

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**



**PANKREATİK BETA HÜCREİ GENLERİNİN SENTETİK
mRNA'LARININ POLİSİSTRONİK OLARAK DİZAYNI, *in vitro* SENTEZİ VE
KARAKTERİZASYONU**

Fatma AKÇAKALE

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

TEMMUZ 2021

ANTALYA

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**



**PANKREATİK BETA HÜCREİ GENLERİNİN SENTETİK
mRNA'LARININ POLİSİSTRONİK OLARAK DİZAYNI, *in vitro* SENTEZİ VE
KARAKTERİZASYONU**

Fatma AKÇAKALE

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

TEMMUZ 2021

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PANKREATİK BETA HÜCREŞİ GENLERİNİN SENTETİK
mRNA'LARININ POLİSİSTRONİK OLARAK DİZAYNI, *in vitro* SENTEZİ VE
KARAKTERİZASYONU**

Fatma AKÇAKALE
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEMMUZ 2021

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PANKREATİK BETA HÜCREŞİ GENLERİNİN SENTETİK
mRNA'LARININ POLİSİSTRONİK OLARAK DİZAYNI, *in vitro* SENTEZİ VE
KARAKTERİZASYONU**

Fatma AKÇAKALE
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bu tez 09/07/2021 tarihinde jüri tarafından oybirliği ile kabul edilmiştir.

JÜRİ: Doç. Dr. Mehmet Fatih Cengiz (Danışman)

Doç. Dr. Hasan MEYDAN

Dr. Öğr. Üyesi Ercan Selçuk ÜNLÜ

ÖZET

PANKREATİK BETA HÜCRESİ GENLERİNİN SENTETİK mRNA'LARININ POLİSİSTRONİK OLARAK DİZAYNI, *in vitro* SENTEZİ VE KARAKTERİZASYONU

Fatma AKÇAKALE

Yüksek Lisans, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Mehmet Fatih Cengiz

2. Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Ersin AKINCI

Temmuz 2021; 74 sayfa

Hücrelere DNA veya RNA'yı etkili ve güvenilir bir şekilde *in vitro* ve *in vivo* koşullarda aktarmak için transfer yöntemleri gerekmektedir. Gen aktarım yöntemleri genel olarak viral vektörler ve viral vektör kullanılmayan yöntemler olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Viral vektörlerde, hücrelere genetik materyal aktarmak için virüslerin doğal bulaşıcılığından yararlanılmaktadır. Viral vektörlerin dezavantajları immünojenite ve aktarılan genetik materyalin genoma rastgele yerleşmesidir. Viral vektör kullanılmayan yöntemler genetik materyali hedef hücrelere aktarmak için fiziksel yöntemlerden veya kimyasal bileşiklerden yararlanmaktadır. Kimyasal yöntemler genellikle viral vektörlerden daha az immünojenik olmakla birlikte daha güvenlidir. Viral vektör kullanılmayan yöntemlerde *in vitro* transkripsiyon ile oluşturulan mRNA, ticari olarak temin edilebilen kitlerle kolayca elde edilebildiğinden, terapötik gen iletiminde plazmit DNA yerine kullanmak için etkili bir yöntemdir. Çeşitli mRNA modifikasyonları ve aktarım yöntemleri birleştirilerek, mRNA gen terapisinin etkinliği büyük ölçüde geliştirilmiştir. Monosistronik mRNA kullanılarak yapılan beta hücre farklılaşması için üç ana transkripsiyon faktörünün (PDX1, NGN3 ve MAFA) hücre içinde eksprese olması gerekmektedir. Monosistronik olarak sentezlenen her bir genin mRNA'larının aynı hücre hatlarına transfeksiyonu sonucu yapılan çalışmalarda hücre farklılaşması düşük verimlilikle sonuçlanmıştır. Bu çalışmada sentetik polisistronik mRNA teknolojisi kullanılarak transfeksiyon ve programlama veriminin yükseltilmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda PDX1, NGN3 ve MAFA transkripsiyon faktörlerine ait mRNA'ların polisistronik olarak tasarlanması, *in vitro* sentezi ve AR42J-B13 hücreleri ile karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda sentetik polisistronik mRNA dizaynı ve *in vitro* sentezi başarılı bir şekilde gerçekleştirilerek ekzogenik *Pdx1*, *Ngn3* ve *MafA* genlerinin aktivasyonu başarılı bir şekilde gösterilmiştir.

ANAHTAR KELİMELE: Beta hücre programlaması, Diyabet, İnsülin, MafA, Ngn3, Pdx1, Polisistronik mRNA

JÜRİ: Doç. Dr. Mehmet Fatih Cengiz

Doç. Dr. Hasan MEYDAN

Dr. Öğr. Üyesi Ercan Selçuk ÜNLÜ

ABSTRACT

POLISTRONIC DESIGN, IN VITRO SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF SYNTHETIC mRNAs OF PANCREATIC BETA CELL GENES

Fatma AKÇAKALE

MSc Thesis in Agricultural Biotechnology Department

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Mehmet Fatih Cengiz

2nd Supervisor: Asst. Prof. Dr. Ersin AKINCI

July 2021; 74 pages

Effective and reliable methods are required to transfer genetic materials *in vitro* and *in vivo* such as DNA and RNA into cells. Gene transfer methods generally are divided into two groups: viral and non-viral methods. In viral methods, the natural contagion of viruses is used to transfer genetic material to cells. The biggest limitations of viral methods are their potential immunogenicity and random insertion into the genome. Non-viral methods includes the use of physical or chemical compounds to transfer genetic material into the target cells. Chemical methods are generally less immunogenic and relatively safer than viral vectors. mRNA generated by *in vitro* transcription in non-viral methods is an effective method for using plasmid DNA instead in therapeutic gene transmission, as it can be easily obtained with commercially available kits. By combining various mRNA modifications and transfer methods, the effectiveness of mRNA gene therapy has been greatly improved. For beta-cell differentiation, three major transcription factors (PDX1, NGN3 and MAFA) has to be expressed within the cell. In previous studies where these transcription factors were transfected monocistronically, reprogramming resulted in low efficiency. In this study, it was aimed to increase the reprogramming efficiency by using polycistronic mRNA technology. The aim of this thesis study is to design mRNAs of PDX1, NGN3 and MAFA transcription factors as polycistronic, *in vitro* synthesis and characterization by AR42J-B13 cells. As a result of the studies, synthetic polycistronic mRNA design and *in vitro* synthesis were successfully performed and the activation of endogenic *Pdx1*, *Ngn3* and *MafA* genes were successfully demonstrated.

KEYWORDS: Beta-cell programming, diabetes, insulin, MafA, Ngn3, Pdx1, Polycistronic mRNA

COMMITTEE: Assoc. Prof. Dr. Mehmet Fatih CENGİZ

Assoc. Prof. Dr. Hasan MEYDAN

Asst. Prof. Dr. Ercan Selçuk ÜNLÜ

ÖNSÖZ

Tez çalışmamın tüm aşamalarında bana her konuda her zaman yardımcı olan, başarılı bir bilim insanı olma yolunda güçlü adımlar atmamı sağlayan, bilgi ve deneyimleri ile iyi bir araştırmacı olmam için yol gösteren ve destek olan eş danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Ersin AKINCI'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca danışman hocam Doç. Dr. Mehmet Fatih CENGİZ'e de çok teşekkür ederim. Aynı zamanda çalışmalarım süresince bana destek ve yardımcı olan Doç. Dr. Azize Yasemin GÖKSU EROL'a teşekkür ederim.

Yüksek lisans boyunca bilgi ve desteklerini, sorun ve sıkıntıları, sevinç ve mutlulukları hep birlikte yaşadığımız canım laboratuvar ailem; Adem KABA, Fadime DEMİREL, Merve ILGIN BÜYÜKSINDIR, Mehmet YILDIZ, Gamze BADAKUL ve tezimin her aşamasında bilgi ve deneyimleriyle yanımda olan Pelin ÜNAL'a çok teşekkür ederim. Aynı zamanda tüm zorluklarımda bana destek olan dostlarım Fatma Nur DEMİR, Emirhan CİHAN ve Muhammed BÜYÜKSINDIR'a sonsuz teşekkür ederim.

Son olarak, hedeflerimin peşinden ilerlemem için maddi ve manevi her koşulda destek olan, beni yetiştiren ayaklarım üstünde durmamı öğreten, iyi bir bilim insanı olma yolunda ilerlemem için her türlü fedakarlıkta bulunan canım ailem; annem Fehmiye AKÇAKALE'ye, babam Ali AKÇAKALE'ye, ablalarım Münevver DOĞAN ve Gülbahar AKÇAKALE'ye, abilerim Mahmut, Vedat ve Ozan AKÇAKALE'ye, enişteme, yengelerime ve yaşam enerjilerim olan yeğenlerime yanımda oldukları için binlerce kez teşekkür ederim.

Tezimi; döneminin şartlarından dolayı okula gidememiş ama içindeki okuma aşkı hiç bitmeyip sonrasında okumayı öğrenen canım annem Fehmiye AKÇAKALE'ye ve okuyup araştırmayı seven tüm kadınlara ithaf ediyorum.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ	iii
AKADEMİK BEYAN	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Gen Aktarımında Kullanılan Viral Vektörler	1
1.1.1. Retrovirüs.....	2
1.1.2. Lentivirüs	3
1.1.3. Adenovirüs	4
1.2. Gen Aktarımında Viral Vektör Kullanılmayan Yöntemler.....	6
1.2.1. Rekombinant Protein Aktarımı	10
1.2.2. Plazmit DNA Aktarımı	11
1.2.3. RNA Aktarımı.....	11
1.3. Polisistronik mRNA Kullanılarak Beta Hücre Programlanması.....	14
1.3.1. Pankreas	16
1.3.2. Önemli Pankreatik Genler.....	17
1.3.3. Diyabet	20
2. KAYNAK TARAMASI	22
3. MATERYAL VE METOT	24
3.1. Kullanılan Materyaller	24
3.2. Deneylerde Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması	25
3.3. Kantitatif PZR (kPZR) için Kullanılan Primerler	27
3.4. İmmünofloresan Boyama için Kullanılan Antikorlar	27
3.5. DNA ve RNA Örneklerinin Miktar Tayininin Yapılması.....	27
3.6. Kompetent Hücre Hazırlanması	28
3.7. Enzim Kesiminden Sonra DNA'nın Jelden İzolasyonu.....	28
3.8. pX1 Plazmit DNA'nın Kompetent Hücreye Transformasyonu	28
3.9. pX1 Plazmitine 2A Peptid Dizisinin Aktarılması	29
3.10. <i>Ngn3</i> , <i>Pdx1</i> ve <i>MafA</i> ORF'lerinin 2A Peptidiyle Birleştirilmesi.....	29

3.11.	<i>NPM</i> Konstraktının pTNT Vektörüne Aktarımı	30
3.12.	pTNT+ <i>NPM</i> Plazmitinin <i>Bgl</i> II ve <i>Nde</i> I Enzimleri ile Kesimi.....	31
3.13.	<i>In vitro</i> Transkripsiyon Reaksiyonu (IVT)	31
3.14.	Hücre Kültürü.....	32
3.14.1.	AR42J-B13 hücrelerine transfeksiyon	33
3.14.2.	RNA izolasyonu	35
3.15.	DNaz Uygulaması ve cDNA Sentezi	36
3.16.	Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (kPZR).....	36
3.17.	İmmüno Floresan Boyama	36
3.18.	İstatistiksel Analiz.....	37
4.	BULGULAR VE TARTIŞMA.....	38
4.1.	AR42J-B13 hücrelerine sentetik pmRNA transfeksiyonu	38
4.2.	AR42J-B13 hücrelerine sentetik pmRNA transfeksiyonu +VPA uygulaması.....	38
4.3.	AR42J-B13 hücrelerine sentetik pmRNA transfeksiyonu +LPS uygulaması.....	39
4.4.	AR42J-B13 hücreleri için ideal Ad-GFP transdüksiyon konsantrasyonunun belirlenmesi	40
4.5.	AR42J-B13 hücrelerine sentetik pmRNA transfeksiyonu+LPS uygulaması+Adenovirüs-GFP transdüksiyonu.....	42
4.6.	AR42J-B13 hücrelerine sentetik pmRNA transfeksiyonu+ Adenovirüs-GFP transdüksiyonu	43
4.7.	AR42J-B13 hücrelerine sentetik pmRNA uygulanması ve proteinlerin belirlenmesi	44
5.	SONUÇLAR.....	46
6.	KAYNAKLAR.....	48
ÖZGEÇMİŞ		

AKADEMİK BEYAN

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Pankreatik beta hücresi genlerinin sentetik mRNA’larının polisistronik olarak dizaynı, *in vitro* sentezi ve karakterizasyonu” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

09/07/2021

Fatma AKÇAKALE



SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

μL	: mikrolitre
μm	: mikrometre
bp	: baz çifti
Da	: dalton
G	: gravity
kb	: kilobaz
M	: molar
mg	: miligram
mL	: mililitre
mM	: milimolar
ng	: nanogram
nm	: nanometre
rpm	: dakikadaki devir sayısı

Kısaltmalar

AAV : Adenovirüs ilişkili virüs

Ad : Adenovirüs

BSA : Sığır Serum Albumin

dH₂O : Distile Su

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DNA : Deoksiribo Nükleik Asit

dsDNA: Çift zincirli DNA

EDTA : Etilendiamin Tetra Asetik Asit

ER : Endoplazmik retikulum

FBS : Fetal Bovin Serum

HEK : Human embriyonik kidney

IPSC : İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücre

ITR : Inverted Terminal Repeat

LPS : Lipopolisakkarit

miRNA: Mikro RNA

MOI : Multiplicity of infection

mRNA: Mesajcı RNA

O.D. : Optik Yoğunluk

ORF : Open Reading Frame

PBS : Phosphate Buffered Saline

pDNA : Plazmit DNA

pmRNA: Polisistronik mRNA

PZR : Polimeraz Zincir Reaksiyonu

RNA : Ribo Nükleik Asit

smRNA: Sentetik mRNA

SOC : Super Optimal Broth

TAE : Tris-Asetik Asit-Edta

UTR : Untranslated region

VPA : Valproik asit



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Gen aktarım yöntemleri	1
Şekil 1.2. Retrovirüsün fiziksel yapısı	2
Şekil 1.3. Adenovirüs kapsidi	4
Şekil 1.4. Adenoviral vektörlerin enfeksiyon mekanizması	5
Şekil 1.5. Katyonik lipid polimerleri ile bağlanan nükleik asitleri hücre içine taşıyan veziküller.....	7
Şekil 1.6. Elektroporasyon.....	8
Şekil 1.7. Sonoporasyon	9
Şekil 1.8. pDNA ve mRNA gen aktarımı	11
Şekil 1.9. smRNA modifikasyon bölgeleri.....	12
Şekil 1.10. Ökaryotik ve prokaryotik mRNA	14
Şekil 1.11. Pankreas yapısı	16
Şekil 1.12. İnsülin biyosentezi.....	17
Şekil 1.13. Pankreas gelişimde majör genler	19
Şekil 3.1. Oluşturulan NPM sentetik pmRNA.....	30
Şekil 3.2. pTNT vektörü	31
Şekil 3.3. Sentetik pmRNA.....	32
Şekil 3.4. Sentetik pmRNA transfeksiyonu+VPA uygulaması	33
Şekil 3.5. Sentetik pmRNA tranfeksiyonu+LPS uygulaması.....	34
Şekil 3.6. Sentetik pmRNA tranfeksiyonu+LPS uygulaması+Adenovirüs-GFP transdüksiyonu	35
Şekil 3.7. Sentetik pmRNA transfeksiyonu+Adenovirüs-GFP transdüksiyonu	35
Şekil 4.1. PNM sentetik pmRNA'sı verilmiş hücrelerde meydana gelen morfolojik değişiklikler.....	38

Şekil 4.2. AR42J-B13 hücrelerine sentetik pmRNA transfeksiyonu+VPA uygulanması sonucu hedef genlerin gerçek zamanlı kantitatif-PZR sonuçları	39
Şekil 4.3. AR42J-B13 hücrelerine sentetik pmRNA transfeksiyonu+LPS uygulanması sonucu hedef genlerin gerçek zamanlı kantitatif-PZR sonuçları	39
Şekil 4.4. AR42J-B13 hücreleri için ideal Ad-GFP transdüksiyon konsantrasyonu tarama sonuçları	41
Şekil 4.5. AR42J-B13 hücrelerine sentetik pmRNA transfeksiyonu +LPS uygulaması +Adenovirüs-GFP transdüksiyonu sonucu hedef genlerin gerçek zamanlı kantitatif-PZR sonuçları.....	42
Şekil 4.6. AR42J-B13 hücrelerine sentetik pmRNA transfeksiyonu+Adenovirüs-GFP transdüksiyonu sonucu hedef genlerin gerçek zamanlı kantitatif-PZR sonuçları	43
Şekil 4.7. PNM sentetik pmRNA'sı verilmiş hücrelerde Anti-Pdx1 (yeşil), Anti-Ngn3 (yeşil), Anti-MafA (yeşil) ve DAPI (mavi) immün boyaması.....	44
Şekil 4.8. PNM pmRNA'sı uygulanmış hücrelerde anti-insülin (yeşil), anti-insülin (kırmızı) ve DAPI (mavi) immün boyama sonucu	45

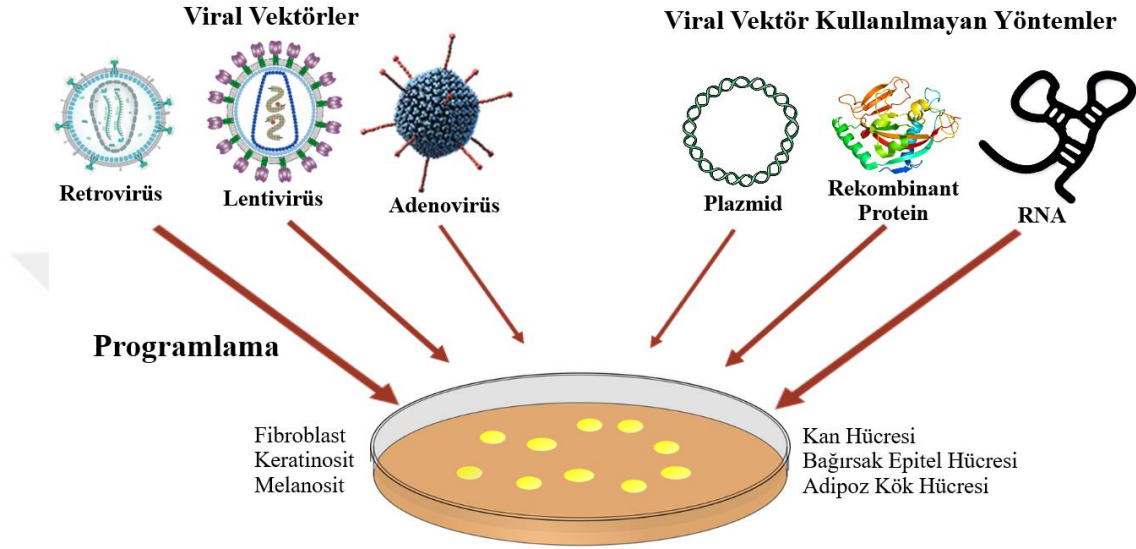
ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Retroviral genlerin işlevleri	2
Çizelge 1.2. Adenoviral vektörlerin avantajları ve dezavantajları.....	5
Çizelge 1.3. Gen taşıyıcı sistemlerin ana sınıflarının karakteristik özellikleri	10
Çizelge 3.1. Kullanılan materyallere ait marka ve katalog numaraları.....	24



1. GİRİŞ

DNA veya RNA'yı etkin ve güvenli bir şekilde konakçı hücelere *in vitro* ve *in vivo* koşullarda aktarabilmek için iletim sistemleri gerekmektedir. Gen transferini kabul edilebilir güvenlik ve verimlilikle optimize etmek için birçok araştırma yapılmış ve biyolojik, kimyasal veya fiziksel prensipler kullanılarak farklı stratejiler geliştirilmiştir (Alsaggar ve Liu 2015). Gen aktarım yöntemleri genel olarak viral vektörler ve viral vektör kullanılmayan yöntemler olarak iki gruba ayrılmaktadır (Şekil 1.1).



