

**T.C.  
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ÖNEMLİ PANKREATİK TRANSKRİPSİYON FAKTÖRLERİNİN SENTETİK  
mRNA'LARININ DİZAYNI, İN VİTRO ÜRETİMİ VE BETA HÜCRE  
FARKLILAŞMASINDAKİ ROLLERİNİN İNCELENMESİ**

**Mehmet YILDIZ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI**

**2017**

**T.C.  
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ÖNEMLİ PANKREATİK TRANSKRİPSİYON FAKTÖRLERİNİN SENTETİK  
mRNA'LARININ DİZAYNI, İN VİTRO ÜRETİMİ VE BETA HÜCRE  
FARKLILAŞMASINDAKİ ROLLERİNİN İNCELENMESİ**

**Mehmet YILDIZ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI**

**Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi  
tarafından FYL-2016-1868 nolu proje; TÜBİTAK 213S198 nolu  
proje ile desteklenmiştir.**

**2017**

**T.C.  
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ÖNEMLİ PANKREATİK TRANSKRİPSİYON FAKTÖRLERİNİN SENTETİK  
mRNA'LARININ DİZAYNI, İN VİTRO ÜRETİMİ VE BETA HÜCRESİ  
FARKLILAŞMASINDAKİ ROLLERİNİN İNCELENMESİ**

**Mehmet YILDIZ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI**

Bu tez 05/07/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği ile kabul edilmiştir.

Yrd. Doç. Dr. Ersin AKINCI  
Yrd. Doç. Dr. Hasan MEYDAN  
Yrd. Doç. Dr. Erdal EROĞLU



## ÖZET

### ÖNEMLİ PANKREATİK TRANSKRİPSİYON FAKTÖRLERİNİN SENTETİK mRNA'LARININ DİZAYNI, IN VITRO ÜRETİMİ VE BETA HÜCRESİ FARKLILAŞMASINDAKİ ROLLERİNİN İNCELENMESİ

Mehmet YILDIZ

Yüksek Lisans Tezi, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Ersin AKINCI

Haziran 2017, 43 sayfa

Diyabet tedavisinde kullanımının mümkün olmasından dolayı pankreatik beta hücresi programlama büyük bir ilgi görmüştür. Çeşitli çalışmalarda, viral vektörler aracılığıyla, önemli pankreatik transkripsiyon faktörlerinin somatik hücrelerde yüksek ekspresyonu sonucunda somatik hücrelerden insülin sentezleyebilen beta hücresi programlanabildiği gösterilmiştir. Ancak viral vektörlerin kullanımındaki kaygılar, genin ekspresyonu ve hücre içine taşınımı konusunda bilim insanlarını yeni arayışlara sokmuştur. mRNA'ların *in vitro* sentezi ve transfeksiyonu gen ekspresyonu için güvenli bir yöntemdir. Bu tez çalışmasında önemli insan pankreatik transkripsiyon faktörleri olan *Pdx1*, *Ngn3* ve *MafA* mRNA'larının dizaynı ve *in vitro* üretimi yapılmıştır. Ayrıca yapılan çalışmada bu mRNA'ların ekspresyon verimi hücre kültüründe gösterilmiştir. Yapılan çalışmada öncelikle ilgili genlerin Açık Okuma Çerçeveleri (ORF) ile modifiye edilmiş 5' ve 3' UTR'ların ligasyonu yapılmıştır. Ligasyon ürünü plazmide klonlanmış ve *in vitro* transkripsiyon için hazır hale getirilmiş, *in vitro* transkripsiyon yapılmıştır. Oluşturulan modifiye mRNA'ların kalitatif ve kantitatif analizleri yapılmış ve proteine translasyon verimleri incelenmiştir. *In vitro* transkripsiyonu yapılan mRNA'ların insan fibroblast hücrelerine başarılı bir şekilde transfekte edildiği gösterilmiştir. Translasyon sonucu oluşan proteinlerin nükleusta doğru bir şekilde lokalize olduğu gösterilmiştir. Sonuç olarak, dizayn edilen ve *in vitro* üretilen bu önemli pankreatik transkripsiyon faktörlerinin hücre programlama çalışmalarında kullanılabileceği gösterilmiştir.

**ANAHTAR KELİMELEER:** Hücre programlama, *in vitro* transkripsiyon, MafA, Ngn3, Pdx1, sentetik mRNA

**JÜRİ:** Yrd. Doç. Dr. Ersin AKINCI (Danışman)

Yrd. Doç. Dr. Hasan MEYDAN

Yrd. Doç. Dr. Erdal EROĞLU

## ABSTRACT

### DESIGNING AND IN VITRO PRODUCTION OF IMPORTANT PANCREATIC TRANSCRIPTION FACTORS' mRNAs and INVESTIGATION of THEIR ROLES IN BETA CELL FORMATION

Mehmet YILDIZ

MSc Thesis in Agricultural Biotechnology  
Supervisor: Assistant Professor Dr. Ersin Akıncı  
June 2017, 43 pages

Direct reprogramming of pancreatic beta cells has a great interest due to its possible use in diabetes treatment. Various studies demonstrated direct reprogramming of insulin expressing beta cells from other somatic cells by over-expressing important pancreatic transcription factors through viral vectors. However, concerns about using viral vectors in clinic have let the scientist to find new approaches for gene delivery and expression. *In vitro* synthesis and transfection of mRNAs is a safer strategy for ectopic gene expression. In this thesis study we pursued to design and *in vitro* synthesize human pancreatic transcription factors' mRNAs; *Pdx1*, *Ngn3* and *MafA*. We also aimed to assess their expression efficiency in cultured cells. First we ligated the open reading frames of these genes to modified 5' and 3' UTRs. Ligation products were then cloned into a plasmid and subjected to *in vitro* transcription to get their corresponding mRNAs. Modified mRNAs were subsequently examined for their quality, quantity, and protein translation efficiency. *In vitro*-transcribed mRNAs were successfully transfected to the human fibroblast cells. Efficiently translated proteins were correctly localized into the nucleus. It is concluded that pancreatic mRNAs designed and *in vitro*-transcribed in this study can be used in further direct beta cell reprogramming studies.

**KEYWORDS:** Direct cell reprogramming, *in vitro* transcription, MafA, Ngn3, Pdx1, synthetic mRNA,

**COMMITTEE:** Asst. Prof. Dr. Ersin AKINCI (Supervisor)  
Asst. Prof. Dr. Hasan MEYDAN  
Asst. Prof. Dr. Erdal EROĞLU

## ÖNSÖZ

Hücresel programlama deneyleriyle birlikte, zamanın göreliliği hakkındaki gözlemlerimi de yapmış bulduğum; geçen üç yıllık süreyi minik bir an gibi algıladığım yüksek lisans eğitimimin sonuna geldim.

Bu yorucu ve stresli dönemde; hücrelerimdeki stres gen ekspresyonunu en aza indiren, vücudumdaki serotonin miktarını en yüksek seviyede tutan güzel insanlara; Mutluluk Ana Transkripsiyon Faktörlerine teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Bana, laboratuvarında yüksek lisans yapma şansı tanıyan, sorduğum sorulara sabırla cevap veren, İngilizce öğrenmeye katkı sağlayan, bilimsel ve teknolojik gelişmeleri takibimde destek olan ve hücresel tedaviyi ayrıntılarıyla öğreten hocam; akademik ahlak ilkelerini öğreten ustam, değerli danışmanım Ersin Akıncı'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Üniversitedeki öğrenim sürem boyunca aynı laboratuvarla birlikte çalışma şansı bulduğum Pelin Ünal ve Gamze Badakul'a rekombinant DNA üretimi ve Western Blot deneyleri sırasındaki üstün çabaları ve emekleri; stajyer öğrencimiz Hakkı Özkaya'ya yardımları için teşekkür ederim. Bu eğlenceli süreç onlarsız çok zor ve karmaşık olabilirdi. Beta hücrelerimize zarar vermemek için tükettiğimiz tatsız yiyecek ve içecekler onlarla lezzet buldu.

Tezin hazırlanması sırasında maddi ve manevi her zaman yanımda olan kardeşlerim Yasin Yıldız, Yakup Yıldız ve İlyas Yıldız'a; inkübasyon sürelerinde beni hiç yalnız bırakmayan, deneylerimi laboratuvar dışına taşımamda yardımcı olan arkadaşlarım Sergen Göçen, Oğuzhan Mirzaoglu, Gamze Koçak, Filiz Köksel, Sibel Altın, Bahar Tosun, İsmet Çakmak ve Meltem Özdemir'e teşekkür ederim. Bu tezin hazırlanması sırasındaki moral ve motivasyonumu onlara borçluyum.

Bu tezin hazırlanmasında destek veren kuruluşlara; TÜBİTAK ve Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Koordinasyon Birimine teşekkür ederim.

Tezimi, yetiştiği sosyal çevrenin yeteneği ve zekâsını keşfedemediği, bana sağladığı mitokondrilerle yaşam enerjisi kaynağım, akademik kariyerim için hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan, içinde bulunduğu koşulları zorlayarak bana her zaman destek olan ilk hocama; canım anneme ithaf ediyorum.

## İÇİNDEKİLER

|                                                                                                                |      |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| ÖZET .....                                                                                                     | i    |
| ABSTRACT .....                                                                                                 | ii   |
| ÖNSÖZ .....                                                                                                    | iii  |
| İÇİNDEKİLER .....                                                                                              | iv   |
| SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ .....                                                                           | vi   |
| ŞEKİLLER DİZİNİ.....                                                                                           | vii  |
| ÇİZELGELER DİZİNİ .....                                                                                        | viii |
| 1.GİRİŞ .....                                                                                                  | 1    |
| 2. KURAMSAL BİLGİLER ve KAYNAK TARAMALARI .....                                                                | 2    |
| 2.1. Pankreas ve Gelişimi.....                                                                                 | 2    |
| 2.2. Önemli Pankreatik Transkripsiyon Faktörleri: <i>Pdx1</i> , <i>Ngn3</i> ve <i>MafA</i> .....               | 2    |
| 2.3. İnsülin Metabolizması.....                                                                                | 4    |
| 2.4. Diabetes Mellitus .....                                                                                   | 5    |
| 2.5. Diyabet Hastalığında Hücresel Tedavi Yaklaşımları.....                                                    | 5    |
| 3. MATERYAL ve METOD .....                                                                                     | 9    |
| 3.1. İlgili Genlerin ORF Dizilerinin Çoğaltılması İçin Gereken Primerler .....                                 | 9    |
| 3.2. Ligasyon İçin Kullanılan UTR'lar ve Splint Oligo Dizileri .....                                           | 10   |
| 3.3. qPCR İçin Kullanılan Primerler .....                                                                      | 11   |
| 3.4. İmmünofloresan ve Western Blot İçin Kullanılan Antikorlar .....                                           | 12   |
| 3.5. Deneylerde Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması.....                                                     | 13   |
| 3.6. DNA Örneklerinin Yürütülmesi.....                                                                         | 16   |
| 3.7. RNA Örneklerinin Yürütülmesi.....                                                                         | 16   |
| 3.8. Kompetan Hücre Hazırlanması.....                                                                          | 16   |
| 3.9. DNA ve RNA Örneklerinin Miktar Tayininin Yapılması .....                                                  | 16   |
| 3.10. Çift Zincirli DNA'nın Tasarımı ve Hazırlanması .....                                                     | 16   |
| 3.11. <i>In vitro</i> Transkripsiyon Reaksiyonu (IVT) .....                                                    | 18   |
| 3.12. İnsan Hücre Kültürü.....                                                                                 | 18   |
| 3.13. mRNA'ların İnsan Hücrelerine Transfeksiyonu .....                                                        | 19   |
| 3.14. İmmünofloresan Boyama .....                                                                              | 20   |
| 3.15. Hücre Canlılık Testi .....                                                                               | 20   |
| 3.16. Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qPCR) .....                                                      | 21   |
| 3.17. Western Blot .....                                                                                       | 21   |
| 3.18. Hücre Farklılaştırma Deneyi .....                                                                        | 22   |
| 4. BULGULAR.....                                                                                               | 23   |
| 4.1. <i>Pdx1</i> , <i>Ngn3</i> ve <i>MafA</i> Çift Zincirli Kalıp DNA'larının Üretilmesi.....                  | 23   |
| 4.2. <i>Pdx1</i> , <i>Ngn3</i> ve <i>MafA</i> mRNA'larının <i>In vitro</i> Transkripsiyonun Gösterilmesi ..... | 24   |

|                                                                                                                                                                    |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.3. Sentezlenen <i>Pdx1</i> , <i>Ngn3</i> ve <i>MafA</i> mRNA'larının İnsan BJ Fibroblast Hücrelerinde Transfeksiyonun Gösterilmesi .....                         | 25 |
| 4.4. Sentezlenen <i>Pdx1</i> , <i>Ngn3</i> ve <i>MafA</i> mRNA'larının İnsan Hücrelerinde <i>İn vivo</i> Translasyonu ve Doğru Lokalizasyonunun Gösterilmesi ..... | 26 |
| 4.5. Sentezlenen <i>Pdx1</i> , <i>Ngn3</i> ve <i>MafA</i> mRNA'larının İnsan Hücrelerinde Transfeksiyonundan Sonra Hücrelerin Canlılıklarının İncelenmesi .....    | 28 |
| 5. TARTIŞMA .....                                                                                                                                                  | 29 |
| 6.SONUÇ .....                                                                                                                                                      | 33 |
| 6.1. <i>Pdx1</i> , <i>Ngn3</i> ve <i>MafA</i> Çift Zincirli Kalıp DNA'nın Tasarımı .....                                                                           | 33 |
| 6.2. <i>Pdx1</i> , <i>Ngn3</i> ve <i>MafA</i> mRNA'larının <i>İn vitro</i> Transkripsiyonu (IVT) .....                                                             | 33 |
| 6.3. Sentezlenen <i>Pdx1</i> , <i>Ngn3</i> ve <i>MafA</i> mRNA'larının İnsan Hücrelerinde Ekspresyonu .....                                                        | 33 |
| 6.4. Sentezlenen <i>Pdx1</i> , <i>Ngn3</i> ve <i>MafA</i> mRNA'larının İnsan Hücrelerinde Translasyonu ve Doğru Lokalizasyonu .....                                | 34 |
| 6.5. Sentezlenen <i>Pdx1</i> , <i>Ngn3</i> ve <i>MafA</i> mRNA'larının İnsan Hücrelerine Transfeksiyonundan Sonra Hücrelerin Canlılıklarının İncelenmesi .....     | 34 |
| 6.6. Sentezlenen <i>Pdx1</i> , <i>Ngn3</i> ve <i>MafA</i> mRNA'larını Hücre Farklılaşmasındaki Rollerinin İncelenmesi .....                                        | 34 |
| 7.KAYNAKLAR .....                                                                                                                                                  | 35 |
| ÖZGEÇMİŞ                                                                                                                                                           |    |

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

### Simgeler

|          |              |
|----------|--------------|
| $\mu$ l  | mikrolitre   |
| $\mu$ m  | mikrometre   |
| bp       | baz çifti    |
| dk       | dakika       |
| ml       | mililitre    |
| s        | saniye       |
| vd       | ve diğerleri |
| $\alpha$ | alfa         |
| $\beta$  | beta         |
| $\gamma$ | gamma        |
| $\delta$ | delta        |

### Kısaltmalar

|       |                                     |
|-------|-------------------------------------|
| DMEM  | Dulbescco's Modified Eagle's Medium |
| DMSO  | Dimetil sülfoksit                   |
| DEPC  | Dietilprokarbonat                   |
| DNA   | Deoksiribonükleik asit              |
| FBS   | Fötal sığır serumu                  |
| GFP   | Yeşil Floresan Protein              |
| IVT   | In vitro transkripsiyon             |
| kD    | kilo Dalton                         |
| NEAA  | Esansiyel Olmayan Amino Asit        |
| PCR   | Polimeraz Zincir Reaksiyonu         |
| PKR   | Protein Kinaz R                     |
| PP    | Pankreatik Polipeptit               |
| RIG-1 | Retinoik Asit İndüklenebilir Gen 1  |
| RNA   | Ribonükleik asit                    |
| STZ   | Streptozotocin                      |
| UTR   | Translasyon Olmayan Bölge           |
| ORF   | Açık Okuma Çerçevesi                |
| PBS   | Fosfat Tamponu                      |
| PNM   | Pdx1, Ngn3, MafA                    |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

|                                                                                                                                                                               |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 4. 1. <i>Pdx1</i> , <i>Ngn3</i> ve <i>MafA</i> ORF'lerinin PCR sonrası agaroz jel görüntüsü.....                                                                        | 23 |
| Şekil 4. 2. <i>Pdx1</i> , <i>Ngn3</i> ve <i>MafA</i> ORF'lerin 5' ve 3' UTR'ler ile ligasyonu sonrası agaroz jel görüntüsü .....                                              | 24 |
| Şekil 4. 3. UTR eklenmiş <i>Pdx1</i> , <i>Ngn3</i> ve <i>MafA</i> ORF'lerinin PCR sonrası jel görüntüsü ve Poly(T) kuyruğu eklendikten sonra agaroz jel görüntüsü. ....       | 24 |
| Şekil 4. 4. <i>In vitro</i> transkribe edilen <i>Pdx1</i> , <i>Ngn3</i> , <i>MafA</i> ve <i>GFP</i> RNA'larının spektrofotometre ile OD değerinin ölçülmesi. ....             | 25 |
| Şekil 4. 5. <i>In vitro</i> transkribe edilen <i>Pdx1</i> , <i>Ngn3</i> , <i>MafA</i> ve <i>GFP</i> RNA'larının denatüre agaroz jel görüntüsü. ....                           | 25 |
| Şekil 4. 6. <i>In vitro</i> transkribe edilen <i>Pdx1</i> , <i>Ngn3</i> ve <i>MafA</i> RNA'larının insan fibroblast hücrelerinde ekspresyonu. ....                            | 26 |
| Şekil 4. 7. İnsan hücrelerindeki PDX1, NGN3 ve MAFA proteinlerinin Western Blot görüntüleri. ....                                                                             | 26 |
| Şekil 4. 8. İnsan hücrelerindeki PDX1, NGN3 ve MAFA proteinlerinin immünofloresan görüntüleri.....                                                                            | 27 |
| Şekil 4. 9. <i>In vitro</i> transkribe edilen <i>Pdx1</i> , <i>Ngn3</i> ve <i>MafA</i> RNA'larının insan fibroblast hücrelerinde transfeksiyon ve translasyon verimleri. .... | 27 |
| Şekil 4. 10. <i>In vitro</i> transkribe edilen <i>Pdx1</i> , <i>Ngn3</i> ve <i>MafA</i> RNA'larının transfeksiyonundan sonra insan hücrelerinin canlılık testi. ....          | 28 |

## ÇİZELGELER DİZİNİ

|                                                                                                  |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Çizelge 3.1. İlgili genlerin Açık Okuma Çerçevesini (ORF) çoğaltmak için gereken primerler ..... | 9  |
| Çizelge 3.2. Ligasyon için kullanılan UTR'lar ve splint oligolar .....                           | 10 |
| Çizelge 3.3. qPCR için kullanılan primerler .....                                                | 11 |
| Çizelge 3.4. İmmünofloresan ve Western Blot için kullanılan birincil ve ikincil antikorlar ..... | 12 |



## 1.GİRİŞ

Klasik diyabet tedavisi için kullanılan insülinle tedavi bireyin sağlıklı bir yaşam sürmesi için yeterli değildir. Bu hastaların kalıcı şekilde tedavisi için gen tedavisi ya da hücre nakil çalışmaları oldukça önemlidir. Farklı hücre hatlarından beta hücrelerinin programlanması, olgunlaşmış adacık hücrelerin replikasyon çalışmaları ve gen terapi metotları diyabet tedavisinde gen ve hücresel tedavi çalışmalarının başlamasına sebep olmuştur. Beta hücresinin sadece insülin sentezlemesi yeterli değildir. Bireylerde glukoz metabolizmasının sağlıklı bir şekilde gerçekleşmesi için glukozu duyarlı insülin sentezleyebilen beta hücre benzeri hücreler programlamak oldukça önemlidir. Daha önce yapılan çalışmalarda farklı hücre kaynaklarından glukozu duyarlı beta hücre benzeri hücreler üretilmiş, *in vivo* aktarım sonucunda organizmadaki glukoz metabolizması düzenlenebilmiştir.

Pankreas oluşumu ve beta hücre farklılaşması sırasında rol oynayan birçok transkripsiyon faktörü iyi bilinmektedir. Bu transkripsiyon faktörleri arasında *Pdx1* pankreas oluşumu ve beta hücre farklılaşmasında kritik bir rol oynar ve beta hücre olgunlaşmasının devamlılığını sağlar. *Ngn3*, pankreatik endokrin hücre farklılaşmasında önemli bir rol oynayan bir gendir. İnsülin gen transkripsiyonunun güçlü bir aktivatörü olarak *MafA*, beta hücre farklılaşması ve fonksiyonunun final basamağında etkilidir.

