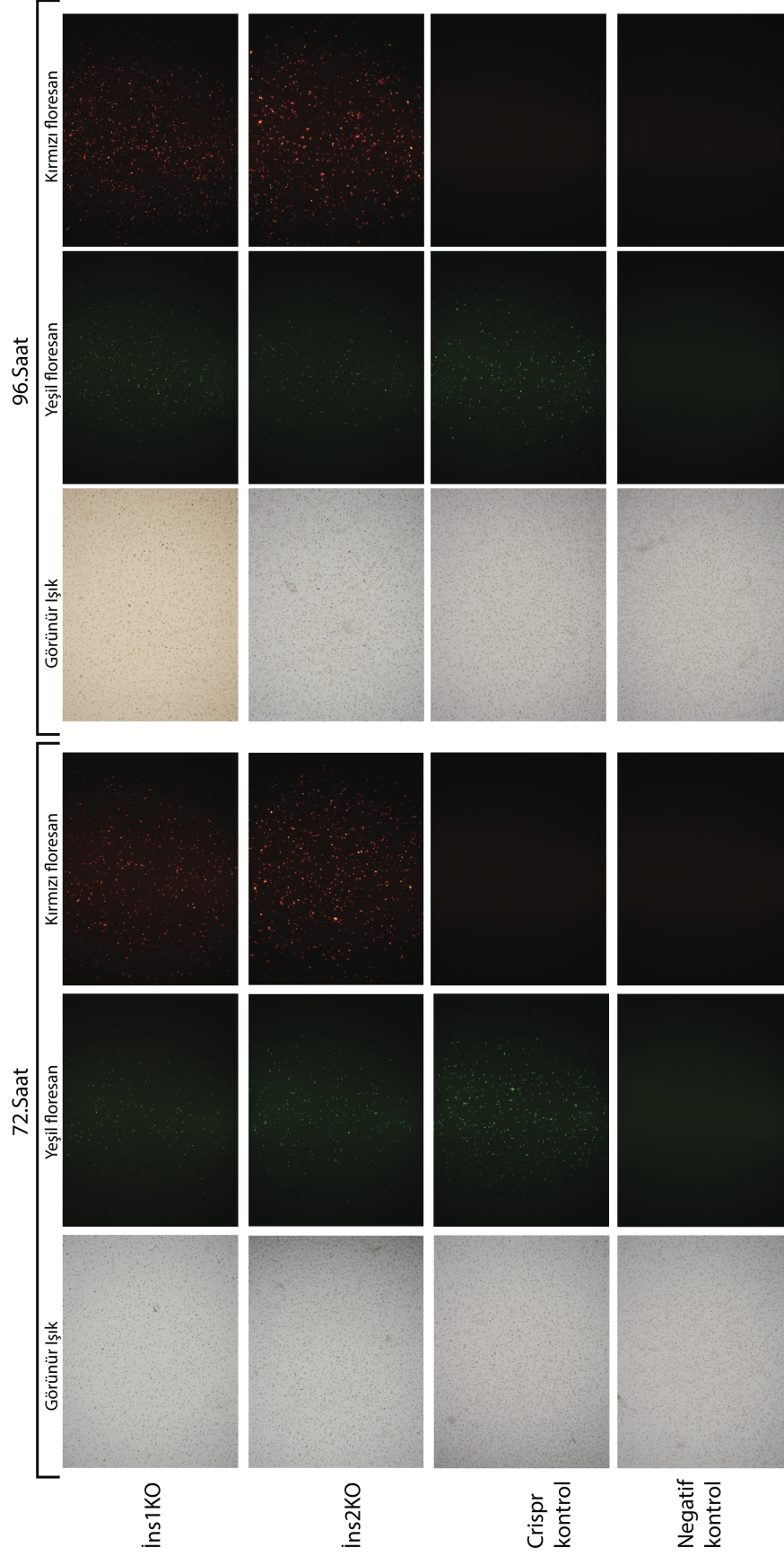
4.4.1. İns1KO ve İns2KO hücrelerinin oluşturulması

CRISPR&Cas9 plazmidlerinde yer alan GFP ekspresyonu plazmidlerin transfeksiyon ardından başarılı bir şekilde Min6 hücrelerine aktarıldığının ve GFP ve Cas9 proteinlerinin ekspresyonları aynı promotor ile gerçekleştiğinden aynı zamanda Cas9 proteininde ekspresyonunun sağlandığını göstermektedir. HDR tamir plazmidleri içerisinde bulunan RFP proteinin ekspresyonu yine bu plazmidlerin hücrelere başarılı bir şekilde aktarıldığının göstergesi durumundadır. Bu noktadan sonra beklenen CRISPR&Cas9 ve HDR plazmidlerini aynı anda alan hücrelerde hedef bölgede kırık

oluşumunun ardından homolog rekombinasyonla RFP ve puromisin antibiyotik geninin aktarıldığı hücrelerin stabil olarak RFP ekspresyonu göstermesi ve puromisin antibiyotiğine karşı direnç özelliğine sahip olmasıdır. Buna bağlı olarak da GFP ekspresyonu zamanla azalırken RFP miktarı artarak devam etmesi bu hücrelerde hedeflenen insülin geninin başarılı bir şekilde nakavt edildiğini gösterecektir. Transfeksiyon sonrasında İnsKO1, İnsKO2, Crispr Kontrol ve Negatif Kontrol gruplarının 24., 48., 72. Ve 96. saatlerdeki durumları ışık ve floresan mikroskoplardan yararlanılarak görünür ışık, kırmızı floresan ve yeşil floresan filtreleri kullanılarak gözlemlendi. Herhangi bir plazmid transfeksiyonu gerçekleştirilmeyen Kontrol grubu hücreleri 96 saat süresince hücresel canlılıklarını korurken herhangi bir floresan ışığa gözlenmedi. CRISPR Kontrol grubunda ise 96 saat süresince plazmid transfeksiyonu kaynaklı herhangi bir hücre ölümü gözlenmezken yalnızca GFP ışması gözlenmesi HDR plazmidlerinin genoma entegre olamadığının yani DNA üzerinde herhangi bir kırık oluşmadığını göstermektedir. İns1KO ve İns2KO gruplarında ise 24. ve 48. saatlerde GFP ve RFP ışmalarının benzer oranlarda ve artarak sürdüğü gözlenirken 72. Saatten itibaren GFP ekspresyonunun düştüğü RFP ekspresyonunun ise artmaya devam ettiği tespit edildi. Bu durum İns1KO ve İns2KO gruplarında ilgili insülin genlerinin (İns1KO- İnsülin1 geni, İns2KO- İnsülin2 geni) başarılı bir şekilde nakavt edildiğini göstermektedir (Şekil 4.9).

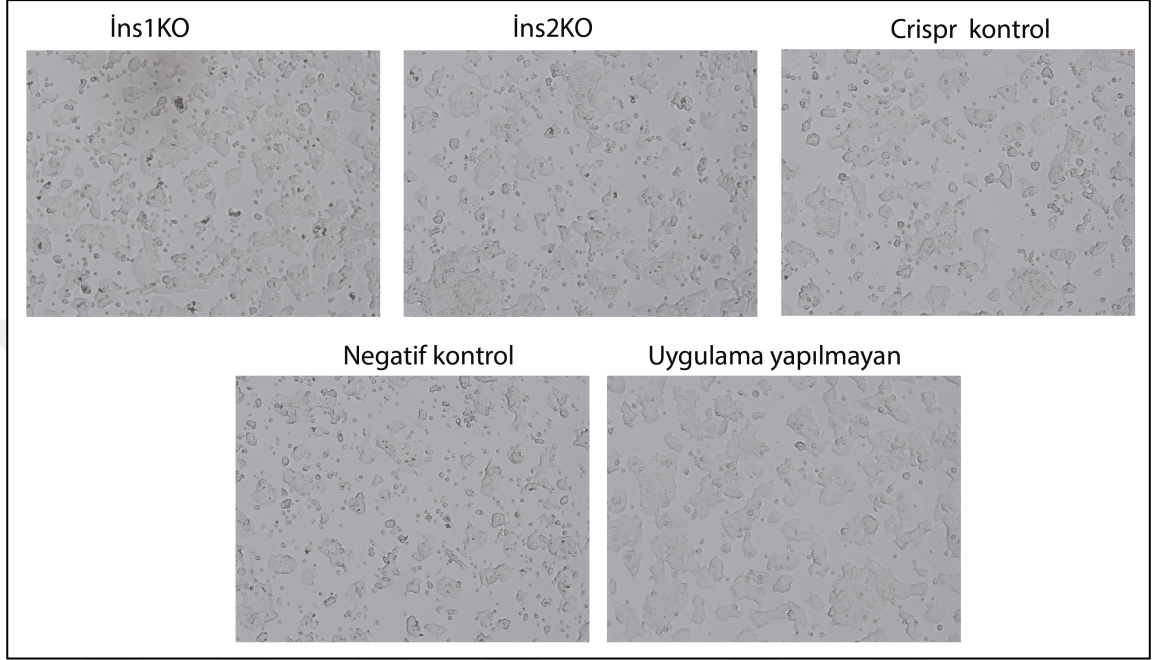


Şekil 4.9. İkili transfeksiyon ardından 24, 48, 72 ve 96. saatlerde Min6 hücrelerindeki GFP ve RFP ekspresyon profilleri.