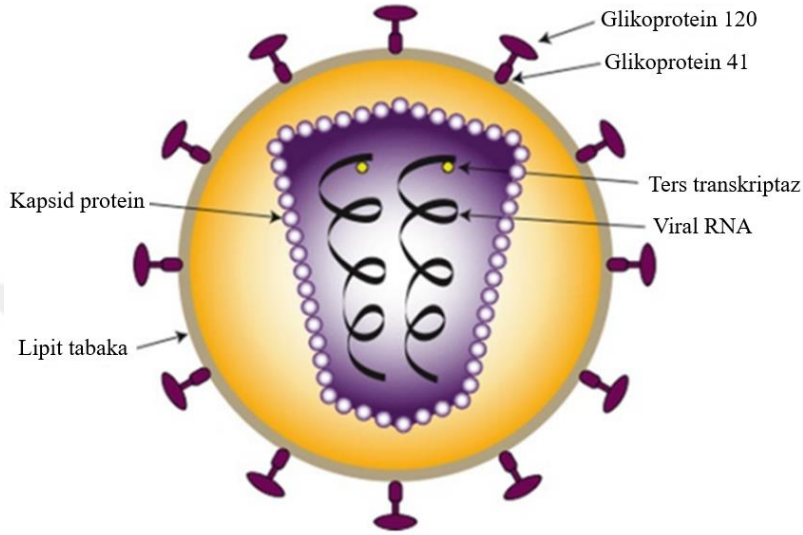
Şekil 1.1. Gen aktarım yöntemleri (Can 2014)

1.1. Gen Aktarımında Kullanılan Viral Vektörler

Viral vektörlerde, hücelere genetik materyal aktarmak için virüslerin doğal bulaşıcılığından yararlanılmaktadır. Yeniden programlama çalışmalarında hücelere spesifik transkripsiyon faktörlerini aktarmak için viral vektörler kullanılmaktadır. Retrovirüsler ve adenovirüsler klinik çalışmalarda en çok kullanılan viral vektörlerdir (Edelstein vd. 2007). Viral vektörlerin en önemli dezavantajı immünojenite ve aktarılmak istenilen genetik materyalin genoma rastgele yerleşmesidir. Genoma rastgele yerleşmesi onkogenler gibi doğal susturulmuş genlerin aktivasyonunu sağlayabilmekte ve tümörojenik transformasyona neden olabilmektedir (Kay vd. 2001; Hacein-Bey-Abina vd. 2003; Cavazzana-Calvo vd. 2010). Benzer şekilde, entegre olmadığı düşünülen adenoviral vektörler, düşük bir ihtimalde olsa viral DNA'yı konakçı genomuna entegre etme eğilimindedir (Stephen vd. 2008; Stephen vd. 2010). Bu nedenle, genoma entegrasyondan bağımsız bir yeniden programlama yöntemi, nihai klinik uygulamalar için türetilmiş hücrelerin güvenliğini önemli ölçüde artırabilmektedir. Gen aktarımında kullanılan başlıca viral vektörler; retrovirüs, lentivirüs ve adenovirüstür (Warnock vd. 2011).

1.1.1. Retrovirüs

Retroviral kapsid, viral genomu içeren zarflı bir protein yapıdır (Osten vd. 2007). Kapsidi çevreleyen zarf yapısı, aslında konakçı hücreden kaynaklanan ve hem virüs tarafından kodlanmış yüzey glikoproteinlerini hem de transmembran glikoproteinlerini içeren bir lipit çift tabakadır (Zhang ve Godbey 2006) (Şekil 1.2).



Şekil 1.2. Retrovirüsün fiziksel yapısı (Warnock vd. 2011)

Basit retrovirüs sınıfı, üç ana kodlama bölümü ve bir küçük kodlama domaini içermektedir. Ana segmentler; viral entegrasyon, replikasyon ve kapsüllemede önemli proteinleri kodlayan genler *gag*, *pol* ve *env* genleridir (Osten vd. 2007). Küçük kodlama domaini, viral proteazı kodlayan *pro* geni içermektedir (Zhang ve Godbey 2006). Kodlama bölümlerinin ve bunların protein ürünlerinin açıklamaları Çizelge 1.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 1.1. Retroviral genlerin işlevleri (Warnock vd. 2011)

Protein	Fonksiyon
<i>gag</i>	Viral çekirdeği kodlar
<i>pol</i>	Ters transkriptaz ve integrazı kodlar
<i>env</i>	Viral zarf proteinlerinin yüzey ve transmembran bileşenlerini kodlar
Pro (küçük kodlama proteini)	Viral proteazı kodlar

Retroviral vektörlerin replikasyonu doğal sürecine göre farklı gerçekleşmektedir. Bunun için, genomun tüm trans-etkili unsurları (*gag*, *pol* ve *env* genleri) çıkarılmakta ve sadece bağlanma bölgeleri, uzun terminal tekrarı, paketlenme sinyalleri ve viral gen ekspresyonu için önemli olan bölgeler kalmaktadır. *Gag*, *pol* ve *env* genlerinin çıkarılması, ilgilenilen genin viral genoma yerleştirilmesi için alan sağlamaktadır (Buchsacher 2001; Buchsacher Jr 2004). Güvenliği artırmak için *gag* ve *pol* genleri bir plazmitte bulunurken *env* geni diğerinde bulunmaktadır. Vektör geni, üçüncü bir plazmit (bölünmüş genom paketlenme plazmiti) içinde yer almaktadır (Hu ve Pathak 2000). Retrovirüsler, tek zincirli RNA genomlarının transkripsiyonunu tersine çevirme yetenekleriyle bilinmektedirler. Böylece konakçı hücreleri enfekte ettikten sonra replike olmak için dsDNA oluşturmaktadırlar. Bu virüsler genellikle basit (onkojenik retrovirüsler) veya karmaşık (lentivirüsler ve spumavirüsler) olarak sınıflandırılmaktadır. Onkojenik retrovirüsler, bölünmeyen hücreleri enfekte edemezler. Yalnızca bölünebilen hücrelere gen aktarımında kullanılabilirler. Bu özellik kanser tedavi çalışmalarında bir avantajdır. Ayrıca doku mühendisliği çalışmalarında özellikle kemik onarımıyla ilgili olanlar için son derece yararlı kabul edilmektedir (Warnock vd. 2011).

Gen aktarımında kullanılmak istenen retrovirüslerin üretimi için yüksek güvenli laboratuvarlar gerekmektedir. Bu da yöntemi maliyetli yapmaktadır. Bir diğer dezavantajı ise retrovirüslerin konakçı genoma entegre olmalarıdır. Retrovirüsler bölünebilen hücrelere gen aktarımı yapabildiğinden gen aktarım çalışmalarında dezavantaj oluşturmaktadır. Bu dezavantajlara rağmen retrovirüslerle yapılan gen aktarım çalışmaları başarıyla sonuçlanmaktadır (Sarmasik vd. 2001; Ekici vd. 2006).

1.1.2. Lentivirüs

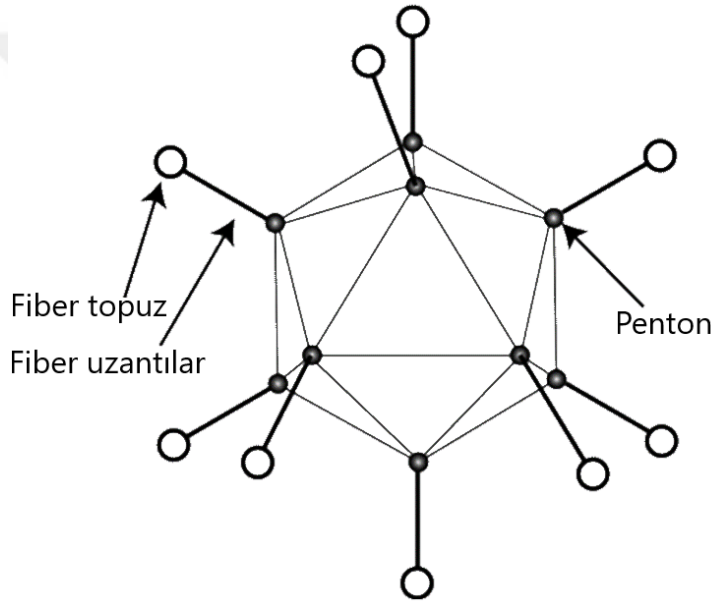
Retrovirüs ailesinin bir alt kategorisi olan lentivirüsler, viral genomun detaylarına göre kompleks retrovirüsler olarak bilinmektedir. Lentiviral kapsid, basit retrovirüslerinkiyle aynıdır. Lentiviral genomda, diğer retrovirüsler gibi, 7–12 kb uzunluğunda tek zincirli bir RNA bulunmaktadır. Bununla birlikte genom, basit retrovirüslerle aynı genleri içerirken, viral replikasyon, bağlanma, enfeksiyon ve salınım için önemli proteinleri kodlayan diğer altı geni (iki düzenleyici gen ve dört yardımcı gen) içermektedir (Warnock vd. 2011). En yaygın lentiviral vektör, insan immün yetmezlik virüsü tip 1 (HIV-1)'den yapılmaktadır. Bu vektörlerde, basit virüste bulunan orijinal genler, ilave yardımcı genlerin dördü ve düzenleyici genlerden biri, yabancı genlerin eklenmesi için alan yaratmak üzere silinmektedir (Naldini vd. 1996; Dull vd. 1998). Basit retrovirüslerin aksine, lentiviral vektörler genellikle insan embriyonik böbrek hücre türevlerinin transfeksiyonu ile üretilmektedir. Lentiviral vektörler, diğer basit retroviral vektörlere göre birçok avantaja sahiptir. Bunlardan en önemlisi bölünemeyen hücrelere gen aktarımında kullanılabilirleridir. Dezavantajlarından biri de genoma entegre olmalarıdır (Warnock vd. 2006).

Lentiviral vektörler, yüksek doku spesifik transgen ekspresyonu ile transgenik hayvanlar oluşturmak için fare ve sıçan embriyolarını enfekte edebilmektedir (Lois vd. 2002). Bu vektörler ayrıca yabancı genomik materyal için nispeten büyük bir taşıma kapasitesine (9 kb) sahip olduklarından (Osten vd. 2007), diğer transgenik hayvan türlerini de üretmek için kullanılabilirleridir önerilmektedir. Lentiviral vektörler,

geleneksel olarak sinir ve kalp sistemleri gibi bölünmeyen konakçı hücrelerle ilgili çalışmalarda kullanılmıştır (Warnock vd. 2006).

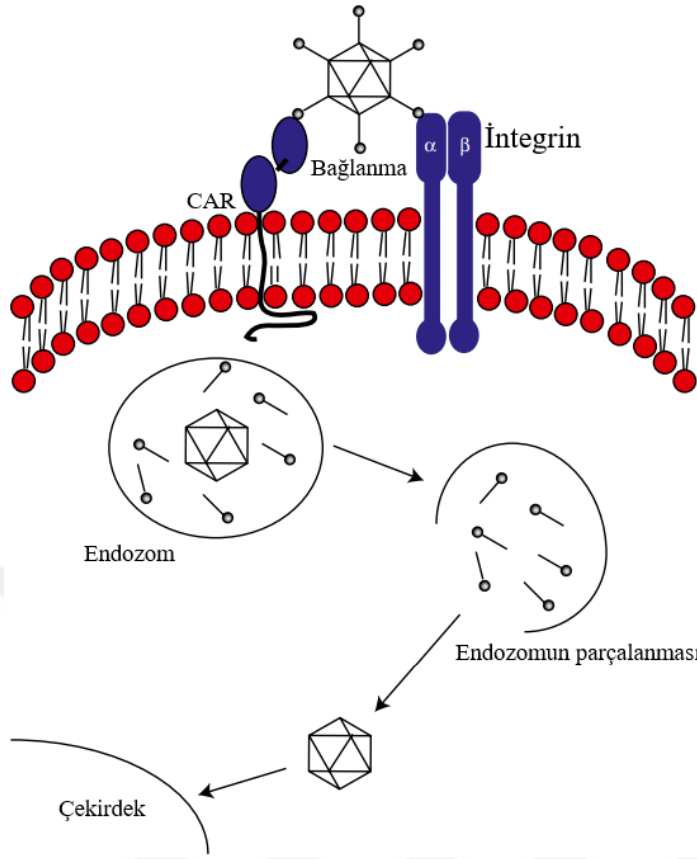
1.1.3. Adenovirüs

Adenovirüs ilk olarak insan adipoz dokusunda keşfedilmiştir (Rowe vd. 1953). Bu virüs insanları enfekte eden altı türde (A–F) sınıflandırılmıştır (Warnock vd. 2011). Araştırmacılar, bilinen çeşitli adenovirüslerden yola çıkarak, C türünün adenovirüs-2 ve adenovirüs-5 virüslerinin, gen terapisinde kullanılmak üzere viral vektörler oluşturmak için en etkili olduğu sonucuna varmışlardır (Kovesdi vd. 1997). Şu anda en çok çalışılan vektör formlarından biri olan adenovirüs vektörleri, dünya çapında klinik deneylerde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Adenovirüs kapsidi, çift zincirli DNA genomunu içeren ve çekirdeği çevreleyen zarfsız bir protein kabuğudur (Şekil 1.3) (Warnock vd. 2011).



Şekil 1.3. Adenovirüs kapsidi (Warnock vd. 2011)

Viral genom, erken bölge ve geç bölge olarak adlandırılan iki ana transkripsiyon bölgesini içermektedir (Seth 1999). Genomun erken bölgesinde dört önemli transkripsiyon birimi bulunmaktadır (E1, E2, E3 ve E4). C türünün adenovirüs-2 ve adenovirüs-5 virüslerine dayanan bu vektörlerde, yabancı DNA için daha fazla genomik alan oluşturmak amacıyla genomun E1 bölgesi silinmiştir (Berkner 1988; Kovesdi vd. 1997). E3 bölgesi ayrıca viral DNA'nın kültürde kopyalanması için silinebilmektedir. Bu eliminasyonlar, vektöre yaklaşık 7.5 kb DNA'nın eklenmesine izin vermektedir. Gen terapisinde kullanılan başka bir vektör formu ise ITR'ler (Inverted Terminal Repeat) ve paketlenme sinyalleri dışında tüm adenoviral DNA'nın kesip çıkarıldığı "guttet" vektör olarak bilinmektedir. Bu vektörler, viral vektör içinde 36 kb'ye kadar yabancı DNA barındırılmasına izin vermektedir (Warnock vd. 2011). Şekil 1.4'te adenoviral vektörlerin enfeksiyon mekanizması gösterilmiştir.



Şekil 1.4. Adenoviral vektörlerin enfeksiyon mekanizması (Warnock vd. 2011)

Adenoviral vektörlerin bazı avantajları ve dezavantajları Çizelge 1.2’de listelenmiştir.

Çizelge 1.2. Adenoviral vektörlerin bazı avantajları ve dezavantajları (Warnock vd. 2011)

Avantajlar	Dezavantajlar
Bölünen ve bölünmeyen hücreleri enfekte edebilmektedir.	Genoma entegre olmadığı için geçici ekspresyona sebep olur ve gen aktarımı uzun süre devam etmez.
Rekombinant vektör stabildir.	Yüksek vektör dozajlarından humoral ve hücrel bağışıklık tepkisine neden olmaktadır.
Büyük taşıma kapasitesine sahiptir.	
Daha az onkojeniktir	
Yüksek miktarda verimlilikle üretilmektedir.	
Alıcı hücre genomuna entegre olmaz.	