Daha önce yapılan bazı araştırmalarda beta hücresi programlaması sırasında kullanılan *Pdx1*, *Ngn3* ve *MafA* transkripsiyon faktörleri, beta hücre programlama verimliliğini ve programlanan hücrenin işlevini arttırmıştır. Binden fazla pankreas bağlantılı transkripsiyon faktörünün arasından seçilen *Pdx1*, *Ngn3* ve *MafA* transkripsiyon faktörlerinden oluşan kombinasyonla farklı hücre kaynaklarından beta hücre benzeri hücreler oluşturulabilmiştir.

Bu tez çalışmasında, *Pdx1*, *Ngn3* ve *MafA* ORF'leri (Açık Okuma Çerçevesi) fare beta globin 3'-UTR ve T7 promotörü yanında güçlü kozak sekansı içeren 5'-UTR ile rekombinant DNA hazırlanmıştır. Hazırlanan bu rekombinant DNA'dan kalitatif ve kantitatif olarak yüksek verimde *in vitro* transkripsiyon yapılmış ve RNA'lar elde edilmiştir. Elde edilen RNA'lar insan hücrelerine yüksek oranda transfekte edilmiş ve hücrelerde toksik etki yaratmamıştır. Transkribe edilen RNA'lar doğru bir şekilde translasyona uğramış ve hücrede doğru yerde lokalize olduğu gösterilmiştir. Beta hücresi programlanmasında güvenle kullanılabilen, pankreatik gelişim için gerekli olan önemli transkripsiyon faktörlerinin sentetik mRNA'larının dizaynı, *in vitro* üretimi ve hücredeki ekspresyonu gösterilmiştir. Böylelikle genoma entegre olmayan, dozaj ayarlaması yapılabilen, hücrede her hangi bir toksik etki yaratmayan ve efektif bir şekilde hücre programlanmasında kullanılabilen insan önemli transkripsiyon faktörleri olan *Pdx1*, *Ngn3* ve *MafA* sentetik mRNA'ları dizaynı ve *in vitro* üretim protokolü elde edilmiştir.

## 2. KURAMSAL BİLGİLER ve KAYNAK TARAMALARI

### 2.1. Pankreas ve Gelişimi

İnsanda, fetüsün gelişimi sırasında dördüncü haftada oluşmaya başlayan pankreas, bağırsağın kaudal tarafında ön ve arka pankreas tomurcukları şeklinde gelişmeye başlar. Bu tomurcuklar sağa doğru yönelir ve ventral pankreasın başladığı bölgenin yanında birleşirler. Daha sonra duodenum ilerledikçe oluşan pankreas da sola doğru yönelir. Erişkinde başın yalnızca kaudal tarafı ve *processus uncinatus* ön pankreastan köken alır. Başın kranial bölümü, gövdenin tamamı ve kuyruk dorsal pankreastan köken alır. Dorsal pankreas kanalının çoğu bölümü ventral pankreas kanalıyla birleşir, esas pankreas kanalı böylelikle oluşur. Ufak bir bölge ek kanal (Santorini) şeklinde kalır. Ventral ve dorsal pankreas kanalı insanların %5-10'unda birleşmez, pankreas bölümlerinin büyük bir bölümü Santorini kanalıyla minör papillaya açılır. Yalnızca ventral pankreasın ufak bir bölgesi safra kanalıyla birlikte papilla veteriye açılır (McHenry vd 1997, Junqueira vd 1998).

Pankreas hem endokrin (iç salgı bezi), hem de ekzokrin (dış salgı bezi) salgı yapabilen bir organdır. Bu salgı bezinin doğru bir şekilde çalışması yaşamın devamlılığı için elzem olup bu salgılar Langerhans adacıklarından salınırlar (McHenry vd 1997). Yapılan son tespitlere göre Langerhans adacıklarının; alfa, beta, delta, epsilon ve pankreatik polipeptit (PP) olmak üzere 5 farklı hücre tipinden oluştuğu gözlenmiştir. Endokrin sistemde görev alan bu hücreler, pankreasın yaklaşık %1-2'sini oluşturmaktadır. Bu hücrelerin her biri glisemik kontrolün sağlanmasında büyük rol oynamaktadır. Adacıkta bulunan hücre tipi kompozisyonu, hem bireyler arasında hem de pankreasının farklı bölgelerinde farklılıklar göstermektedir. Ancak bu adacıkların ortalama %54'ü insülin üreten beta hücreleri, %35'i glukagon sentezleyen alfa hücreleri, %11'i ise somatostatin salgılayan delta hücreleri ve çok az sayıda epsilon ve pankreatik polipeptit hücrelerinden oluşmaktadır. (Brissova vd 2005, Cabrera vd 2006)

### 2.2. Önemli Pankreatik Transkripsiyon Faktörleri: *Pdx1*, *Ngn3* ve *MafA*

İnsülin Promotör Faktör 1 (IPF1) olarak da bilinen Pankreatik ve duodenal homeobox 1 (PDX1), homodomain oluşumlu, pankreatik  $\beta$  hücrelerine karakteristik bir transkripsiyon faktördür. Pankreasın gelişimi sırasında,  $\beta$  hücresi öncül hücrelerinin  $\beta$  hücresine farklılaşması ve  $\beta$  hücre olgunlaşması için gereklidir. Postnatal  $\beta$  hücresinde insülin gen ekspresyonu için anahtar bir düzenleyicidir (Ashizawa vd 2004, Feanny vd 2008). Farelerin erken embriyonik gelişim dönemine bakıldığında *Pdx1* ekspresyonu ilk olarak embriyonik 8,5 günde pankreasın dorsal ve ventral tomurcuğunda görülmeye başlanır. *Pdx1* büyük çoğunlukla adacıklarda bulunan  $\beta$  hücresinde aktiftir.  $\beta$  hücresi olgunlaşmasında ve glukoz duyarlı  $\beta$  hücresi farklılaşmasında; insülin, glukokinaz, adacık amiloid polipeptiti ve glukoz tip 2 transportırı gibi  $\beta$  hücresi spesifik genlerin ekspresyonunda önemli bir anahtar rol oynar. *Pdx1* genindeki homozigot mutasyonlar pankreas gelişimindeki olumsuzluklar nedeniyle öldürücüdür (Liu vd 2007, Feanny vd 2008).  $\beta$  hücresinde bu gen knock-out edildiğinde diyabet, knock-down yapıldığında ise insülin segregasyonunda azalma gözlenmiştir (Gidekel vd 2009).

*Pdx1* geninin yüksek oranda ekspresyonu, bening HEK293 insan hücrelerinde, pankreatik kanser hücre hatları olan PANC1, MiaPaca2 ve insülinoma hücreleri olan Min6 ve  $\beta$ TC6 hücrelerinde hücre bölünmesini, invazyonunu arttırdığı ve bununla birlikte tümör oluşumunu da arttırdığı gözlenmiştir (Tirone vd 2004, Wang vd 2004, Liu vd 2007, Wu vd 2014, Wu vd 2015).

*Pdx1*<sup>+/-</sup> mutant insan embriyonik kök hücrelerinde yapılan farklılaştırma çalışmalarında, kök hücrelerin endokrin farklılaşması için *Pdx1* geninin sadece bir kopyasının yeterli olduğu gözlenmiştir (Zengrong vd 2016). Yaşları 17 ile 67 arasında değişen bireyler incelendiğinde ise *Pdx1* geni heterozigot olan bireylerin diyabet hastası olduğu gözlemlenmiştir (Stoffers vd 1997). *Pdx1* geninin heterozigot olması durumunda beta hücresi defektlerinin olduğu ve/veya olgun bireylerde beta hücrelerinin yaşamını devam ettiremediği gözlemlenmiştir (Brissova vd 2002, Johnson vd 2003, Brissova vd 2005). *Pdx1*<sup>+/-</sup> farelerde ise her hangi bir gelişim abnormalisine rastlanmamıştır (Jonsson vd 1994, Offield vd 1996).

Sonuç olarak; *Pdx1*<sup>+/-</sup> bireylerde, allellerden birinin kaybı PDX1 proteinin ekspresyonunda azalma göstermiştir. Bu azalma endokrin hücre farklılaşmasına zarar vermemiş fakat sağlıklı beta hücresi oluşumunu engellemiştir. *Pdx1* genindeki bu dozaj gereksinimi kök hücrelerin endokrin farklılaşması, projenitör hücrelerin beta hücresine dönüşmesi, beta hücresi olgunlaşması ve yaşamını devamlılığı için oldukça önemli olduğunu göstermiştir (Hani vd 1999).

Neurogenin-3 (NGN3) endokrin projenitör hücrelerde eksprese edilen bir transkripsiyon faktördür. Bu transkripsiyon faktör aynı zamanda pankreas ve ince bağırsağın özelleşmesinde de görev alır. Nöroektoderimde nöral öncül hücrelerinin farklılaşmasında da rol oynayan basic-heliks-loop-heliks transkripsiyon faktörlerinden oluşan bir aileye aittir (Wang vd 2006). CRISPR sistemi kullanılarak embriyonik kök hücrelerde *Ngn3* geninde homozigot delesyon yapılmış; bu delesyonla protein kodlama sekansı, promotörü ve DNA bağlanma domaini olan basic-helix-loop-helix bölgesini de içeren 526 baz çifti uzunluğunda DNA bölgesi knock-out yapılarak mutant bir hücre hattı oluşturulmuştur. Yabani hücrelerin çok büyük bir kısmının endoderme farklılaştırılabilirdiğini, fakat mutant hücrelerin çok az bir kısmının endoderme farklılaştırıldığı, böylelikle insan hücrelerinin endokrin farklılaşması için *Ngn3* geninin önemli olduğu fakat mutlak şart olmadığı gösterilmiştir. Aynı çalışmada; *Ngn3*<sup>-/-</sup> embriyonik kök hücrelerinde beta hücre farklılaşması protokolü uygulandığında, immünofloresan boyamaları ve FACS analizleri sonucunda hücrelerin yaklaşık olarak %0,5'inin beta hücre karakterinde olduğu fakat bu hücrelerin glukoz duyarlı olmadığı gözlenmiştir. Bu yüzden *Ngn3* geninin glukoz-duyarlı  $\beta$ -benzeri hücrelerin programlanması için oldukça önemli olduğu düşünülmektedir. *Ngn3* geninin zamana bağlı aktivasyonu endokrin farklılaşmasında önemli bir dönüm noktasıdır. Polihormonel hücrelerden  $\beta$  hücresi oluşma sırasında NGN3 çok önemli bir ana transkripsiyon faktördür (Zengrong vd 2016).

*MafA* memelilerde  $\beta$ -hücre karakterizasyonu ve bu hücrelerin glukoz duyarlı olmasından sorumlu bir transkripsiyon faktörü kodlar. Bu zamana kadar yapılan çalışmalar bu transkripsiyon faktörünün  $\beta$  hücre olgunlaşması için gerekli olan ana transkripsiyon faktörü olduğunu göstermiştir (Sharma vd 1994, Ogino vd 1998, Kataoka

vd 2002, Matsuoka vd 2003). *MafA* geninin ekspresyon zamanı ve miktarı  $\beta$  hücre olgunlaşması için kritik bir rol oynar. Kemirgen ve insan  $\beta$  hücreleri arasında önemli birkaç farklılık vardır. Örneğin; farelerde beta hücresi olgunlaşmasında yalnızca *MafA* görev alırken insan hücrelerinde ise *MafA* ve *MafB* görev alır. İnsan hücrelerinde *MafA* ve *MafB* aynı görevi üstlenirler (Dai vd 2012, Guo vd 2013). Bu nedenle knock-out çalışmalarında *MafA* geninin insan  $\beta$  hücre maturasyonunda ana faktör olduğunu göstermek zor olsa da *in vitro*  $\beta$  hücresi programlamasında *MafA* geninin yüksek dozda ekspresyonu efektif şekilde kullanılmakta ve beta hücre olgunlaşmasını gerçekleştirdiği gösterilmektedir. Farelerde yapılan beta hücre programlama protokolleri insan hücrelerine uygulandığında genellikle başarılı sonuçlar vermektedir. Bu nedenle hücre programlama çalışmalarında beta hücresi olgunlaşması için insanlarda da *MafA* tercih edilir. Bu gen her ne kadar beta hücre olgunlaşması için gerekli olsa da beta hücresi fonksiyonları için de anahtar bir rol oynar. *MafA* knock-out farelerde, embriyonik dönemde ve doğumdan sonra adacık morfolojisinde her hangi bir sorun gözlenmemiş, gelişimin ilerleyen dönemlerinde beta hücresinin glukoz duyarlılığında büyük sorunların ortaya çıktığı gösterilmiştir (Zhang vd 2005). Farelerde gözlenen spesifik *MafA* delesyonları doğum sonrası ve ilerleyen gelişim dönemlerinde  $\beta$  hücresi fonksiyonlarında ve glukoz metabolizmasında sorunların olduğunu göstermiştir. Bu mutasyona sahip hayvanların beta hücrelerinde doğum sonrasında *Ins1*, *Ins2*, *Glut2*, *G6pc2* ve *Slc30a8* gen ekspresyonlarında düşüşler gösterilmiştir. Doğumdan sonra; gelişimin ilerleyen dönemlerinde, *MafA* genine bağlı olarak plazma insülin seviyesinin %40 azaldığı gösterilmiştir (Hang vd 2014).

### 2.3. İnsülin Metabolizması

Açlık ya da tokluk fark etmeksizin, bir bireyde, plazmadaki glukoz miktarı 4 ile 7 mM arasında bir değerde bulunmaktadır. Bağırsaklarda gerçekleşen glukoz emilimi, karaciğerde glukoz depolanması ve periferik dokulardaki glukoz alımı ile bu hassas denge sürekli olarak düzenlenmektedir. İnsülin, glukozun kaslarda ve yağ dokusunda farklı formlarda depolanmasını sağlarken hepatik glukozun da üretilmesini inhibe etmektedir. Böylelikle kandaki glukoz seviyesi sürekli bir şekilde dengede tutulmaktadır. İnsülin ayrıca hücre büyümesi ve farklılaşmasında da görev almaktadır, bazı maddelerin yağ olarak depolanmasını tetikler, karaciğer ve kanda lipogenezi kontrol eder, glikojen ve protein sentezinde görev alır, lipolizi inhibe eder, glikojenoliz ve protein parçalanmasında görev alır. İnsülin yokluğu ya da insülin direnci bu süreçlerin disregülasyonuna neden olur. İnsülin, hücre yüzeyinde bulunan Glukoz transportörü (GLUT4) yardımıyla hücre dışı ortamdan hücre içersine glukoz alımını artırır. Plazmada bulunan glukozun yaklaşık %75'i insülin yardımıyla kaslara taşınırken, yağ dokulara ise küçük bir bölümü taşınır (Klip vd 1990). Buna rağmen insülin reseptörü açısından knock-out farelerin kaslarında normal bir insülin toleransı varken (Bruning vd 1998), insülin duyarlı glukoz transportörleri knock-out farelerin insülin direncinin bozulduğu ve şişmanladıkları gözlenmiştir. Bu da kas ve karaciğerde meydana gelen insülin direncinden kaynaklanmaktadır (Abel vd 2001). İnsülin karaciğerde glukoz alımını stimüle etmese de, glikojenoliz glikoneosisi bloklar, glukojen sentezini stimüle eder bunlar açlık şekerini düzenler. İnsülinin doğru salınması beyin ve pankreatik beta hücrelerinde glukoz homeostazisinde önemlidir (Patti vd 1998, Kulkarni vd 1999, Gavrilova vd 2000, Abel vd 2001).

Olgun adacıklarda, glukozu duyarlı insülin segregasyonu; plazmadaki glukoz ve hücre içersindeki  $Ca^{2+}$  iyon konsantrasyonuna oldukça duyarlıdır. Hücre dışındaki glukoz konsantrasyonu bazal düzeyin üzerine çıktığında, glukoz GLUT2 transportörüyle  $\beta$  hücrelerine taşınır ve glukokinaz ile metabolize edilir bu da hücre içersindeki ATP/ADP oranını değiştirir. Oran değişimiyle  $K^+$ (ATP) kanalları kapanır ve hücre zarı depolarizasyona uğrayarak  $Ca^{2+}$  kanallarının açılması sağlanır. Hücre içersindeki  $Ca^{2+}$  iyon konsantrasyonunun artması insülinin hücre dışına salınımı için gerekli olan ana habercidir. Böylelikle insülin plazmaya salınmış olur (Wolheim vd 1981, Gilon vd 1993, Rutter vd 2001).

## 2.4. Diabetes Mellitus

Diabetes mellitus (şeker hastalığı), dünya çapında milyonlarca bireyi etkileyen yaygın bir hastalıktır. Uzun yıllar boyunca dünya sağlığı üzerindeki etkisi bilinmeyen bu hastalık, tanımlandıktan sonra, 21. yüzyılın en büyük sağlık sorunlarından biri olduğu fark edilmiştir (Zimmet 2000). Son iki yüzyılda dünya çapında hastalık teşhisi alan insan sayısı dramatik bir şekilde artmaktadır (Amos vd 1997, King vd 1998). Modern yaşamın getirdiği çevre sorunları, bireyin yaşam şekli ve beslenme alışkanlıkları, küreselleşmenin getirdiği yaşam sorunlarıyla beraber obezite ve diyabet hastalığı tanısı alan birey sayısı giderek artmaktadır. Bu nedenle son zamanlarda bilim insanlarının diyabet üzerindeki ilgisi artmış ve bu alanda çalışmalar yoğunlaşmıştır (Astrup vd 2000).

Diyabetin başlıca iki ana formu vardır. Tip 1 diyabet, büyük çoğunlukla oto-immün bozukluklardan kaynaklanan pankreatik adacıklardaki  $\beta$  hücrelerinin hasarı sonucunda meydana gelmektedir. Bu hasar sonucunda hücreler büyük çoğunlukla insülin segregasyonu yapamaz ve insülin metabolizmasında bozulmalar meydana gelir. Bu nedenle tip 1 diyabet hastaları, vücutlarına dışarıdan verilen insülin hormonuyla yaşamlarını sürdürmek zorundadırlar. Tip 2 diyabet ise erişkin diyabeti olarak bilinen, insülin direnci ve/veya insülin segregasyonunda meydana gelen sorunlardan kaynaklanan bir hastalıktır. Tip 2 diyabet hastaları çoğunlukla dışarıdan verilen insülin takviyesine ihtiyaç duymazlar. Fakat diyet ve oral hipoglisemik ajanlarla kandaki glukoz seviyesi kontrol edilemez ise bu hastalara da insülin takviyesi yapılabilir. Tip 1 diyabet hastaları, tip 2 diyabet hastalarına göre daha azdır. Hastaların yaklaşık %10'u tip-1 diyabetli iken yaklaşık %90'ı ise tip 2 diyabetlidir (Zimmet 1999).

## 2.5. Diyabet Hastalığında Hücresel Tedavi Yaklaşımları

Tip 1 diyabeti tedavi amacıyla Amerika Birleşik Devletleri'nde yılda ortalama 1300 hastaya sağlıklı pankreas nakli yapılmaktadır. Bu hastaların yaklaşık olarak %83'ünün bir sene içerisinde sağlığına kavuştuğu kaydedilmiştir. Ancak, uygun donörün bulunmasındaki güçlük, organ nakli gerçekleştirilen hastaların ömür boyunca immün sistemi baskılayıcı ilaçları kullanmak zorunda olması ve bunların yanında gelişen enfeksiyon riski bu tedavi yöntemini oldukça zorlaştırmaktadır. Bu zorlukları aşmak amacıyla son yıllarda organ nakli yerine önemli pankreatik salgı hücrelerini içeren adacık nakli çalışmaları başlamış ama hastaların yalnızca %8'inde başarılı sonuçlar alınmıştır. Ancak nakledilen adacıkların sayısının artırılması ve yeni immün

baskılayıcı sistemlerin kullanılması son yıllarda bu nakillerdeki başarı oranını arttırmıştır (Shapiro vd 2000).

Pankreatik adacıkların hasta bireylere nakliyle gerçekleşen hücre aktarım tedavisi, tip 1 diyabet hastalığının kalıcı tedavisini mümkün kılabilir. Fakat uygun donörün bulunması, immünolojik komplikasyonlar ve transplantın ömür süresi gibi sorunlar hücre transplantasyonu şansını azaltmaktadır (Shapiro vd 2006). Bu yüzden, hasta bireylerde yeterli insülin üretimi için gerekli olan hücreler farklı hücre kaynaklarından üretilmeye çalışılmıştır. Bu hücreler; embriyonik kök hücreler (ESCs), indüklenmiş pluripotent kök hücreler (iPSCs), hepatik hücreler, ekzokrin hücreleri ve diğer endokrin hücrelerden oluşmuştur (Zhou vd 2008, Kroon vd 2008, Collombat vd 2009, Talchai vd 2012, Al-Hasani vd 2013, Chera vd 2014, Pagliuca vd 2014, Sangan vd 2015).