Şekil 4.9. İkili transfeksiyon ardından 24, 48, 72 ve 96. saatlerde Min6 hücrelerindeki GFP ve RFP ekspresyon profilleri(devam).

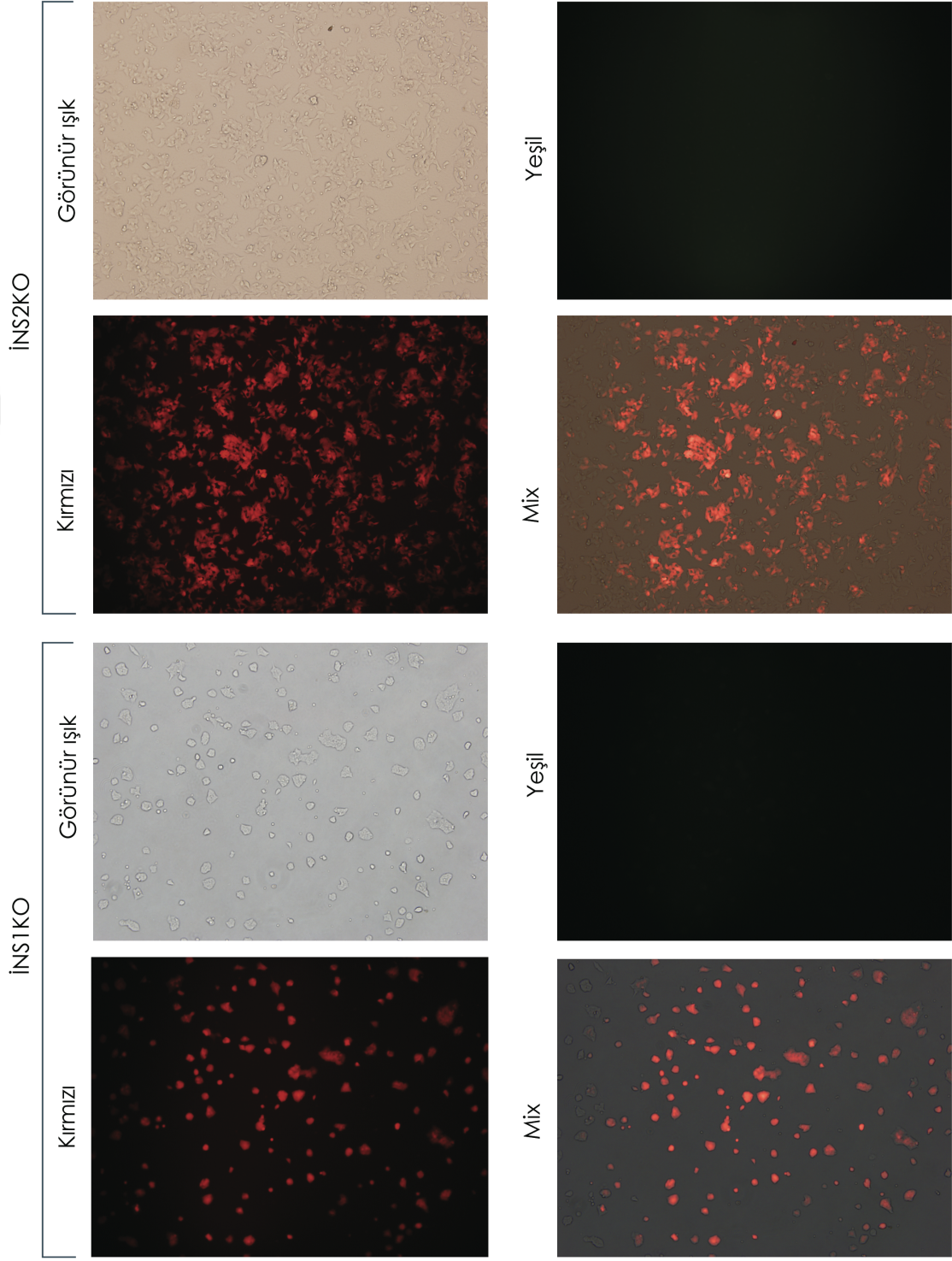
96. saat sonunda kullanılan transfeksiyon ajanlarına ve/veya plazmidlere bağı olarak hücre morfolojilerinde gözle belirlenebilen bir değışim gözlenmemiştir (şekil 4.10).



şekil 4.10. İkili trasfeksiyonun ardından 96. saatte hücre morfolojileri

4.4.2 İns1KO ve İns2KO Hücrelerini Seçilimi

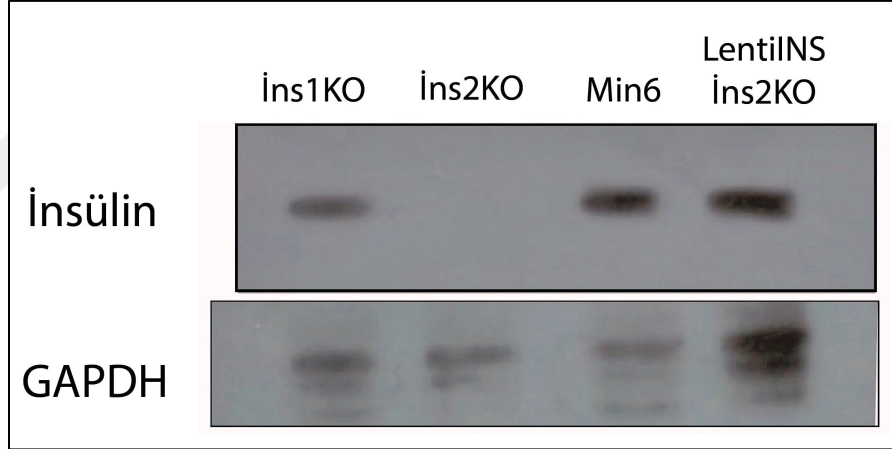
Belirlenen puromisin dojazı kullanılarak 14 gün boyunca her 2 günde bir yenilenmek suretiyle İns1KO ve İns2KO hücrelerinin saflaştırma işlemleri başarı ile gerçekleştirildi. Süre sonunda GFP ışımlarının artık tamamen kaybolduğı, RFP ve görünür ışık görüntülerinin çakıştırılması ile elde edilen Mix fotoğraflarda ortamda KO hücrelerin dışında gözle ayırt edilebilecek başka bir hücrenin kalmadığı gözlendi (şekil 4.11).



Şekil 4.11. Puromisin seleksiyonu sonrası İns1KO ve İns2KO hücrelerin saflık durumu.

4.4.3. İnsülin Protein Ekspresyon Analizleri

İns1KO, İns2KO ve kontrol olarak Min6 hücrelerinin insülin içerikleri western blot kullanılarak belirlendi. Neticede insandaki insülin geninin faredeki homologu olan insülin 2 geninin nakavt edildiği hücre hattında insülin ekspresyonunun engellendiği belirlendi. İnternal kontrol olarak GAPDH kullanıldı. Bir sonraki aşamada LentiINS viral vektörleri ile yeniden insülin ekspresyon yeteneği kazandırılan ve blastisidin seleksiyonu yolu ile saflaştırılan LentiINSİns2KO hücrelerinin de insülin içerikleri western blot ile incelendi (Şekil 4.12). Neticede LentiINSİnsKO2 hücrelerinin Min6 hücreleri kadar insülin içeriğine sahip olduğu gözlemlendi (Bu deneyler farklı zamanlarda gerçekleştirildi. Verilerin bir arada verilerek bütünlük sağlanması açısından yeniden yapılarak tüm hücre hatlarının aynı anda insülin içerikleri yeniden incelendi).