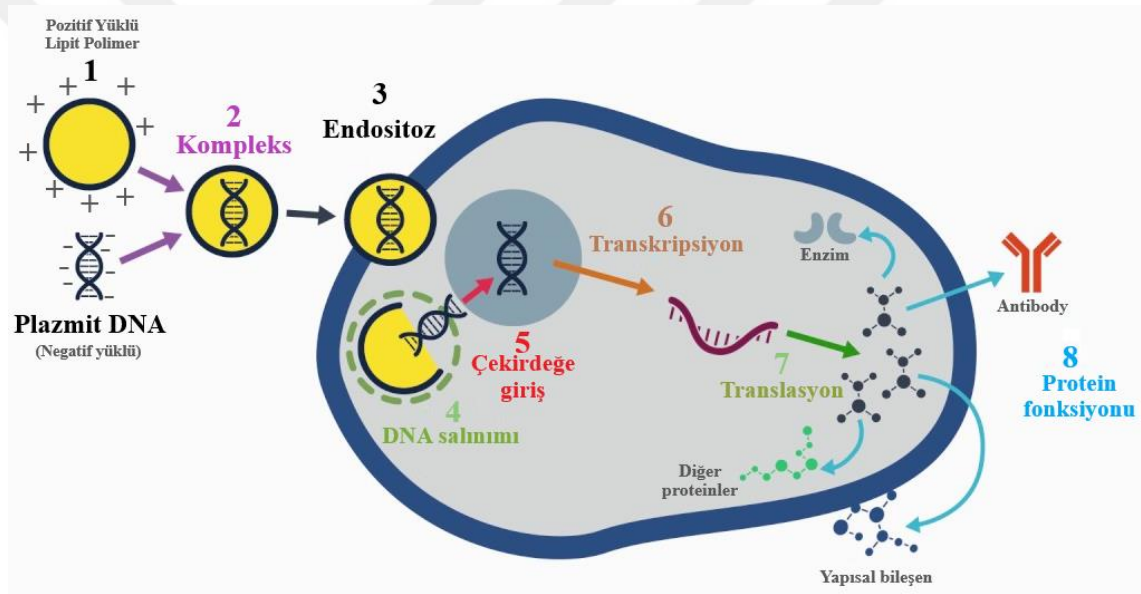
Adenovirüs vektörü en yaygın olarak kanser tedavisi çalışmalarıyla ilişkilidir. Yapılan bir çalışmada, bu vektörler ile tümör baskılayıcı genler olan p53 ve p16'yı başarıyla aktararak tümör büyümesi sağlamıştır. p53 geninin aktarılmasından sorumlu adenovirüs vektörü, gen tedavisi için onaylanan ilk vektördür (Roth 2006). Adenovirüs vektörleriyle yapılan diğer popüler araştırmalar, kök hücre farklılaşması (Okuda vd. 2004), AIDS (Shiver vd. 2002), kardiyovasküler hastalıklar (Suckau vd. 2009) ve akciğer tüberkülozu (Happel vd. 2005; Mata-Espinosa vd. 2008) çalışmalarını içermektedir. Son zamanlarda yapılan gen terapisi çalışmalarında kullanılan bir diğer viral vektör ise adeno-ilişkili virüs (AAV: adeno-associated virüs) vektörüdür (Büning vd. 2004). Bu virüsün her serotipi, konakçı özgüllüğü sağlayan karakteristik kapside sahiptir. Bu da çeşitli doku tiplerini hedeflemek için kullanılmasına izin vermektedir. Bölünmeyen hücreleri enfekte edebilmektedirler (Kotin vd. 1991; McCarty vd. 2003; Ding vd. 2005). AAV'lerden vektör oluşturma süreci, Rep ve Cap proteinlerini kodlayan genlerin silinmesiyle başlamaktadır. Bu silme, yabancı DNA için yaklaşık 5 kb paketleme alanı sağlamaktadır. Yeni DNA, yalnızca ITR'leri içeren "guttet" virüse eklenmektedir. ITR'ler, yardımcı bir virüs varlığında replikasyon ve paketleme için gerekli tüm cis-etkili öğeleri içermektedir. Rep ve Cap proteinleri ve gerekli tüm adenoviral yardımcı genler, bir veya iki plazmit üzerinde ifade edilmektedir. Bir plazmitten adenovirüs genlerinin ekspresyonu, yabancı tip adenovirüs ile ortak enfeksiyon ihtiyacını ortadan kaldırmaktadır. AAV vektörlerinin üretimi HEK293 hücrelerinde modifiye AAV ve bir veya iki yardımcı plazmit (Matsushita vd. 1998; Russell ve Kay 1999; Gonçalves 2005) ile transfeksiyonunu gerektirmektedir.

AAV, doku mühendisliği çalışmalarında en yaygın olarak kullanılan viral vektördür. Bu vektörlerin ticari olarak onaylanması ve tedavi için hazır olmasında bazı engellerin aşılması gerekmektedir. AAV'nin avantajları; patojenik olmaması, geniş konak özgüllüğü, bölünen ve bölünmeyen hücrelere gen aktarımının mümkün olması ve *in vivo* olarak yıllar boyunca yüksek seviyelerde gen ekspresyonunu korumasıdır. AAV'nin dezavantajları; aktarılacak yabancı gen miktarı küçük boyutlarla sınırlı olması ve gen ifade sürecinin yavaş olmasıdır (Warnock vd. 2011).

1.2. Gen Aktarımında Viral Vektör Kullanılmayan Yöntemler

Viral olmayan yöntemler genetik materyali hedef hücrelere aktarmak için fiziksel yöntemlerden veya kimyasal bileşiklerden yararlanmaktadır. Kimyasal yöntemler, DNA'yı nükleaz aktivitesinden korumak için formüleleştirilebilir ve hücrelerin endositoz, fagositoz ve pinositoz gibi fonksiyonlarını tetikleyerek gen transferini kolaylaştırmayı amaçlamaktadır. Kimyasal yöntemler genellikle viral vektörlerden daha az immünojenik ve daha güvenlidir. Daha düşük transfeksiyon verimliliğine rağmen, gen terapisi çalışmalarında giderek daha fazla kullanılmaktadır (Gao X. vd. 2007; Al-Dosari ve Gao 2009). Bu yöntemler aynı zamanda hedefleme özgüllüğünü arttırmak için modifikasyonlara uygundur. Ancak taşıma verimliliğini arttırmak için daha fazla optimizasyon gerekmektedir (Alsaggar ve Liu 2015). Lipid ve polimer bazlı sistemler en kapsamlı şekilde çalışılan ve geliştirilen kimyasal vektör türleridir. Lipozomlar, miseller, emülsiyonlar ve diğer organize lipid yapıları gibi *in vitro* ve *in vivo* gen transferi için vektörler olarak birçok farklı lipidik sistem geliştirilmiştir. İlk çalışmalarda nötr ve anyonik lipozomlar kullanılmıştır. Plazmit DNA, veziküllerin içine kapsüllenerek lipozomların yapıları değişmeden kalmaktadır. Katyonik lipozomlar, yük etkileşimi yoluyla DNA ile etkileşime girmekte ve kompleks

oluşumu sırasında kapsamlı bir lipid yeniden düzenlenmesi gerçekleşmektedir (Li S. ve Ma 2001). Bugüne kadar çok sayıda katyonik lipid sentezlenmiş ve transfeksiyon verimliliği ve toksisite açısından test edilmiştir (Li S. ve Huang 2000). Gen iletimi için katyonik lipozomların kullanılmasının birçok avantajı vardır. İlk olarak, DNA'nın keseciklerin içinde tutulmasını gerektiren nötr veya anyonik lipozomların aksine, katyonik lipozomlar, yük etkileşimi yoluyla negatif yüklü DNA molekülleri ile kompleksler oluşturmaktadır (Şekil 1.5). Teorik olarak, DNA üzerinde kesin bir boyut sınırlaması yoktur ve DNA'nın neredeyse %100'ü kompleks formda geri kazanılabilmektedir. İkinci olarak, lipozom/DNA kompleksleri, normal komplekslerin negatif yüklü hücre zarı ile verimli etkileşime izin vermekte ve biraz fazla pozitif yüke sahip olacağı şekilde hazırlanmaktadır. Lipid bileşimine bağlı olarak kompleksler, endositozu takiben DNA'nın sitozole salınmasını kolaylaştıracak bir endozom bozma mekanizmasına sahip olabilir. Son olarak, katyonik lipozomların DNA ile kompleksleşmesi, DNA için fiziksel kuvvetlere ve enzimatik sindirime karşı bir miktar koruma sağlayabilmektedir (Li S. ve Ma 2001).

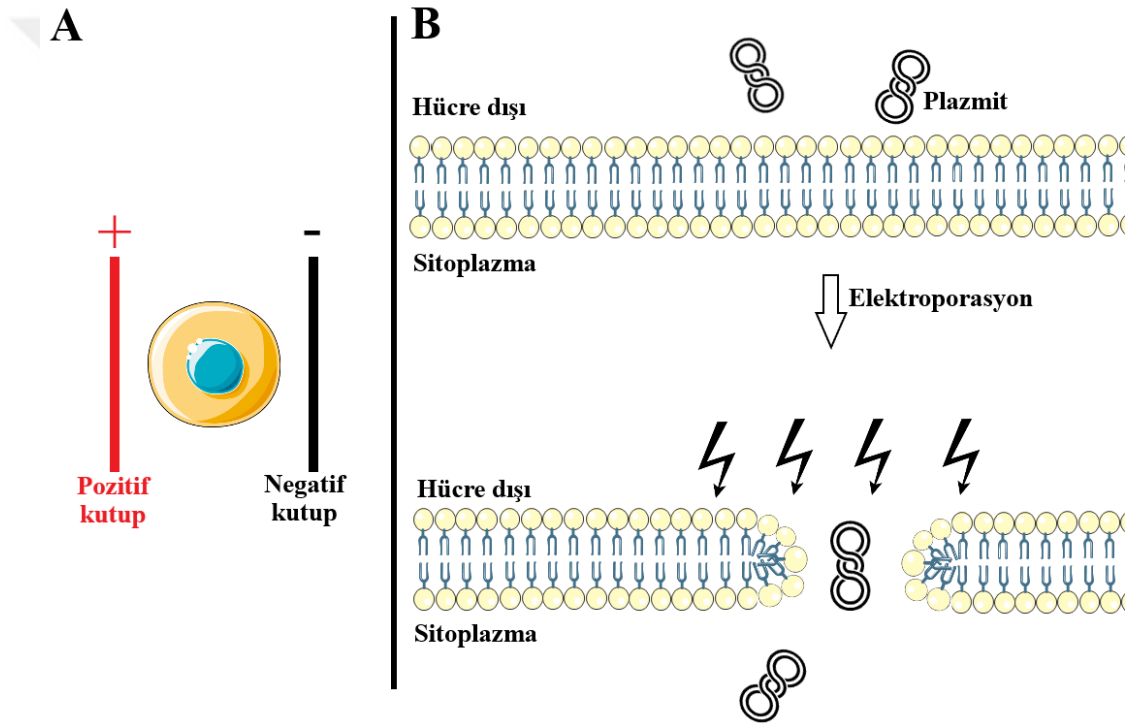


Şekil 1.5. Katyonik lipid polimerleri ile bağlanan nükleik asitleri hücre içine taşıyan veziküller (Anonymous 1)

Vektör bazlı sistemlerin yanı sıra, gen aktarımındaki fiziksel yöntemler, DNA'nın hücrelere aktarılması için özel bir taşıyıcıya olan ihtiyacı ortadan kaldırması açısından benzersizdir. Fiziksel yöntemlerde, "çıplak" DNA moleküllerinin geçebilmesi için plazma zarında geçici gözenekler oluşturmak amacıyla fiziksel güçler kullanılmaktadır. Kullanılan kuvvetler arasında elektrik akımı (elektroporasyon), ultrasonik dalgalar (ultrasonikasyon), hidrodinamik basınç gibi uygulamalar bulunmaktadır (Villemejeane ve Mir 2009).

Elektirik alanı DNA'yı hücrelere aktarmak için kullanılan yaygın bir fiziksel yöntemdir. Elektroporasyon veya elektro geçirgenleştirme olarak adlandırılan bu teknik, hücre zarını geçici ve lokalize olarak kararsızlaşmasına neden olabilen yüksek yoğunluklu elektrik darbelerine maruz bırakmaktadır. Bu uygulama sırasında hücre zarı, ortamda bulunan DNA gibi eksojen moleküller için oldukça geçirgen bir hale

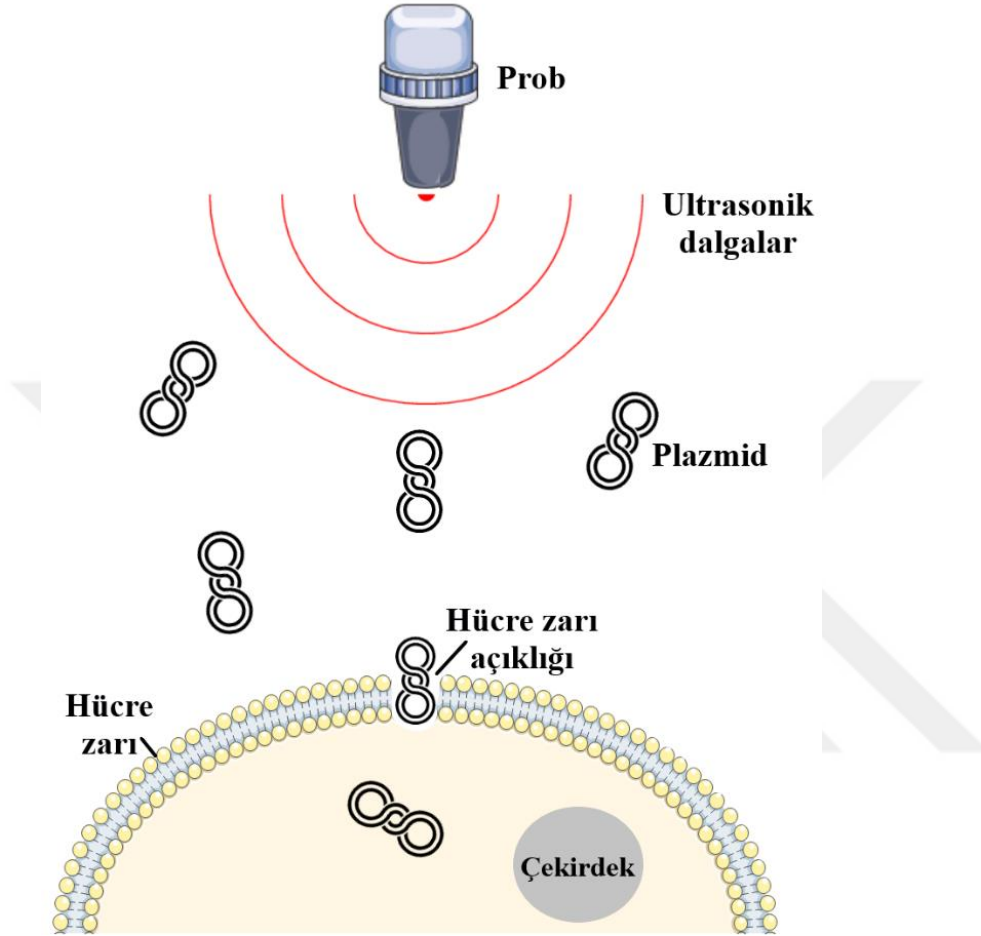
gelmektedir (Şekil 1.6) (Mehier-Humbert ve Guy 2005). Geçirgenlik mekanizmasının zarlarda oluşturulan geçici gözenekler olduğu ve DNA, proteinler ve hatta ilaçlar gibi iyonik ve/veya iyonik olmayan makromoleküllerin geçmesine izin verdiği ortaya çıkmıştır (Chang ve Reese 1990). Daha da önemlisi, bu gözenekler membran yapısı veya hücre canlılığı üzerinde önemli bir etki olmaksızın birkaç saniye ile birkaç dakika içinde yeniden kapanmaktadır (Weaver 1995). *In vitro* elektroporasyon, hücre ve DNA süspansiyonuna sahip ve bir güç kaynağına bağlı özel bir kuvvette uygulanırken, *in vivo* elektroporasyon sistemi hedef dokuya yerleştirilen ve onu çevreleyen elektrotları içermektedir (Gehl 2003). Hücrelere, DNA'nın girmesine izin veren bir elektrik akımı uygulanmaktadır. Transfeksiyon verimliliği, tekrarlanabilirlik, akımın uygulanma süresi, elektrik akımının uygulanma sıklığı ve elektrik alanın yoğunluğu gibi prosedür parametrelerinin sıkı bir şekilde ayarlanmasıyla kontrol edilmektedir. Gen transfer verimliliği, farklı hücre tipleri ve deneysel koşullara göre önemli ölçüde değişmektedir (Alsaggar ve Liu 2015).



Şekil 1.6. Elektroporasyon (A) Hedef hücreler bir güç kaynağına bağlı iki elektrot arasında yer alması (B) Yüksek yoğunluklu elektrik akımı hücre zarının geçici olarak kararsızlaşması ve oldukça geçirgen bir hale gelen zarın DNA moleküllerinin hücre içine girmesi

Sonoporasyon, ultrasonik dalgalar uygulamasıyla hücre geçirgenliğini arttırmakta ve makromoleküllerin (DNA, protein) hücre içerisine girmesini sağlamaktadır (Şekil 1.7). Ultrason, çok çeşitli frekansları ve dalga formlarını kapsamaktadır (Mehier-Humbert ve Guy 2005). Elektroporasyon gibi, sonoporasyonun da hücre zarındaki küçük gözeneklerin geçici oluşumunu indüklediği ve genetik materyalin hücrelere doğrudan transferine izin verdiği düşünülmektedir (Endoh vd. 2002; Taniyama, Tachibana, Hiraoka, Aoki, vd. 2002) ve birkaç hücre tipi sonoporasyon ile *in vitro* koşullarda başarıyla transfecte edilmiştir (Unger vd. 2001).