Hücrelerin beta hücrelerine programlanmasında, pankreasın normal gelişim sürecinde rol oynayan önemli transkripsiyon faktörlerinin yüksek oranda eksprese edilmesi sağlanmış ve birkaç farklı çalışmada ise küçük moleküller kullanılarak bu önemli genlerin aktivasyonu sağlanmaya çalışılmıştır (Fomina-Yadlin vd 2010, Kubicek vd 2012, Pennarossa vd 2013, Xie vd 2013, Yi vd 2013).

*Pdx1*, *Ngn3* ve *MafA* (PNM) DNA tabanlı vektör sistemleri, birçok farklı hücrede *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda insülin pozitif beta hücre benzeri hücrelerin programlanmasında başarıyla kullanılmış ve programlanan hücrenin epigenetik markırlarının doğal beta hücre markırlarıyla örtüştüğü gösterilmiştir (Akinci vd 2012, Banga vd 2012, Yang vd 2013). Fare primer hepatositlerine multisistronik PNM içeren plazmit lipofektamin yardımıyla transfekte edilmiş, transfeksiyon sonucunda hücrelerin insülin salgılayabilen  $\beta$  hücre benzeri hücrelere dönüştüğü gözlenmiştir. Farklılaşan hücreler, STZ (streptozotosin) uygulaması yapılmış farelere nakledildiğinde hasta farelerin glukoz metabolizmasında iyileşme görülmüştür (Luo vd 2014).

Her bir PNM geni için adenoviral vektörler dizayn edilmiş ve bu vektörlerle *in vivo* fare deneyleri yapılmıştır. Sadece *Ngn3* ile transdükte olan asinar hücrelerin endokrin hücrelere farklılaştıkları gözlenmiştir. Daha sonra oluşan bu endokrin hücreleri; yalnızca *Ngn3* ile transdükte edildiklerinde  $\delta$  hücrelerine farklılaşma gözlenmiş, *Ngn3*'ün yanında *MafA* ile transdükte edildiklerinde  $\alpha$  hücrelerine farklılaşma gözlenmiş ancak  $\delta$  hücre farklılaşması bloklanmıştır. Endokrin karakterde hücrelere PNM genlerinin üçü aynı anda transdükte edildiğinde ise  $\beta$  hücre oluşumu gözlenmiş ve endokrin hücrelerinin  $\alpha$  ve  $\delta$  hücrelerine farklılaşması bloklanmıştır. Bu çalışmayla asinar hücrelerden pankreatik adacıkta bulunan  $\alpha$ ,  $\beta$  ve  $\delta$  hücrelerinin oluşabileceği gösterilmiştir (Li vd 2014).

PNM geni indüklenebilir transgenik farelerde PNM ekspresyonu sonucunda ince bağırsak hücrelerinden insülin sentezleyebilen ve glukozu duyarlı beta hücre benzeri hücrelerin oluştuğu gösterilmiş, oluşan bu hücrelerin hiperglisemik farelerde iyileştirme etkisinin olduğu ortaya koyulmuştur (Chen vd 2014). İnsan troit bezinden izole edilen troit nöroendokrin hücreleri PNM genleri içeren retrovirüsle transdükte edilmiş ve bu hücrelerin yaklaşık %56'sının insülin sentezleyebilen, glukozu duyarlı ve oto-immün

reaksiyondan etkilenmeyen beta hücre benzeri hücrelere programlandığı gösterilmiştir (Thulé vd 2014).

İnsan olgun hepatositleri kimyasal aktivasyonlu kültür ortamı içerisinde microRNA-302 (miR-302) ile transfeke edildiklerinde, bu hücrelerin; PNM genleri açısından pozitif, insülin salgıyalabilen  $\beta$  hücre benzeri hücrelere programlandığı gözlenmiştir (Lu vd 2014).

Beyin ölümü gerçekleşen hastalardan alınan pankreastan ekzokrin hücreleri izole edilmiş ve kültüre edilmiştir. *Pdx1*, *Ngn3*, *MafA* ve *Pax4* transkripsiyon faktörleri adenoviral vektörle hücrelere transfer edilmiştir. Gen transferi sonrasında hücrelerin yaklaşık olarak %45'nin adacık formunda görüldüğü; bu formda olan hücrelerin %80'inden fazlasının monohormonal insülin hücresi karakterinde olduğu gösterilmiştir (Lima vd 2016). Başka bir çalışmada ise; STZ uygulaması yapılarak  $\beta$  hücrelerinde defekt oluşturulmuş diyabetik farelere PNM genleri adenoviral vektörle *in vivo* olarak uygulanmış; sonuç olarak pankreatik ekzokrin hücrelerinden  $\beta$  hücre benzeri hücreler programlandığı gösterilmiştir (Cavelti-Weder vd 2016).

Mezankimal kök hücrelerden de  $\beta$  hücre programlanması yapılabilmektedir. Pankreatik dokudan ekzokrin hücreleri ayrılmış, izole edilen ekzokrin hücreleri önce süspansiyon kültürüne ardından da farklılaşma ortamı içeren adherent hücre kültürüne alınmıştır. Bu hücrelerin yaklaşık %90'nının mezankimal kök hücre yüzey markırları taşıdığı ve hücrelerin bir kısmının olgun beta hücre markırları olan *Pdx1*, *Ngn3* ve *MafA* genleri açısından pozitif olduğu da gösterilmiştir. Bu çalışmayla mezankimal kök hücrelerin beta hücre programlanması için iyi birer kaynak olduğu gösterilmiştir. (Lee vd 2016).

*Pdx1*, *Ngn3* ve *MafA* sentetik mRNA'ları AR42J pankreatik ekzokrin hücrelerine transfeke edildiğinde bu hücrelerden insülin salgılayabilen aynı zamanda beta hücre markırları; *Sur1*, *Kir6.2*, *Pcsk1*, and *Pcsk2* genleri açısından da pozitif olan hücrelerin programlandığı gösterilmiştir (Kobbas vd 2016).

H9 insan embriyonik kök hücreleri biyomimetik 3D skaffoltlarında kültüre edilerek organoidler oluşturulmuş ve oluşan bu organoidlerde pankreatik  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ , ve pankreatik polipeptit (PP) olduğu gözlenmiştir. *Ngn3*, *MafA*, *Pdx1*, *Ins* ve *Glut2* genleri açısından pozitif; beta hücre benzeri hücrelerin üretilmesi başarılı ve oluşan bu hücrelerin büyük çoğunluğunun sadece insülin salgıladığı fakat polihormonel hücre karakterinin bir sonucu olan glukagon, somatostatin, ya da PP segregasyonu yapmadığı gösterilmiştir (Wang vd 2017).

*Pdx1*, *Ngn3* ve *MafA* genleri adenoviral vektörle makakların karaciğerlerine *in vivo* transfeksiyon yapılmış ve sonuç olarak insülin sentezleyebilen beta hücre benzeri hücrelerin meydana geldiği gösterilmiştir (Hill vd 2017).

Transgenik farelerde yapılan çalışmalar yalnızca *MafA* geninin fazla ekspresyonu sonucu *Ngn3* pozitif hücrelerde *Pdx1* geni aktivasyonu sağlandığını ve bunun sonucunda insülin salgılayabilen  $\beta$ -hücrelerinin oluşabildiğini; yalnızca *Pdx1* geninin fazla ekspresyonu sonucunda ise  $\alpha$ -hücrelerinden  $\beta$ -hücrelerinin oluştuğunu

göstermiştir (Matsuoka vd 2017). Başka bir çalışmada ise; PNM polisistronik vektörü hazırlanmış ve farelerde yapılan *in vivo* deneylerde asinar hücrelerinden  $\beta$ -hücre benzeri hücrelerin programlandığı gösterilmiştir (Cavelti-Weder vd 2017).



### 3. MATERİYAL ve METOD

#### 3.1. İlgili Genlerin ORF Dizilerinin Çoğaltılması İçin Gereken Primerler

*Pdx1*, *Ngn3* ve *MafA* genlerinin açık okuma çerçevelerini (ORF) PCR ile çoğaltmak için gerekli olan primer listesi verilmiştir (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. İlgili genlerin Açık Okuma Çerçevelerini (ORF) çoğaltmak için gereken primerler

| Gen (Erişim numarası)     | ORF primerleri (5'-3')                                                        |
|---------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Pdx1</i> (NM_000209.3) | F: AACGGCGAGGAGCAGTA (5' fosfat içerir)<br>R: TCATCGTGGTTCCTGCGG              |
| <i>Ngn3</i> (NM_020999.3) | F: ACGCCTCAACCCTCG (5' fosfat içerir)<br>R: TCACAGAAAATCTGAGAAAGCC            |
| <i>MafA</i> (NM_201589.3) | F: GCCGCGGAGCTGGCGATGGGCGCC (5' fosfat içerir)<br>R: CTACAGGAAGAAGTCGGCCGTGCC |

(F: Forward, R: Reverse)

### 3.2. Ligasyon İçin Kullanılan UTR'lar ve Splint Oligo Dizileri

*Pdx1*, *Ngn3* ve *MafA* genlerinin çoğaltılan açık okuma çerçevelerine UTR ligasyonu yapmak için gerekli olan UTR ve splint oligo dizileri (Çizelge 3.2) verilmiştir.

Çizelge 3.2. Ligasyon için kullanılan UTR'lar ve splint oligolar

|                           |                                                                                                                                                                |
|---------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b><i>Pdx1</i></b>        |                                                                                                                                                                |
| 5'-Splint                 | GTACTGCTCCTCGCCCTTCATGGTGGCTCTTATATT<br>TCTTCTTACTCTTCT                                                                                                        |
| 3'-Splint                 | CCCGCAGAAGGCAGCTCATCGTGGTTCCTGCGGC<br>CG                                                                                                                       |
| <b><i>Ngn3</i></b>        |                                                                                                                                                                |
| 5'-Splint                 | ACCCGAGGGTTGAGGCGTCATGGTGGCTCTTATAT<br>TTCTTCTT                                                                                                                |
| 3'-Splint                 | CCCGCAGAAGGCAGCTCACAGAAAATCTGAGAAA<br>GC                                                                                                                       |
| <b><i>MafA</i></b>        |                                                                                                                                                                |
| 5'-Splint                 | CATCGCCAGCTCCGCGGCCATGGTGGCTCTTATAT<br>TTCTTCTT                                                                                                                |
| 3'-Splint                 | CCCGCAGAAGGCAGCCTACAGGAAGAAGTCGGCC<br>GT                                                                                                                       |
| <b>5'-UTR</b>             | <u>TTGGACCCTCGTACAGAAGCTAATACGACTCACTA</u><br><u>TAGGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAG</u><br><u>AAATATAAGAGCCACCATG</u>                                           |
| <b>3'-UTR</b>             | GCTGCCTTCTGCGGGGCTTGCCTTCTGGCCATGCC<br>CTTCTTCTCTCCCTTGCACCTGTACCTCTTGGTCTT<br>TGAATAAAGCCTGAGTAGGAAGTGAGGGTCTAGA<br><u>ACTAGTGTGCGACGC</u> (5' fosfat içerir) |
| <b>Template primerler</b> | F: TTGGACCCTCGTACAGAAGCTAATACG<br>R: GCGTCGACACTAGTTCTAGACCCTCA                                                                                                |
| <b>Kuyruk primerleri</b>  | F: TTGGACCCTCGTACAGAAGCTAATACG<br>R: T <sub>(120)</sub> CTTCCTACTCAGGCTTTATTCAAAGACCA                                                                          |

(3'-UTR dizilerinde altı çizili GTCGAC *Sall*, ACTAGT *SpeI* enzim kesim bölgeleri, 5'-UTR dizilerinde altı çizili TAATACGACTCACTATAGGG T7 promotor dizileridir.)

### 3.3. qPCR İçin Kullanılan Primerler

*Pdx1*, *Ngn3* ve *MafA* mRNA'larının hücreye transfeksiyonundan sonra qPCR için gerekli olan endogen ve ekzogen primer dizileri (Çizelge 3.3) verilmiştir.

Çizelge 3.3. qPCR için kullanılan primerler

| Gen            |    | Forward primer (5'-3') | Reverse primer (5'-3') |
|----------------|----|------------------------|------------------------|
| <i>Pdx1</i>    | En | GGAACCACGATGAGAGGCAG   | CCCAAGGTGGAGTGCTGTAG   |
| <i>Pdx1</i>    | Ek | TTGGACCCTCGTACAGAAGC   | CGCGTGAGCTTTGGTAGACT   |
| <i>Ngn3</i>    | En | TCACCAAGATCGAGACGCTG   | CCCTTACCCTTAGCACCCAC   |
| <i>Ngn3</i>    | Ek | CCCTCGTACAGAAGCTAATACG | TCGATCTTGGTGAGCTTCGC   |
| <i>MafA</i>    | En | GTCATCCGGCTCAAGCAGAAG  | GAGGCCTGCGCGAACTTGTC   |
| <i>MafA</i>    | Ek | TTGGACCCTCGTACAGAAGC   | TTGAGGTGATGCTGGTAGCC   |
| <i>Ins</i>     | En | GCAGCCTTTGTGAACCAACAC  | TTGTACAGGTCCCGCTCTTT   |
| <i>B-aktin</i> | En | GCCTCGCCTTTGCCGA       | GGAATCCTTCTGACCCATGC   |
| <i>Gapdh</i>   | En | AGGGCTGCTTTTAACTCTGGT  | CCCCACTTGATTTTGAGGGA   |

(En: Endogen, Ek: Ekzogen)

### 3.4. İmmüno Floresan ve Western Blot İçin Kullanılan Antikorlar

*In vitro* translasyon sonrası PDX1, NGN3 ve MAFA proteinlerini göstermek amacıyla İmmüno Floresan ve Western Blot için kullanılan birincil ve ikincil antikorlar ve dilüsyon oranları verilmiştir (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.4. İmmüno Floresan ve Western Blot için kullanılan birincil ve ikincil antikorlar

| Antikor                       | Şirket                    | Dilüsyon/Deney        |
|-------------------------------|---------------------------|-----------------------|
| Rb monoklonal anti-Pdx1       | Abcam (ab134150)          | 1:200 IF<br>1:1000 WB |
| Rb poliklonal anti-Ngn3       | Abcam (ab38548)           | 1:200 IF<br>1:1000 WB |
| Rb poliklonal anti-MafA       | Abcam (ab26405)           | 1:200 IF<br>1:1000 WB |
| Ms monoklonal anti-Beta aktin | Abcam (ab6276)            | 1:5000 WB             |
| Gt anti-Rb IgG Dylight 488    | Thermo Scientific (35552) | 1:500 IF              |
| Gt anti-Rb IgG HRP konjugat   | Thermo Scientific (31460) | 1:3000 WB             |
| Gt anti-Ms IgG HRP konjugat   | BioRad (170-6516)         | 1:5000 WB             |

(Rb: rabbit, Gt: goat, Ms: mouse, HRP: horseradish peroxidase, IF:immüno Floresan, WB: western blot)

### 3.5. Deneylerde Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması

- ✓ **TBE tamponu (10X):** 108gr Tris Base (Fisher, BP152), 155gr Borik Asit (Merck) tartıldı ve 40ml 500mM EDTA (pH:8,0) karıştırıldı, bidistile su ile 1 litreye tamamlandı. HCl ile pH 7,4'e ayarlandı.
- ✓ **TBE tamponu (1X):** 100ml 10X TBE stok çözeltisi alınarak 900 ml bidistile su ile 1litreye tamamlandı.
- ✓ **1M Tris-HCl:** 121,1g Tris tartıldı, 800ml bidistile su ile çözündürüldü. HCl ile pH 7,4 değerine ayarlandı ve bidistile su ile hacim 1litreye tamamlandı.
- ✓ **PBS hazırlanması:** 5 tane PBS tablet (Life Technologies, 00302) son hacim 500 ml olacak şekilde bidistile suda çözüldü.
- ✓ **50 mM CaCl<sub>2</sub> /10 mM Tris (pH:7,4):** 5,55gr CaCl<sub>2</sub> tartıldı, 900ml bidistile suda çözüldü. 10ml 1M Tris-HCl (pH7,4) eklenerek son hacim bidistile su ile 1000ml'ye tamamlandı.
- ✓ **%0,8'lik agaroz jel:** 3,2g agaroz tartıldı ve 400ml 1X TBE tamponunda çözüldü. Agaroz tamamen çözünene kadar yaklaşık olarak 9 dk mikrodalga fırında bekletildi. Çözeltinin sıcaklığı yaklaşık olarak 50 °C'ye kadar düşüldükten sonra 9µl Et-Br ya da GelStar eklendi. Tarakları önceden yerleştirilmiş yatay elektroforez küvetine kabarcık kalmadan döküldü ve jelin polimerleşmesi bekledi.
- ✓ **%1,5'luk agaroz jel:** 6g agaroz tartıldı ve 400ml 1X TBE tamponunda çözüldü. Agaroz tamamen çözünene kadar yaklaşık olarak 9dk mikrodalga fırında bekletildi. Çözeltinin sıcaklığı yaklaşık olarak 50°C'ye kadar soğuduktan sonra 9µl Et-Br ya da GelStar boyası eklendi. Tarakları önceden yerleştirilmiş yatay elektroforez küvetine kabarcık kalmadan döküldü ve jelin polimerleşmesi bekledi.
- ✓ **%0,2'lik jelatin çözeltisi:** 0,5g domuz jelatini son hacmi 250ml olan saf suyun içerisinde çözöldükten sonra 121°C'de 30dk otoklav yapıldı. Hazırlanan çözelti soğuduktan sonra +4°C'de muhafaza edildi. 75cm<sup>2</sup>'lik kültür kaplarına 10ml, 6 kuyucuklu kültür kaplarının her bir kuyucuğuna 1ml jelatin çözeltisi kullanıldı.
- ✓ **2X dondurma ortamı:** 8ml FBS, 2ml DMSO karıştırıldı ve 22µm'lik filtre yardımıyla sterilize edildi. Daha sonraki kullanımlar için -20°C'de muhafaza edildi.
- ✓ **%0,1'lik Tween-20 çözeltisi:** 100µl Tween-20 alınarak PBS içerisinde çözöldü. Son hacim PBS ile 100ml'ye tamamladı. Daha sonra kullanılmak üzere, hazırlanan çözelti +4°C'de muhafaza edildi.

- ✓ **%1'lik BSA çözeltisi:** 100 µl Tween-20 ve 1g BSA alındı ve PBS içerisinde çözöldü. Son hacim PBS ile 100ml'ye tamamladı. Daha sonra kullanılmak üzere, hazırlanan çözelti +4°C'de muhafaza edildi.
- ✓ **%0.2'lik TritonX-100 çözeltisi:** 200µl TritonX-100 alınarak PBS içerisinde çözöldü. Son hacim PBS ile 100ml'ye tamamladı. Daha sonra kullanılmak üzere, hazırlanan çözelti +4°C'de muhafaza edildi.
- ✓ **Birincil antikor (İmmünoşitokimyasal boyama) (1:200):** 3µl antikor alındı ve 600µl %1'lik BSA içerisinde çözöldü.
- ✓ **İkincil antikor (İmmünoşitokimyasal boyama) (1:500):** 1,2µl antikor alındı ve 600µl %1'lik BSA içerisinde çözöldü.
- ✓ **DAPI (İmmünoşitokimyasal boyama) (1:500)** 1,2µl DAPI alındı ve 600µl %1'lik BSA içerisinde çözöldü.
- ✓ **Antibiyotik:** 1g Antibiyotik suda çözöldü ve son hacim suyla 10 ml'ye tamamlandı. Hazırlanan çözelti 22µm'lik filtre yardımıyla sterilize edildi. 1'er ml bölünerek daha sonra kullanılmak üzere -20°C'de muhafaza edildi.
- ✓ **LB-Broth:** 2,5g Tripton, 1,25g Yeast Extrat, 2,5g NaCl saf su içerisinde çözöldü. Son hacim su ile 250ml'ye tamamlandı. 121°C'de 20dk otoklavlandı. Daha sonra kullanılmak üzere; hazırlanan çözelti +4°C'de muhafaza edildi. Eğer antibiyotikli ortam kullanılacaksa; daha önce hazırlanmış olan stoktan 250µl antibiyotik çözeltisi alındı ve soğumuş olan 250ml LB ortamına eklendi.
- ✓ **LB-Agar:** 2,5g Tripton, 1,25g Yeast Extrat, 2,5g NaCl, 3,75g Agar saf su içerisinde çözöldü. Son hacim su ile 250ml'ye tamamlandı. 121°C'de 20dk otoklavlandı. Çözeltinin sıcaklığı yaklaşık 50°C'ye düştüğünde steril kabin içerisinde petri kaplarına dököltü. Polimerleşme tamamlandıktan sonra daha sonra kullanılmak üzere +4°C'de muhafaza edildi. Eğer antibiyotikli ortam kullanılacaksa; daha önce hazırlanmış olan stoktan 250µl antibiyotik çözeltisi alındı ve soğumuş olan 250ml LB ortamına eklendi ve petri kaplarına dökme işlemi gerçekleştirildi.
- ✓ **%10'luk APS:** 60mg APS tartıldı ve son hacim 600µl olacak şekilde bidistile su içerisinde çözöldü.
- ✓ **Kazein çözeltisi:** 1g Kazein son hacim 200ml olacak şekilde PBS içerisinde çözöldü.
- ✓ **%10'luk Resolving jel:** 3,58ml bidistile su, 2,43ml %40 Akrilamit, 1,34ml %2 Bisakrilamit, 2,5ml 1,5M Tris-HCl, 100µl %10 SDS, 5µl TEMED ve 50µl %10'luk APS eklenerek hazırlandı.