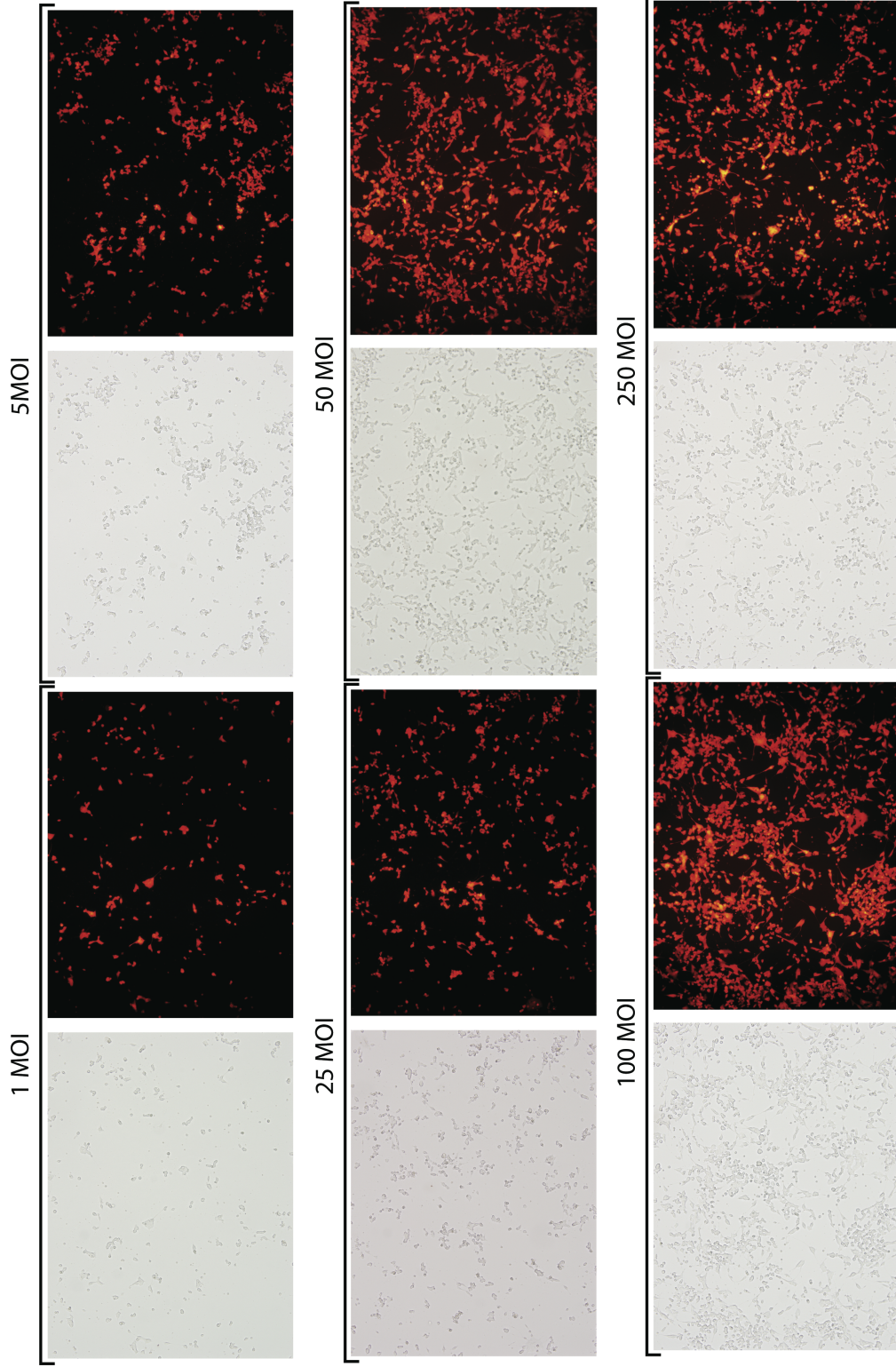
Şekil 4.12. Grupların insülin içeriklerinin western blot görüntüsü

4.4.4 İnsülin Negatif İns2KO Hücre Hattının Lentiviral Vektörlerle Transdüksiyonu

İnsülin negatif İnsKO2 hücreleri 6 kuyucuklu petrilere 2×10^5 hücre/kuyu olarak şekilde ekildikten sonra artan MOI'larda LentiINS viral vektörleri ile transdükte edildi. LentiLacZ viral vektörleri kontrol olarak kullanıldı. Transdüksiyon için destekleyici bir ajan kullanılmadı. LentiINS vektörlerinin artan MOI miktarlarına bağlı transdüksiyon etkinlikleri ve yeniden insülin pozitif hale gelerek insan insülin proteinini eksprese eden hücreler (İns2KOLentiINS) 4ug/ml blastisidin antibiyotiği kullanılarak elde edildi. En yüksek transdüksiyon etkinliği 100 MOI'da elde edildi. Yüksek konsantrasyonlarda

lentivirusların transdüksiyon etkinliğinin azaldığı bilinmektedir. Bu noktada herhangi bir sitotoksite gözlenmemekle birlikte 250 MOI konsantrasyonda virüs aktarılan kuyucuklardaki transdükte hücre sayısı 100 MOI verilenlerden daha az olduğu belirlendi (Şekil 4.13).