Sonoporasyon, solid tümörler (Miller ve Song 2003), kas (Taniyama, Tachibana, Hiraoka, Aoki, vd. 2002; Lu vd. 2003) ve damar sistemleri (Taniyama, Tachibana, Hiraoka, Namba, vd. 2002; Huber vd. 2003) dahil olmak üzere farklı dokularda geniş ölçüde uygulanmıştır.



Şekil 1.7. Sonoporasyon

Fiziksel gen transferi yöntemleri, diğer yöntemlere kıyasla güvenliği, basitliği ve önemli olan prosedür parametrelerinin spesifik terapötik ihtiyaçlara göre manipüle etme yeteneği nedeniyle biyomedikal araştırmalarda giderek daha fazla uygulanmaktadır. Bununla birlikte, çoğu fiziksel yöntemin gen transfer etkinliği, viral yöntemlerinkinden daha düşüktür. Ayrıca, iç organlar gen iletimi için hedeflenecek birincil dokular olduğunda zorlaşır. Çünkü genellikle hedef dokuya erişmek için invaziv bir prosedür gerektirmektedir (Kamimura ve Liu 2008). Çizelge 1.3'te viral, kimyasal ve fiziksel yöntemler dahil şimdiye kadar kullanılan yöntemlerin özellikleri özetlenmiştir.

Çizelge 1.3. Gen taşıyıcı sistemlerin ana sınıflarının karakteristik özellikleri (Alsaggar ve Liu 2015)

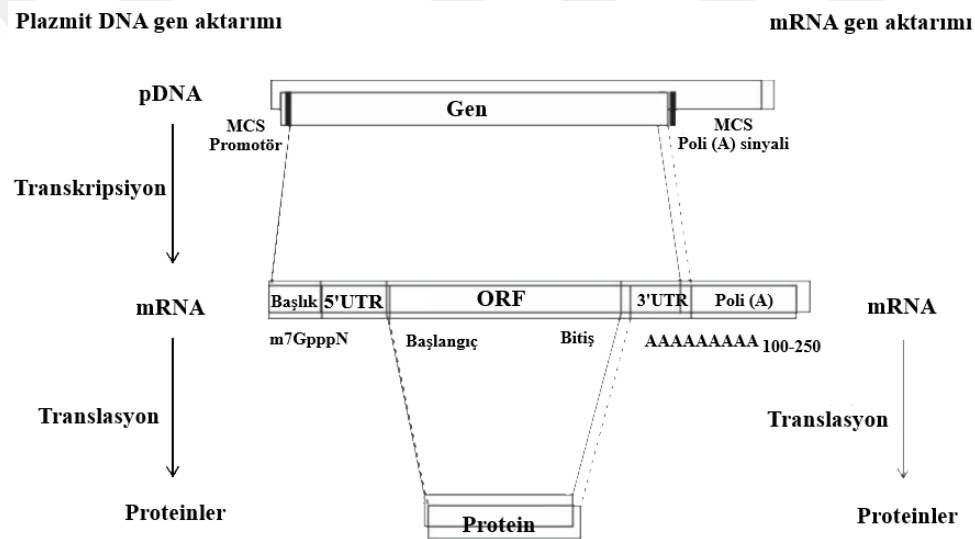
YÖNTEM	PRENSİP	AVANTAJ	DEZAVANTAJ
Viral Yöntemler	DNA veya RNA'nın viral yolla transferi	Yüksek transdüksiyon verimi Kalıcı gen ekspresyonu. Bölünen ve bölünmeyen hücrelerde. <i>In vivo</i> ve <i>in vitro</i> çalışmalar	Güçlü bağışıklık tepkisi Onkogenez ve insersiyonel mutajenez. Yüksek maliyet Transgen büyüklüğünde kısıtlama
Kimyasal Yöntemler	DNA veya RNA'nın katyonik lipitler veya polimerler ile kompleks halinde hücresel endositoz yoluyla transferi	Güvenli ve ucuz. Modifikasyon uygun <i>In vitro</i> deneylerde yaygın ve etkili	Kısa gen ekspresyonu süresi <i>In vivoda</i> düşük transfeksiyon verimliliği Bölünmeyen hücrelerde düşük verim.
Fiziksel Yöntemler	Mekanik kuvvetler tarafından plazma zarında oluşturulan geçici gözeneklerden DNA veya RNA transferi	<i>In vitro</i> ve <i>in vivo</i> deneylerde kullanılır Spesifik dokularda kullanılır Bölünen ve bölünmeyen hücrelerde	Uygulama yerinde lokal doku hasarı Özel alet gerekli Farklı doku tipleri için optimize edilmiş prosedür parametreleri gerekli

1.2.1. Rekombinant Protein Aktarımı

Rekombinant proteinler ile hücresel yeniden programlama yapılabilir. Bu yaklaşımla ilgili temel sorun, proteinlerin büyük boyutu ve hücre zarı hidrofobik özelliği nedeniyle proteinlerin hücre içi boşluğa taşınmasıdır. Proteinler gibi makromoleküller, plazma zarına zayıf bir şekilde nüfuz etmektedir. Bu nedenle somatik hücreler, proteinlerin geçmesine izin vermek için hücre zarında geçici olarak porlar açan tersine çevrilebilir geçirgenleştirme için hücre geçirgenleştirme maddeleriyle ön işleme tabi tutulmalıdır. Bu prosedür hücrenin hayatta kalması açısından çok zararlıdır ve yeniden programlamanın verimini etkilemektedir (Seo vd. 2017).

1.2.2. Plazmit DNA Aktarımı

Mevcut gen terapisi stratejileri arasında, normal işlevden önce sağlıklı genetik materyalin verilmesi ile kusurlu genin değiştirilmesi yer almaktadır. Gen tedavisi için, virüs aracılığıyla gen iletimi, yüksek verimlilikle en başarılı gen değiştirme yöntemi olarak kabul edilmektedir. Bununla birlikte bu yöntem, genoma entegrasyon ve doğuştan gelen immün yanıtın tetiklenmesi dahil olmak üzere ciddi güvenlik endişelerine neden olmaktadır (Sheridan 2011). Plazmit DNA (pDNA) kullanılarak viral vektör kullanılmayan yöntemlerde gen aktarımı daha güvenlidir, ancak yetersiz nükleer taşıma nedeniyle viral vektörlere kıyasla daha düşük transfeksiyon verimliliğine sahiptir. pDNA'nın nükleer lokalizasyon için modifiye edilmesi ve güçlü yapısal promotör kullanılarak transkripsiyonun geliştirilmesi terapötik genlerin ekspresyonunu arttırmaktadır (Şekil 1.8). Ancak aktarılan sekansların nükleer DNA'ya entegrasyonu da beklenmedik genetik değişiklikleri indükleyebilmektedir (Sheridan 2011; Das vd. 2015).



Şekil 1.8. pDNA ve mRNA gen aktarımı (Youn ve Chung 2015)

1.2.3. RNA Aktarımı

Aktarılan pDNA'nın istenmeyen entegrasyonunun üstesinden gelmek için, alternatif olarak mRNA önerilmiştir (Yamamoto vd. 2009; Phua vd. 2013). Yeterli miktarlarda *in vitro* transkripsiyonlu mRNA, ticari olarak temin edilebilen kitlerle kolayca elde edilebildiğinden, mRNA kullanılarak terapötik gen iletimi, artık gen terapisinde pDNA yerine kullanmak için etkili bir yöntemdir. mRNA kullanılarak gen iletiminin pDNA'ya kıyasla birçok avantajı vardır. İlk olarak, RNA aktarımında beklenmedik genoma entegrasyon yoktur. Aynı zamanda mRNA'nın doğrudan translasyonu gerçekleştiğinden, pDNA aktarımında olduğu gibi transkripsiyon için promotör bağımlılığı bulunmamaktadır. Bu nedenle nükleer translokasyon ve transkripsiyon gerekli değildir. İkincisi, mRNA aracılı gen transferi bölünmeyen hücrelerde meydana gelirken, pDNA aracılığıyla gen transferi çoğunlukla bölünen hücrelerde etkilidir. Üçüncüsü, immünojenite, kimyasal modifikasyonla kolayca modüle edilebilmektedir. mRNA aracılığıyla gen dağıtımının birçok avantajı olmasına rağmen,

mRNA daha önce terapötik bir molekül olarak kullanılamayacak kadar kararsız kabul edilmekteydi. Bununla birlikte, mRNA'nın transfeksiyon etkinliği büyük ölçüde iyileştirilmiştir (Malone vd. 1989; Van Tendeloo vd. 2001). Terapötik gen transferi için mRNA'nın yarı ömrü, mRNA'nın kullanımını kolaylaştıran kimyasal modifikasyonlar ile birkaç dakikadan birkaç saate kadar değiştirilerek dramatik bir şekilde arttırılmıştır (Stepinski vd. 2001; Zohra vd. 2007; Strenkowska vd. 2010). Çeşitli mRNA modifikasyonları ve aktarım yöntemleri birleştirilerek, mRNA gen terapisinin etkinliği büyük ölçüde geliştirilebilmektedir. Bununla beraber, yüksek seviyelerde mRNA kararsızlığı ve immünojenite, terapötik araştırma ve klinik uygulamalar için mRNA'nın geniş kullanımını engellemiştir (Van Tendeloo vd. 2007). Bu sorunlar, bir 7-metilguanozin (m7G) 5'-başlık yapısı, untranslated bölgeler (UTR'ler), poli (A) kuyruk ve belki de en önemlisi modifiye edilmiş nükleotitler dahil olmak üzere mRNA moleküllerinde bir dizi yapısal modifikasyonun eklenmesiyle büyük ölçüde azaltılmıştır (Şekil 1.9) (Karikó vd. 2005; Kormann vd. 2011; Sahin vd. 2014). Yapısal modifikasyonlar, mRNA stabilitesini önemli ölçüde iyileştirmekte, immünojenitesini azaltmakta ve translasyonel verimliliğini arttırmaktadır. Modifiye mRNA'nın dönüşümsel etkinliğindeki gelişme, kodlanan proteine ve modifikasyonların tipine bağlıdır. Warren ve ark. (2010) GFP mRNA'ların yapısında 5-metilsitidin veya psödoüridin eklendiğinde floresans yoğunluğunda 4 kat artış gözlemlemişler, daha sonra her iki modifiye nükleotid kullanıldığında ise yoğunluğun 10 kat daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir (Warren vd. 2010). Bundan sonraki bölümlerde kimyasal olarak modifiye edilmiş mRNA, sentetik mRNA (smRNA) olarak anılacaktır ve *in vitro* transkripsiyon yoluyla sentezlenmektedir. Ancak modifikasyon kuralları halen devam etmekte olan bir çalışma alanıdır ve gerekli modifikasyonlar uygulamaya bağlı olarak değişebilmektedir. mRNA'ların yapılarındaki olası modifikasyonlardan özellikle modifiye nükleotidlerin tipi henüz tam olarak araştırılmamıştır. Farklı araştırma grupları çeşitli smRNA modifikasyon setlerini kullanmışlardır (Sahin vd. 2014). Genel olarak, belirli bir smRNA endikasyonu için yararlı olan optimal modifikasyon setini bulmak için keşfedilecek çok fazla kimyasal vardır. Doğrudan smRNA modifikasyonları aşağıdakileri içermektedir.



Şekil 1.9. smRNA modifikasyon bölgeleri (Badieyan ve Evans 2019)

- **5'-Başlık Yapısı**

Transkripsiyon sırasında, ökaryotik mRNA'nın 5' ucu, bir m7G 5' başlığına bağlanmaktadır. Başlık yapısı, iki mekanizma ile translasyon verimliliğini önemli ölçüde etkileyebilmektedir. İlk olarak, başlığın translasyon başlatma faktörü 4E'ye (eIF4E) bağlanması, kodlanan proteinin translasyonu için önemlidir. İkinci olarak, başlığın mRNA başlık bozucu enzimlerine bağlanması, mRNA bozulmasını başlatmaktadır. Bu nedenle, eIF4E'ye bağlanma için yüksek güvenilirliğe sahip ve başlık bozucu enzimlerine karşı dirençli uygun başlık yapılarının seçilmesi, translasyon etkinliğini ve smRNA stabilitesini önemli ölçüde arttırabilmektedir (Sahin vd. 2014; Hadas vd. 2017).

- **UTR'ler**

Düzenleyici sekans elemanlarının varlığı, RNA kök döngüsü gibi üçüncül yapıları etkilemesi ve RNA bağlayıcı proteinlerle etkileşim nedeniyle, 5'- ve 3'-UTR'ler smRNA'ların hem stabilitesini hem de translasyon etkinliğini etkileyebilmektedir. Bu amaçla araştırmacılar, istenen smRNA'ların translasyonunun stabilitesini ve etkinliğini artırmak için α/β -globin genlerinden türetilen yüksek düzeyde stabilize edici UTR'leri kullanmışlardır (Patel vd. 2019).

- **Poli (A) Kuyruk**

Ökaryotik mRNA'lar doğal olarak 3' ucunda bir poli (A) kuyruk yapısı taşır, bu da mRNA stabilitesinde ve translasyonunda önemli bir rol oynamaktadır. Optimum uzunluğu 120-150 nükleotid olan poli (A) kuyruğu, sentetik smRNA'ya iki yoldan biriyle eklenebilmektedir. Bu yollar; hedef smRNA'nın şablon vektöründeki poli (A) yapısını kodlamasıyla veya smRNA'nın transkripsiyon sonrası adenin nükleotitlerini enzimatik olarak eklemesiyle gerçekleşmektedir (Sahin vd. 2014).

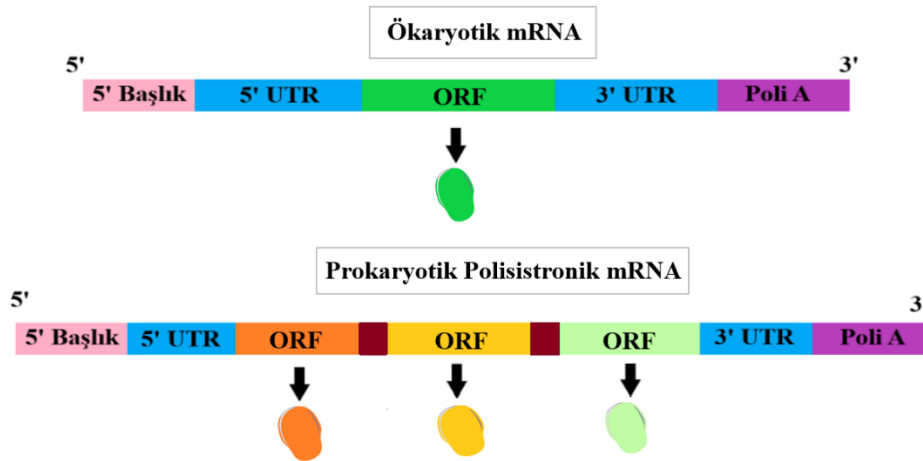
- **Modifiye Edilmiş Nükleotidler**

Modifiye edilmemiş mRNA'lar, TLR7 gibi Toll benzeri reseptörlerin (TLR'ler) bir alt sınıfı tarafından tespit edilebilmektedir ve bu nedenle oldukça immünojeniktir. smRNA'ların yapısına 5-metilsitidin (5mC), psödouridin (Ψ), 5-metilüridin (5mU) veya N6-metiladenozin gibi modifiye edilmiş nükleotidlerin dahil edilmesinin, TLR'lerin aktivasyonundan kaçınarak immünojenisiteyi önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir (Sahin vd. 2014; Patel vd. 2019). smRNA'nın ortaya çıkışı hem akademide hem de endüstride smRNA tabanlı terapötik araştırmaları büyük ölçüde hızlandırmıştır. smRNA, kanser immünoterapisi, mRNA aşıları, protein replasmanı, gen düzenleme, hücre kaderi dönüşümü ve rejeneratif tıp alanlarında araştırılmaktadır (Sahin vd. 2014). Kanser immünoterapisi için smRNA'nın uygulanması ve mRNA bazlı aşıların geliştirilmesi, daha önce gözden geçirilmiş bir konu olan klinik deneyler aşamasındadır (Fiedler vd. 2016; Diken vd. 2017). smRNA'lar hücre programlama ve doku mühendisliği uygulamalarında da kullanılmaktadır. smRNA'ların hücrelere *in vivo*, *in vitro* ve *ex vivo* transfeksiyonu için çeşitli yöntemler kullanılmıştır. smRNA transfeksiyonu için elektroporasyon ve gen tabancası gibi mekanik yöntemler yaygın olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte, bunlar pahalı yöntemlerdir. smRNA iletimi için kimyasal yöntemler daha ucuz, kolay, düşük toksisite ve düşük immünojeniteye sahiptir. En önemlisi kimyasal yöntemler *in vivo* olarak invazif olmayan smRNA aktarım yeteneğine sahiptir. Bu yöntemlerde, katyonik lipidler veya polimerler, negatif yüklü smRNA molekülleri ile elektrostatik olarak bağlanarak ve nanopartiküller oluşturmaktadırlar (Patel vd. 2019). Lipid veya polimer nanopartiküllerin kullanımı, smRNA'lar dahil nükleik asitlerin aktarılması için mevcut altın standart olarak düşünülebilir (Xue vd. 2015). Bu tür kompleksler biyoyumludur, biyolojik olarak parçalanabilir ve bir endositik yoldan kargo alımını kolaylaştırmak için doğal olarak hücre zarlarıyla etkileşime girme eğilimindedirler. smRNA'lar, nöronlar (Goparaju vd. 2017), beta-hücreleri (Koblas vd. 2016), endotelial progenitörler (Van Pham vd. 2017), kardiyovasküler hücreler (Zangi vd. 2013; Lee vd. 2015) ve miyojenik hücreler (Warren vd. 2010; Lee vd. 2015) dahil olmak üzere çeşitli hücre tiplerine farklılaşma ve transdiferansiyasyon için kullanılmıştır.

mRNA'nın hücre farklılaştırmasında ve rejeneratif tıpta uygulanması hızla ilerleyen bir alan olmasına rağmen, bazı mevcut engeller devam etmektedir. smRNA'ların yüksek maliyeti, ısıya ve her yerde bulunan nükleazlara karşı olan yüksek hassasiyeti, endüstriyel ve akademik grupların smRNA tabanlı uygulamalara zaman ve çaba harcama isteğini sınırlayabilmektedir. Özellikle *in vivo* çalışmalar da mRNA'nın transfeksiyonu için optimal taşıyıcının her bir uygulamada belirlenmesi gerekebilmektedir. Geliştirilmiş uygulama araçlarıyla bile smRNA'nın endositozunu takiben sitoplazmaya salınmasını ve eksprese edilen proteinlerin seviyelerinin kontrol edilmesi gibi zorluklar devam etmektedir. Hücrelerin yeniden programlanmasında veya doku rejenerasyonunda nispeten uzun bir zaman sürecine ihtiyaç duyulduğunda, mRNA'nın geçici etkisini telafi etmek ve çoklu transfeksiyon ihtiyacını azaltmada mRNA'nın uzun süreli iletimi için ideal biyomateryaller belirlenmelidir (Badieyan ve Evans 2019).