- ✓ **Stacking jel:** 2,92ml bidistile su, 480µl %40 Akrilamit, 260µl %2 Bisakrilamit, 1,26ml 1,5 M Tris-HCl, 50µl TEMED, 25µl %10'luk APS ve 50µl %10'luk SDS karıştırılarak hazırlandı.
- ✓ **1X Running tamponu:** 3,03g Tris, 14,3g glisin, 10 ml %10 SDS alınarak son hacim 1000ml olacak şekilde bidistile su içerisinde çözöldü.
- ✓ **5X TBS hazırlanması:** (20 mM Tris (pH:5,5), 150 mM NaCl), 12,115 g Tris, 43,88 g NaCl, 800 ml bidistile su içerisinde çözöldü. pH:7,5 olana kadar HCl eklendi ve son hacim bidistile su ile 1000 ml'ye tamamlandı.
- ✓ **1X TBS hazırlanması:** 100ml 5X TBS alındı ve son hacim 500ml olacak şekilde bidistile su ile çözöldü.
- ✓ **1X Transfer tamponu:** 5,8g Tris, 2,93g glisin ve 0,37µl %10'luk SDS alındı son hacim 1000ml olacak şekilde bidistile su içerisinde çözöldü.
- ✓ **1X TBS-T:** 200ml 5X TBS ve 1ml Tween-20 alındı ve son hacim 1000ml olacak şekilde bidistile su ile çözöldü.
- ✓ **%70'lik alkol:** 70ml etil alkol son hacim 100ml olacak şekilde bidistile su ile karıştırıldı.
- ✓ **I-block:** 0,5g kazein son hacim 100ml olacak şekilde 1X TBS içerisinde, manyetik karıştırıcı ile 3-5 saatte çözöldü.
- ✓ **Birincil antikor (Western Blot) (1:1000):** 10µl antikor alındı ve 10ml I-block içerisinde çözöldü.
- ✓ **İkincil antikor (Western Blot) (1:2000):** 5µl antikor alındı ve 10ml I-block içerisinde çözöldü.
- ✓ **Kemiluminesans:** Üretici firmanın önerdiği protokole göre; (Thermo, SuperSignal 34078) 1ml Ajan A, 1ml Ajan B ve 10µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> karıştırılarak karanlık ortamda bekletildi ve taze olarak kullanıldı.
- ✓ **RNase içermeyen bidistile su:** 1ml DEPC (Gold Biotechnology, 1609-47-8) alındı ve bidistile su ile son hacim 1000ml'ye tamamlandı. Gece boyunca çalkalamalı inkübatörde 25°C'de bekletildi. 121°C'de 20dk otoklavlandı.
- ✓ **MOPS tamponu:** 100ml 10X MOPS buffer (Lonza, 50876), RNase içermeyen bidistile su ile son hacim 1000ml'ye tamamlandı.
- ✓ **Jel boyama solüsyonu (RNA için):** 50ml RNase içermeyen 1X TE içerisinde 5µl Etidyum Bromür çözöldü.

### 3.6. DNA Örneklerinin Yürütülmesi

Hazırlanan agaroz jel, içi 1X TBE tamponuyla doldurulmuş olan küvete yerleştirildi. 20µl DNA çözeltilerinin üzerine 4µl 6X yükleme tamponu eklendi. DNA jeldeki kuyucuklara yüklendi. Birinci kuyucuğa referans olarak 3µl 1kb DNA Lader (New England Biolabs, N32325) yüklendi. Örnekler tamamen açılana kadar 100V'da yürütüldü.

### 3.7. RNA Örneklerinin Yürütülmesi

RNA örneklerinin üzerine hacimce 1:1 oranında formaldehit solüsyonu (Lonza, 50571) eklendi ve 60°C'de 15dk inkübasyon yapıldı. Daha sonra örnekler 1dk buz üzerinde bekletildi. Ticari olarak satın alınmış Reliant Gel System agaroz jel (Lonza, 54922) 1X MOPS tamponu içeren yatay elektroforez tamponu içerisine yerleştirildi. Hazırlanan örnekler kuyucuğa yüklendi. 2 saat 50V'da yürütme işlemi gerçekleştirildi. Jel boyama solüsyonu içerisinde gece boyunca bekletildi ve UV görüntüleme cihazında görüntülendi.

### 3.8. Kompetan Hücre Hazırlanması

Önceden -80°C'de dondurulmuş DH5α *E.coli* bakterilerinden 40µl alındı, 40ml LB broth içine eklendi ve 37°C'de 200rpm çalkalamalı inkübatörde bir gece inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon sonucunda çoğalan bakterilerden 1ml alınarak 200ml LB besiyerine eklendi ve 4 saat 37°C'de inkübatörde çoğaltıldı. Bakterilerin 600nm dalga boyundaki optik dansitesi 0,4 noktasına ulaştıktan sonra, buz üzerine alınıp 10dk soğuması için bekletildi. 50ml'lik falkon tüplere bölünüp, +4°C ve 2000rpm'de 5dk santrifüj edildi. Süpernatant atılıp, her bir tüpe 25ml 50mM CaCl<sub>2</sub>/10mM Tris (pH:7,4) ilave edildi ve 15dk buzda bekletildi. Ardından, yine +4°C ve 2000rpm'de 5dk santrifüj edildi. Süpernatant atılıp, çökelti üzerine 9ml 50mM CaCl<sub>2</sub>/10mM Tris (pH:7,4) ve 1ml %100 gliserol eklenip homojenize edildi. 100ul'lik hacimlere ayrılıp -80°C'ye kaldırıldı.

### 3.9. DNA ve RNA Örneklerinin Miktar Tayininin Yapılması

Hazırlanan DNA ve RNA'ların kalitatif ve kantitatif analizleri NanoDrop spektrofotometresi (Thermo Scientific, Waltham, MA) kullanılarak yapıldı. Cihaz öncelikle 1µl bidistile su ile temizlendi. Ardından DNA ya da RNA'nın çözülmüş olduğu çözeltiliden 1µl alınarak ölçüm değeri sıfırlandı. İzole edilen DNA ya da RNA'dan 1µl alınarak 230, 260 ve 280nm dalgaboyunda ölçüm yapıldı. Ölçüm sonucunda elde edilen RNA'lar son konsantrasyonu 100ng/µl olacak şekilde TE tamponuyla seyreltilti.

### 3.10. Çift Zincirli DNA'nın Tasarımı ve Hazırlanması

İnsan *Pdx1* (SC300025), *Ngn3* (SC304889) and *MafA* (SC308064) cDNA'ları liyofilize edilmiş olarak OriGene company (Rockville, MD) şirketinden satın alındı ve üretici firmanın önerdiği protokole göre çözüldü. Herbir cDNA örneğinin açık okuma çerçevesi (Open reading frames- ORFs) PCR yöntemiyle çoğaltıldı. 0,2µl (2U/µl)

Phusion DNA polimeraz (Phusion high fidelity DNA polymerase enzyme) (Thermo Scientific, Waltham, MA), 4µl tampon, 0,5µl (~1ng) cDNA, 0,5'er µl ORF primerleri (Çizelge 3.1), 4µl betaine (Sigma, St. Louis, MO), 0,4µl dNTP, 0,6µl DMSO ve 9,3µl dH<sub>2</sub>O içeren 20µl PCR karışımı hazırlandı. PCR koşulları: 98°C'de 30s başlangıç denatürasyonu, 98°C 10s denatürasyon, 60°C'de 30s bağlanma, 72°C'de 1 dk uzama ve 72°C 5 dk final uzaması yapılarak 30 döngüde PCR tamamlandı. PCR ürünleri %0,8 TBE GelStar (Lonza, Basel, Switzerland) jel boyası içeren agaroz jel içerisinde koşturuldu. Jel PrepOne Sapphire blue light box (EmbiTec, San Diego, CA) görüntüleme cihazında görüntülendi. Uygun büyüklükte olan DNA'ları içeren bantlar jelden bistüri ile kesilip alındı ve GeneJET (Thermo Scientific, Waltham, MA) jelden DNA izolasyon kitiyle, üretici firmanın önerdiği protokolle DNA'lar jelden izole edildi.

*Pdx1*, *Ngn3* and *MafA* ORF'lerinin 5' ve 3' transkribe olmayan bölgeleri (untranslated regions - UTRs) ile ligasyonu yapıldı (Çizelge 3.2). Splint oligo primerler, (Çizelge 3.2) UTR ve ORF bağlanması için adaptor olarak kullanıldı. Ligasyon reaksiyon karışımı 1µl ligaz enzimi (Ampligase thermostable DNA ligase) (5U/µl) (Epicentre, Madison, WI), 5µl tampon çözelti, 25µl (~500ng) cDNA, 1µl 5'-UTR, 1µl 3'-UTR, 0,5µl 5'-splint oligo primeri (10µM), 0,5µl 3'-splint oligo primeri (10µM), 10µl betaine ve 6µl dH<sub>2</sub>O olacak şekilde toplamda 50µl hazırlandı. Ligasyon koşulları: 95°C 10s denatürasyon, 45°C 60s, 50°C 60s, 55°C 60s bağlanma için toplamda 5 döngü olacak şekilde yapıldı. Ligasyon sonucunda oluşan ürünler saflaştırılmadı.

UTR ile ligasyonu gerçekleşen cDNA'lar template primerleriyle PCR ile çoğaltıldı (Çizelge 3.2). PCR karışımı 0,2µl Phusion HF DNA polimeraz enzimi (2U/µl), 4µl tampon, 0,5µl (~1ng) kalıp olarak kullanılacak olan cDNA, 0,5µl template primeri, 4µl betaine, 0,4µl dNTP, 0,6µl DMSO ve 9,3µl dH<sub>2</sub>O olacak şekilde 20µl olacak şekilde hazırlandı. PCR koşulları: 98°C 30s başlangıç denatürasyonu, 98°C 10s denatürasyon, 60°C 30s bağlanma, 72°C 1 dk uzama ve 72°C 5 dk final uzaması olacak şekilde toplamda 35 döngüde PCR tamamlandı. UTR ligasyonunu kontrol etmek ve bu ürünleri elde etmek amacıyla PCR ürünleri GelStar jel boyası içeren %0,8 TBE tamponuyla hazırlanmış agaroz jelde yürütüldü. Yürütme sonrasında jel PrepOne Sapphire blue light box görüntüleme cihazında görüntülendi. Uygun boyutta olan DNA jelden kesilerek alındı ve GeneJET jel izolasyon kitiyle izole edildi. Elde edilen ürünün nükleotid sekansın doğruluğunu test etmek amacıyla ligasyon örnekleri küt uçlu klonlama vektörüne (pJET1.2/blunt), CloneJet PCR klonlama kitiyle (Thermo Scientific, Waltham, MA), üretici firmanın önerdiği protokolle klonlandı. Plazmit DNA'sı kimyasal olarak kompetan hale getirilmiş *E. coli* (Dh5α) bakterisine ısı şok protokolü uygulanarak aktarıldı. Bunun için 5µl klonlama için elde edilmiş plazmit ile 300µl kompetan hücre 1,5ml tüpün içerisinde karıştırıldı. Bu karışım 30 dk boyunca buzun içerisinde bekletildi ardından 30s 42°C su banyosunda bekletildi. Bu işlemlerin ardından karışım tekrardan 2 dakika buzda bekletildi. Karışımın üzerine 250µl SOC ortamı eklendi ve 1 saat 37°C 200rpm'de çalkalamalı inkübatörde bekletildi. İnkübasyonun ardından ampicilin içeren LB agarda bir gece boyunca 37°C inkübatörde bekletildi. Bir sonraki gün her petri kabından 10 bakteri kolonisi alındı ve ampicilin içeren LB broth içerisine inoküle edildi ve 1 gece boyunca 37°C 200 rpm'de çalkalamalı inkübatörde bekletildi. Plazmit DNA'sı GeneJET plazmit mini prep kit (Thermo Scientific, Waltham, MA) ile üretici firmanın önerdiği protokolle izole edildi. Elde

edilen ürünlerin sekansı MacroGen Company (Amsterdam, Netherland) şirketi aracılığıyla yapıldı.

Sekans doğruluğu kontrol edilen plazmitleri linerize hale getirmek için *SalI* enzimiyle (Thermo Scientific, Waltham, MA) kesim yapıldı. Kesim koşulları: 1µl (~500ng) plazmit DNA, 1µl *SalI* enzimi, 2µl tampon ve 16µl dH<sub>2</sub>O olacak şekilde toplamda 20µl hazırlandı. Hazırlanan bu karışım öncelikle 37°C’de 2 saat ardından 80°C 20dk bekletildi. Linerize edilmiş DNA’lara Poly(T) kuyruğu eklemek amacıyla; 100µl KAPA HiFi hot start ready mix karışımı (Kapa Biosystems, Wilmington, MA), 1µl linerize edilmiş plazmit DNA, 6µl kuyruk primerleri (Çizelge 3.2) ve 87µl dH<sub>2</sub>O olacak şekilde 200µl hazırlandı. Hazırlanan karışım 8 PCR tüpüne 25µl olacak şekilde paylaştırıldı. PCR koşulları: 95°C 3dk başlangıç denatürasyonu, 98°C 20s denatürasyon, 60°C 15s bağlanma, 72°C 1 dk uzama ve 72°C 3 dakika final uzaması olacak şekilde, *Pdx1* ve *Ngn3* için 30 döngü, *MafA* için 28 döngü yapıldı. Her tüpten 2µl örnek EtBr içeren %1,5 TBE agaroz jelinde koşturuldu ve UV tabanlı jel görüntüleme sisteminde görüntülendi. Poly(T) kuyruğu eklenmiş olan örnekler tek bir tüpte toplandı ve GeneJET PCR purification kit (Thermo Scientific, Waltham, MA) ile üretici firma tarafından önerilen protokol yardımıyla saflaştırıldı.

### 3.11. *In vitro* Transkripsiyon Reaksiyonu (IVT)

Öncelikle deney yapılacak olan ortam, pipetler ve kullanılacak olan diğer malzemeler RNaseZap (Ambion, AM9780) ile silinerek ortamdaki RNAase enzimleri denatüre edildi. *Pdx1*, *Ngn3* ve *MafA* modifiye mRNA’ları, poly(T) kuyruğu eklenmiş ve saflaştırılmış PCR ürünleri kullanılarak mMessage mMachine T7 transkripsiyon kitle, (Ambion, Austin, TX) üretici firmanın önermiş olduğu protokole uygun olarak sentezlendi. IVT reaksiyon karışımı; 16µl (~1-2µg) poly(T) kuyruğu eklenmiş PCR ürünü, 4µl T7 enzimi, 4µl tampon çözeltisi, 2,5µl Anti Reverse Cap Analog (ARCA, 3'-O-Me-m<sup>7</sup>G(5')ppp(5')G) (Trilink, San Diego, CA), 0,8µl GTP, 4µl ATP, 3µl 5-metilsitozin (5-me-CTP) (Trilink, San Diego, CA), 3ul psödoüridin (pUTP) (Trilink, San Diego, CA) ve 2,7µl dH<sub>2</sub>O olacak şekilde 40µl hazırlandı. Hazırlanan IVT karışımı 37°C 4 saat bekletildi. Reaksiyon sonucunda DNA’yı ortamdan uzaklaştırmak için 2µl Turbo DNase enzimi karışıma eklendi ve 37 °C 15 dk bekletildi. IVT reaksiyon ürünü MEGAclean transkripsiyon temizleme kiti (Ambion, Austin, TX) ile üretici firmanın önermiş olduğu protokolle saflaştırıldı. Saflaştırılan IVT ürününe 2µl Antartik Fosfataz (NEB, Ipswich, MA) ve 10µl tampon çözelti eklendi ve 37°C’de 1 saat bekletildi. Reaksiyon ürünü tekrardan MEGAclean transkripsiyon temizleme kiti ile üretici firmanın önermiş olduğu protokolle saflaştırıldı. Hazırlanan RNA’ların kalitatif ve kantitatif analizleri NanoDrop spektrofotometresi (Thermo Scientific, Waltham, MA) kullanılarak yapıldı. Elde edilen RNA’ların son konsantrasyonu TE tampon çözeltisiyle 100ng/µl olacak şekilde ayarlandı ve -80 °C’de saklandı.

### 3.12. İnsan Hücre Kültürü

ATCC (Manassas, VA) firmasından satın alınan insan deri fibroblast hücreleri (BJ fibroblast) kültür işlemine kadar sıvı azotta (-196 °C) saklandı. Sıvı azottan alınan hücreler 37°C sıcaklıktaki su banyosunda, tüpün içerisinde küçük bir buz parçası kalacak şekilde eritildi. Tüp %70’lik etil alkol ile sterilize edildi ve steril kabine

koyuldu. 2ml'lik serolojik pipet yardımıyla hücreler tüpün içerisinden alındı ve 15ml'lik tüpün içerisine aktarıldı. 37°C ve %5 CO<sub>2</sub>'li ortamda ısıtılmış, yüksek glukozlu DMEM (Gibco, Waltham, MA), 10% FBS (Gibco, Waltham, MA), 1X L-glutamin (Gibco, Waltham, MA), 1X NEAA (Gibco, Waltham, MA) ve 1X antibiyotik-antimikotik(anti-anti) (Gibco, Waltham, MA) içeren besin ortamından 2ml alındı ve küçük damlalar halinde 15ml tüpün içerisindeki hücrelerin üzerine bırakıldı. Bu işlem yapılırken tüp yavaşça çalkalandı. Tüpün içerisine son hacim 12ml olacak şekilde besin ortamı eklendi. 270g 37°C'de 5dk santrifüj yapıldı. Süpernatant kısmı atıldı. Hücre peleti 12ml besin ortamı içerisinde çözüldü ve önceden %0,2 jelatin kaplı T-75 kültür kabına (Corning, Corning, NY) aktarıldı. Hücre yoğunluğu %60-80 oluncaya kadar her gün, 10ml PBS ile yıkandıktan sonra hücrelerin besin ortamı değiştirildi.

Deneylerin yapılması amacıyla hücreler 6 kuyucuklu kültür kaplarına pasajlandı. Pasaj sırasında T75 kültür ortamında bulunan hücrelerin besin ortamları pipet yardımıyla alındı. 10ml PBS ile yıkama işlemi yapıldı. 3ml Tripsin enzimi eklendi ve 5dk 37°C ve %5 CO<sub>2</sub>'li inkübatörde (Thermo) bekletildi. Mikroskop altında hücrelerin kalktığı gözlemlendiğinde 10ml kültür ortamı eklendi ve hücre karışımı serolojik pipet yardımıyla 12ml tüpe kuyuldu. 5 dk 37°C 270g santrifüj yapıldı. Süpernatant atıldı ve hücre peleti besin ortamıyla çözdürüldü. Her kuyusunda  $3 \times 10^5$  hücre olacak şekilde 6 kuyucuklu kültür kaplarına (Corning, Corning, NY) pasaj yapıldı. Geri kalan hücreler alınarak üzerine eşit hacimde 2X dondurma ortamı eklendi ve öncelikle -80°C'de bir gece bekletildi ardından uzun süre saklamak amacıyla sıvı azota kaldırıldı.

### 3.13. mRNA'ların İnsan Hücrelerine Transfeksiyonu

Transfeksiyondan 12 saat önce hücrelerin besin ortamı; önceden 37°C ve %5 CO<sub>2</sub>'li ortamda ısıtılmış, yüksek glukozlu DMEM (Gibco, Waltham, MA), 10% FBS (Gibco, Waltham, MA), 1X L-glutamin (Gibco, Waltham, MA), 1X NEAA (Gibco, Waltham, MA) ve 1:2400 oranında B18R (Stemgent, Cambridge, MA) içeren transfeksiyon besin ortamı ile değiştirildi.