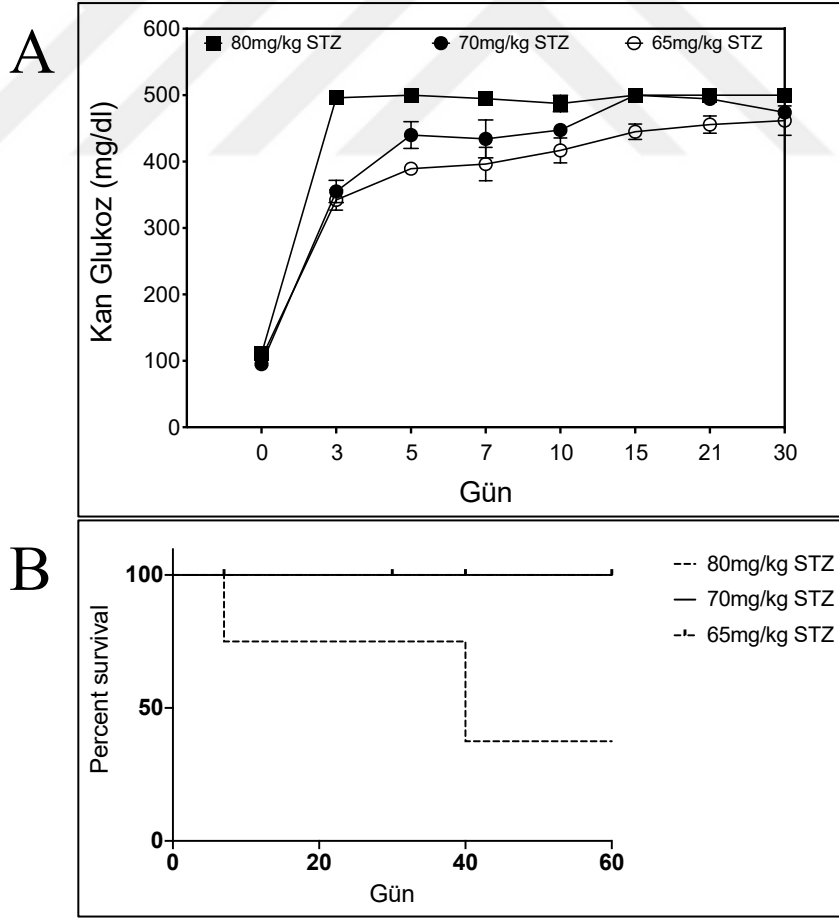




Şekil 4.13. Blastisidin seleksiyonu sonrasında transdüksiyon verimlilikleri

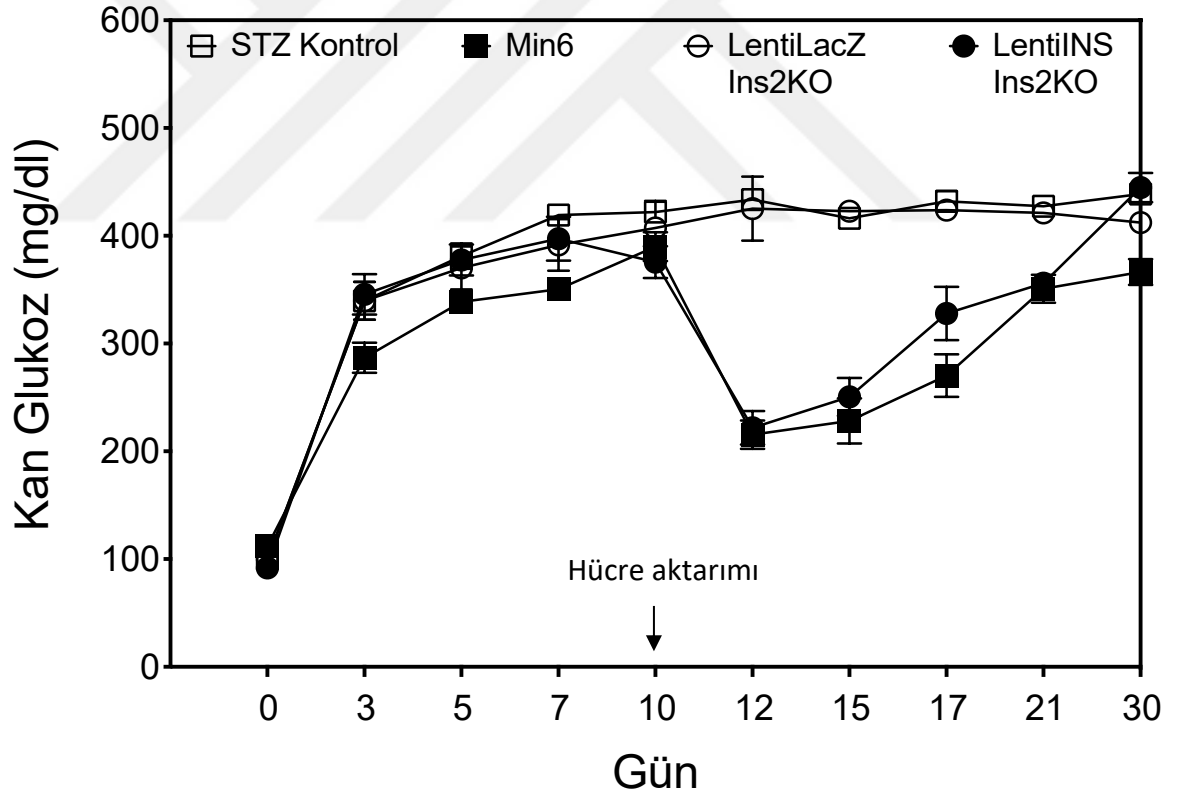
4.4.5 LentiINS vektörü ile enfekte olmuş İnsülin nakavtı yapılan pankreatik hücrelerin tip 1 diyabette terapötik etkinliği

Bu çalışmanın ilk basamağında immunité aracılı diyabetik model geliştirmek adına çoklu düşük doz STZ uygulaması ile T1DM hayvan modeli kullanıldı. İkinci aşamada ise amacımız insülin gen naklinin etkinliğini hem in vitro hem de ortamda in vivo gözlemlemektir. Bu amaçla 2. aşamada endojen insülinleri ekarte ederek sadece LentiINS vektörlerinin etkisini gözlemlememizi sağlayacak modeller geliştirmeye odaklandık. Burada LentiINS vektörünün in vitro etkinliğini, geliştirdiğimiz Min6 İns2KO hücre hattında denedik. İn vivo deneyler için ise pankreatik beta hücrelerinin olabildiğince tahribatını hedefledik. Bunun için farklı doz (65, 70, 80 mg/kg) STZ deneyleri yapıldı (Şekil 4.14) (Daisy ve ark., 2010; Nakamaki ve ark., 2011). Bu deneyler sonucunda 65 mg/kg STZ uygulama dozajı olarak belirlendi.



Şekil 4.14. Tek doz STZ indüklü hiperglisemik hayvan modeli için doz demesi kan glukoz düzeyleri (A) ve survival verileri (B)

Elde edilen diyabetik hayvanların böbrek kapsüllerinin altına LentiLacZIns2KO, LentiINSIns2KO ve Min6 hücreleri makrocerrahik yöntemlerle, hayvan sol tarafı üzerine yatırılarak sol karın bölgesinden bir kesik açılıp böbreğin dışarı çıkarılması suretiyle aktarıldı. Aktarım sonrası tüm grupların kan glukoz düzeyleri takip edildi. Neticede Min6 ve LentiINSIns2KO hücre aktarımının yapıldığı hayvanlarda kısa süreli olarak (6-8 gün arası) kan glukoz düzeylerinin LentiLacZIns2KO ve STZ kontrol gruplarına nazaran düştüğü gözlemlendi (2 way-ANOVA Dunnett'in çoklu karşılaştırma testi $p<0.0001$). Bu durum insülin gen nakli yapılan pankreatik beta hücrelerinin fonksiyonel açıdan normal beta hücrelerine benzer özellik gösterdikleri belirlenmiştir (Şekil 4.15).



Şekil 4.15. Böbrek kapsülü altına hücre aktarımı sonrası grupların kan glukoz değerleri.

5.TARTIŞMA

İnsülin gen terapisinin tek başına ana hedefi T1DM’i kökünden tedavi etmek değil, hedef dokularda insülin gen ekspresyonu sağlamak, periferel dokulara glukoz alımını arttırmak, glukagon sekresyonunu baskılamak ve hiperglisemiyi düşürmek maksadıyla hepatik glukoz üretimini inhibe etmek olarak tanımlanır (Bansal ve Wang, 2008). İnsülin aynı zamanda bir büyüme faktörü olduğundan pankreasa özgü insülin gen sentezinin tahribata uğramış beta hücrelerinin rejenerasyonuna ve sağ kalanların da proliferasyonuna sebebiyet vererek diyabet gelişimini yavaşlatacağı beklenir. Şimdiye kadar gerçekleştirilen deneysel insülin gen nakli çalışmalarının çoğunda insülin gen sentezi için seçilen hedef organlar başta karaciğer olmak üzere pankreas dışı organlar olmuştur. Bunun ana gerekçesi olarak T1DM hastalığında beta hücrelerine karşı gelişen özellikle hücrese bağışıklık yanıtın varlığı gösterilse de pankreasın hassas bir organ olması ve pankreas gen nakli konusundaki çalışmaların azlığı da bu duruma neden olan faktörler arasında sayılabilir. Diğer taraftan deneysel insülin gen nakli çalışmalarında genelde karaciğerin seçilmesinin asıl sebebi, kolayca ulaşılabilir olması, intravenöz enjeksiyondan sonra hepatositlerin viral vektörler tarafından kolayca transdüksiyona uğratılmaları, ayrıca terapötik proteinlerin üretilip sistemik dolaşıma salınabilmesi sayılabilir. Unutmamak gerekir ki vücudumuzda glukozu duyarlı iki organdan biri pankreas diğeri ise karaciğerdir. Gerçekleştirilen deneysel insülin gen nakli çalışmalarında yukarıda sayılan sebeplerle; gerek gen naklinde kullanılan vektörün uygunsuzluğu, gerekse seçilen hedef organın beta hücre özelliklerini taşınamaması sebebiyle istenen başarı bir türlü yakalanamamıştır.

Projemizde, toksik etki oluşturmaksızın kalıcı insülin gen ekspresyonunun sağlanabilmesi ana hedeflerden biri olmuştur. Bir vektörün kalıcı gen ekspresyonu sağlaması için hedef hücre genomuna entegre olması gereklidir. Entegrasyon yeteneği olan vektörler arasında, hem bölünen hem de bölünmeyen hücreleri enfekte edebilmesi, immünolojik cevap uyandırmaksızın hedef hücreye girebilmesi ve entegrasyon sonrasında mutageneze yol açmaması nedeniyle lentiviral vektörler en cazip aday olarak öne çıkmaktadır. Üçüncü nesil integrasyon sonrası inaktive olan (SIN) lentiviral vektörler, yabanil tip HIV-1 enfeksiyonu sonrasında bile vektör mobilizasyonunun gözlenmediği güvenilir bir gen

aktarım aracı olarak görülmekte, bu nedenle in vivo çalışmalarda tercih edilmektedir. Ayrıca lentiviral vektörlerle yapılan çalışmalarda doz sınırlayıcı toksik etki bildirilmediğinden yüksek dozlarda tekrar tekrar alıcıya güvenle verilebilir. Bu çalışmada vektör dayanıklılığının ve tropizminin artırılması amacıyla Veziküler Somatit Virüsü G-glikoproteini ile tiplendirilmiş üçüncü nesil lentiviral vektörler gen nakil araçları olarak geliştirilmiştir. Dolayısıyla bu projede güvenilirliği ve etkinliği klinik denemelerde kanıtlanmış en gelişmiş gen nakil vektörlerinden biri kullanılmıştır.