1.3. Polisistronik mRNA Kullanılarak Beta Hücre Programlanması

Virüslerde, protozoanlarda ve omurgasızlarda iki veya daha fazla bağımsız olarak düzenlenen proteinleri kodlayan çoklu açık okuma çerçevesi taşıyan sayısız gen vardır. Protozoanlar ve omurgasızlardaki polisistronik genler, koordineli gen ekspresyonunun etkili bir aracı olarak tek bir mRNA transkripti boyunca iki veya daha fazla bölgede translasyonun başlatılmasına izin vermektedir. Polisistronik mesajcı RNA (sentetik pmRNA), iki veya daha fazla ardışık, fonksiyonel açık okuma çerçevesi (ORF) içeren birden fazla proteini kodlayan tek bir RNA molekülüdür. Böylece her protein bağımsız olarak üretilmektedir. Sentetik pmRNA bakterilerde yaygındır. Bakteriyel ribozomlar tarafından translasyon başlatma mekanizması, translasyonu mRNA üzerinde dahili olarak bulunan başlangıç kodonlarından kolayca başlatılmasına izin vermektedir. Destekleyici ve düzenleyici bölgelerle birlikte sentetik pmRNA için kodlama yapan bölgeye operon denmektedir (Parker 2013).



Şekil 1.10. Ökaryotik ve prokaryotik mRNA

Hücresel yeniden programlama, farklılaştırılmış bir hücre tipinin başka bir farklılaştırılmış hücre tipine dönüştürüldüğü bir işlemdir (Zhou Q. ve Melton 2008). Beta hücre rejenerasyonu açısından, asinar hücrelerinden beta hücre yeniden programlaması için gelişimsel açıdan önemli üç transkripsiyon faktörü olan Pancreatic

and Duodenal Homeobox 1 (PDX1), Neurogenin 3 (NGN3) ve MAF BZIP Transcription Factor A (MAFA)'nın ekspresyonu gerekmektedir (Zhou Q. vd. 2008). Yeniden programlanma başarısının üç transkripsiyon faktörünün tümünü içeren polisistronik viral yapıların, her bir transkripsiyon faktörünü taşıyan monosistronik viral yapılardan üstün olduğu kanıtlanmıştır (Li W. vd. 2014). Polisistronik yapı içinde bulunan transkripsiyon faktörleri 2A peptitleri ile birbirlerinden ayrılmaktadır. Bu 2A peptitleri, tek bir transkriptten çoklu proteinlerin üretilmesine izin veren translasyonel “atlamaya” aracılık etmektedir (Szymczak ve Vignali 2005).

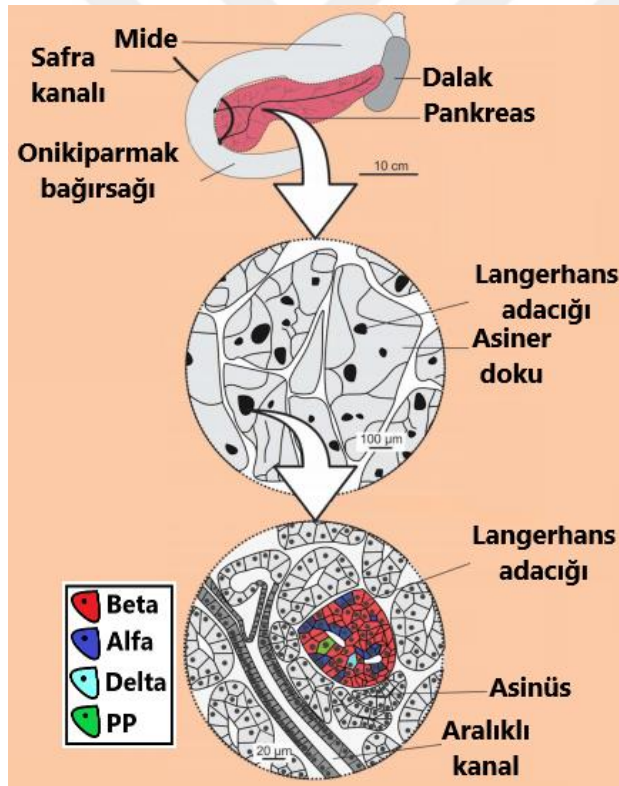
Sentetik pmRNA içerdiği operonların ürünlerinin sentezi için veya etkin olarak fonksiyon göstermesi için koordineli bir şekilde düzenlendiği görülmektedir. Buna biyosentetik bir yolaktaki enzimleri kodlayan polisistronik genler örnek verilebilir. Sentetik pmRNA'nın translasyona uğradığı organizmalarda bu genlerin bir arada bulunması doğal bir avantaj sağlıyor olabilir. Farklı organizmaların sekanslanmış genomlarını karşılaştırırken, en yüksek oranda korunan sentetik pmRNA'lar belirli ribozomal proteinleri kodlayan operonlardır. Tipik bir sentetik pmRNA üzerindeki her gen, prokaryotik ribozomlar tarafından translasyonun başlatılmasında yer alan bir dizi olan kendi Shine-Dalgarno dizisini içermektedir ve bu nedenle her gen bağımsız olarak üretilmektedir. Ayrıca, bir bölgede translasyonun başlaması mRNA'nın başka bir bölgesinin translasyonuna bağlı olduğu durumlar da vardır. Bazı durumlarda, sentetik pmRNA'nın ikincil yapısındaki değişiklikler, diğer proteinlerin üretilmesi için indükleyici olarak davranırlar. Örneğin, küçük RNA bakteriyofaj MS2'de replikaz geninin translasyona uğraması, kaplama proteini geninin translasyonuna bağlıdır (Parker 2013). Her ne kadar sentetik pmRNA prokaryotlara özgü olsa da bu organizmalarda üretilen mesajların çoğu monosistronik mRNA'nın transkripsiyonel birimlerinden gelmektedir. *Escherichia coli*'de, mRNA'nın % 30'undan daha azı polisistroniktir ve sentetik pmRNA'nın arkealarda bundan daha az yaygın olduğu görülmektedir (Parker 2013).

Beta hücre farklılaşması için üç major transkripsiyon faktörünün hücre içinde eksprese olması gerekmektedir. Monosistronik olarak sentezlenen her bir genin mRNA'ların aynı hücre kültürüne transfeksiyonu sonucu yapılan çalışmalarda hücre farklılaşması düşük verimlilikle sonuçlanmıştır. Bu çalışmada verimin yükseltilmesi için sentetik pmRNA teknolojisine başvurulmuştur. Gen aktarım çalışmalarında sentetik pmRNA kullanılmasının diğer gen aktarım yöntemlerine göre bazı avantajları bulunmaktadır. Bu avantajlardan ilki sentetik pmRNA'da birlikte kopyalanan genler genellikle aynı biyolojik süreçte katılan veya bir protein kompleksinde etkileşime giren proteinleri kodlayarak, bu genlerin transkripsiyonun hız sınırlayıcı adımlarını paylaşmasına izin vermektedir. Böylece, polisistronik transkripsiyon, işlevsel olarak ilgili genlerin ekspresyonunu senkronize edebilir ve genomdaki gen düzenlemesini düzene sokabilir. İkinci avantajı ise sentetik pmRNA transkripsiyonun da bir operonu paylaşan tüm genler için teorik olarak eşit miktarlarda mRNA üretilir (Dar ve Sorek 2018). Üçüncü avantajı sentetik pmRNA transkripsiyonu bazen gen ekspresyonunu koordine etmek için kullanılmaktadır. Örneğin mRNA'daki tek bir kontrol noktası aracılığıyla birkaç ribozomal proteinin üretimini açılması veya kapatılması için ayarlanabilmektedir. Sentetik pmRNA'nın birden fazla proteini aynı anda kodlaması nedeniyle protein üretimine daha az enerji harcanarak verimlilik sağlanmaktadır (Kozak 2005). Son avantajı ise sentetik pmRNA vektörleri ile transfeksiyonda çok sayıda gen

eşzamanlı olarak hedef hücelere verimli bir şekilde iletebilirken, tek seferde birden fazla viral vektörle birlikte transdüksiyon gerçekleştirmek zor olabilmektedir (Frimpong ve Spector 2000).

1.3.1. Pankreas

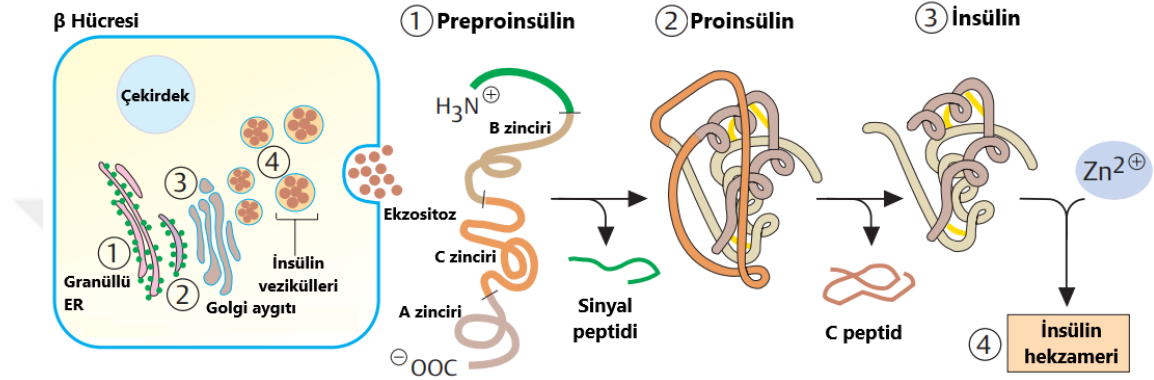
Pankreas, endokrin ve ekzokrin olmak üzere iki kısımdan oluşmaktadır. Ekzokrin pankreas hücreleri içerisinde su, bikarbonat iyonları ve çeşitli enzimleri (tripsininojen, kimotripsininojen, karboksipeptidazlar, elastaz, lipaz, fosfolipaz A, amilaz, DNAz ve RNAz) içeren pankreas sıvısı salgılamaktadır. Pankreas sıvısı, pankreatik kanallar yoluyla onikiparmak bağırsağına boşalmaktadır (Henry vd. 2019). Endokrin pankreas hücreleri, Langerhans adacıkları, kandaki ve hücrel depolardaki besin seviyesini korumada önemli bir rol oynamaktır (Jo vd. 2007). Langerhans adacıkları, insülin salgılayan beta hücreleri (% 65-90), glukagon salgılayan alfa hücreleri (% 15-20), somatostatin salgılayan delta hücreleri (% 3-10) ve pankreas polipeptidi salgılayan pankreatik polipeptit hücreleri (% 1) topluluğundan oluşmaktadır (Elayat vd. 1995) (Şekil 1.11). Salgılanan hormonlar kan akışı yoluyla hedef organlara ve dokulara taşınmaktadır (Dubois 1999).



Şekil 1.11. Pankreas yapısı (Dolenšek vd. 2015)

Küçük endokrin hücre kümeleri ilk olarak Langerhans tarafından tanımlanmıştır (Langerhans 1869). Genellikle pankreasın endokrin kısmı Langerhans adacıkları olarak adlandırılmaktadır. İnsülin, kanda yükselen şeker konsantrasyonuna yanıt olarak Langerhans adacıklarındaki beta hücreleri tarafından üretilmektedir. İlk başta 1150 Da

moleküler ağırlığında preproinsülin olarak üretilmektedir. Peptit zincirini endoplazmik retikulumun (ER) içine yönlendiren N-terminal sinyal peptidi ile A zinciri, B zinciri ve C zinciri olmak üzere dört peptide sahiptir. ER’de sinyal peptidinin parçalanması ve disülfür bağlarının oluşturulmasıyla proinsülin üretilmektedir. Proinsülin golgiye geçer ve burada veziküllerde biriktirilmektedir. C peptidin kesilmesinden sonra veziküllerde olgun insülin oluşur ve salınımına kadar çinko içeren hekzamerler formunda depolanmaktadır (Şekil 1.12). Glikoz, temel fizyolojik insülin salınımını uyaran ve beta hücre aktivitesinin güçlü bir düzenleyicisidir (Koolman ve Röhm 2005; Skelin vd. 2010).



Şekil 1.12. İnsülin biyosentezi (Koolman ve Röhm 2005)

İnsanlarda, insülin salınımının uyarılmasında ve beta hücrelerinin spesifik farklılaşmasında rol oynayan önemli transkripsiyon faktörleri bulunmaktadır. Bunlardan en önemlileri PDX1, NGN3 ve MAFA transkripsiyon faktörleridir (Akinci vd. 2012). PDX1 dahil olmak üzere farklı büyüme faktörleri de beta hücre yenilenmesi ve büyümesinde rol oynamaktadır (Skelin vd. 2010).

1.3.2. Önemli Pankreatik Genler

Pankreas gelişiminin farklı evrelerinde çeşitli transkripsiyon faktörleri spesifik olarak eksprese olmaktadır. *Pdx1* geninin pankreas gelişimi ve beta hücresi özelliklerinin gelişmesi için gerekli olduğu fareler üzerinde yapılan çalışmada gösterilmiştir. Aynı çalışmada *Pdx1* geninin yokluğunda pankreas gelişimi gözlenmemiştir (Ahlgren vd. 1998). Daha sonra Zhou ve arkadaşlarının yapmış oldukları farklılaştırma deneyleri de bu bilgi doğrulanmıştır. Zhou ve arkadaşları farelerde pankreasta eksprese olan transkripsiyon faktörlerinin pankreas oluşumundaki rollerini inceleyerek, *Pdx1* genine ek olarak *Ngn3* ve *MafA* genlerinin de beta hücresinin yeniden programlanmasında ve farklılaşmasında ana transkripsiyon faktörleri olduğunu bildirmişlerdir. Daha sonra belirledikleri bu üç transkripsiyon faktörlerini asinar hücrelere verdiklerinde beta hücresine farklılaşması olduğunu göstermişlerdir (Zhou Q. vd. 2008). Bu nedenle PDX1, NGN3 ve MAFA transkripsiyon faktörlerinin birlikte kullanılması beta hücresi farklılaşması için önemlidir (Şekil 1.3).