Transkefsiyon kültür ortamının değişiminden 12 saat sonra hücrelere RNA transfeksiyonu yapıldı. Bu işlem için iki ayrı tüpte karışımlar hazırlandı. Birinci tüpe 15µl Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA) alındı, üzerine 35ul Opti-MEM (Gibco, Waltham, MA) eklendi ve yavaşça pipetaj yapıldı. İkinci tüpe 30µl (3mg) alındı ve üzerine 20µl Opti-MEM eklenerek pipetaj yapıldı. Birinci tüp içerisindeki 50µl karışım alınarak ikinci tüp içerisindeki 50µl karışım üzerine eklendi ve hazırlanan bu 100µl karışım yavaşça pipetaj yapıldı. Oda sıcaklığında 20dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından 100µl olan karışım bir kuyucuğa yavaşça çalkalanarak ekildi. İşlemin ardından hücreler tekrardan 37°C %5 CO<sub>2</sub> inkübatöre koyuldu ve 6 saat inkübasyona bırakıldı. 6 saat sonra transfeksiyon besin ortamı değişimi yapıldı. Öncelikle hücrenin üzerinde bulunan transfeksiyon besin ortamı – RNA karışımı alındı. 2ml PBS ile hücreler yıkandı. Hücrelerin üzerine, önceden 37°C ve %5 CO<sub>2</sub>'li inkübatörde ısıtılmış transfeksiyon besin ortamından eklendi. Transfeksiyondan 16 saat sonra hücreler mRNA izolasyonu, immünositokimyasal boyama, protein izolasyonu için kullanıldı.

### 3.14. İmmüno Floresan Boyama

Kültürdeki hücrelerin besin ortamı pipet yardımıyla uzaklaştırıldı. Hücreler 5dk 1ml PBS (Lonza, Basel, Switzerland) ile yıkandı. Bu işlem üç kere tekrarlandı. Hücrelerin üzerine fiksatif olarak 1 ml %10 formalin (Sigma, St. Louis, MO) eklendi ve 15 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakılarak fiksasyon işlemi gerçekleştirildi. Hücrelerin üzerinde bulunan formalin pipet yardımıyla uzaklaştırıldı. Hücreler 5dk 1 ml %0,1 PBS-Tween çözeltisiyle yıkandı. Bu işlem üç kere tekrarlandı. Hücrelerin üzerine PBS ile hazırlanmış 1ml %0,2 (v/v) Triton X-100 (Sigma, St. Louis, MO) çözeltisi eklendi ve oda sıcaklığında 15 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından hücreler 5dk 1ml %0,1 (v/v) Tween-20 (Sigma, St. Louis, MO) ile yıkandı. Bu işlem üç kere tekrarlandı. Yıkamanın ardından hücrelerin üzerine 1ml %1 (w/v) BSA çözeltisi eklendi ve oda sıcaklığında 1 saat inkübasyona bırakılarak bloklama işlemi yapıldı. Bloklama işlemin ardından 1ml %0,1 (v/v) Tween-20 ile 5dk yıkama yapıldı. Bu işlem üç kere tekrarlandı. Birincil antikorlar %1 (w/v) BSA çözeltisi içinde 1:200 oranında hazırlandı ve her bir kuyucuğa 600µl eklendi. Gece boyunca +4°C sıcaklıkta inkübasyondan sonra hücrelerin üzerinde bulunan birincil antikor uzaklaştırıldı ve hücreler 5dk 1ml %0,1 (v/v) Tween-20 çözeltisiyle yıkandı. Bu işlem üç kere tekrarlandı. Yıkamanın ardından hücrelerin üzerine 600µl %1 (w/v) BSA çözeltisi içinde 1:500 oranında hazırlanmış ikincilantikorlar eklendi ve oda sıcaklığında 1 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından ikincil antikor karışımı hücrelerden uzaklaştırıldı ve hücreler 5dk 1ml %0,1 (v/v) Tween-20 çözeltisiyle yıkandı. Bu işlem üç kere tekrarlandı. Yıkamanın ardından %1 (w/v) BSA çözeltisi ile hazırlanmış 1:500 oranında Hoechst (1:500) (Cell Signaling Technologies, Danvers, MA) hücrelere eklendi ve oda sıcaklığında 20dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından hücre üzerindeki çözelti uzaklaştırıldı ve hücrelerin üzerine PBS eklendi ve oda sıcaklığında 5dk inkübasyona bırakıldı. Bu işlemin ardından hücre üzerinde bulunan PBS uzaklaştırıldı ve yeni PBS eklenerek hücreler mikroskop (Olympus, Tokyo, Japan) altında görüntüldü. (Kullanılan birincil ve ikincil antikorların listesi Çizelge 3.4’de gösterilmiştir.)

### 3.15. Hücre Canlılık Testi

BJ fibroblast hücreleri her bir kuyucukta  $1.5 \times 10^4$  hücre olacak şekilde 180µl besin ortamında 96 kuyucuklu kültür kabına ekildi. RNA transfeksiyon protokolü uygulanarak her bir kuyucukta 110ng RNA olacak şekilde transfeksiyon yapıldı.

RNA transfeksiyonu için iki ayrı tüpte karışımlar hazırlandı. Birinci tüpe 0,5µl Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA) alındı, üzerine 9,5µl Opti-MEM (Gibco, Waltham, MA) eklendi ve pipetaj yapıldı. İkinci tüpe 1µl (100 ng) RNA alındı ve üzerine 9µl Opti-MEM eklenerek pipetaj yapıldı. Birinci tüp içerisindeki 10µl karışım alınarak ikinci Tüp içerisindeki 10µl karışım üzerine eklendi ve hazırlanan bu 20µl karışım pipetaj yapıldı. Oda sıcaklığında 20dk inkübasyonun ardından 20µl olan karışım bir kuyucuğa yavaşça çalkalanarak ekildi. Her bir kuyucuğa bir genin RNA’sı (*Pdx1*, *Ngn3* ve *MafA*) transfekte edildi. Kontrol olarak bir kuyucuğa hiç RNA kullanılmadan transfeksiyon karışımından verildi. İşlemin ardından hücreler tekrardan 37°C %5 CO<sub>2</sub> inkübatöre koyuldu ve inkübasyona bırakıldı.

Transfeksiyondan 20, 44 ve 68 saat sonra CellTiter-Blue cell viability assay kit (Promega, Madison, WI) karışımından 40µl alınarak hücrelerin üzerinde bulunan 200µl besin ortamında eklendi ve 37°C ve %5 CO<sub>2</sub>'li inkübatörde 4 saat beklendi. İnkübasyonun ardından Multiskan Go microplate spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA) cihazında 560 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçüldü.

### 3.16. Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qPCR)

Transfeksiyondan 16 saat sonra Purelink RNA mini kit (Invitrogen, Carlsbad, CA) kullanarak üretici firmanın önerdiği protokolle total RNA izolasyonu yapıldı. İzole edilen RNA'ların kalitatif ve kantitatif analizleri NanoDrop spektrofotometre kullanılarak ölçüldü. İzole edilen RNA'lardan 2µg alınarak Maxima first strand cDNA sentez kiti (Thermo Scientific, Waltham, MA) kullanılarak, üretici firmanın önerdiği protokolle cDNA sentezlendi. cDNA örnekleri kantitatif PCR yapılarak Light Cycler 96 system (Roche, Basel, Switzerland) cihazında analiz edildi. qPCR karışımı: 10µl KAPA SYBR FAST qPCR ana karışımı (KAPA Biosystems, Wilmington, MA), 0,4µl forward ve reverse primerler (Çizelge 3.3), 1µl DNA (~20 ng) ve 8,2µl dH<sub>2</sub>O olacak şekilde 20µl hazırlandı. İki tekrar halinde yapılan qPCR koşulları: 95°C 3dk başlangıç denatürasyonu, 95°C 10s denatürasyon, 60°C for 30s bağlanma ve uzama, olacak şekilde 45 döngü olarak yapıldı. Karşılaştırmalı ölçüm  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  ile hesaplandı, *Ins* için *Beta-aktin*; *Pdx1*, *Ngn3* ve *MafA* için *Gapdh* ekspresyonu ile normalize edildi.

### 3.17. Western Blot

Transfeksiyondan 16 saat sonra BJ hücrelerinden total protein izolasyonu yapıldı. Protein izolasyonu için 10<sup>6</sup> hücre tripsinize edildi ve santrifüj yardımıyla hücre peleti elde edildi. 5µl PIC (Thermo Scientific, Waltham, MA) içeren 0,5ml RIPA liziz ve izolasyon tamponu (Thermo Scientific, Waltham, MA) hücre peletinin üzerine eklendi. Hücreler 5 kere vortekslendi ve 2dk buz içerisinde bekletildi. Karışım 15000g, 4°C'de 10dk santrifüj yapıldı. Süpernatant peletten alındı ve çalışmada kullanıldı.

%10'luk Resolving Jel hazırlandı ve cam yüzeye aktarıldı. Cam yüzeyin üzeri taşana kadar izopropanol eklendi. 45dk sonra jelin yüzeyindeki izopropanol döküldü ve hiç izopropanol kalmayacak şekilde kurutma kağıdıyla kurutuldu. Stacking jel hazırlandı ve polimerleşen %10'luk Resolving Jelin üzerine döküldü ve hemen taraklar takıldı ve jelin polimerleşmesi beklendi. Polimerleşmenin ardından jel sistemi Running tamponu ile doldurulmuş olan tankın içerisinde dik bir şekilde konumlandırıldı.

Jele yüklenecek örnekler hazırlandı. Bunun için 20µl izole edilen protein karışımından, 5µl laemli çözeltisi eklendi ve örnekler daha sonra kullanılmak üzere -20°C'ye kaldırıldı. Yükleme öncesi örnekler 5dk 95°C'de sıcak su banyosunda inkübe edildi. İnkübasyonun ardından hazırlanan örnekler pipet yardımıyla kuyucuklara yüklendi. 80V 90dk yürütme işlemi yapıldı. Protein markırının yeteri kadar açıldığı görüldükten sonra yürütme işlemi durduruldu.

Yürütmenin ardından boş bir kaba 1X Transfer tamponundan koyuldu. Bu tamponun içersine alttan üste sırasıyla; sünger, blotlama kağıdı, protein yürütülmüş jel,

membran, blotlama kağıdı ve sünger yerleştirilerek sandviç aparatı kapatıldı. Aparat tanka yerleştirildi ve bir gece boyunca 32V +4 °C’de yürütüldü. Yürütmenin ardından membran transfer tamponundan alındı ve 3 kere 5dk TBS-T solüsyonunda yıkama yapıldı. Daha sonra membran I-block solüsyonunda 60dk bekletildi. Daha önce hazırlanan birincil antikor membran üzerine eklendi ve 25°C’de 4 saat inkübasyona bırakıldı. TBS-T solüsyonunda 5dk yıkama yapıldı. Bu işlem üç kere tekrarlandı. Membran daha önceden hazırlanmış ikincil antikor çözeltisinde 60dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından 3 kere 5dk TBS-T solüsyonunda yıkama yapıldı. Hazırlanan kemiluminesans çözeltisi membran üzerine eklendi ve 5dk karanlık ortamda inkübasyona bırakıldı. Mebran Syngene Genegenome cihazında görüntülendi.

### 3.18. Hücre Farklılaştırma Deneyi

İnsan BJ hücreleri (ATCC HB-8065) her bir kuyucukta  $5 \times 10^4$  hücre olacak şekilde 500µl besin ortamında 24 kuyucuklu kültür kabına ekildi. RNA transfeksiyon protokolü uygulanarak; her bir kuyucukta 275ng *Pdx1*, 275ng *Ngn3*, 275ng *MafA* RNA’sı olacak şekilde toplamda 825ng RNA transfeksiyonu yapıldı.

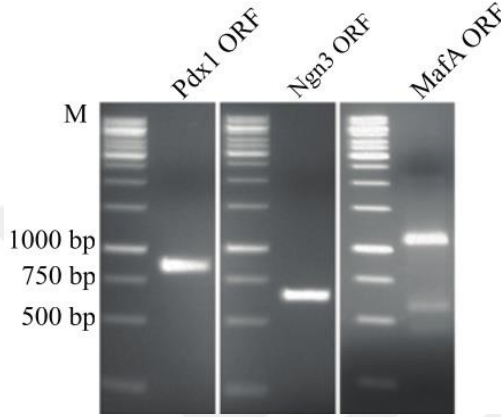
Transfeksiyondan 12 saat önce hücrelerin besin ortamı; 37°C ve %5 CO<sub>2</sub>’li ortamda ısıtılmış Pluriton Reprogramming Medium (Stemgent, 01-0015), 2500X Pluriton Supplement (Stemgent, 01-0016), 1:2400 oranında B18R (Stemgent, Cambridge, MA) içeren programlama ortamı ile değiştirildi. Bu işlem için hücrelerin üzerindeki besin ortamı pipet yardımıyla çekildi ve her bir kuyucuğa 1ml PBS eklendi. PBS alındı ve her bir kuyucuğa 450µl transfeksiyon besin ortamı eklendi.

RNA transfeksiyonu için iki ayrı tüpte karışımlar hazırlandı. Birinci tüpe 4,125µl Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA) alındı, üzerine 20,875µl Opti-MEM (Gibco, Waltham, MA) eklendi ve pipetaj yapıldı. İkinci tüpe 8,25µl (825ng) RNA karışımı alındı ve üzerine 16,75µl Opti-MEM eklenerek pipetaj yapıldı. Birinci tüp içerisindeki 25µl karışım alınarak ikinci Tüp içerisindeki 25µl karışım üzerine eklendi ve hazırlanan bu 50µl karışım pipetaj yapıldı. Oda sıcaklığında 20dk inkübasyonun ardından 50µl olan karışım bir kuyucuğa yavaşça çalkalanarak ekildi. Her bir kuyucuğa üç genin RNA karışımı (*Pdx1*, *Ngn3* ve *MafA*) transfekte edildi. Kontrol olarak bir kuyucuğa hiç RNA kullanılmadan transfeksiyon karışımından verildi. İşlemin ardından hücreler tekrardan 37°C %5 CO<sub>2</sub> inkübatöre koyuldu ve inkübasyona bırakıldı. Transfeksiyondan 6 saat sonra hücrelerin programlama ortamı değiştirildi. Bu işlem için; önceden verilen programlama ortamı pipet yardımıyla alındı. Hücrelerin üzerine 1ml PBS eklendi ve pipet yardımıyla PBS alındı. Hücrelerin üzerine taze programlama ortamı eklendi. Transfeksiyon işlemi on gün boyunca her gün tekrarlandı. Son transfeksiyondan 16 saat sonra hücrelerden RNA izolasyonu yapıldı.

#### 4. BULGULAR

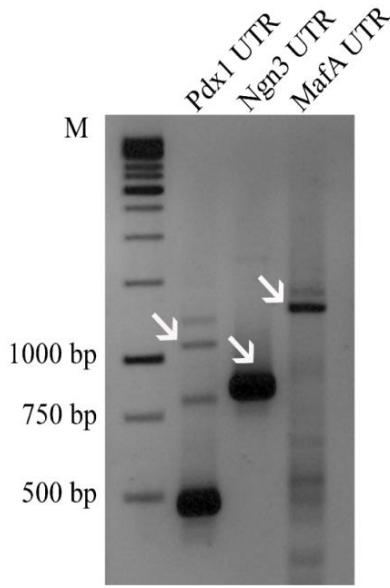
##### 4.1. *Pdx1*, *Ngn3* ve *MafA* Çift Zincirli Kalıp DNA'larının Üretilmesi

İnsan *Pdx1*, *Ngn3* ve *MafA* cDNA örneklerinin her birinin Açık Okuma Çerçevesi (Open Reading Frame: ORF) PCR yöntemiyle çoğaltıldı. PCR ürünleri 0.8% TBE GelStar jel boyası içeren agaroz jel içerisinde yürütüldü ve görüntüldü (Şekil 4.1). Uygun büyüklükte olan DNA'ları içeren bantlar jelden kesilip alındı ve DNA'lar jelden izole edildi.



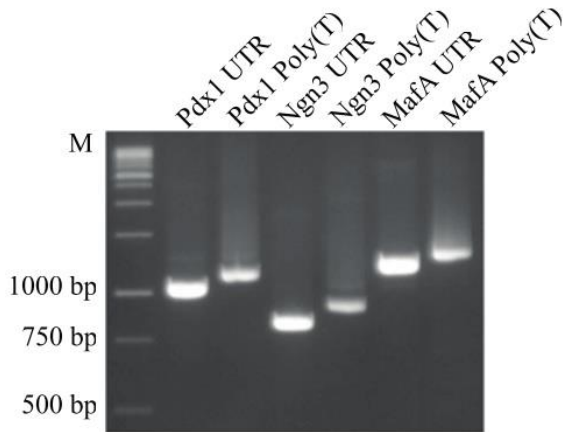
Şekil 4. 1. *Pdx1*, *Ngn3* ve *MafA* ORF'lerinin PCR sonrası agaroz jel görüntüsü

*Pdx1*, *Ngn3* and *MafA* ORF'lerinin 5' ve 3' transkribe olmayan bölgeler (Untranslated Regions: UTR) ile ligasyonu yapıldı. Splint oligo primerler, UTR ve ORF'lerin bağlanması için adaptör olarak kullanıldı. Ligasyon sonucunda oluşan ürünler saflaştırılmadı. UTR ile ligasyonu gerçekleşen cDNA'lar template primerler kullanarak PCR'da çoğaltıldı. UTR ligasyonunu kontrol etmek ve bu ürünleri elde etmek amacıyla PCR ürünleri GelStar jel boyası içeren %0,8 TBE tamponuyla hazırlanmış agaroz jelde yürütüldü. Koşurma sonrasında jel PrepOne Sapphire blue light box görüntüleme cihazında görüntüldü (Şekil 4.2). Uygun boyutta olan DNA'lar (okla gösterilen bantlar) jelden kesilerek alındı ve GeneJET jel izolasyon kitiyle izole edildi.



Şekil 4. 2. *Pdx1*, *Ngn3* ve *MafA* ORF'lerin 5' ve 3' UTR'ler ile ligasyonu sonrası agaroz jel görüntüsü

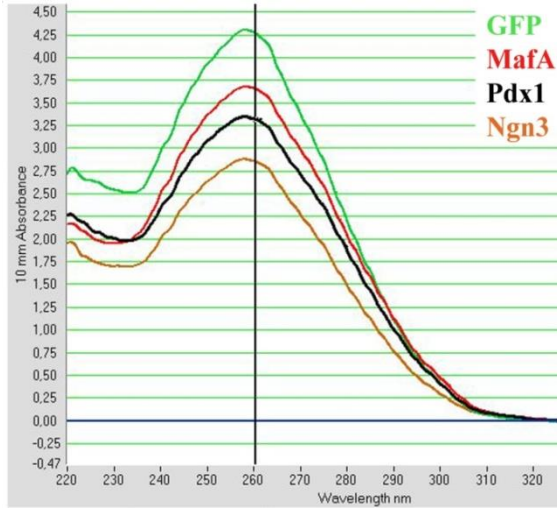
DNA'lara PCR yardımıyla Poly(T) kuyruğu eklendikten sonra; Poly(T) eklenen ve eklenmeyen DNA örnekleri EtBr içeren %1,5'luk TBE agaroz jelinde koşturuldu ve UV tabanlı jel görüntüleme sisteminde görüntülendi (Şekil 4.3).



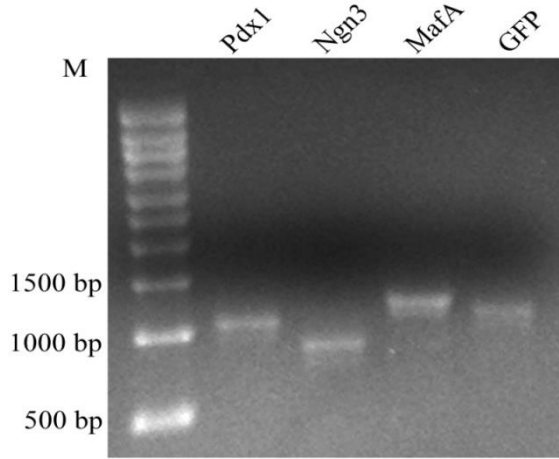
Şekil 4. 3. UTR eklenmiş *Pdx1*, *Ngn3* ve *MafA* ORF'lerinin PCR sonrası jel görüntüsü ve PCR ile Poly(T) kuyruğu eklendikten sonra agaroz jel görüntüsü.

#### 4.2. *Pdx1*, *Ngn3* ve *MafA* mRNA'larının *In vitro* Transkripsiyonun Gösterilmesi

*Pdx1*, *Ngn3* ve *MafA* modifiye mRNA'ları, poly(T) kuyruğu eklenmiş ve saflaştırılmış PCR ürünleri kullanılarak mMessage mMachine T7 transkripsiyon kitle, (Ambion, Austin, TX) üretici firmanın önermiş olduğu protokolle sentezlendi. Hazırlanan RNA'ların kalitatif ve kantitatif analizleri NanoDrop spektrofotometresi kullanılarak yapıldı (Şekil 4.4). Örnekler agaroz jelde yürütülerek uygun bant boyutu gösterildi (Şekil 4.5).