Çalışmamızın hedeflerinden bir diğeri de, beta hücrelerine özgün ve glukoz kontrollü gen sentezinin sağlanmasıydı. İnsülin üreten pankreatik beta hücrelerine spesifik yüksek transgen ekspresyonu sağlamak ve özellikle pankreasın asiner hücrelerine transgen ekspresyonunu engellemek için insülin promotorunun kullanımı gerekir. İnsan insülin promotorunun (HIP) transkripsiyon faktörleri ile etkileşiminde glukoz düzeyinin anahtar rol oynadığı bilinmektedir. Bu sayede HIP kontrolündeki bir genin sentez seviyesi ortamdaki glukoz miktarına cevap olarak arttırılabilmekte ya da azaltılabilmektedir. Projemizde, HIP altında insülin sentezleyen lentiviral vektörlerin üretilebilmesi için HIP kodlayan ekspresyon vektörleri (LentiINS) oluşturulmuştur. Oluşturulan LentiINS vektörün pankreas beta hücre hattında insülin sentezi yaptığı ancak 293T hücre hattında ise (insan embriyonik böbrek hücre hattı) insülin sentezi etmediği belirlenmiştir. Bu bulgular doku özgünlüğü açısından kısmen de olsa LentiINS vektörünün pankreas beta hücrelerine özgün çalıştığını göstermektedir.

Çalışmamızda, geliştirdiğimiz LentiINS vektörünün terapötik etkinliğinin ölçülmesi için sıçanlarda STZ indüklü tip 1 diyabet modeli oluşturmak gerekiyordu. Bunu yapmamızın temel sebebi literatürde T1DM oluşturabilmek için tek doz STZ uygulamalarına sıçanlarda veya çoklu doz STZ uygulamalarına farelerde rastlanılmasına rağmen, T1DM indüksiyonuna örnek teşkil edebilecek çoklu doz STZ uygulamalarının sıçanlarda yapıldığına dair literatür bilgisine rastlanılamamış olmasıydı (O'Brien ve ark., 1996; Li ve ark., 2000; Muller ve ark., 2002; Dirice ve ark., 2009). Çoklu doz STZ uygulamaları ile Wistar sıçanlarda T1DM başarıyla indüklenmiştir. LentiINS vektörünün T1DM sıçanlara nakli hem tokluk hem de açlık kan şekeri başarıyla düşürmüştür. LentiINS vektörü verilen sıçanların tokluk kan şekeri LentiLacZ verilen diyabetik sıçanlara oranla çok daha

düşük olsa da tokluk kan şekeri tam olarak baskılanamamıştır. Bunun muhtemel sebepleri var olan otoimmün bağışıklık yanıt sebebiyle pankreas beta hücre tahribatının devam etmesi, insülin promotorunun beta hücresine özgünlük sağlamasına rağmen yeterince güçlü insülin sentezi yapmaması sayılabilir. Nitekim glukoz duyarlı promotorlarda benzer durum farklı promotorlarla yapılan çalışmalarda daha önce de bildirilmişti. Herhalukarda geliştirilen gen tedavi vektörü insan insülin promotoru aracılığıyla glukoz bağımlı çalıştığı için vektör uygulaması sonrasında hipoglisemi riski de gözlenmemiştir. Ayrıca LentiINS terapötik gen nakli yapılan sıçanlarda glukoz toleransının arttığı ve diyabetin sebebiyet verdiği kilo kayıplarının önlendiği tespit edilmiştir.

Sonuç olarak insülin gen nakli T1DM deneklerin insülin ihtiyacını kısmen karşılamıştır. Bu sonuçlar bize T1DM'nin kesin çözümü için hastalarda insülin ihtiyacının karşılanmasının yanında, aktif olan otoimmün yanıtının da baskılanması gerektiğini göstermektedir.

T1DM otoimmün aracılı beta hücre hasarı ile karakterize bir hastalıktır. Bununla birlikte bu immün ataklar sonucunda beta hücreleri tamamen yok olmamaktadır. Benzer bir şekilde STZ indüklü diyabetik hayvan modellerinde de beta hücreleri tümüyle yok olmamaktadır. Bu nedenle LentiINS vektörlerinin terapötik etkiliklerinin daha net bir şekilde anlaşılabilmesi için CRISPR&Cas9 sistemi ile insülin eksikliğine sahip pankreatik beta hücre hattı oluşturuldu. Min6 pankreatik beta hücrelerinde İns1 ve İns2 genlerinin ekspresyon profilleri glukoz indüklenmesi, pasaj sayısı ve hücre-hücre etkileşimi gibi faktörlere bağlı olarak farklılık göstermektedir. Roderigo-Milne ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, Min6 hücrelerinde İns1 gen ekspresyonunun monolayer halde iken yüksek oranda azalırken pseudoadacık formunda arttığı, İns2 ekspresyonunun ise her iki durumda da benzer düzeyde olduğu gösterilmiştir (Roderigo-Milne ve ark., 2002). Bu noktada hücre-hücre etkileşiminin İns1 ekspresyonunda etkili olduğu görüşü öne sürülmektedir. Aynı çalışmada İns1 geninin ekspresyonunun glukoz uyarımı ile artmakta olduğu, uyarımın olmadığı durumda ise ekspresyon düzeylerinin normal düzeyin %2'sine kadar düştüğü bildirilmiştir. Ek olarak Min6 pseudoadacıklarda 32. pasaja kadar her iki geninde ekspresyonu gözlenirken, pasaj 40'a gelindiğinde İns1 ekspresyonunun baskılandığı İns2 ekspresyonunun ise artış gösterdiği RT-PZR çalışmalarıyla gösterilmiştir. Bu noktada

toplam preproinsülin mRNA miktarına, İns1 geninin anlamlı oranda bir katkı sağlamadığı belirlenmiştir (Roderigo-Milne ve ark., 2002). Bu veriler göz önüne alındığında elde ettiğimiz İns2KO Min6 hücre hattında herhangi bir insülin ekspresyonu gözlenmemesi anlam kazanmaktadır. Bu noktada bu hücreler mutlak insülin eksikliğine sahip bir model pankreatik beta hücre hattı olarak değerlendirilebilir.

LentiINS ile transdüksiyonu sonrasında bu hücrelerde yeniden insülin ekspresyonu sağlandı. Bununla beraber hücrelerin diyabetik hayvanların böbrek kapsülleri altına aktarılması diyabetik hayvanlarda kısa süreli de olsa kan glukoz düzeylerini düşürerek LentiINS aracılı gen replasman uygulamasının terapötik etkiye sahip olduğunu gösterdi. Bu durum panreasa yönlendirilmiş lentivirus aracılı insülin gen naklinin, insülin geninde meydana gelen bozulmalara bağlı olarak oluşabilecek hastalıkların tedavisinde de kullanılabileceğini gösterdi.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak projemizde insan insülin proteini kodlayan 3. nesil lentiviral vektörler (LentiINS) başarı bir şekilde oluşturuldu.

LentiINS vektörünün T1DM sıçanlara nakli hem tokluk hem de açlık kan şekerini başarıyla düşürdü.

LentiINS vektörü verilen sıçanların tokluk kan şekeri LentiLacZ verilen diyabetik sıçanlara oranla çok daha düşük olsa da tokluk kan şekeri tam olarak baskılanamamıştır.

LentiINS terapötik gen nakli yapılan sıçanlarda glukoz toleransının arttığı ve diyabetin sebebiyet verdiği kilo kayıplarının önlendiği tespit edildi.

Bunlara ek olarak CRISPR&Cas9 gen modifikasyon sistemi kullanılarak insülin eksikliğine sahip Min6 pankreatik beta hücre hattı (İns2KO) oluşturuldu.

İns2KO hücre hatlarına LentiINS transdüksiyonu bu hücrelerde insan insülin ekspresyonunu sağladı.

Yeniden insülin ekspresyon özelliğine sahip olan bu hücreler (İns2KOLentiINS) diyabetik hayvanların böbrek kapsülerinin altına aktarıldığında kan glukoz düzeylerinde bir düşüş gözlemlendi.