Pdx1

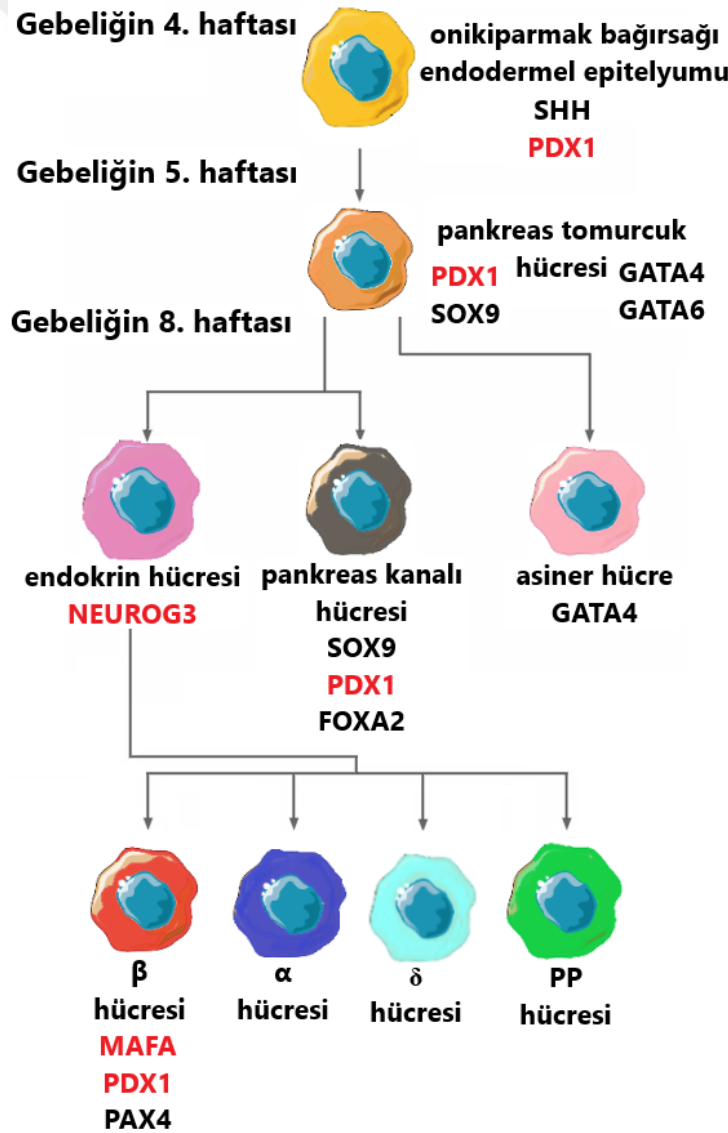
Pdx1 genellikle pankreas gelişiminin “ana düzenleyicisi” olarak adlandırılmaktadır (Shih vd. 2013; Shih vd. 2015; Teo vd. 2015). Ana düzenleyici, bu proteinin gelişim sırasında bir hiyerarşik olay dizisini başlattığını veya başlamasına katıldığını ifade etmektedir (Kondratyeva vd. 2015). Endodermal hücre kümeleri embriyonik gelişiminin dördüncü haftasından sonra tübüllerden tomurcuklanır ve adacık hücreleri oluşturmak için mezoderm içinde birikmektedir. Beta hücreleri onuncu haftadan sonra insülin salgılamaya başlamaktadır (Skelin vd. 2010). Farelerde ve insanlarda bu proteini kodlayan genin silinmesi, pankreasın oluşmamasıyla sonuçlanmıştır (Puri vd. 2015; Teo vd. 2015). Gelişmekte olan pankreasta PDX1 seviyesi beta hücrelerinde yüksek seviyededir (Puri vd. 2015). Pankreastaki hücrelerin kimliğinin korunması, transkripsiyon faktörleri arasındaki etkileşimleri içeren gen düzenleme ağının çalışmasına bağlıdır. PDX1 bu ağdaki merkezi noktalardan biridir ve pankreas hücre hatlarının doğru işleyişinin sürdürülmesi için dinamik ekspresyonunu gerektirmektedir (Vinogradova ve Sverdlov 2017). İnsanda PDX1 seviyelerinin azalması, tip 2 diyabetteki beta hücre fonksiyon bozukluğu ile ilişkilidir (Guo S. vd. 2013). PDX1’in spesifik olarak olgun beta hücrelerinden çıkarılması, insülin üreten beta hücre popülasyonunun alfa benzeri hücre fenotipine transkripsiyonel olarak farklılaşmasıyla ve hiperglisemiyle sonuçlanmıştır (Gao T. vd. 2014). Ayrıca *in vivo*’da *Ngn3* pozitif endokrin progenitor hücrelerde zorlanmış *Pdx1* ekspresyonu alfa hücrelerini beta hücrelerine dönüştürmüştür (Yang vd. 2011). Bu sonuçlar *Pdx1* ile düzenlenen pozitif ve negatif kontrol mekanizmalarının beta hücresi oluşumunun kontrolü üzerindeki önemini göstermektedir (Spaeth vd. 2016).

Ngn3

Temel sarmal-döngü-sarmal (bHLH) transkripsiyon faktörü olan NGN3 farelerdeki pankreatik progenitor hücrelerinde eksprese edilerek fonksiyonel endokrin hücreler oluşturulabilmektedir (Schwitzgebel vd. 2000). *Ngn3*, farelerde tüm pankreatik endokrin hücre tiplerinin geliştirilmesi için gereklidir. Hücre tiplerinin gelişmesi NeuroD, Rfx6, Pax4, Nkx6.1, Arx ve diğer transkripsiyon faktörlerinin doğrudan veya dolaylı olarak düzenlenmesi ile gerçekleşmektedir. Tüm endokrin adacık hücreleri, yüksek seviyelerde *Ngn3* eksprese eden pankreatik progenitorlardan türetilmektedir (Gu vd. 2002). *Ngn3* eksprese eden hücreler farede ilk önce E9 ve E12.5 arasında birincil geçiş sırasında gözlenmektedir. Bu birincil geçiş endokrin hücrelerinin bazıları yetişkin adacıklarına katkıda bulunabilse de, endokrin hücre kütlelerinin çoğu E12.5 ve E16.5 arasında ikinci bir endokrin hücre gelişimi dalgası sırasında oluşmaktadır (McGrath vd. 2015). *In vitro* yönlendirilmiş farklılaşma protokolünde, *Ngn3* fonksiyonu gen düzenleme ile devre dışı bırakılmış ve insan pluripotent kök hücrelerinden pankreas endokrin hücresinin üretilmediği görülmüştür (McGrath vd. 2015; Zhu vd. 2016). Domuzlarda (Gradwohl vd. 2000; Sheets vd. 2018) ve farelerde (Gradwohl vd. 2000) *Ngn3* geninin silinmesi gelişmekte olan pankreasta endokrin hücre oluşumunda başarısızlık göstermiş ve bu da yeni doğanda kalıcı diyabetle sonuçlanmıştır.

MafA

MAFA, Maf ailesine ait bZIP tasarımlı bir transkripsiyon faktörüdür. MAFA proteini, insülin geni promotorunun insülin artırıcı elementi olan RIPE3b'ye bağlanmakta ve insülin gen ekspresyonunu aktive etmektedir (Ye vd. 2006). MAFA'nın NGN3 ve PDX1 ile etkileşimi insülin sentezini ve salgılanmasını arttırmaktadır. Ayrıca *MafA*, pankreatik hücre oluşumunu ve farklılaşmasını indüklemek için *MafB* ile koordine halindedir (Kaneto vd. 2009). MAFA pankreas, kas ve yağ dokusu gibi farklı dokulardaki glikoz ve enerji dengesini düzenlemektedir. Farelerde *MafA* eksikliği diyabete ve diyabetik nefropatiye (diyabete spesifik böbrek hastalığı) yol açmaktadır (Tsuchiya vd. 2011). Bazı çalışmalar, *MafA*'nın adipositlerin farklılaşmasında ve yağ dokusunun insüline duyarlılığında nihai rolünü vurgulamıştır (Guo Q. S. vd. 2012; Nishimura vd. 2015). Bu bulgular göz önüne alındığında, *MafA* pankreas beta hücrelerinin yenilenmesi ve insülin üreten hücrelere farklılaşmanın indüklenmesi için önemlidir.



Şekil 1.13. Pankreas gelişimde majör genler (Dolenšek vd. 2015)

1.3.3. Diyabet

Diyabet, insülin salınımından ya da üretilen insülinin etkisinden veya her ikisindeki kusurdan kaynaklanan hiperglisemi ile karakterize metabolik bir hastalıktır. Diyabetin gelişiminde çeşitli patojenik süreçler yer almaktadır. Bu süreçlerden bazıları pankreastaki beta hücrelerinin otoimmün atak sonucu yıkılması ve üretilen insülinin hedef hücrelerde yeterli etkiyi oluşturmamasıyla oluşan insülin direncidir. Tip 1 diyabet (T1D) ve tip 2 diyabet (T2D) olmak üzere en sık görülen iki temel diyabet çeşidi vardır. T1D’de insülin salınımında bir yetersizlik görülmektedir. Bunun nedeni pankreasta Langerhans adacıklarındaki insülin üreten beta hücrelerinin otoimmün atak sonucu hasar almış olmasıdır. T2D’de pankreastaki beta hücrelerinden insülin üretilmekte fakat hedef hücreler insülin hormonuna düzgün bir şekilde yanıt verememektedir. Böylece kandaki glikoz kanda kalmaya ve kan şekerinin yüksek seviyelerde kalmasına neden olmaktadır (Skyler 2004). Sonuç olarak iki diyabet çeşidinde de hastalar insülin kaynağına ihtiyaç duymaktadır. Diyabette karşımıza çıkan beta hücresi hasarı ve insülin hormonunun yetersizliği hastalığın temelini oluşturmaktadır. Hastalığın tedavisi için genotip ve fenotip arasındaki bağlantının çok iyi anlaşılması, hasara uğrayan beta hücrelerinin yerine kullanılabilecek adacık kaynaklarına, yeni yaklaşımlara ve alternatif tedavi yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır (Bluestone vd. 2010).

Alternatif tedavi yöntemlerinden pankreas transplantasyonu ve izole pankreatik adacık transplantasyonunun potansiyel olarak insülin bağımlı diyabeti iyileştirebileceği bildirilmiştir (Shapiro vd. 2006). Bu terapötik yaklaşımın kullanımı, uygun organ vericilerinin eksikliği ve kalıcı immünosupresyon ihtiyacı ile sınırlanmaktadır (Koblas vd. 2016). Dolayısıyla, güvenli ve bol miktarda insülin üreten hücre kaynağına ihtiyaç vardır. Yüksek verimliliği ve türetilmiş hücrelerin kalitesi nedeniyle en umut verici yöntemlerden biri embriyonik kök hücrelerin ve uyarılmış pluripotent kök hücrelerin insülin üreten hücrelere farklılaşmasıdır (Kroon vd. 2008; Pagliuca vd. 2014). Bununla birlikte, bu yöntemin klinik uygulaması, malign hücrelere potansiyel dönüşüm riski ile sınırlanmaktadır (Ben-David vd. 2014; Peterson ve Loring 2014).

Hücrelerin yeniden programlanması son zamanlarda insülin üreten hücreler oluşturmak için gelecek vaat eden başka bir yöntem olarak ortaya çıkmıştır. Farklılaşmış bir hücre, transdiferansiyasyon programını aktive eden spesifik transkripsiyon faktörlerinin zamansal ifadesi ile doğrudan istenen hücre tipine yeniden programlanabilmektedir. Özel transkripsiyon faktörü kombinasyonları, fibroblastların nöronlara (Vierbuchen vd. 2010), kardiyomiyositlere (Song vd. 2012), hepatositlere (Sekiya ve Suzuki 2011) ve uyarılmış pluripotent kök hücrelere yeniden programlanmasını indüklediği gösterilmiştir (Takahashi ve Yamanaka 2006; Takahashi vd. 2007). Benzer şekilde, pankreatik ekzokrin hücreleri ve karaciğer safra kanalı epitel hücreleri, pankreas beta hücrelerinin doğal farklılaşmasına katılan PDX1, NGN3 ve MAFA transkripsiyon faktörlerinin uyarılmasıyla insülin üreten hücrelere farklılaşabilmektedir (Akinci vd. 2012; Banga vd. 2012; Lima vd. 2012). *In vivo* yeniden programlama yoluyla ekzokrin veya karaciğer hücrelerinden oluşturulan insülin üreten hücrelerin, diyabetik farelerde kan şekeri seviyelerini normaleştirdiği ve terapötik potansiyellerini gösterdiği bildirilmiştir (Zhou Q. vd. 2008; Banga vd. 2014).

Hücre farklılaştırılması deneyinde dışarıdan aktarılan genlerin hücre programlama verimi etkileyen bir diğer faktör kromozomun yeniden modellenmesidir. Dışarıdan aktarılan genler sayesinde kromozom yeniden modellenenebilir veya aktarılan genlere ek olarak kromozomu yeniden modelleyen ajanlarda hücrelere uygulanmaktadır. Kromozomun yeniden modellenmesi hücre farklılaşmasını kolaylaştırmaktadır. Yapılan bu tez çalışmasında sentetik pmRNA aktardıktan sonra hücrenin daha kolay farklılaşmasını sağlamak için aynı zamanda hücrelere kromotinin yeniden modellenmesinde rol oynayan valproik asit (VPA) ve immün sistemi uyaran lipopolisakkarit (LPS) uygulanmıştır.

Bu tez çalışmasında PDX1, NGN3 ve MAFA transkripsiyon faktörlerini içeren sentetik pmRNA kullanılarak pankreas ekzokrin hücrelerin insülin üreten hücrelere yeniden programlanması için güvenli ve entegrasyon gerektirmeyen bir yöntem geliştirmek amaçlanmıştır. Bu amaçla AR42J-B13 hücre hattı seçilmiştir. AR42J-B13 hücre hattı kimyasal olarak indüklenmiş bir pankreatik tümörden türetilen bir sıçan pankreatik ekzokrin hücre hattıdır (Longnecker vd. 1979). Daha önce PDX1, NGN3 ve MAFA transkripsiyon faktörlerini kodlayan adenoviral vektörler tarafından indüklenen insülin üreten hücrelere transdiferansiyasyonu için bir model hücre hattı olarak kullanılmıştır (Akinci vd. 2012; Lima vd. 2012). Aynı zamanda AR42J-B13 hücreleri standart kültür koşulları altında adacık hormonlarının hiçbirini eksprese etmemektedir (Zhou J. vd. 1999). Dahası, AR42J-B13 hücreleri *in vitro* kültür üzerine stabil bir fenotipe sahiptir (Akinci vd. 2012). Yeniden programlama faktörleri PDX1, NGN3 ve MAFA'yı kodlayan sentetik pmRNA'lar şeklinde verilmiştir.

2. KAYNAK TARAMASI

Farklı araştırma grupları tarafından yapılan çalışmalar sonucunda pankreas oluşumu için *Pdx1*, *Ngn3* ve *MafA* genlerinin gerekli olduğu gösterilmiştir. Hatta bu genlerin beta hücre olgunlaşmasında ve beta hücrelerinin hormon salgılarını düzeltmesinde de çok önemli fonksiyonlarının olduğu gösterilmiştir (Ahlgren vd. 1998; Zhou Q. vd. 2008; Akinci vd. 2012; Lima vd. 2012).

Warren ve arkadaşları doğal antiviral yanıtın üstesinden gelmek için modifiye edilmiş sentetik mRNA'nın uygulanmasına dayalı olarak hücre kaderini yeniden programlamak için basit, entegre olmayan bir strateji geliştirmişlerdir. Bu stratejinin yüksek verimlilikle birçok insan hücre tipine farklılaştırmada kullanılabileceğini bildirmişlerdir. RNA ile indüklenen pluripotent kök hücrelerin miyojenik hücrelere farklılaşmasını etkili bir şekilde yönlendirmek için kullanılabileceğini de göstermişlerdir. Bu teknoloji, temel araştırma, hastalık modelleme ve rejeneratif tıp için geniş uygulanabilirliğe sahip somatik hücre yeniden programlaması ve hücre kaderinin yönlendirilmesi için güvenli ve verimli bir stratejidir (Warren vd. 2010).

Bazı araştırma grupları tarafından pankreatik ekzokrin hücrelerin ve karaciğer safra kanalı epitel hücrelerinin, pankreatik beta hücrelerine doğal farklılaşmasına katılan PDX1, NGN3 ve MAFA transkripsiyon faktörlerinin uyarılmış ekspresyonu yoluyla insülin üreten hücrelere transdiferansiye edilebildiği gösterilmiştir (Akinci vd. 2012; Lima vd. 2012).

Li ve ekibi adenoviral yapı da *Pdx1*, *Ngn3* ve *MafA* genlerini kullanarak yetişkin fare pankreas asinar hücrelerinin beta hücrelerine *in vivo* dönüşümünü bildirmişlerdir. İndüklenen beta hücrelerinin 13 ay boyunca karakterlerini koruduğu, pankreas adacık hücre benzeri yapılar oluşturduğu ve diyabetik farelerde kan şekeri normal seviyelerde tuttuğu gösterilmiştir. İndüklenmiş beta hücrelerinin 7 ay boyunca ayrıntılı moleküler analizlerini yapmışlar ve küresel DNA metilasyon değişikliklerinin 10 gün içinde meydana geldiğini ortaya çıkarmışlardır. Transkripsiyonel ağın olgun beta hücresine benzemek için 2 aydan fazla sürdüğünü ve daha sonra stabil kaldığını bildirmişlerdir. Bu çalışmada beta hücre programlanması yaklaşık 1 yıl boyunca takip edilmiştir ve bir beta hücresi programlamak için epigenetik, transkripsiyonel, anatomik ve fonksiyonel gelişime uğraması gerektiği gösterilmiştir (Li W. vd. 2014).

Schlaeger ve ekibi iPSC programlaması için sendai-viral, epizomal ve mRNA transfeksiyonu yöntemlerini karşılaştırmıştır. Tüm yöntemler de iPSC'ler üretilmiştir ancak anöploidi oranları, yeniden programlama verimliliği, güvenilirlik ve iş yükünde önemli farklılıklar olduğunu bildirmişlerdir. mRNA yönteminin ana avantajlarının, koloninin ortaya çıkış hızı, yüksek verimlilik, tam bir entegrasyon yokluğu, çok düşük bir anöploidi oranı ve düşük bir donör hücre gereksinimi olduğu belirtilmiştir (Schlaeger vd. 2015).

Koblas ve arkadaşları pankreatik transkripsiyon faktörleri olan PDX1, NGN3 ve MAFA'yı kodlayan sentetik mRNA'ları kullanarak pankreatik ekzokrin hücrelerin karakteristik pankreatik beta hücre markörlerini eksprese eden, proinsülininden insülin üreten hücrelere transdiferansiyasyonu gerçekleştirmişlerdir. Yeniden programlanan hücreler, olgunlaşmamış beta hücrelerinkine benzer şekilde sınırlı insülin sekresyonu ile

glikoz stimülasyonuna yanıt vermiştir. Bu sonuçlar sentetik mRNA'lara dayalı bir genoma entegrasyon içermeyen protokol kullanılarak ekzokrin pankreatik hücrelerin transdiferansiyasyonu yoluyla insülin üreten hücrelerin üretilmesinin mümkün olduğunun ilk kanıtı olmuştur (Koblas vd. 2016).