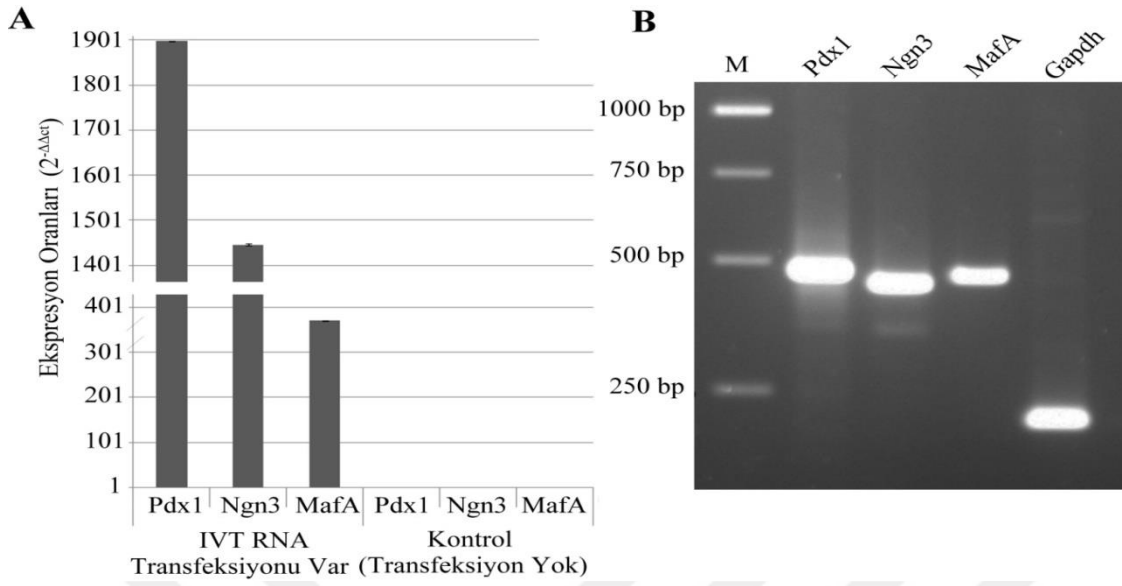
Şekil 4. 4. *In vitro* transcribe edilen *Pdx1*, *Ngn3*, *MafA* ve *GFP* RNA'larının spektrofotometre ile OD değerinin ölçülmesi.



Şekil 4. 5. *In vitro* transkribe edilen *Pdx1*, *Ngn3*, *MafA* ve *GFP* RNA'larının denatüre agaroz jel görüntüsü.

#### 4.3. Sentezlenen *Pdx1*, *Ngn3* ve *MafA* mRNA'larının İnsan BJ Fibroblast Hücrelerinde Transfeksiyonun Gösterilmesi

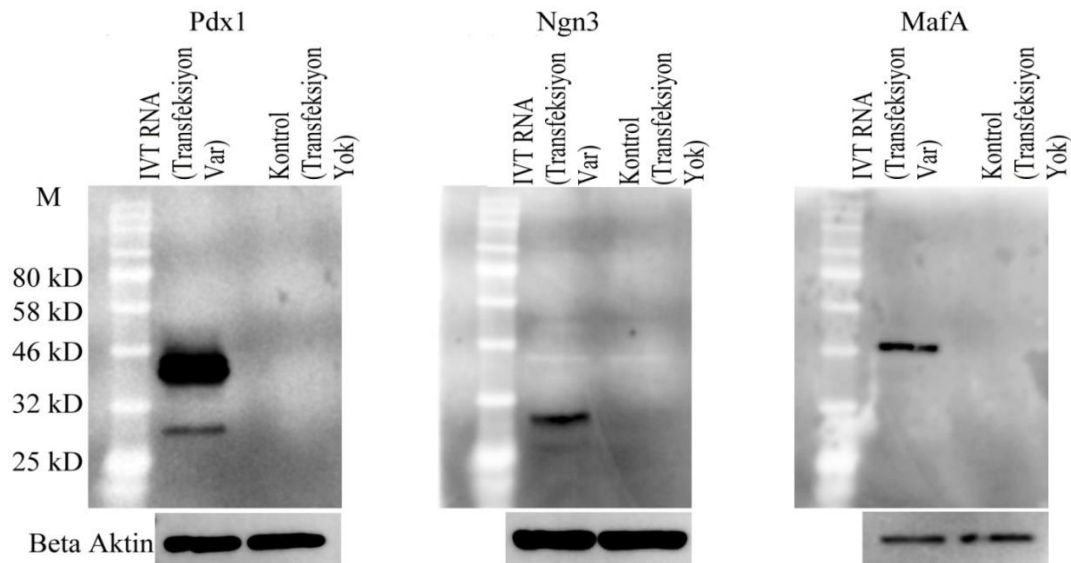
Transfeksiyondan 16 saat sonra total RNA izolasyonu yapıldı. İzole edilen RNA'ların kalitatif ve kantitatif analizleri NanoDrop spektrofotometre kullanılarak ölçüldü. İzole edilen RNA'lardan cDNA sentezlendi. cDNA örnekleri kantitatif PCR yapılarak Light Cycler 96 system (Roche, Basel, Switzerland) cihazında analiz edildi. Karşılaştırmalı ölçüm  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  ile hesaplandı ve *Gapdh* ekspresyonuyla normalize edildi (Şekil 4.6).



Şekil 4. 6. a) *İn vitro* transkribe edilen *Pdx1*, *Ngn3* ve *MafA* RNA'larının insan fibroblast hücrelerinde ekspresyonu. *İn vitro* transkribe edilen *Pdx1*, *Ngn3* ve *MafA* RNA'larının *Gapdh* ekspresyonuna göre normalize edilmiş qPCR sonuçları (Hata çizgisi standart sapmayı göstermektedir; n=3.) b) qPCR sonuçlarının jel görüntüsü.

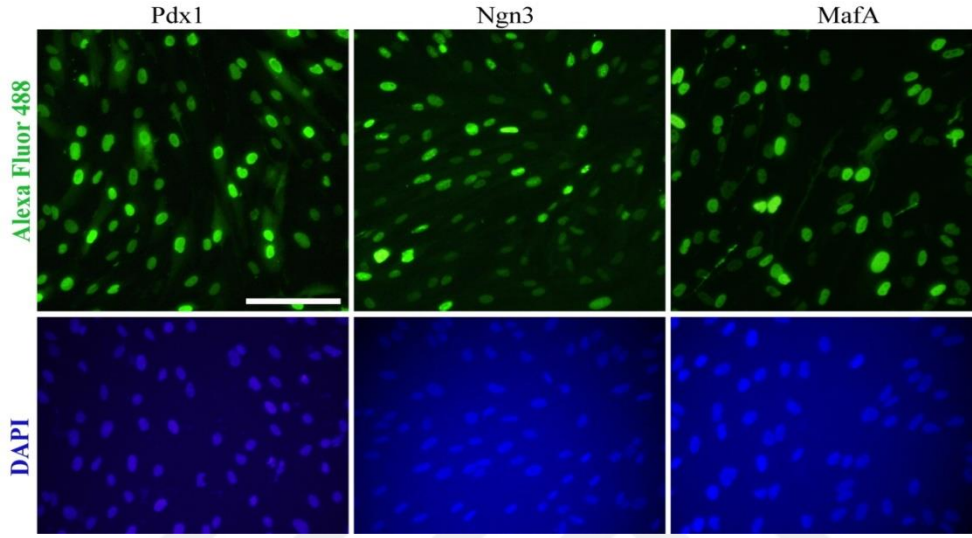
#### 4.4. Sentezlenen *Pdx1*, *Ngn3* ve *MafA* mRNA'larının İnsan Hücrelerinde *İn vivo* Translasyonu ve Doğru Lokalizasyonunun Gösterilmesi

Transfeksiyondan 16 saat sonra hücrelerden total protein izolasyonu yapıldı. İzolasyonun ardından proteinler jele yüklenerek Western Blotlama işlemi yapıldı. Görüntüleme cihazında proteinler görüntülendi (Şekil 4.7).

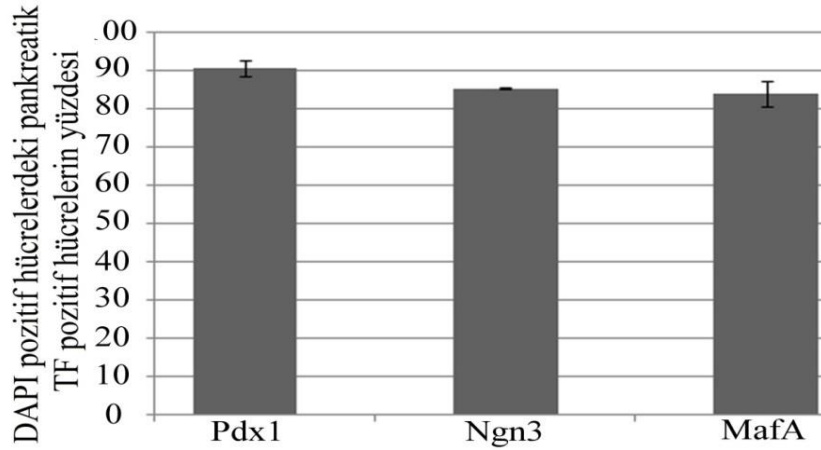


Şekil 4. 7. İnsan hücrelerindeki PDX1, NGN3 ve MAFA proteinlerinin Western Blot görüntüleri.

Kültür ortamında BJ hücrelerine farklı sentetik mRNA'ların transfeksiyonu yapıldı. Transfeksiyondan 16 saat sonra hücrelere immünohistokimyasal boyama yapıldı (Şekil 4.8). Her bir kültüre ait 10 farklı noktadan mikroskop görüntüsü alındı. Bu deney bağımsız olarak 2 kere tekrarlandı. Her deneyde elde edilen fotoğraflardaki DAPI pozitif ve transkripsiyon faktörü pozitif hücreler sayıldı. DAPI pozitif hücrelerde transkripsiyon faktörü pozitif olan hücrelerin yüzdesi hesaplanarak grafik çizildi (Şekil 4.9).



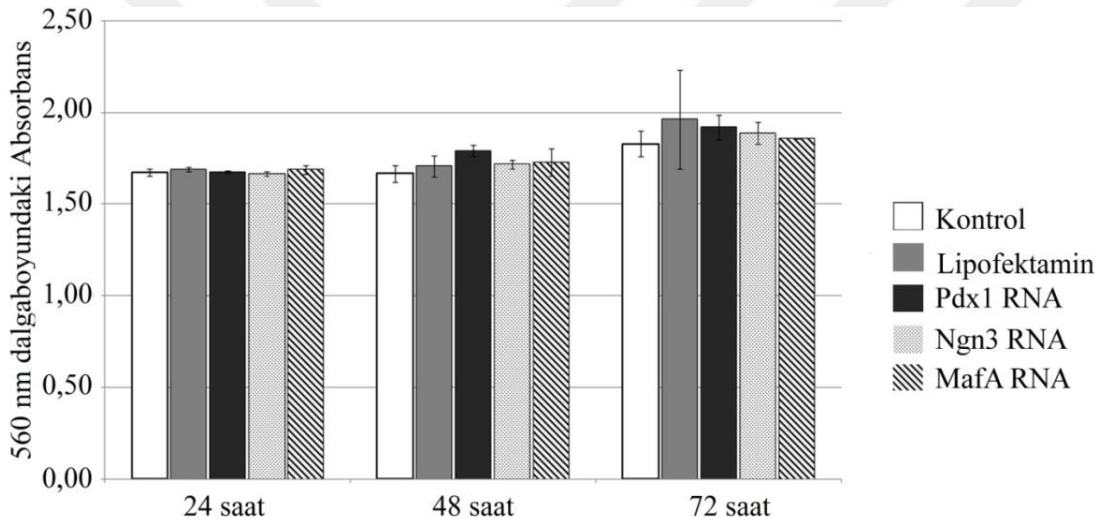
Şekil 4. 8. İnsan hücrelerindeki PDX1, NGN3 ve MAFA proteinlerinin immünofloresan görüntüleri. (Bar 100µm'dir.)



Şekil 4. 9. *In vitro* transkribe edilen *Pdx1*, *Ngn3* ve *MafA* RNA'larının insan fibroblast hücrelerinde transfeksiyon ve translasyon verimleri. (Hata çizgisi standart sapmayı göstermektedir; n=2.)

#### 4.5. *Pdx1*, *Ngn3* ve *MafA* mRNA'larının İnsan Hücrelerine Transfeksiyonundan Sonra Hücrelerin Canlılıklarının İncelenmesi

BJ hücreleri her bir kuyucukta  $1.5 \times 10^4$  hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu kültür kabına ekildi. RNA transfeksiyon protokolü uygulayarak her bir kuyucukta 110 ng RNA olacak şekilde transfeksiyon yapıldı. Her bir kuyucuğa bir genin RNA'sı (*Pdx1*, *Ngn3* ve *MafA*) transfeke edildi. Kontrol olarak bir kuyucuğa RNA içermeyen transfeksiyon karışımından verildi. İşlemin ardından hücreler tekrardan 37 °C %5 CO<sub>2</sub> inkübatöre koyuldu ve inkübasyona bırakıldı. Transfeksiyondan 20, 44 ve 68 saat sonra CellTiter-Blue cell viability assay kit (Promega, Madison, WI) karışımından 20 µl alınarak hücrelerin üzerinde bulunan 200 µl besin ortamına eklendi ve 37 °C ve %5 CO<sub>2</sub>'li inkübatörde 4 saat beklendi. İnkübasyonun ardından Multiskan Go microplate spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA) cihazında 560 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçüldü. Deney bağımsız olarak 3 kere tekrarlandı. Üç deneyin ortalaması alınarak standart sapma hesaplandı ve grafik çizildi (Şekil 4.10).



Şekil 4. 10. *In vitro* transkribe edilen *Pdx1*, *Ngn3* ve *MafA* RNA'larının transfeksiyonundan sonra insan hücrelerinin canlılık testi. (Hata çizgisi standart sapmayı göstermektedir; n=3.)

## 5. TARTIŞMA

Birçok hücrede ana transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonu, hücre programlanması için gereklidir (Fomina-Yadlin vd 2010, Kubicek vd 2012, Pennarossa vd 2013, Xie vd 2013, Yi vd 2013). Özellikle beta hücresi programlanmasında ana transkripsiyon faktörleri kullanılarak başarılı çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalarda, *Pdx1*, *Ngn3* ve *MafA* kombinasyonunun pankreas ve beta hücresi gelişimi için gerekli olduğu gösterilmiştir (Akinci vd 2012, Banga vd 2012, Yang vd 2013, Thulé vd 2014, Chen vd 2014, Luo vd 2014, Li vd 2014, Cavelti-Weder vd 2016, Lee vd 2016, Lima vd 2016, Wang vd 2017, Hill vd 2017, Matsuoka vd 2017, Cavelti-Weder vd 2017). Bu nedenle bu tez çalışmasında; önemli pankreatik transkripsiyon faktörlerinin genleri olan *Pdx1*, *Ngn3* ve *MafA* seçilmiş, bu genlerin sentetik mRNA'ları dizayn edilmiş, *in vitro* üretilmiş ve insan hücrelerindeki etkisi gösterilmiştir.

Daha önce yapılan çalışmalarda, genlerin hücreye taşınması sırasında kullanılan yöntemler, bazı sorunları ortaya çıkarmıştır. Vektörlerin düşük transgen ekspresyonu, düşük transdüksiyon verimi, konakçı genomuna rastgele entegre olmaları ve transgenin daha sonra hücre tarafından susturulması gibi sorunlar bu vektörlerin gen aktarımı çalışmalarındaki kullanımlarını kısıtlamıştır (Saha vd 2009). Yüksek ekspresyon verimi olan lentiviral ve retroviral vektörler genoma entegre olduğundan dolayı tümör oluşturma riskleri vardır. Adenoviral vektörler genoma entegre olmazlar fakat retrovirüslere göre ekspresyon verimleri düşüktür. Bu nedenle tedavi amacıyla yapılan hücresel programlama deneylerinde genoma entegre olmayan vektörler kullanılmalıdır. Bunlar; epizomal vektörler, rekombinant sinyal molekülleri, Sendai RNA virüsü, miRNA'lar ve sentetik RNA'lardır (Kobbas vd 2016). Yapmış olduğumuz çalışmada, yüksek transfeksiyon verimi olan, genoma entegre olmayan ve hücrelerde toksik etki göstermeyen önemli insan pankreatik transkripsiyon faktörleri: *Pdx1*, *Ngn3* ve *MafA* genlerinin sentetik mRNA'ları dizayn edilmiş ve üretilmiştir.

Daha önce yapılan çalışmalarda fare *Pdx1*, *Ngn3* ve *MafA* sentetik mRNA'ları dizayn edilmiş ve üretilen bu RNA'lar ile pankreatik AR42J ekzokrin hücrelerinden beta hücre benzeri hücreler programlanmıştır. Dizayn edilen bu mRNA'larda; translasyonun gerçekleşmesi için güçlü bir KOZAK dizisi içeren 5' UTR, alfa globin 3' UTR, ORF dizileri ve poly(A) kuyruğu için gerekli olan oligo(dT) dizisi içermektedir (Kobbas vd 2016). Bu tez çalışmasında diğer çalışmalardan farklı olarak insan *Pdx1*, *Ngn3* ve *MafA* genlerinin sentetik RNA'ları dizayn edilmiş ve sentezlenmiştir.. Öncelikle çift zincirli DNA tasarlanmış ardından bu DNA'dan *in vitro* olarak sentetik RNA transkribe edilmiştir. PCR sonuçları ORF ve UTR ligasyonunun spesifik olmayan ürünler verdiğini de göstermiştir (Şekil 4.2). Bu durum PCR için sınırlı sayıda primer tasarlanabilme olanağından kaynaklanmaktadır. Spesifik olmayan ürünlerden kurtulmak için uygun boyuttaki DNA fragmentleri jelden izole edilmiş ve saflaştırılmıştır. Saflaştırılan bu DNA'ların ilgili genlere ait olup olmadığı DNA sekanslama sonucunda belirlenmiştir. Çalışmada yüksek doğrulukta PCR reaksiyonu gerçekleştiren DNA polimerazlar tercih edilmiş ve çalışma en az baz hatasıyla tamamlanmıştır. Dizayn edilen DNA ve üretilen RNA'ların kalitesini karşılaştırmak amacıyla; Derrick Rossi tarafından üretilmiş (Addgene plasmid #26820) pcDNA3.3\_NDG plazmitinden IVT reaksiyonuyla *GFP* RNA'sı üretilmiştir (Warren vd 2010). Elde edilen *GFP* RNA'sı ile ilgili RNA'ların kalitesi NanoDrop Spektrofotometresi (Şekil 4.4) ve denature agaroz

jelde (Şekil 4.5) karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak yüksek verimde ve doğrulukta RNA üretildiği gösterilmiştir (Şekil 4.4, Şekil 4.5).

Ökaryotik mRNA'larda 5'uçta m<sup>7</sup>G(7-metil-guanozin) modifikasyonu vardır. 5' guanin cap; metillenmiş Guaninin ilk transkribe olan nükleotide 5'-5'-trifosfat aracılığıyla bağlanmasıyla oluşur (Wei vd 1975). mRNA'nın hücre içerisindeki yarı ömrünü uzatmak ve verimli bir translasyon için IVT mRNA'da 5' guanin cap çok önemlidir (Yisraeli vd 1989). Sitozolde bulunan mRNA'ların 5'-3' ekzonükleazlar tarafından tanınmamasını, dolayısıyla da yıkılmasını engeller ve translasyonun başlaması için görev alır. Aynı zamanda nükleusta bulunan pre-mRNA'nın doğru bir şekilde alternatif kesip ekleme işlemi yapmasına yardımcı olur ve olgun mRNA'nın nükleustan stoplazmaya geçmesine yardımcı olur (Ramanathan vd 2016, Topisirovic vd 2011). 5' guanin cap olmayan RNA'lar hücrede RIG-I sinyali tetikler ve hücrede stres yaratır (Pichlmair vd 2006). Yapmış olduğumuz çalışmada *in vitro* üretilen sentetik mRNA'ların hücre içerisindeki degradasyonunu önlemek, hücrelerdeki sitotoksik etkiyi azaltmak ve doğru translasyon sağlamak amacıyla 3'-0-Me-m<sup>7</sup>G(5')ppp(5')G ARCA cap analogu kullanılmıştır. Deneysel hata sonucu reaksiyon ortamında analog bağlanmamış mRNA miktarını azaltmak için IVT mRNA'lara antartik fosfataz uygulanarak 5' uçta bulunan serbest fosfatlar uzaklaştırılmıştır. Bu modifiye bazlar ile yüksek kalitede RNA sentezlenmiş (Şekil 4.4, Şekil 4.5) ve hücrelere transfeksiyonda herhangi bir sitotoksik etki görülmemiştir (Şekil 4.10).