KAYNAKLAR

- Alam, T., & Sollinger, H. W. Glucose-regulated insülin production in hepatocytes. Transplantation. 2002; 74 (12): 1781-1787.
- Argaud, D., Zhang, Q., Pan, W., Maitra, S., Pilkis, S. J., & Lange, A. J. Regulation of rat liver glucose-6-phosphatase gene expression in different nutritional and hormonal states: Gene structure and 5'-flanking sequence. Diabetes. 1996; 45 (11): 1563-1571.
- Ashwell, S. G., Gebbie, J., & Home, P. D. Twice-daily compared with once-daily insülin glargine in people with type 1 diabetes using meal-time insülin aspart. Diabet Med. 2006; 23 (8): 879-886.
- Auricchio, A., Gao, G. P., Yu, Q. C., Raper, S., Rivera, V. M., Clackson, T., & Wilson, J. M. Constitutive and regulated expression of processed insülin following in vivo hepatic gene transfer. Gene Ther. 2002; 9 (14): 963-971.
- Ayuso, E., Chillon, M., Agudo, J., Haurigot, V., Bosch, A., Carretero, A., . . . Bosch, F. In vivo gene transfer to pancreatic beta cells by systemic delivery of adenoviral vectors. Hum Gene Ther. 2004; 15 (8): 805-812.
- Ayuso, E., Chillon, M., Garcia, F., Agudo, J., Andaluz, A., Carretero, A., . . . Bosch, F. In vivo gene transfer to healthy and diabetic canine pancreas. Mol Ther. 2006; 13 (4): 747-755.
- Bansal, P., & Wang, Q. Insülin as a physiological modulator of glucagon secretion. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2008; 295 (4): E751-761.
- Bell, G., Pictet, R., Rutter, W., Cordell, B., Tischer, E., & Goodman, H. Sequence of the human insülin gene. Nature. 1980; 284 (5751): 26-32.
- Brockstedt, D. G., Podsakoff, G. M., Fong, L., Kurtzman, G., Mueller-Ruchholtz, W., & Engleman, E. G. Induction of immunity to antigens expressed by recombinant adeno-associated virus depends on the route of administration. Clin Immunol. 1999; 92 (1): 67-75.
- Chan, L., Fujimiya, M., & Kojima, H. J. T. i. M. M. In vivo gene therapy for diabetes mellitus. 2003; 9 (10): 430-435.
- Chen, R., Meseck, M., McEvoy, R. C., & Woo, S. L. Glucose-stimulated and self-limiting insülin production by glucose 6-phosphatase promoter driven insülin expression in hepatoma cells. Gene Ther. 2000; 7 (21): 1802-1809.

Cheung, A. T., Dayanandan, B., Lewis, J. T., Korbitt, G. S., Rajotte, R. V., Bryer-Ash, M., . . . Kieffer, T. J. Glucose-dependent insülin release from genetically engineered k cells. *Science*. 2000; 290 (5498): 1959-1962.

Corbett, J. A. K cells: A novel target for insülin gene therapy for the prevention of diabetes. *Trends Endocrinol Metab*. 2001; 12 (4): 140-142.

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

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

Dong, H., & Woo, S. L. Hepatic insülin production for type 1 diabetes. *Trends Endocrinol Metab*. 2001; 12 (10): 441-446.

EKŞİ, Y. E., & ŞANLIOĞLU, S. J. T. K. I. A.-S. T. Kök hücrelerde programlanabilir nükleazlarla genom mühendisliği uygulamaları ve yeni bir insüli gen nakli hastalık modeli oluşturma. 2019; 12 (1): 79-88.

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

Falqui, L., Martinenghi, S., Severini, G. M., Corbella, P., Taglietti, M. V., Arcelloni, C., . . . Bordignon, C. Reversal of diabetes in mice by implantation of human fibroblasts genetically engineered to release mature human insülin. *Hum Gene Ther*. 1999; 10 (11): 1753-1762.

Federation, I. Idf diabetes atlas eighth edition 2017. 2017.

Gallichan, W. S., Kafri, T., Krah, T., Verma, I. M., & Sarvetnick, N. Lentivirus-mediated transduction of islet grafts with interleukin 4 results in sustained gene expression and protection from insulinitis. *Hum Gene Ther*. 1998; 9 (18): 2717-2726.

Giannoukakis, N., Mi, Z., Gambotto, A., Eramo, A., Ricordi, C., Trucco, M., & Robbins, P. Infection of intact human islets by a lentiviral vector. *Gene Ther*. 1999; 6 (9): 1545-1551.

Giménez, C. A., Ielpi, M., Mutto, A., Grosebacher, L., Argibay, P., & Pereyra-Bonnet, F. J. G. t. Crispr-on system for the activation of the endogenous human ins gene. 2016; 23 (6): 543.

Ginsberg, B. H. The role of technology in diabetes therapy. *Diabetes Care*. 1994; 17 Suppl 1: 50-55.

Groskreutz, D. J., Sliwkowski, M. X., & Gorman, C. M. Genetically engineered proinsulin constitutively processed and secreted as mature, active insulin. *J Biol Chem*. 1994; 269 (8): 6241-6245.

Han, J., McLane, B., Kim, E. H., Yoon, J. W., & Jun, H. S. Remission of diabetes by insulin gene therapy using a hepatocyte-specific and glucose-responsive synthetic promoter. *Mol Ther*. 2011; 19 (3): 470-478.

He, Z., Wang, F., Kumagai-Braesch, M., Permert, J., & Holgersson, J. Long-term gene expression and metabolic control exerted by lentivirus-transduced pancreatic islets. *Xenotransplantation*. 2006; 13 (3): 195-203.

Heise, T., & Pieber, T. R. Towards peakless, reproducible and long-acting insulins. An assessment of the basal analogues based on isoglycaemic clamp studies. *Diabetes Obes Metab*. 2007; 9 (5): 648-659.

Hemkens, L. G., Grouven, U., Bender, R., Gunster, C., Gutschmidt, S., Selke, G. W., & Sawicki, P. T. Risk of malignancies in patients with diabetes treated with human insulin or insulin analogues: A cohort study. *Diabetologia*. 2009; 52 (9): 1732-1744.

Hirsch, I. B. Insulin analogues. *N Engl J Med*. 2005; 352 (2): 174-183.

Hsu, P. Y., & Yang, Y. W. Effect of polyethylenimine on recombinant adeno-associated virus mediated insulin gene therapy. *J Gene Med*. 2005; 7 (10): 1311-1321.

Irminger, J. C., Meyer, K., & Halban, P. Proinsulin processing in the rat insulinoma cell line ins after overexpression of the endoproteases pc2 or pc3 by recombinant adenovirus. *Biochem J*. 1996; 320 (Pt 1): 11-15.

Kamiya, H., Zhang, W., & Sima, A. A. The beneficial effects of c-peptide on diabetic polyneuropathy. *Rev Diabet Stud*. 2009; 6 (3): 187-202.

Kobinger, G. P., Deng, S., Louboutin, J. P., Vatamaniuk, M., Matschinsky, F., Markmann, J. F., . . . Wilson, J. M. Transduction of human islets with pseudotyped lentiviral vectors. *Hum Gene Ther*. 2004; 15 (2): 211-219.

Kolodka, T. M., Finegold, M., Moss, L., & Woo, S. L. Gene therapy for diabetes mellitus in rats by hepatic expression of insulin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995; 92 (8): 3293-3297.

Kurtzhals, P., Schaffer, L., Sorensen, A., Kristensen, C., Jonassen, I., Schmid, C., & Trub, T. Correlations of receptor binding and metabolic and mitogenic potencies of insulin analogs designed for clinical use. *Diabetes*. 2000; 49 (6): 999-1005.

Leibowitz, G., Beattie, G. M., Kafri, T., Cirulli, V., Lopez, A. D., Hayek, A., & Levine, F. Gene transfer to human pancreatic endocrine cells using viral vectors. *Diabetes*. 1999; 48 (4): 745-753.

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

Lin, X., Pelletier, S., Gingras, S., Rigaud, S., Maine, C. J., Marquardt, K., . . . Martin, G. J. D. Crispr-cas9-mediated modification of the nod mouse genome with ptpn22r619w mutation increases autoimmune diabetes. 2016; 65 (8): 2134-2138.

Lu, D., Tamemoto, H., Shibata, H., Saito, I., & Takeuchi, T. Regulatable production of insulin from primary-cultured hepatocytes: Insulin production is up-regulated by glucagon and camp and down-regulated by insulin. *Gene Ther*. 1998; 5 (7): 888-895.

Mahato, R. I., Henry, J., Narang, A. S., Sabek, O., Fraga, D., Kotb, M., & Gaber, A. O. Cationic lipid and polymer-based gene delivery to human pancreatic islets. *Mol Ther*. 2003; 7 (1): 89-100.

Marcin, J. P., Kuppermann, N., Tancredi, D. J., & Glaser, N. S. Insulin administration for treatment of pediatric diabetic ketoacidosis: Are lower rates of infusion beneficial? *Pediatr Crit Care Med*. 2011; 12 (2): 217-219.

Mohn, A., Marcovecchio, M., & Chiarelli, F. Insulin analogues. *N Engl J Med*. 2005; 352 (17): 1822-1824; author reply 1822-1824.

Moore, H. P., Walker, M. D., Lee, F., & Kelly, R. B. Expressing a human proinsulin cDNA in a mouse acth-secreting cell. Intracellular storage, proteolytic processing, and secretion on stimulation. *Cell*. 1983; 35 (2 Pt 1): 531-538.

Mukai, E., Fujimoto, S., Sakurai, F., Kawabata, K., Yamashita, M., Inagaki, N., & Mizuguchi, H. Efficient gene transfer into murine pancreatic islets using adenovirus vectors. *J Control Release*. 2007; 119 (1): 136-141.