Kogut ve arkadaşları sentetik mRNA kullanarak insan primer fibroblastlarının iPSC'lere yeniden programlanmasını büyük ölçüde arttırdığını göstermiştir. Hücrelerin %90,7'sini başarılı bir şekilde yeniden programlayabilmişlerdir (Kogut vd. 2018).

Mandal ve Rossi yaptıkları çalışmada yeniden programlama faktörlerini kodlayan modifiye edilmiş mRNA'ları sentezleyerek hücrelere aktarmak için kültür ortamı seçimi, kalite kontrolü ve optimizasyon adımları dahil olmak üzere çeşitli kritik parametrelere odaklanarak birincil insan fibroblast hücrelerinden modifiye mRNA kullanarak iPSC hücrelerini elde etmişlerdir. Yapılan çalışma sonucunda başarılı bir yeniden programlama için hücrelere 2-3 hafta boyunca modifiye edilmiş mRNA aktarımının etkili olduğunu göstermişlerdir. Aynı zamanda modifiye mRNA'nın hücre farklılaşması ve terapötik uygulamalarda geniş bir uygulama alanına sahip olduğunu ve protein ekspresyonu için güçlü bir yöntem olduğunu belirtmişlerdir (Mandal ve Rossi 2013).

Tavernier ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada pluripotensi için gerekli olan OCT4, SOX2, KLF4 ve cMYC transkripsiyon faktörlerini kodlayan mRNA'ları katyonik lipidler aracılığı ile fare embriyonik fibroblastlarına aktararak pluripotensi ile ilişkili genlerin başarılı aktivasyonunu göstermişlerdir. Aynı zamanda geliştirdikleri transfeksiyon protokolünün maksimum üç transfeksiyon gerektirdiğini bildirmişlerdir. Aktarılan transkripsiyon faktörlerin nükleer lokalizasyonunu doğrulamışlardır. Sonuç olarak geliştirmiş oldukları bu yöntem fare kaynaklı indüklenmiş pluripotent kök hücrelerin genoma entegrasyon içermeyen güvenli bir yöntemle üretilmesi için büyük umut vaat etmektedir (Tavernier vd. 2012).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Kullanılan Materyaller

Tez çalışmasında kullanılan materyallere ait marka ve katalog numaraları Çizelge.3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Kullanılan materyallere ait marka ve katalog numaraları

Materyal	Marka	Katalog Numarası
DH5α Competent Cells	Invitrogen, USA	18265-017
Fast Digest <i>NotI</i>	Thermo Fisher Scientific, USA	FD0593
Fast Digest <i>Sall</i>	Thermo Fisher Scientific, USA	FD0644
Fast Digest <i>BamHI</i>	Thermo Fisher Scientific, USA	FD0054
Fast Digest <i>ClaI</i>	Thermo Fisher Scientific, USA	FD0143
Fast Digest <i>SpeI</i>	Thermo Fisher Scientific, USA	FD1254
Fast Digest <i>BamHI</i>	Thermo Fisher Scientific, USA	FD0054
Fast Digest <i>NdeI</i>	Thermo Fisher Scientific, USA	FD0583
pX1 plazmid	Addgene, USA	46848
Antarctic Phosphatase	New England Biolabs, USA	M0289S
T4 DNA Ligase	Thermo Fisher Scientific, USA	EL0011
GeneJet Plazmid Miniprep Kit	Thermo Fisher Scientific, USA	K0503
GeneJet PCR Purification Kit	Thermo Fisher Scientific, USA	K0701
GeneRuler 1 kb DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific, USA	SM0311
GeneRuler 100 bp DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific, USA	SM0241
Agarose	BIOMAX, USA	124543PR
EtBr	Thermo Fisher Scientific, USA	17896
Tris Base	Thermo Fisher Scientific, USA	BP152
Asetik Asit	Merck Millipore, USA	109088
EDTA Disodium Salt Dihydrate	Merck Millipore, USA	108418
pTNT TM vector	Promega, USA	L5610
SOC medium	New England Biolabs, USA	B9020S
Agar Bacteriological	Thermo Fisher Scientifics, USA	LP0011
Yeast Extract	VWR Life Science Amresco, USA	VWRVJ850-500G
Tryptone	VWR Life Science Amresco, USA	VWRVJ859-500G
Ampicillin	Sigma Aldrich, USA	A5354
Gliserol	Sigma Aldrich, USA	15524-1L-R
Ambion 5X MEGAscript T7 Kit	Invitrogen, USA	AM1334
GeneJet PCR Purification Kit	Thermo Fisher Scientific, USA	K0701
AR42J-B13 Cell Line	AddexBio, USA	C0018004
DMEM, Low Glucose	Capricorn, Germany	DMEM-LPA
Antibiotic-Antimycotic	Biowest, France	L0010-020
Fetal Bovine Serum	Biological Industries, Israel	04-007-1A
MEM Non-essential amino acids	Gibco, USA	11140-050
Dulbecco’s PBS (1X)	Cegrogen, Germany	H0500-560
Opti-MEM	Gibco, Australia	31985-62
Lipofectamine 2000	Thermo Fisher Scientific, USA	12604-21
DEPC	Gold Biotechnology, USA	1609-47-8
DNase I, RNase-free	Thermo Fisher Scientific, USA	EN0525
Sodium Chloride	Sigma Aldrich, USA	31434
iScript cDNA Synthesis Kit	Bio-Rad Laboratories, USA	1708891
TRIzol Reagent	Invitrogen, USA	15596026
Formalin solution	Sigma Aldrich, USA	HT501128-4L
Hoechst 33342 Solution	Thermo Fisher Scientific, USA	62249

Çizelge 3.1'in devamı

iTaq™ Universal SYBR Green Supermix	Bio-Rad Laboratories, USA	172-5121
Bovin Serum Albümin	GenDEPOT, USA	A0100-010
Tween 20	Sigma Aldrich, USA	P9416
TritonX-100	Fisher BioReagents, USA	BP151-500
Kalsiyum klorür	Merck Millipore, USA	102378
DMSO	ChemCruz, USA	Sc-202581A
0.22 µm'lik filtre	Isolab, Germany	I.094.03.008.100
T-75 kültür kabına	Corning, USA	430720U
Insulin (2D11-H5)	Santa Cruz Biotechnology, USA	sc-8033
Anti-Insulin	Abcam, England	ab7842
Ngn3 Antibody (C-7)	Santa Cruz Biotechnology, USA	sc-37442
Anti-MafA antibody	Abcam, England	ab26405
Anti-PDX1 antibody	Abcam, England	ab47267
Goat Anti-Mouse IgG, DyLight 488	Thermo Scientific, USA	35502
Goat Anti-Rabbit IgG, DyLight 488	Thermo Scientific, USA	35552

3.2. Deneylerde Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması**➤ 50X Tris- Asetat- EDTA (TAE) tampon**

242 gram Tris 700 mL ddH₂O'da çözündürülmüştür. Üzerine çeker ocak içerisinde 57,1 mL asetik asit yavaş yavaş ilave edilmiş ve 4,65 gram EDTA eklenilip çözündürülmüştür. Son hacim ddH₂O ile 1 litreye tamamlanmıştır.

➤ 0,5X TAE tampon

50X TAE tamponundan, 0,5X'lik TAE hazırlamak için 10 mL alınmış ve 1 litreye ddH₂O ile tamamlanmıştır.

➤ 1 M Tris-HCl

121,1 gram Tris 750 mL ddH₂O ile çözündürülmüştür. pH: 7,4'e ayarlanmış ve ddH₂O ile 1 litreye tamamlanmıştır.

➤ 50 mM CaCl₂

5,55 gram CaCl₂ 750 mL ddH₂O'da çözündürülmüştür ve ddH₂O ile 1 litreye tamamlanmıştır.

➤ %0,8'lik agaroz jel

0,8 gram agaroz 100 mL 0,5X TAE tamponu üzerine eklenmiştir. Mikrodalgada agaroz çözündürülmüştür. Daha sonra soğutulmuş ve 2 µL EtBr eklenmiştir. Jel dökme tepsisine dökülmüştür.

➤ **%1'lik agaroz jel**

1 gram agaroz 100 mL 0,5X TAE tamponu üzerine eklenmiştir. Mikrodalgada agaroz kaynatılarak çözündürülmüştür. 2 µL EtBr eklenerek jel dökme tepsisine dökülmüştür.

➤ **Ampisilin**

2 gram ampisilin 14 mL ddH₂O'da çözündürülmüştür ve 20 mL'ye tamamlanmıştır. 0,22 µm'lik filtreden geçirilmiştir. Eşit şekilde bölünmüş ve -20°C'de muhafaza edilmiştir.

➤ **2X hücre dondurma ortamı**

8 mL hücre kültür ortamı üzerine 2 mL DMSO eklenmiştir. 0,22 µm'lik filtreden geçirilmiş ve -20°C'de muhafaza edilmiştir.

➤ **Luria-Bertani- Broth (LB)**

2,5 gram tripton, 1,25 gram maya özütü ve 2,5 gram NaCl 200 mL ddH₂O'da çözündürülmüştür. Son hacim ddH₂O ile 250 mL'ye tamamlanmıştır. 121°C'de 30 dakika otoklavlanmıştır. 4°C'de muhafaza edilmiştir. Antibiyotikli ortam hazırlanması; antibiyotik çözeltisinden (100 mg/mL) 250 µL alınmış ve 250 mL LB besiyerine eklenmiştir.

➤ **Luria-Bertani- Agar**

3,75 gram agar, 2,5 gram tripton, 1,25 gram maya özütü ve 2,5 gram NaCl 200 mL ddH₂O'da çözündürülmüştür. Son hacim ddH₂O ile 250 mL'ye tamamlanmıştır ve 121°C'de 30 dakika otoklavlanmıştır. Hazırlanan solüsyonun sıcaklığı yaklaşık 50°C'ye kadar soğutulmuş ve steril kabin içerisinde petri kaplarına dökülmüştür. Polimerleşme tamamlandığında, daha sonra kullanılmak için kenarları parafinle sıkıca hava almayacak şekilde kapatılıp 4°C'ye kaldırılmıştır. Antibiyotikli ortam hazırlanması; çözeltinin sıcaklığı yaklaşık 50-55°C'ye geldiğinde steril kabin içerisinde 100 mg/mL antibiyotikten 250 µL alınmış, 250 mL LB-agar besiyerine eklenmiş ve petri kaplarına dökülmüştür.

➤ **%0,1'lik PBS-Tween-20 çözeltisi**

80 mL PBS içerisine 100 µL Tween-20 konulup çözündürülmüştür. PBS ile 100 mL'ye tamamlanmıştır. 4°C'de muhafaza edilmiştir.

➤ **%1'lik Bovine Serum Albumin çözeltisi**

1 gram BSA ve 100 µL Tween-20 80 mL PBS içerisinde çözündürülmüştür. PBS ile 100 mL'ye tamamlanmıştır. 4°C'de muhafaza edilmiştir.

➤ **%5'lik BSA çözeltisi**

5 gram BSA ve 100 µL Tween-20 80 mL PBS içerisinde çözündürülmüştür. PBS ile 100 mL'ye tamamlanmıştır. 4°C'de muhafaza edilmiştir.

➤ **%0,2'lik PBS-TritonX-100 çözeltisi**

80 mL PBS içerisine 200 µL TritonX-100 konulup çözündürülmüştür. PBS ile 100 mL'ye tamamlanmıştır. 4°C'de muhafaza edilmiştir.

➤ **Hoechst Boyası**

Hoechst stok solüsyonundan (1 mg/ml) 1:400 oranında kullanmak için; %1'lik BSA çözeltisi içerisinde çözündürülmüştür. Karanlık ortamda muhafaza edilmiştir.

3.3. Kantitatif PZR (kPZR) için Kullanılan Primerler

Çizelge 3.2. kPZR için kullanılan primer dizileri (m: mouse/fare, r: rat/sıçan)

Gen	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Ürün (bp)
<i>rAct-β</i>	CCGCGAGTACAACCTTCTTG	CAGTTGGTGACAATGCCGTG	297
<i>mPdx1</i>	GGTGCTTACACAGCGGAAC	CTTCATGCGACGGTTTTTG	192
<i>mNgn3</i>	CCACGAAGTGCTCAGTTCC	CCGATCATTGGCCTTCTTGC	196
<i>mMafA</i>	CACTGCCCACCATCATCACTCTGC	CCCGCACGGACATGGATACC	170
<i>rIns1</i>	CACCCAAGTCCCGTCGTGAA	CTCCAGTTGGTAGAGGGAGC	167
<i>rIns2</i>	AGCCCTAAGTGACCAGCTACAG	CAGTTGTGCCACTTGTGGGT	255

3.4. İmmüno Floresan Boyama için Kullanılan Antikorlar

Birincil antikorlar %0,1'lik PBS-Tween-20 çözeltisinde; Mouse monoklonal anti-İnsülin 1:50; Guinea pig poliklonal anti-İnsülin 1:100; Mouse monoklonal anti-NGN3 1:50; Rabbit poliklonal anti-PDX1 1:3000; Rabbit poliklonal anti-MAFA 1:100 oranlarında kullanılmıştır. İkincil antikor %0,1'lik PBS-Tween-20 çözeltisinde; Goat Anti-Mouse 1:400; Goat Anti-Rabbit 1:400 oranında kullanılmıştır.

3.5. DNA ve RNA Örneklerinin Miktar Tayininin Yapılması

İzolasyonu yapılan DNA veya RNA örneklerinin miktar ve saflık ölçümü BioDrop µLite Spektrofotometre cihazı (Biochrom US, USA) ile yapılmıştır. Ölçüm yapılırken 1 µL ddH₂O ile cihazın detektörü temizlenmiştir. Örneklerin çözündüğü çözeltiden 1 µL alınarak ölçüm değeri sıfırlanmıştır. Örneklerden 1 µL alınarak 230, 260 ve 280 nm'deki absorbans değerleri ölçülmüştür.

3.6. Kompetent Hücre Hazırlanması

DH5α *E. coli* bakterileri -80°C'den çıkarılmış ve buz üzerinde eritilmiştir. Önceden hazırlanmış antibiyotik içermeyen 5 mL LB-broth besiyerine ekilmiştir. Gece boyu 37°C 220 rpm çalkalamalı inkübatörde bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası çoğalan bakterilerden 500 µL alınarak 50 mL antibiyotiksiz LB-broth besiyerine konulmuştur. 2 saat 37°C'de 225 rpm çalkalamalı etüvde inkübasyona bırakılmıştır. Yarım saat aralıklarla 1 mL alınarak 600 nm dalga boyunda spektrofotometrede optik yoğunluk ölçümü yapılmıştır. Optik yoğunluk değeri 0,4-0,6 değer aralığına geldiğinde buz üzerine alınıp 10 dakika bekletilmiştir. 5000 rpm'de 4 dakika santrifüj yapılmıştır. Süpernatant uzaklaştırılıp pelet üzerine 5 mL 0,1 M CaCl₂ eklenmiş ve pipetaj yapılmıştır. 15 dakika buz üzerinde inkübasyona bırakılmıştır. 5000 g'de 4°C'de 4 dakika santrifüj yapılmıştır ve süpernatant uzaklaştırılmıştır. Pelet üzerine 2,5 mL %15'lik gliserol içinde hazırlanmış 0,1 M CaCl₂ eklenmiş ve homojenize edilmiştir. Hazırlanan kompetent hücreler 300 µL olacak şekilde ependorflara bölünüp -80°C'de muhafaza edilmiştir.

3.7. Enzim Kesiminden Sonra DNA'nın Jelden İzolasyonu

%0,8'lik agaroz jel hazırlanmış ve içerisine 10 µL GelStar™ Nucleic Acid Gel Stain eklenmiştir. Belirteç olarak 1 kb DNA Ladder kullanılmıştır. Kesim sonucu oluşan ürün agaroz jele yüklenerek 3 saat 50V'da yürütülmüştür. Görüntüleme için Glite 900 BW Jel Görüntüleme aleti (Biocenter, Avusturya) ile mavi ışık altında görüntüleme yapılmıştır. Beklenen bant büyüklüğündeki ürün jelden kesilip GeneJET Gel Extraction Kit ile jelden izolasyon yapılmıştır. Örnekler -20°C'de muhafaza edilmiştir.

3.8. pX1 Plazmit DNA'nın Kompetent Hücreye Transformasyonu

DH5α *E. coli* bakterileri -80°C'den alınmış ve buz üzerinde eritilmiştir. Kompetent hücre üzerine çoğaltılacak olan pX1 plazmit DNA'sı eklenmiş ve pipetaj yapılmıştır. Buz üzerine 30 dakika bekletilmiştir. 42°C'ye ayarlanan sıcak su banyosunun içinde 40-50 saniye bekletilip hemen buz üzerine alınıp 2 dakika bu şekilde bırakılmıştır. Süre sonunda üzerine 250 µL SOC besiyeri konulup pipetaj yapılmıştır. 37°C'de 220 rpm çalkalamalı etüvde 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. Hazırlanan ampisilinli LB-agar besiyeri ortamına yayma ekimi yapılmıştır. 1 gece boyunca 37°C'ye ayarlanmış etüvde inkübasyona bırakılmıştır. Petride oluşan kolonilerden tek koloni seçimi yapılmıştır. 5 mL ampisilinli LB-broth besiyerine ekim yapılmıştır. 37°C'de 220 rpm çalkalamalı etüvde gece boyu inkübasyona bırakılıp çoğaltması sağlanmıştır.