Ökaryotik mRNA'larda bulunan bazlar bazı modifikasyona uğrarlar. Bu modifikasyonların yokluğu hücrede RIG-I ve PKR sinyallerini arttırdığı için hücredeki sitotoksik etki artmaktadır. Bu nedenle bu modifikasyonların gerçekleşmesi hücrenin yaşayabilirdiği için önemlidir (Karikó vd 2007, Uzri vd 2009). Yapmış olduğumuz çalışmada PNM IVT RNA'larının hücre içerisindeki toksik etkisini azaltmak için modifiye bazlar kullanıldı. Sitozin yerine 5-metilsitozin (5mC), urasil yerine psödourasil kullanılarak IVT reaksiyonu gerçekleştirildi. Sonuç olarak hücrede sitotoksik etki görülmemiştir (Şekil 4.10).

B18R proteini, hücrenin doğal bağışıklık sistemini baskılar. Böylelikle hücrenin RNA virüslerine ve yabancı RNA molekülüne gösterdiği immün yanıt azaltılır ve hücredeki sitotoksik etki fark edilemeyecek kadar azalır (Fritz-Frenh vd 2014). Yapmış olduğumuz çalışmada, hücrelerdeki sitotoksik etkinin azalması için IVT mRNA'ların sentezlenmesi sırasında 5' cap ve modifiye bazlar kullanılmıştır. Ancak üretilen IVT mRNA'ların hücrelere transfeksiyonu sırasında yine de sitotoksik etkiler gözlenmiştir. Transfeksiyondan 12 saat önce hücre kültür ortamına B18R rekombinant proteini eklendiğinde sitotoksik etkinin ortadan kalktığı ve transfeksiyondan 3 gün sonra bile hücrelerde herhangi bir sitotoksik etki gözlenmediği deneysel olarak gösterilmiştir (Şekil 4.10).

Dizayn edilen mRNA'ların UTR bölgeleriyle hücre içerisinde doğal olarak bulunan *Pdx1*, *Ngn3* ve *MafA* mRNA'sında bulunan UTR dizileri bir birinden farklıdır. Yapmış olduğumuz çalışmada elde edilen qPCR verileri, hazırlanan *Pdx1*, *Ngn3* ve *MafA* IVT mRNA'larıyla insan BJ hücresinin yüksek oranda transfekte edildiğini göstermiştir (Şekil 4.9). Bu işlem sırasında sadece hücre dışından transfekte edilen RNA'ları tespit etmek amacıyla primerler (Çizelge 3.3) ORF ve UTR bölgelerinden

seçilmiştir. İlgili üç gen için de sonuçlar gösterilmiştir (Şekil 4.6). Proteinlerin translasyonu ve doğru lokalizasyonu WB ve IF ile gösterilmiştir (Şekil 4.7, Şekil 4.8).

PDX1 proteininin ~ 40 kD olduğu Western Blot deneylerinde anti-Pdx1 antikoru (Abcam, ab134150) ile gösterilmiş ve elde edilen sonuçlar üretici firmanın gösterdiği sonuçlarla tutarlı olduğu görülmüştür. NGN3 proteininin ~ 30 kD olduğu anti-Ngn3 antikoru (Abcam, ab38548) ile gösterilmiştir. Yapılan çalışmada elde edilen NGN3 protein boyutunun Pinney (2011) tarafından aynı antikor kullanılarak yapılan çalışmada elde edilen sonuçla tutarlı olduğu gösterilmiştir (Pinney vd 2011). MAFA proteininin ~48 KDa olduğu anti-MafA antikoru (Abcam, ab26405) ile gösterilmiştir. Yapılan çalışmada elde edilen MAFA protein boyutunun Kondo (2009) tarafından aynı antikor kullanılarak yapılan çalışmadan elde edilen sonuçla (Şekil 4.7) tutarlı olduğu gösterilmiştir (Kondo vd 2009).

Transkripsiyon faktörleri hedef RNA'ların sentezlenmesi için gerekli olan cis-düzenleyici elementlerdir. Ökaryotik hücrelerde bu işlemin yapılabilmesi için nükleusa taşınırlar ve DNA'ya bağlanma domainleri bulundurmaları sebebiyle özel DNA dizilerine bağlanarak görev yaparlar (Todeschini vd 2014). Daha önceki çalışmalarda yapılan immüno floresan boyamalarda PNM transkripsiyon faktörlerinin hücrenin nükleusunda lokalize olduğu gösterilmiştir (Akinci vd 2012, Banga vd 2012, Yang vd 2013). Yaptığımız bu çalışmada immüno floresan boyama ile PDX1, NGN3 ve MAFA proteinlerinin hücrenin nükleusunda lokalize olduğu gösterilmiştir. Aynı kültür hücrelerine ikinci bir Hoechst boyaması yapılarak proteinlerin nükleusta konumlandığı kesinleştirilmiştir (Şekil 4.8).

mRNA'ların hücre içerisindeki stabilizasyonu ve degradasyon süresi, üretilcek olan protein miktarını doğrudan etkiler. Hücresel farklılaşma ve hücre programlaması için hücre içerisinde oluşan proteinin miktarı ve oluşma zamanı oldukça önemlidir. Doğal bir hücresel farklılaşmayı gerçekleştirmek amacıyla hücre içerisindeki protein miktarı ve o proteinin hücre içerisinde bulunma zamanlarını taklit etmek gerekir. Aynı proteinin bir hücrede az sentezlenmesi gerekirken başka bir hücrede fazla sentezlenmesi gerekebilir. Bir hücre için gereken mRNA stokiyometrisi başka bir hücre için farklı olabilmektedir. Bu nedenle hücre içerisindeki mRNA stokiyometrisi oldukça önemlidir (White vd 2008, Schwitzgebel vd 2000, Arda vd 2013). Yapmış olduğumuz bu çalışmada üretilen *Pdx1*, *Ngn3* ve *MafA* RNA'ları hücrelere farklı konsantrasyonlarda transfekte edilebilmektedir. Hatta bu mRNA'lar istenilen kombinasyon ve stokiyometride hazırlanarak hücrelerde farklılaştırma çalışmaları denenebilir ve fonksiyonel genomik çalışmalarında kullanılabilir. Böylelikle hücrelerin beta hücrelerine programlanması için gerekli olan dozaj stokiyometrisi bulunabilecektir.

Sentetik mRNA'larla hücresel programlamanın olumsuz yönleri de vardır. Sentetik mRNA'ların periyodik olarak hücreye transfeksiyonu hücrelerdeki kontaminasyon riskini arttırmakta aynı zamanda dışarıdan verilen mRNA hücrede sitotoksik etkiler yaratabilmektedir. Bunlara rağmen, sentetik mRNA'larda dozaj ayarlaması yapılabildiğinden dolayı hücrede en az sitotoksik etki yaratacak kritik mRNA konsantrasyonu bulunabilir (Warren vd 2010). Yapılan çalışmada hücrelere transfekte edilen RNA miktarı üçüncü günün sonunda bile her hangi bir toksik etki yaratmamış (Şekil 4.10) ve hücrelerin büyük bir kısmı başarılı şekilde transfekte olmuş

(Şekil 4.9) ve sentetik mRNA'nın *in vivo* translasyonu sonucu yüksek miktarda protein üretilmiştir (Şekil 4.7).

Hücrelerin doğal farklılaşma sürecinde, hücredeki proteinlerin miktarı, ekspresyon zamanı ve stokiyometrisi oldukça önemlidir. Bu nedenle, hücre programlaması sırasında gerekli olan protein miktarı ve stokiyometrisi hücreden hücreye farklılık göstermektedir (White vd 2008, Schwitzgebel vd 2000, Arda vd 2013). Yapmış olduğumuz çalışmada; İnsan BJ hücrelerine eşit miktarda *Pdx1*, *Ngn3* ve *MafA* RNA'sı transfekte edilmiş ve *Ins* ekspresyonuna bakılmış, sonuç olarak hücrelerde *Ins* ekspresyonu gözlenmemiştir. Bu tez çalışmasında üretilmiş olan IVT RNA'lar hücrelere farklı stokiyometrilere transfekte edilerek farklılaştırma deneyleri yapılabilir.

Daha önce yapılan çalışmalarda; *Pdx1*, *Ngn3* ve *MafA* kombinasyonunun pankreas ve beta hücresi gelişimi için gerekli olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmalarda gelişim evresi beta hücresine yakın olan hücreler kullanılmış ve farklılaştırma deneyleri sonrasında *Ins* ekspresyonu sağlandığı gösterilmiştir (Akinci vd 2012, Banga vd 2012, Yang vd 2013, Thulé vd 2014, Chen vd 2014, Luo vd 2014, Li vd 2014, Lee vd 2016, Lima vd 2016, Wang vd 2017, Hill vd 2017, Matsuoka vd 2017, Cavelti-Weder vd 2017). Yapmış olduğumuz tez çalışmasında, farklılaştırma deneylerinde insan BJ hücreleri kullanılmış ve bu hücrelerde *Ins* ekspresyonu gözlenmemiştir. Daha sonra yapılacak olan çalışmalarda, bu tez çalışmasında üretilmiş olan IVT RNA'lar kullanılarak, gelişim evresi beta hücresine yakın hücrelerde farklılaştırma deneyleri yapılabilir böylelikle *Ins* ekspresyonu sağlanabilir.

Sonuç olarak, bu tez çalışmasında *Pdx1*, *Ngn3* ve *MafA* ORF'leri fare beta globin 3'-UTR ve T7 promotörü yanında güçlü bir KOZAK sekansı içeren 5'-UTR ile birleştirilerek rekombinant DNA kalıpları hazırlanmıştır. Hazırlanan bu rekombinant DNA'lardan kalitatif ve kantitatif olarak yüksek verimde *in vitro* transkripsiyon gerçekleştirilmiş ve sentetik RNA'lar elde edilmiştir. Elde edilen RNA'lar insan hücrelerine yüksek oranda transfekte edilmiş ve hücrelerde toksik etki yaratmamıştır. Transkribe edilen RNA'ların ayrıca doğru bir şekilde translasyona uğradığı ve hücrede doğru yere lokalize olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada, beta hücresi programlanmasında güvenle kullanılabilecek, pankreatik gelişim için gerekli olan önemli transkripsiyon faktörlerinin sentetik mRNA'larının dizaynı, *in vitro* üretimi ve hücredeki ekspresyonu gösterilmiştir.

## 6.SONUÇ

### 6.1. *Pdx1*, *Ngn3* ve *MafA* Çift Zincirli Kalıp DNA'nın Tasarımı

Uzun süreli stabilite ve doğru bir transkripsiyon için *in vitro* transkripsiyonda genlerin modifiye edilmiş UTR bölgeleriyle ligasyonu yapılmalıdır. Bu nedenden dolayı deneyde UTR bölgelerinin ilgili genlerin çift zincirli DNA'ları ile ligasyonunun doğru bir şekilde yapılması önemlidir. Başlangıç olarak *Pdx1*, *Ngn3* ve *MafA* ORF bölgeleri PCR yardımıyla çoğaltılmış ve agaroz jelde gösterilmiştir. Jele UV ışığı altında bakılmış ve *Pdx1* 849 bp, *Ngn3* 643 bp ve *MafA* 1059 bp olarak istenilen uzunlukta gösterilmiştir (Şekil 4.1). 5' UTR (87 bp) ve 3' UTR (119 bp), ligasyonu yapılan ürünler PCR ile çoğaltılmış ve agaroz jelde gösterilmiştir. Jele UV ışığı altında bakılmış ve *Pdx1* 1055 bp, *Ngn3* 849 bp ve *MafA* 1265 bp olarak istenilen uzunlukta gösterilmiştir (Şekil 4.2). Ligasyon ürünlerine PCR yardımıyla Poly(T) Kuyruğu (T<sub>120</sub>) eklenmiş ve örnekler agaroz jelde koşturulmuştur. Jelin görüntülenmesi UV ışığı altında yapılmış ve 120 bp Poly(T) kuyruğunun ligasyonla eklendiği gösterilmiştir (Şekil 4.3). UTR ligasyonu yapılmış ORF'ler sekanslama için Macrogen şirketine gönderilmiştir. Sekanslama sonucu her bir genin klonlaması ve PCR'ının yüksek oranda doğru olarak yapıldığını göstermiştir (*Pdx1* için % 99.7, *Ngn3* için %99.8 ve *MafA* için %99.9). Sonuçlar NCBI verileriyle karşılaştırıldığında *Pdx1*'da aminoasit değişimine neden olmayan iki nükleotid değişimi gözlenmiş, *Ngn3*'de F199S amino asit değişimine neden olan bir nükleotid değişimi gözlenmiş ve son olarak *MafA*'da aminoasit değişimine neden olmayan bir nükleotid değişimi gözlenmiştir.

### 6.2. *Pdx1*, *Ngn3* ve *MafA* mRNA'larının *In vitro* Transkripsiyonu (IVT)

*In vitro* transkribe edilen RNA'ların kalitatif ve kantitatif analizinin yapılması için NanoDrop Spektrofotometresinde OD (Optik Dansite) değerleri ölçülmüştür. Sentezlenen bütün RNA örneklerinde OD değerleri beklenen aralıktadır. RNA örneklerinin saflıkları için  $A_{260}/A_{280} \geq 1,8$  ve  $A_{260}/A_{230} \sim 2$  (Şekil 4.4) oranları bulunmuştur. Bu sonuç; saflık derecesi yüksek RNA üretildiğini göstermiştir. Sentezlenen RNA'ların boyutları denature edilmiş agaroz jele yüklenerek gösterilmiştir. Sonuçlar, sentezlenen RNA'ların beklenen boyutta olduğunu; *Pdx1* için 1175 bp, *Ngn3* için 969 bp ve *MafA* için 1385 bp boyutunda olduğunu göstermiştir (Şekil 4.5).

### 6.3. Sentezlenen *Pdx1*, *Ngn3* ve *MafA* mRNA'larının İnsan Hücrelerinde Ekspresyonu

*In vitro* transkribe edilen RNA'ların hücre içerisindeki ekspresyon seviyeleri transfeksiyondan 16 saat sonra gösterilmiştir. qPCR sonuçları transfekte edilen *Pdx1*, *Ngn3* ve *MafA* RNA'larını göstermektedir. qPCR sonuçları ve agaroz jel görüntüleri (Şekil 4.6) *in vitro* transkribe edilen RNA'ların transfeksiyondan 16 saat sonra insan hücrelerinde yüksek şekilde eksprese olduğunu göstermiştir.

#### 6.4. Sentezlenen *Pdx1*, *Ngn3* ve *MafA* mRNA'larının İnsan Hücrelerinde Translasyonu ve Doğru Lokalizasyonu

*In vitro* sentezlenen RNA'ların insan BJ hücrelerinde doğru translasyon olduğunu göstermek amacıyla Western Blot (WB) deneyi yapılmıştır. WB sonuçları IVT RNA'ların doğru bir şekilde proteine dönüştüğünü göstermiştir (Şekil 4.7). Ayrıca IVT RNA'lardan translasyona uğramış proteinlerin (PDX1, NGN3 ve MAFA) hücre içersinde doğru yerde lokalize olduğu immünofloresan (IF) deneyleriyle gösterilmiştir. IF görüntüleri her üç proteinin de diğer transkripsiyon faktörlerinde olduğu gibi nükleusta lokalize olduğunu göstermiştir (Şekil 4.8). IVT RNA'larının transfeksiyonundan 16 saat sonra, ilgili RNA'ların insan hücrelerinde proteine dönüşme oranları: *Pdx1* için  $90,6 \pm 2,1$  , *Ngn3* için  $85,4 \pm 0,2$  ve *MafA* için  $83,9 \pm 3,3$  olduğu gösterilmiştir (Şekil 4.9).

#### 6.5. Sentezlenen *Pdx1*, *Ngn3* ve *MafA* mRNA'larının İnsan Hücrelerine Transfeksiyonundan Sonra Hücrelerin Canlılıklarının İncelenmesi

Hücre canlılık deneyleri, *in vitro* transkribe edilmiş *Pdx1*, *Ngn3* ve *MafA* RNA'larının insan hücrelerine transfeksiyonundan üç gün sonra dahi toksik etki yaratmadığını göstermiştir (Şekil 4.10). Hücre canlılık deneylerinde hücrelere resazurin verilmiştir. Metabolik olarak aktif olan hücreler resazurini resofurine dönüştürür. Resofurin 560 nm dalgaboyunda absorbands verir. Bu nedenle metabolik olarak aktif olan hücrelerde 560 nm dalgaboyunda ölçülen absorbands değeri, metabolik olarak inaktif olan hücrelerde ölçülen değerden yüksek çıkmaktadır. IVT RNA transfekte edilmiş hücrelerle transfekte edilmemiş hücrelerden elde edilen absorbands değerleri arasında istatistiksel olarak fark yoktur. Bu sonuç IVT RNA'ların insan BJ hücresi için toksik olmadığını göstermektedir.

#### 6.6. Sentezlenen *Pdx1*, *Ngn3* ve *MafA* mRNA'larının Hücre Farklılaşmasındaki Rollerinin İncelenmesi

Hücre farklılaştırma deneyinden sonra yapılan immünofloresan boyamasında INS pozitif hücre görülmemiştir. Bu sonuçlara paralel olarak; qPCR sonuçlarında *Ins* ekspresyonu ile *Beta-aktin* gen ekspresyonu arasında anlamlı bir sonuç bulunamamıştır.

## 7. KAYNAKLAR

- ABEL, E.D., PERONI, O., KIM, J.K., KIM, Y.B., BOSS, O., HADRO, E., MINNEMANN, T., SHULMAN, G.I. and KAHN, B.B. 2001. Adipose-selective targeting of the GLUT4 gene impairs insulin action in muscle and liver. *Nature*, 409, 729–733.
- AKINCI, E., BANGA, A., GREDER, L.V., DUTTON, J.R. and SLACK, J.M. 2012. Reprogramming of pancreatic exocrine cells towards a beta (beta) cell character using Pdx1, Ngn3 and MafA. *Biochemical Journal*, 442, 539-550.
- AL-HASANI, K. et al. 2013. Adult duct-lining cells can reprogram into  $\beta$ -like cells able to counter repeated cycles of toxin-induced diabetes. *Dev Cell*, 26, 86–100.
- AMOS, A., MCCARTY, D. and ZIMMET, P. 1997. The rising global burden of diabetes and its complications: estimates and projections to the year 2010. *Diabetic Med*, 14, 1–85.
- ARDA, H.E., BENITEZ, C.M. and KIM, S.K. 2013. Gene regulatory networks governing pancreas development. *Dev Cell*, 25, 5–13.
- ARDA, H.E., BENITEZ, C.M. and KIM, S.K. 2013. Gene regulatory networks governing pancreas development. *Dev Cell*, 25, 5–13.
- ASHIZAWA, S., BRUNICARDI, F.C. and WANG, X.P. 2004. PDX-1 and the pancreas. *Pancreas*, 28, 109-20.
- ASTRUP, A. and FINER, N. 2000. Redefining type 2 diabetes: ‘diabesity’ or ‘obesity dependent diabetes mellitus’. *Obesity Rev*, 1, 57–59.
- BANGA, A., AKINCI, E., GREDER, L.V., DUTTON, J.R. and SLACK, J.M. 2012. In vivo reprogramming of Sox9+ cells in the liver to insulin-secreting ducts. *Proc Natl Acad Sci USA*, 109, 15336-15341.
- BONNER-WEIR, S., TANEJA, M., WEIR, G.C., TATAKIEWICZ, K., SONG, K.H., SHARMA, A. and O’NEIL, J.J. 2000. In vitro cultivation of human islets from expanded ductal tissue. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97, 7999-8004.
- BRISSOVA, M., FOWLER, M.J., NICHOLSON, W.E., CHU, A., HIRSHBERG, B., HARLAN, D.M. and POWERS, A.C. 2005. Assessment of human pancreatic islet architecture and composition by laser scanning confocal microscopy. *J Histochem Cytochem Off J Histochem Soc*, 53, 9, 1087–97.
- BRISSOVA, M., BLAHA, M., SPEAR, C., NICHOLSON, W., RADHIKA, A., SHIOTA, M., CHARRON, M.J., WRIGHT, C.V. and POWERS, A.C.J. 2005. Reduced PDX-1 expression impairs islet response to insulin resistance and worsens glucose homeostasis. *Physiol Endocrinol Metab*, 288, 707–714.