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

Niu, L., Xu, Y. C., Dai, Z., & Tang, H. Q. Gene therapy for type 1 diabetes mellitus in rats by gastrointestinal administration of chitosan nanoparticles containing human insulin gene. *World J Gastroenterol*. 2008; 14 (26): 4209-4215.

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

Palmer, D. J., & Ng, P. Helper-dependent adenoviral vectors for gene therapy. *Hum Gene Ther.* 2005; 16 (1): 1-16.

Park, Y. M., Woo, S., Lee, G. T., Ko, J. Y., Lee, Y., Zhao, Z. S., . . . Lee, H. C. Safety and efficacy of adeno-associated viral vector-mediated insulin gene transfer via portal vein to the livers of streptozotocin-induced diabetic sprague-dawley rats. *J Gene Med.* 2005; 7 (5): 621-629.

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

Raper, S. E., & DeMatteo, R. P. Adenovirus-mediated in vivo gene transfer and expression in normal rat pancreas. *Pancreas.* 1996; 12 (4): 401-410.

Rivera, V. M., Wang, X., Wardwell, S., Courage, N. L., Volchuk, A., Keenan, T., . . . Clackson, T. Regulation of protein secretion through controlled aggregation in the endoplasmic reticulum. *Science.* 2000; 287 (5454): 826-830.

Roderigo-Milne, H., Hauge-Evans, A. C., Persaud, S. J., Jones, P. M. J. B., & communications, b. r. Differential expression of insulin genes 1 and 2 in min6 cells and pseudoislets. 2002; 296 (3): 589-595.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Short, D. K., Okada, S., Yamauchi, K., & Pessin, J. E. Adenovirus-mediated transfer of a modified human proinsulin gene reverses hyperglycemia in diabetic mice. *Am J Physiol.* 1998; 275 (5): E748-756.

Simonson, G. D., Groskreutz, D. J., Gorman, C. M., & MacDonald, M. J. Synthesis and processing of genetically modified human proinsulin by rat myoblast primary cultures. *Hum Gene Ther.* 1996; 7 (1): 71-78.

Tanaka, S. I., Yamakawa, T., Kimura, M., Aoki, I., Kamei, J., Okuda, K., & Mobbs, C. Daily nasal inoculation with the insulin gene ameliorates diabetes in mice. *Diabetes Res Clin Pract.* 2004; 63 (1): 1-9.

Tang, S. C., & Sambanis, A. Differential raav2 transduction efficiencies and insulin secretion profiles in pure and co-culture models of human enteroendocrine l-cells and enterocytes. *J Gene Med.* 2004; 6 (9): 1003-1013.

Taniguchi, H., Yamato, E., Tashiro, F., Ikegami, H., Ogihara, T., & Miyazaki, J. Beta-cell neogenesis induced by adenovirus-mediated gene delivery of transcription factor pdx-1 into mouse pancreas. *Gene Ther.* 2003; 10 (1): 15-23.

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

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

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

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

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

Thule, P. M., Campbell, A. G., Kleinhenz, D. J., Olson, D. E., Boutwell, J. J., Sutliff, R. L., & Hart, C. M. Hepatic insulin gene therapy prevents deterioration of vascular function and improves adipocytokine profile in stz-diabetic rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2006; 290 (1): E114-E122.

Vollenweider, F., Kaufmann, J., Irminger, J. C., & Halban, P. A. Processing of proinsulin by furin, pc2, and pc3 in (co) transfected cos (monkey kidney) cells. *Diabetes*. 1995; 44 (9): 1075-1080.

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

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

Wong, M. S., Hawthorne, W. J., & Manolios, N. Gene therapy in diabetes. *Self Nonself*. 2010; 1 (3): 165-175.

Xu, H., Yang, Y., Chen, Y., Mueller, U., Iyer, S., Presland, J., . . . endocrinology, c. Determination of epac2 function using epac2 null min6 sublines generated through crispr-cas9 technology. 2018; 473: 114-123.

Yang, Y. W., & Chao, C. K. Incorporation of calcium phosphate enhances recombinant adeno-associated virus-mediated gene therapy in diabetic mice. *J Gene Med*. 2003; 5 (5): 417-424.

Zhang, B., Xia, H. Q., Cleghorn, G., Gobe, G., West, M., & Wei, M. Q. A highly efficient and consistent method for harvesting large volumes of high-titre lentiviral vectors. *Gene Ther*. 2001; 8 (22): 1745-1751.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Yunus Emre	Uyruğu	T.C
Soyadı	EKŞİ	Tel no	506 238 5453
Doğum tarihi	23/03/1985	e-posta	yunusemreeksi@akdeniz.edu.tr

Eğitim Bilgileri

Mezun olduğu kurum		Mezuniyet yılı
Lise	Rize Fener (Süper) Lisesi	2003
Lisans	Karadeniz Teknik Üniversitesi Biyoloji Bölümü	2009
Yüksek Lisans	İstanbul Üniversitesi DETAE Moleküler Tıp AD	2012
Doktora	Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD	2019

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (yıl-yıl)
Araştırma Görevlisi	Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü	2012-2013
Araştırma Görevlisi	Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD	2013-2019

Yabancı Dilleri	Sınav türü	Puanı
İngilizce	YDS	82,5
İtalyanca		

Proje Deneyimi

Proje Adı	Destekleyen kurum	Süre (Yıl-Yıl)
Pankreatik Beta Hücrelerine Özgün Vazoaktif İntestinal Peptid Sentezinin Diyabetik Deney Hayvan Modellerinde Beta Hücre Fonksiyonu ve Adacık Kitle Kaybı Üzerindeki Terapötik Etkinliği	TUBITAK-111S157	2013-2014

Pankreasa Yönlendirilmiş Lentiviral Vektörlerle İnsülin Gen Naklinin Terapötik Etkinliğinin Diyabetik Deney Hayvan Modellerinde Belirlenmesi	TUBITAK-215S820	2017-2019
---	-----------------	-----------

Yayınlar:

Eksi Y.E., Şanlıoğlu S., "Kök Hücrelerde Programlanabilir Nükleazlarla Genom Mühendisliği Uygulamaları ve Yeni Bir İnsülin Gen Nakli Hastalık Modeli Oluşturma", Türkiye Klinikleri İmmünoloji Alerji- Özel Konular, cilt.1, no.1, ss.79-88, 2019

Taşyürek M.H., **Eksi Y.E.**, Şanlıoğlu A.D., Altunbaş H.A., Balci M.K., Griffith T.S., et al., "HIV-based lentivirus-mediated vasoactive intestinal peptide gene delivery protects against DIO animal model of Type 2 diabetes", GENE THERAPY, no.0, pp.0-0, 2018

Eksi Y.E., Şanlıoğlu S., "FDA Onaylı İlk Onkolitik Viral Terapi Ajansı Talimogene Laherparepvec'in (IMLYGICTM) Öyküsü", Turkish Journal of Medical Sciences, cilt.1, no.80, ss.9-9, 2016

Eksi Y.E., Karaali Z.E., Incekara K., Ergen H.A., "Myeloperoxidase And Glutamate-Cysteine Lıgase Polymorphisms In Type 2 Diabetes Mellitus: A Preliminary Study", Journal Of Medical Biochemistry, vol.33, pp.156-161, 2014

Bildiriler:

Eksi Y.E., Altunbaş H.A., Şanlıoğlu S., "Development of MODY10 diabetic experimental animal model using CRISPR/Cas9 technology for insülin gene transfer studies", ESGCT XXV Anniversary Congress, Berlin, ALMANYA, 17-20 Ekim 2017, pp.P112-P112

Taşyürek M.H., **Eksi Y.E.**, Erendor F., Altunbaş H.A., Şanlıoğlu S., "Diyabet Hastalığına karşı geliştirilen gen tedavi stratejilerinde kullanılmak üzere tip 1 diyabet hayvan modelinin oluşturulması", 53. Ulusal Diyabet Kongresi, GİRNE, KUZEY KIBRIS TÜRK CUM., 19-23 Nisan 2017, ss.251-251

Eksi Y.E., Altunbaş H.A., Şanlıoğlu S., "İnsülin gen replasman tedavisinde kullanılmak üzere CRISPR- Cas9 yöntemiyle MODY10 diyabetik deney hayvan modeli oluşturma", 15. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, MUĞLA, TÜRKİYE, 26-29 Ekim 2017, ss.P-012-P-012

Taşyürek M.H., **Eksi Y.E.**, Erendor F., Altunbaş H.A., Şanlıoğlu S., "Diyabet hastalığına karşı geliştirilen gen tedavi stratejilerinde kullanılmak üzere Tip 1 Diyabet

hayvan modelinin oluşturulması", 53. Ulusal Diyabet Kongresi, KKTC / Girne, TÜRKİYE, 19-23 Nisan 2017, ss.11-11

Taşıyürek M.H., **Eksi Y.E.**, Balci M.K., Şanlıoğlu S., "Pankreatik beta hücrelerine özgün insülin promotorlu proinsülin gen tedavi vektörünün oluşturulması", 53. Ulusal Diyabet Kongresi, KKTC / Girne, TÜRKİYE, 19-23 Nisan 2017, ss.09-09

Taşıyürek M.H., **Eksi Y.E.**, Balci M.K., Şanlıoğlu S., "Pankreatik beta hücrelerine özgün insülin promotorlu proinsülin gen tedavi vektörünün oluşturulması", 53. Ulusal Diyabet Kongresi, Girne, KUZEY KIBRIS TÜRK CUM., 19-23 Nisan 2017, ss.249-249

Taşıyürek M.H., **Eksi Y.E.**, Balci M.K., Şanlıoğlu S., "EF-1 promotoru kontrolünde insülin gen ekspresyonu yapan HIV tabanlı lentiviral gen tedavi vektörünün oluşturulması", Uluslararası Katılımlı 12. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi, İZMİR, TÜRKİYE, 5-9 Ekim 2016, cilt.2, ss.200-200

Eksi Y.E., Balci M.K., Şanlıoğlu S., "Generation of a lentiviral vector encoding human insülin for diabetes treatment", Conference on Changing the Face of Modern Medicine - Stem Cells and Gene Therapy., FLORANSA, ITALYA, 18-21 Ekim 2016, vol.27, pp.A156-A156

Eksi Y.E., Taşıyürek M.H., Balci M.K., Şanlıoğlu S., "Pankreatik beta hücre hedefli HIV tabanlı insülin gen tedavi vektörünün oluşturulması", Uluslararası Katılımlı 12. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi, İZMİR, TÜRKİYE, 5-9 Ekim 2016, cilt.2, ss.206-206

Eksi Y.E., Balci M.K., Şanlıoğlu S., "Novel approaches for insülin mediated gene delivery in diabetes treatment", Conference on Changing the Face of Modern Medicine - Stem Cells and Gene Therapy. Human Gene Therapy, FLORANSA, ITALYA, 18-21 Ekim 2016, vol.27, pp.A156-A156

Taşıyürek M.H., **Eksi Y.E.**, Balci M.K., Şanlıoğlu S., "Gen tedavisinde kullanılan lentiviral vektörlerin in vivo dağılımlarının Tip 2 Diyabet hayvan modelinde belirlenmesi", 51. Ulusal Diyabet Kongresi, ANTALYA, TÜRKİYE, 22-26 Nisan 2015, ss.146-147

Eksi Y.E., Taşıyürek M.H., Balci M.K., Şanlıoğlu S., " In vivo distribution of HIV based 3rd generation of lentiviral vectors used in gene therapy in DOI animal model of type 2 diabetes", ESGCT and FSGCT Collaborative Congress,2015, Helsinki, FINLANDIYA, 17-20 Eylül 2015, pp.A94-A94

Eksi Y.E., Taşıyürek M.H., Şanlıoğlu A.D., Balci M.K., Şanlıoğlu S., "Construction of A lentiviral Vector Encoding Human Vasoactive Intestinal Peptide for Diabetes Treatment", EMBO Workshop , Evry, FRANSA, 30 Mart - 4 Nisan 2015, pp.185-185

Eksi Y.E., Taşıyürek M.H., Balci M.K., Şanlıoğlu S., "In vivo distribution of HIV based 3rd generationof lentiviral vectors used in gene therapy in DOI animalmodel of type 2

diabetes", ESGCT and FSGT Collaborative Congress, Helsinki, FINLANDIYA, , vol.26, pp.94-94

Eksi Y.E., Balık O., Taşyürek M.H., Balci M.K., Altunbaş H.A., Şanlıoğlu S., "Diyabet hastalığına karşı geliştirilen insan vazoaktif intestinal peptid kodlayan HIV tabanlı gen transfer vektörlerinin yapımı ve testi", 50. Ulusal Diyabet Kongresi, ANTALYA, TÜRKIYE, 23-27 Nisan 2014, ss.12-12

Eksi Y.E., Balık O., Taşyürek M.H., Balci M.K., Altunbaş H.A., Şanlıoğlu S., "Constitution of Pre-diabetic State in C57BL6J Mice Versus Sprague Dawley Rats", American Diabetes Association , San Francisco, ABD, 14-17 Haziran 2014, pp.659-659

Taşyürek M.H., **Eksi Y.E.**, Altunbaş H.A., Balci M.K., Şanlıoğlu S., "Generation of A Lentiviral Vector Encoding Human Glucagon Like Peptide-1 (GLP-1) for Diabetes Treatment", ESGCT AND NVGCT COLLABORATIVE CONGRESS, 2014, The Hauge, Amsterdam, HOLLANDA, 23-26 Ekim 2014, vol.25, no.11, pp.87-88

Eksi Y.E., Taşyürek M.H., Şanlıoğlu A.D., Balci M.K., Şanlıoğlu S., "Construction of A Lentiviral Vector Encoding Human Vasoactive Intestinal Peptide for Diabetes Treatment", Human Gene Therapy ESGCT and NVGCT Collaborative Congress, THE HAGUE, HOLLANDA, 23-26 Ekim 2014, pp.P123-P123

Eksi Y.E., Taşyürek M.H., Balık O., Altunbaş H.A., Balci M.K., Şanlıoğlu S., "Constitution of Pre-diabetic State in C57BL6J Mice Versus Sprague Dawley Rats", American Diabetes Association, SAN FRANCİSCO, ABD, 13-17 Haziran 2014, vol.63, pp.A659-A659

Taşyürek M.H., **Eksi Y.E.**, Şanlıoğlu A.D., Balci M.K., Şanlıoğlu S., "Therapeutic efficacy of an HIV-Based Lentivirus Mediated Vasoactive İntestinal Peptide Gene Delivery for Diabetes", The XXII. Annual ESGCT Congress in collaboration with the NCGCT, Hague, HOLLANDA, 23-26 Ekim 2014, pp.A86-A86

Eksi Y.E., Taşyürek M.H., Altunbaş H.A., Şanlıoğlu S., "Induction of Diet İnduced Obesity in Sprague Dawley Rats as a Model of Type 2 Diabetes", The XXII. Annual ESGCT Congress in collaboration with the NCGCT, Hague, HOLLANDA, 23-26 Ekim 2014, pp.A60-A61

Balık O., Taşyürek M.H., **Eksi Y.E.**, Altunbaş H.A., Balci M.K., Şanlıoğlu S., "C57bl6j Farelerde Diyabet İndüksiyonu Pankreas Kökenli Glp-1 Sentezini Arttırdı", 50. Ulusal Diyabet Kongresi, ANTALYA, TÜRKIYE, 23-27 Nisan 2014, ss.166-166

Eksi Y.E., Taşyürek M.H., Şanlıoğlu A.D., Balci M.K., Şanlıoğlu S., "Comperative efficacy of Diet İnduced Obesity in c57bl/6j versus Balb/C mice for gene Threapy applications", The XXII. Annual ESGCT Congress in collaboration with the NCGCT, Hague, HOLLANDA, 23-26 Ekim 2014, pp.A60-A60

Taşıyürek M.H., Balık O., **Eksi Y.E.**, Altunbaş H.A., Balci M.K., Şanlıoğlu S., "Diyabet Hastalığına Karşı Geliştirilen İnsan Vasoaktif İntestinal Peptid Kodlayan HIV tabanlı Gen Tranasfer Vektörlerinin Yapımı ve Testi", 50. Ulusal Diyabet Kongresi, ANTALYA, TÜRKİYE, 23-27 Nisan 2014, ss.168-168

Taşıyürek M.H., **Eksi Y.E.**, Altunbaş H.A., Balci M.K., Şanlıoğlu S., "Up Regulation of Glukagon Like Peptide-1 Expression in Pancreases of C57BL6j Mice with Diabetes", The XXII. Annual ESGCT Congress in collaboration with the NCGCT, Hague, HOLLANDA, 23-26 Ekim 2014, pp.A63-A63

Eksi Y.E., Taşıyürek M.H., Balık O., Altunbaş H.A., Balci M.K., Şanlıoğlu S., "C57bl6j Fareler Diyetle Sprague Dawley Sıçanlara Kıyasla Daha Hızlı Ve Etkin Prediyabet Gelişimi Gösterdi", 50. Ulusal Diyabet Kongresi, ANTALYA, TÜRKİYE, 23-27 Nisan 2014, ss.167-167