- BRISSOVA, M., SHIOTA, M., NICHOLSON, W.E., GANNON, M., KNOBEL, S.M., PISTON, D.W., WRIGHT, C.V. and POWERS, A.C.J. 2002. Reduction in pancreatic transcription factor PDX-1 impairs glucose-stimulated insulin secretion. *Biol Chem*, 277, 11225–11232.
- BRUNING, J.C., MICHAEL, M.D., WINNAY, J.N., HAYASHI, T., HORSCH, D., ACCILI, D., GOODYEAR, L.J. and KAHN, C.R. 1998. A muscle-specific insulin receptor knockout exhibits features of the metabolic syndrome of NIDDM without altering glucose tolerance. *Mol Cell*, 2, 559–569.
- CABRERA, O., BERMAN, D.M., KENYON, N.S., RICORDI, C., BERGGREN, P.O. and CAICEDO, A. 2006. The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103, 7, 2334–9.
- CAVELTI-WEDER, C. et al. 2016. Hyperglycaemia attenuates in vivo reprogramming of pancreatic exocrine cells to beta cells in mice. *Diabetologia*. 59, 3, 522–32.
- CAVELTI-WEDER, C., ZUMSTEG, A., LI, W. and ZHOU, Q. 2017. Reprogramming of Pancreatic Acinar Cells to Functional Beta Cells by In Vivo Transduction of a Polycistronic Construct Containing Pdx1, Ngn3, MafA in Mice. *Curr Protoc Stem Cell Biol*, 40, 10, 10–12.
- CHEN, Y.J. et al. 2014. De novo formation of insulin-producing "neo- $\beta$  cell islets" from intestinal crypts. *Cell Rep*, 27, 6, 1046–58.
- CHERA, S. et al. 2014. Diabetes recovery by age-dependent conversion of pancreatic  $\delta$ -cells into insulin producers. *Nature*, 514, 503–507.
- COLLOMBAT, P., XU, X., RAVASSARD, P., SOSA-PINEDA, B., DUSSAUD, S., BILLESTRUP, N., MADSEN, O.D., SERUP, P., HEIMBERG, H. and MANSOURI, A. 2009. The ectopic expression of Pax4 in the mouse pancreas converts progenitor cells into alpha and subsequently beta cells. *Cell*, 138, 449–462.
- DAI, C., BRISSOVA, M., HANG, Y., THOMPSON, C., POFFENBERGER, G., SHOSTAK, A., CHEN, Z., STEIN, R. and POWERS, A.C. 2012. Islet-enriched gene expression and glucose-induced insulin secretion in human and mouse islets. *Diabetologia*, 55, 3, 707–718.
- FEANNY, M.A., FAGAN, S.P., BALLIAN, N., LIU, S.H., LI, Z., WANG, X., FISHER, W., BRUNICARDI, F.C. and BELAGULI, N.S. 2008. PDX-1 expression is associated with islet proliferation in vitro and in vivo. *J Surg Res*, 144, 8–16.
- FOMINA-YADLIN, D. et al. 2010. Small-molecule inducers of insulin expression in pancreatic alpha-cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 107, 15099–15104.

- FRITZ-FRENCH, C., SHAWAHNA, R., WARD, J.E., MAROUN, L.E. and TYOR, W.R. 2014. The Recombinant Vaccinia Virus Gene Product, B18R, Neutralizes Interferon Alpha and Alleviates Histopathological Complications in an HIV Encephalitis Mouse Model. *J Interferon Cytokine Res*, 34, 7, 510-7.
- GAVRILOVA, O., MARCUS-SAMUELS, B., GRAHAM, D., KIM, J.K., SHULMAN, G.I., CASTLE, A.L., VINSON, C., ECKHAUS, M. and REITMAN, M.L. 2000. Surgical implantation of adipose tissue reverses diabetes in lipotrophic mice. *Journal of Clinical Investigation*, 105, 271–278 .
- GIDEKEL FRIEDLANDER, S.Y., CHU, G.C., SNYDER, E.L., GIRNIUS, N., DIBELIUS, G., CROWLEY, D., VASILE, E., DEPINHO R.A. and JACKS, T. 2009. Context-dependent transformation of adult pancreatic cells by oncogenic K-Ras. *Cancer Cell*, 16, 379-89.
- GILON, P., SHEPHERD, R.M. and HENQUIN, J.C. 1993. Oscillations of secretion driven by oscillations of cytoplasmic Ca<sup>2</sup> as evidenced in single pancreatic islets. *The Journal of Biological Chemistry*, 268, 22265–22268.
- GUO, S., DAI, C., GUO, M., TAYLOR, B., HARMON, J.S., SANDER, M., ROBERTSON, R.P., POWERS, A.C. and STEIN, R. 2013. Inactivation of specific beta cell transcription factors in type 2 diabetes. *Journal of Clinical Investigation*, 123, 8, 3305–3316.
- HANG, Y. et al. 2014. The MafA transcription factor becomes essential to islet beta-cells soon after birth. *Diabetes*, 63, 6, 1994–2005.
- HANI, E.H., STOFFERS, D.A., CHEVRE, J.C., DURAND, E., STANOJEVIC, V., DINA, C., HABENER, J.F. and FROGUEL, P. 1999. Froguel Defective mutations in the insulin promoter factor-1 (IPF-1) gene in late-onset type 2 diabetes mellitus. *Journal of Clinical Investigation*, 104, 41-48.
- HILL, C.M., BANGA, A., ABRAHANTE, J.E., YUAN, C., MUTCH, L.A., JANECEK, J., O'BRIEN, T., GRAHAM, M.L. and DUTTON, J.R. 2017. Establishing a Large-Animal Model for In Vivo Reprogramming of Bile Duct Cells into Insulin-Secreting Cells to Treat Diabetes. *Human Gene Therapy Clinical Development*, 28, 2, 87-95.
- JOHNSON, J.D., AHMED, N.T., LUCIANI, D.S., HAN, Z., TRAN, H., FUJITA, J., MISLER, S., EDLUND, H. and POLONSKY, K.S.J. 2003. Increased islet apoptosis in Pdx1<sup>+/-</sup> mice. *Clinical Investigation*, 111, 1147–1160.
- JONSSON, J., CARLSSON, L., EDLUND, T. and EDLUND, H. 1994. Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice. *Nature*, 371, 606–609.
- JUNQUEIRA L.C., CARNEIRO J., KELLEY R.O. 1998. Basic Histology, 9th Ed. Appleton & Lange.

- KARIKO, K. and WEISSMAN, D. 2007. Naturally occurring nucleoside modifications suppress the immunostimulatory activity of RNA: implication for therapeutic RNA development. *Current Opinion in Drug Discovery and Development*, 10, 5, 523-32.
- KATAOKA, K., HAN, S.I., SHIODA, S., HIRAI, M., NISHIZAWA, M. and HANDA, H. 2002. MafA is a glucose-regulated and pancreatic beta-cell-specific transcriptional activator for the insulin gene. *The Journal of Biological Chemistry*, 277, 51, 49903–49910.
- KING, H., AUBERT, R. and HERMAN, W. 1998. Global burden of diabetes, 1995-2025. Prevalence, numerical estimates and projections. *Diabetes Care*, 21, 1414–1431.
- KLIP, A. and PAQUET, M. R. 2000. Glucose transport and glucose transporters in muscle and their metabolic regulation. *Diabetes Care*, 13, 228–243.
- KOBLAS, T., LEONTOVYC, I., LOUKOTOVA, S., KOSINOVA, L. and SAUDEK, F. 2016. Reprogramming of Pancreatic Exocrine Cells AR42J Into Insulin-producing Cells Using mRNAs for Pdx1, Ngn3, and MafA Transcription Factors. *Molecular Therapy Nucleic Acids*, 17, 5, 320.
- KROON, E. et al. 2008. Pancreatic endoderm derived from human embryonic stem cells generates glucose-responsive insulin-secreting cells in vivo. *Nature Biotechnology*, 26, 443–452.
- KUBICEK, S. et al. 2012. Chromatin-targeting small molecules cause class-specific transcriptional changes in pancreatic endocrine cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 109, 5364–5369.
- KULKARNI, R.N., BRUNING, J.C., WINNAY, J.N., POSTIC, C., MAGNUSON, M.A. and KAHN, C.R. 1999. Tissue-specific knockout of the insulin receptor in pancreatic beta cells creates an insulin secretory defect similar to that in type 2 diabetes. *Cell*, 96, 329–339.
- LEE, S., JEONG, S., LEE, C., OH, J. and KIM, S.C. 2016. Mesenchymal Stem Cells Derived from Human Exocrine Pancreas Spontaneously Express Pancreas Progenitor-Cell Markers in a Cell-Passage-Dependent Manner. *Stem Cells Int*, 2142646.
- LI, W., NAKANISHI, M., ZUMSTEG, A., SHEAR, M., WRIGHT, C., MELTON, D.A. and ZHOU, Q. 2014. In vivo reprogramming of pancreatic acinar cells to three islet endocrine subtypes. *Elife*, 1, 3, 01846.
- LIMA, M.J. MUIR, K.R., DOCHERTY, H.M., MCGOWAN, N.W.A., FORBES, S. HEREMANS, Y., HEIMBERG H., CASEY J. and DOCHERTY K. 2016. Generation of Functional Beta-Like Cells from Human Exocrine Pancreas. *PLoS ONE*, 11, 5, 156204.

- LIU, SH., DAVIS, A., LI, Z., BALLIAN, N., DAVIS, E., WANG, X.P., FISHER, W. and BRUNICARDI, F.C. 2007. Effective ablation of pancreatic cancer cells in SCID mice using systemic adenoviral RIP-TK/GCV gene therapy. *J Surg Res*, 141, 45-52.
- LIU, T., WANG, C.Y., GOU, S.M., WU, H.S., XIONG, J.X. and ZHOU, J. 2007. PDX-1 expression and proliferation of duct epithelial cells after partial pancreatectomy in rats. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 6, 424-9.
- LU, J., DONG, H., LIN, L., WANG, Q., HUANG, L. and TAN, J. 2014. miRNA-302 facilitates reprogramming of human adult hepatocytes into pancreatic islets-like cells in combination with a chemical defined media. *Biochem Biophys Res Commun*, 24, 453, 3, 405-10.
- LUO, H., CHEN, R., YANG, R., LIU, Y., CHEN, Y., SHU, Y. and CHEN, H. 2014. Reprogramming of mice primary hepatocytes into insulin-producing cells by transfection with multicistronic vectors. *J Diabetes Res*, 716163.
- MATSUOKA, T.A., ZHAO, L., ARTNER, I., JARRETT, H.W., FRIEDMAN, D., MEANS, A. and STEIN, R. 2003. Members of the large Maf transcription family regulate insulin gene transcription in islet beta cells. *Molecular and Cellular Biology*, 23, 17, 6049–6062.
- MATSUOKA, T.A. et al. 2017. Mafa Enables Pdx1 to Effectively Convert Pancreatic Islet Progenitors and Committed Islet  $\alpha$ -Cells Into  $\beta$ -Cells In Vivo. *Diabetes*, 66, 5, 1293-1300.
- MCHEHENRY, C.R. and STRAIN, J.W. 1997. Anatomy and Embryology of the pancreas. In: Clark O. H, editor. textbook of endocrine Surgery. Philedelphia: Saunders, 549-555.
- OFFIELD, M.F., JETTON, T.L., LABOSKY, P.A., RAY, M., STEIN, R.W., MAGNUSON, M.A., HOGAN, B.L., and WRIGHT, C.V. 1996. PDX-1 is required for pancreatic outgrowth and differentiation of the rostral duodenum. *Development*, 122, 983–995.
- OGINO, H. and YASUDA, K. 1998. Induction of lens differentiation by activation of a bZIP transcription factor L-Maf. *Science*, 280, 115–118.
- PAGLIUCA, F.W., MILLMAN, J.R., GURTLER, M., SEGEL, M., VAN DERVORT, A., RYU, J.H., PETERSON, Q.P., GREINER, D., and MELTON, D.A. 2014. Generation of functional human pancreatic  $\beta$  cells in vitro. *Cell*, 159, 428–439.
- PATTI, M. E. and KAHN, C. R. 1998. The insulin receptor—a critical link in glucose homeostasis and insulin action. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*, 9, 89–109.

- PENNAROSSA, G., MAFFEI, S., CAMPAGNOL, M., TARANTINI, L., GANDOLFI, F., and BREVINI, T.A. 2013. Brief demethylation step allows the conversion of adult human skin fibroblasts into insulin-secreting cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 110, 8948–8953.
- PICHLMAIR, A., SCHULZ, O., TAN, C.P., NÄSLUND, T.I., LILJESTROM, P., WEBER, F., REIS, E. and SOUSA, C. 2006. RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. *Science*, 10, 314, 997–1001.
- PINNEY, S. E., JAECKLE SANTOS, L. J., HAN, Y., STOFFERS, D. A. and SIMMONS, R. A. 2011. Exendin-4 increases histone acetylase activity and reverses epigenetic modifications that silence Pdx1 in the intrauterine growth retarded rat. *Diabetologia*, 54, 2606–2614.
- RAMANATHAN, A., ROBB, G.B. and CHAN, S.H. 2016. mRNA capping: biological functions and applications. *Nucl Acid Res*, 44, 7511–7526.
- RUTTER, G.A. 2011. Nutrient-secretion coupling in the pancreatic islet beta-cell: recent advances. *Molecular Aspects of Medicine*, 22, 6, 247–284.
- KONDO, T., EL HATTABI, I., NISHIMURA, W., LAYBUTT, D.R., GERALDES, P., SHAH, S., KING, G., BONNER-WEIR, S., WEIR, G. and SHARMA, A. 2009. p38 MAPK is a major regulator of MafA protein stability under oxidative stress. *Mol Endocrinol*, 23, 1281–1290.
- SAHA, K. and JAENISCH, R. 2009. Technical challenges in using human induced pluripotent stem cells to model disease. *Cell Stem Cell*, 4, 5, 584–595.
- SANGAN, C.B., JOVER, R., HEIMBERG, H. and TOSH, D. 2015. In vitro reprogramming of pancreatic alpha cells towards a beta cell phenotype following ectopic HNF4a expression. *Mol Cell Endocrinol*, 399, 50–59.
- SCHWITZGEBEL, V.M., SCHEEL, D.W., CONNERS, J.R., KALAMARAS, J., LEE, J.E., ANDERSON, D.J., SUSSEL, L., JOHNSON, J.D. and GERMAN, M.S. 2000. Expression of neurogenin3 reveals an islet cell precursor population in the pancreas. *Development*, 127, 3533–3542.
- SHAPIRO, A.M. et al. 2006. International trial of the Edmonton protocol for islet transplantation. *N. Engl. J. Med*, 355, 1318–1330.
- SHAPIRO, J., LAKEY, J.R.T., RYAN, E.A., KARBUTT, G.S., TATH, E., WARNOCK, G.I., KNETEMAN, N.M. and RAJATTE, R.V. 2000. Islet transplantation in seven patients with type1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med*, 343, 230–238.

- SHARMA, A. and STEIN, R. 1994. Glucose-induced transcription of the insulin gene is mediated by factors required for B-cell-type-specific expression. *Molecular and Cellular Biology*, 14, 871–879.
- STOFFERS, D.A., FERRER, J., CLARKE, W.L. and HABENER, J.F. 1997. Early-onset type-II diabetes mellitus (MODY4) linked to IPF1. *Nat Genet*, 17, 138–139.
- TALCHAI, C., XUAN, S., KITAMURA, T., DEPINHO, R.A., and ACCILI, D. 2012. Generation of functional insulin-producing cells in the gut by Foxo1 ablation. *Nat Genet*, 44, 406–412.
- THULE, P.M., JIA, D., SAFLEY, S., GORDON, K., BARBER, G., YI, H., NALLI, S., ONDERCI, M., SHARMA, J., SHIRES, J. and WEBER, C.J. 2014. Engineered insulin secretion from neuroendocrine cells isolated from human thyroid. *World J Surg*, 38, 6, 1251-61.
- TIRONE, T.A., WANG, X.P., TEMPLETON, N.S., LEE, T., NGUYEN, L., FISHER, W. and BRUNICARDI, F.C. 2004. Cell-specific cytotoxicity of human pancreatic adenocarcinoma cells using rat insulin promoter thymidine kinase-directed gene therapy. *World J Surg*, 28, 826-33.
- TODESCHINI, A.L., GEORGES, A. and VEITIA, R.A. 2014. Transcription factors: specific DNA binding and specific gene regulation. *Cell Press*, 30, 6.
- TOPISIROVIC, I., SVITKIN, Y.V., SONENBERG, N. and SHATKIN, A.J. 2011. Cap and cap-binding proteins in the control of gene expression. *Wiley Interdiscip Rev Rna*, 2, 277–298.
- UZRI, D. and GEHRKE, L. 2009. Nucleotide sequences and modifications that determine RIG-I/RNA binding and signaling activities. *J Virol*, 83, 9, 4174-84.
- WEIWEI, W., SHA, J. and KAIMING, Y. 2017. Development of Islet Organoids from H9 Human Embryonic Stem Cells in Biomimetic 3D Scaffolds. *Stem Cells and Development*, 26, 6, 394-404.
- WANG, X.P., YAZAWA, K. and YANG, J. 2004. Specific gene expression and therapy for pancreatic cancer using the cytosine deaminase gene directed by the rat insulin promoter. *J Gastrointest Surg*, 8, 98-108.
- WANG, J. et al. 2006. Mutant neurogenin-3 in congenital malabsorptive diarrhea. *N Engl J Med*, 20, 355, 3, 270-80.
- WARREN, L. et al. 2010. Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells using synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell*, 7, 5, 618-30.

- WEI, C.M., GERSHOWITZ, A. and MOSS, B. 1975. Methylated nucleotides block 5' terminus of HeLa cell messenger RNA. *Cell*, 4, 4, 379-86.
- WHITE, P., MAY, C.L., LAMOUNIER, R.N., BRESTELLI, J.E. and KAESTNER, K.H. 2008. Defining pancreatic endocrine precursors and their descendants. *Diabetes*, 57, 654–668.
- WOLHEIM, C.B. and SHARP, G.W. 1981. Regulation of insulin release by calcium. *Physiological Reviews*, 61, 914–973.
- WU, J. et al. 2014. Vertically integrated translational studies of PDX1 as a therapeutic target for pancreatic cancer via a novel bifunctional RNAi platform. *Cancer Gene Ther*, 21, 48-53.
- WU, J.X., LIU, S.H., NEMUNAITIS, J.J. and BRUNICARDI, F.C. 2015. Liposomal insulin promoter-thymidine kinase gene therapy followed by ganciclovir effectively ablates human pancreatic cancer in mice. *Cancer Lett*, 359, 206-10.
- XIE, S., SINHA, R.A., SINGH, B.K., LI, G.D., HAN, W. and YEN, P.M. 2013. Resveratrol induces insulin gene expression in mouse pancreatic  $\alpha$ -cells. *Cell Bioscience*, 3, 47.
- YANG, Y., AKINCI, E., DUTTON, J.R., BANGA, A. and SLACK, J.M.W. 2013. Stage specific reprogramming of mouse embryo liver cells to a beta cell-like phenotype. *Mechanisms of Development*, 130, 602-612.
- YI, P., PARK, J.S. and MELTON, D.A. 2013. Betatrophin: a hormone that controls pancreatic  $\beta$  cell proliferation. *Cell*, 153, 747–758.
- YİSRAELI, J.K. and MELTON, D.A. 1989. Synthesis of long, capped transcripts in vitro by SP6 and T7 RNA polymerases. *Methods Enzymol*, 180, 42-50.
- ZENGRONG, Z.H.U., QING, V., LEE, L.K., BESS P., ROSEN, F.G., CHEW-LI, S. and DANWEI, H. 2016. Genome Editing of Lineage Determinants in Human Pluripotent Stem Cells Reveals Mechanisms of Pancreatic Development and Diabetes. *Cell Stem Cell*, 18, 6, 755–768.
- ZHANG, C. et al. 2005. MafA is a key regulator of glucose-stimulated insulin secretion. *Molecular and Cellular Biology*, 25, 12, 4969–4976.
- ZHOU, Q., BROWN, J., KANAREK, A., RAJAGOPAL, J. and MELTON, D.A. 2008. In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to beta-cells. *Nature*, 455, 627–632.
- ZIMMET, P. 1999. Diabetes epidemiology as a trigger to diabetes research. *Diabetologia*, 42, 499–518.

ZIMMET, P. 2000. Globalization, coca-colonization and the chronic disease epidemic: can the doomsday scenario be averted. *J Intern Med*, 247, 301–310.



## ÖZGEÇMİŞ



Mehmet Yıldız 1991 yılında Seyhan'da doğmuştur. Antalya Toros Lisesi Fen Bilimleri alanından 2009 yılında mezun olmuştur. 2010 yılında başladığı Cumhuriyet Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünü 2014 yılında bitirmiştir. 2014 yılında Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarımsal Biyoteknoloji Anabilimdalında Yüksek Lisans eğitime başlamıştır. Hâlâ aynı Anabilimdalında yüksek lisans çalışmalarını sürdürmektedir.