LB-broth besiyerinde çoğaltılan pX1 plazmit DNA örnekleri GeneJet Plazmit Miniprep Kit ile plazmit izolasyonu yapılmıştır. Örnekler 5 dakika 4000 rpm'de santrifüj yapılmıştır. Süpernatant uzaklaştırılmıştır ve pelet üzerine 250 µL Resuspension Buffer eklenip pipetaj yapılmıştır. Süspansiyon yeni bir tüpe aktarılmıştır. Üzerine 250 µL Lysis Buffer eklenip 8 kere alt üst edilmiştir. 350 µL Neutralization Buffer eklenip tekrar 8 kere alt üst edilmiştir. Sonrasında örnekler 5 dakika 12000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Süpernatant filtre üzerine konulup 1 dakika 12000 rpm'de santrifüj yapılmıştır. Filtre üzerine 500 µL Wash Buffer eklenip 45 saniye 12000 rpm'de santrifüj yapılmıştır. Bu işlem bir kere daha tekrarlandı. Filtre yeni ependorfa aktarılmıştır ve 50 µL Elution Buffer eklenip oda sıcaklığında 3 dakika inkübasyona

bırakılmıştır. 2 dakika 12000 rpm’de santrifüj yapılmıştır. Elde edilen plazmit DNA - 20°C’de muhafaza edilmiştir.

3.9. pX1 Plazmitine 2A Peptid Dizisinin Aktarılması

2A peptid gen dizisi IDT (Integrated DNA Technologies) firmasından pIDTSMART-AMP plazmitine klonlanmış biçimde satın alınmıştır. pX1 plazmitinden ve 2A peptid dizisini bulunduran plazmitten 1 µg alınıp. 1 µL Fast Digest *NotI* enzimi ve 1 µL Fast Digest *SalI* enzimi ile kesim yapılmıştır. İnkübasyondan alınan kesim enzim ürünleri GeneJET PCR Purification Kit kullanılarak saflaştırılmıştır. Örnekler - 20°C’ye kaldırılmıştır. *SalI-NotI* enzimleriyle kesilip ve pürifiye edilen pX1 ve 2A peptid dizileri T4 DNA Ligase ile birleştirilmiştir.

Transformasyon için; DH5α *E. coli* bakterilerine heat shock yöntemi ile aktarılmıştır. Heat shock yönteminde DH5α *E. coli* bakterileri -80°C’den alınmış ve buz üzerinde eritilmiştir. Kompetent hücre üzerine çoğaltılacak ligasyon ürünü eklenmiş ve pipetaj yapılmıştır. Buz üzerine 30 dakika bekletilmiştir. 42°C’ye ayarlanan sıcak su banyosunun içinde 50 saniye bekletilip hemen buz üzerine alınıp 2 dakika bu şekilde bırakılmıştır. Süre sonunda üzerine 250 µL SOC besiyeri konulup pipetaj yapılmıştır. 37°C’de 150 rpm çalkalamalı etüvde 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. Hazırlanan ampisilinli LB-agar besiyeri ortamına yayma ekimi yapılmıştır. 1 gece boyunca 37°C’ye ayarlanmış etüvde inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün çoğalan kolonilerden tek koloni seçimi yapılmıştır. 5 mL ampisilinli LB-broth besiyerine ekim yapılmıştır. 37°C’de 220 rpm çalkalamalı etüvde gece boyu inkübasyona bırakılıp çoğaltılması sağlanmıştır. LB-broth besiyerinde çoğaltılan pX1+2A peptid dizisi örnekleri GeneJet Plazmit Miniprep Kit’i ile plazmit izolasyonu yapılmıştır. İzolasyonu yapılan pX1+2A plazmiti 5’GTAAACGACGGCCAGT’3 ve 5’CAGGAAACAGCTATGAC’3 primerleri ile sekanslanmıştır.

3.10. *Ngn3*, *Pdx1* ve *MafA* ORF’lerinin 2A Peptidiyle Birleştirilmesi

Fare *Pdx1*, *Ngn3* ve *MafA* açık okuma çerçeveleri (open reading frame, ORF) sentezlendirilip pUC57 plazmitine klonlanmış biçimde GenScript firmasından satın alınmıştır. Bu gen dizilerinden sadece *MafA* ORF’sinde stop kodonu bulunmaktadır. Fare *Pdx1* (P), *Ngn3* (N) ve *MafA* (M) gen dizisini taşıyan plazmitlerden 1 µg alınıp sırasıyla *BamHI*, *SalI-BcuI* ve *ClaI* kesim enzimleriyle kesilmiştir. Oluşan ürünler %0,8’lik agaroz jele yüklenmiş ve sırasıyla 858 bp, 657 bp ve 1086 bp’dan oluşan ürünler jelden izole edilerek pürifiye edilmiştir.

2A peptid dizisini içeren pX1 plazmitinden (pX1+2A) 1 µg alınarak *BamHI* kesim enzimi ile kesilmiştir. Oluşan ürün filtre kullanılarak pürifiye edilmiştir. *BamHI* ile kesilen pX1+2A ürünü ve jelden izole edilen P kesim ürünü T4 DNA Ligase ile birleştirilmiştir. Oluşan ligasyon ürünü (pX1+2A+P) heat shock yöntemiyle DH5α *E. coli* kompetent hücrelerine transformasyon yapılmıştır. Çoğaltılan pX1+2A+P plazmit örnekleri GeneJet Plazmid Miniprep Kit ile plazmit izolasyonu yapılmıştır. İzolasyonu yapılan pX1+2A+P plazmitinin doğrulanması 5’AGTGCCACGAACCTTCTCTCTG’3 ve 5’CAGGAAACAGCTATGAC’3 primerleri ile sekanslanmıştır. Sekanslama sonucuna göre doğru ligasyon örnekleri seçilmiştir.

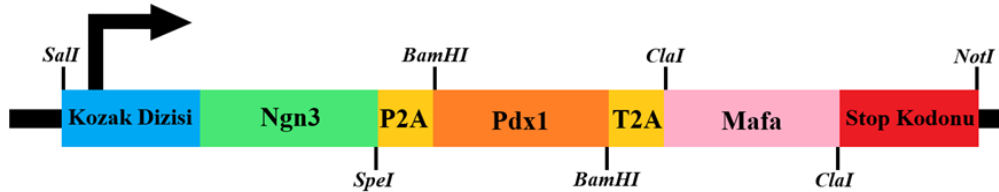
pX1+2A+P plazmitinden 1 µg alınarak *SalI*-*BclI* kesim enzimleri ile kesilmiştir. Oluşan ürün filtre kullanılarak pürifiye edilmiştir. *SalI* ve *BclI* kesim enzimleri ile kesilen pX1+2A+P ürünü ve jelden izole edilen N kesim ürünü T4 DNA Ligase ile birleştirilmiştir. Oluşan ligasyon ürünü (pX1+2A+N+P) heat shock yöntemiyle DH5α *E. coli* kompetent hücrelerine transformasyon yapılmıştır. Çoğaltılan pX1+2A+N+P plazmit örnekleri GeneJet Plazmid Miniprep Kit ile plazmit izolasyonu yapılmıştır. İzolasyonu yapılan pX1+2A+N+P plazmitinin doğrulanması 5'GTAAACGACGGCCAGT'3 ve 5'CACGGGTCCTTGTAGAGCTG'3 primerleri ile sekanslanmıştır. Sekanslama sonucuna göre doğru ligasyon örnekleri seçilmiştir.

pX1+2A+N+P yapısından 1 µg *ClaI* kesim enzimi ile kesilmiştir. Oluşan ürün filtre kullanılarak pürifiye edilmiştir. *ClaI* ile kesilen pX1+2A+N+P ürünü ve jelden izole edilen M kesim ürünü T4 DNA Ligase ile birleştirilmiştir. Oluşan ligasyon ürünü (pX1+2A+N+P+M) heat shock yöntemiyle DH5α *E. coli* kompetent hücrelerine transformasyon yapılmıştır. Çoğaltılan pX1+2A+N+P+M (pX1+NPM) plazmit örnekleri GeneJet Plazmid Miniprep Kit ile plazmit izolasyonu yapılmıştır. İzolasyonu yapılan pX1+2A+N+P+M plazmitinin doğrulanması 5'GGCAGAGGAAGTCTTCTAACATGC'3 ve 5'CAGGAAACAGCTATGAC'3 primerleri ile sekanslanmıştır. Sekanslama sonucuna göre doğru ligasyon örnekleri seçilmiştir.

Oluşan pX1+NPM ligasyon ürünü heat shock yöntemiyle DH5α *E. coli* kompetent hücreye transformasyon yapılmıştır. Çoğaltılan pX1+NPM plazmit örnekleri GeneJet Plazmid Miniprep Kit ile plazmit izolasyonu yapılmıştır. İzolasyonu yapılan pX1+NPM plazmitinin doğrulanması için 5'GGCAGAGGAAGTCTTCTAACATGC'3 ve 5'CAGGAAACAGCTATGAC'3 primerleri ile sekanslanmıştır. Sekanslama sonucuna göre doğru ligasyon örnekleri seçilmiştir.

3.11. NPM Konstraktının pTNT Vektörüne Aktarımı

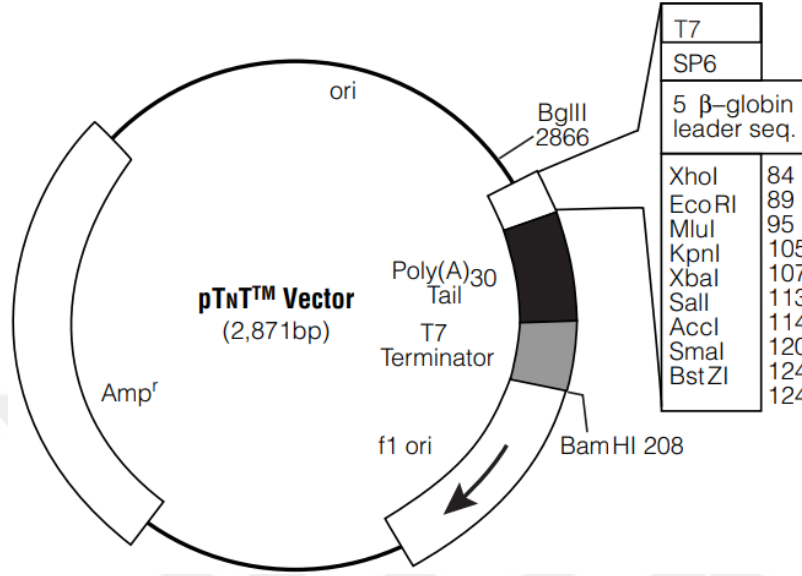
NPM (2798 bç) yapıları pX1 plazmitinden *SalI* ve *NotI* enzimleri kullanılarak çıkarılmıştır. Elde edilen ürün %0,8'lik agaroz jelde 3 saat 50V'da yürütülmüştür. Kesim sonrası beklenen ürün (2791 bç) jelden kesilerek GeneJET Gel Extraction Kit ile saflaştırılmıştır.



Şekil 3.1. Oluşturulan NPM sentetik pmRNA

pTNT vektörü heat shock yöntemiyle DH5α *E. coli* bakterilerine transformasyonu gerçekleştirilmiştir. Çoğaltılan pTNT vektörü GeneJet Plazmid Miniprep Kit ile plazmit izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen plazmit DNA -20°C'ye kaldırılmıştır. Bir sonraki aşamaya geçerken örneklerin miktar ve saflık ölçümü BioDrop µLite Spektrofotometre cihazı ile yapılmıştır. pTNT vektöründen (Şekil 3.2) 3 µg alınıp *NotI* ve *SalI* enzimleri ile kesilmiştir. Elde edilen kesim ürünü %0,8'lik agaroz

jelde 3 saat 50V'da yürütülmüştür. Kesim sonrası beklenen ürün (2860 bç) jelden kesilerek GeneJET Gel Extraction Kit ile saflaştırılmıştır. Sonraki aşamaya geçerken örneklerinin miktar ve saflık ölçümü BioDrop µLite Spektrofotometre cihazı ile yapılmıştır.



Şekil 3.2. pTNT vektörü (Anonymous 2)

Sall ve *NotI* kesim enzimleri ile kesilip pürifiye edilen pTNT plazmiti ve *NPM* yapısı T4 DNA Ligase ile birleştirilmiştir. pTNT+*NPM* konstraktı heat shock yöntemiyle DH5α *E. coli* bakterilerine transformasyonu gerçekleştirilmiştir. Çoğaltılan pTNT vektörü GeneJet Plazmid Miniprep Kit ile plazmit izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen ürünü doğrulamak için %0,8'lik agaroz jelde 3 saat 50V'da yürütülmüştür. Ligasyon sonrası beklenen ürün 5651 bç olmalıdır. Örneklerin miktar ve saflık ölçümü BioDrop µLite Spektrofotometre cihazı ile yapılmıştır.

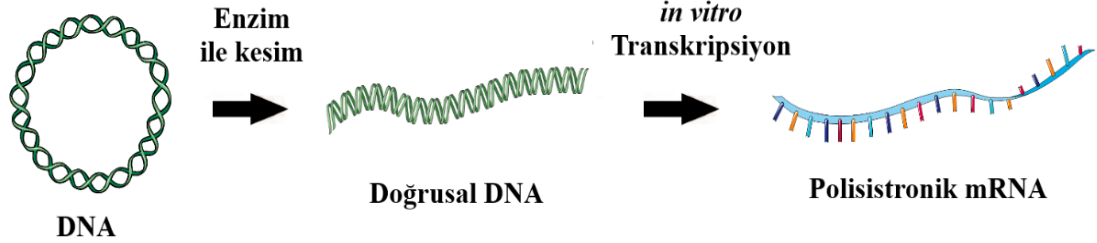
3.12. pTNT+ NPM Plazmitinin *BglII* ve *NdeI* Enzimleri ile Kesimi

pTNT+*NPM* plazmitinden 3 µg alınıp *BglII* ve *NdeI* enzimleri ile kesim yapılmıştır. Elde edilen ürünü doğrulamak için %0,8'lik agaroz jelde 3 saat 50V'da yürütülmüştür. Kesim sonrası beklenen (3470 bç) ürün GeneJET Gel Extraction Kit ile pürifiye edilmiştir. Elde edilen ürün -20°C'de muhafaza edilmiştir. Örneklerinin miktar ve saflık ölçümü BioDrop µLite Spektrofotometre cihazı ile yapılmıştır.

3.13. *In vitro* Transkripsiyon Reaksiyonu (IVT)

IVT reaksiyon karışımı için; 2,5 µL Anti Reverse Cap Analog (ARCA, 3'-O-Me-m⁷G(5')ppp(5')G), 0,8 µL GTP, 4 µL ATP, 3 µL 5-metilsitozin (5-me-CTP), 3 µL psödoüridin (pUTP), 16 µL (~1-2 µg) *NPM* konstraktı, 4 µL 10X T7 enzimi, 4 µL 10X T7 tampon çözeltisi ve 2.7 µL ddH₂O eklenerek 40 µL'lik karışım hazırlanmıştır. Oluşan IVT karışımı 4 saat 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. DNA'yı ortamdan uzaklaştırmak için 2 µL Turbo DNaz enzimi eklenmiş ve 15 dakika 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. IVT reaksiyon ürünü GeneJet RNA Purification Kit ile üretici firmanın önermiş olduğu protokolle saflaştırılmıştır. Saflaştırılan IVT ürününe 2

μL Antartik Fosfataz, 10 μL tampon çözelti eklenmiş ve 1 saat 37°C 'de inkübasyona bırakılmıştır. Sonrasında GeneJet RNA Purification Kit ile üretici firmanın önermiş olduğu protokolle saflaştırılmıştır. RNA örneklerinin miktar ve saflık ölçümü BioDrop μLite Spektrofotometre cihazı ile yapılmıştır. Elde edilen RNA'ların son konsantrasyonu TE tampon çözeltisiyle 100 ng/ μL olacak şekilde bölünmüştür ve -80°C 'de saklanmış.



Şekil 3.3. Sentetik pmRNA

3.14. Hücre Kültürü

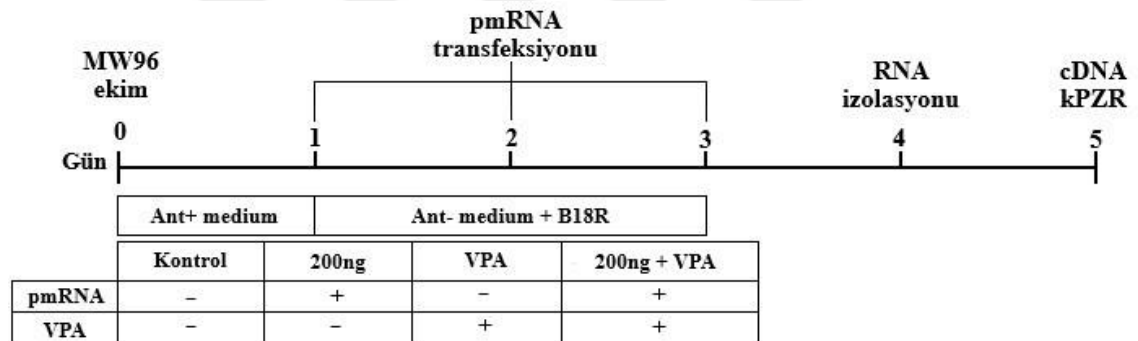
Sıçan asinar hücre hattı olan AR42J-B13 hücreleri sıvı azotta (-196°C) muhafaza edilmiştir. Sıvı azottan alınan hücreler 37°C 'ye ayarlanmış su banyosunda içinde küçük buz parçası kalacak şekilde eritilmiştir. %70'lik etil alkolle sterilize edilmiş ve steril kabin içerisine alınmıştır. Mikropipetle hücreler tüpün içerisinden alınarak 15 mL'lik santrifüj tüpünün içerisine aktarılmıştır. 37°C ve %5 CO_2 'li ortamda ısıtılmış; L-glutaminli düşük glikozlu DMEM, 1X antibiyotik-antimikotik (anti-anti), %10 FBS ve 1X non esansiyel aminoasit (NEAA) içeren hücre kültürü ortamından 1 mL alınmış ve damlalar halinde 15 mL tüpün içerisindeki hücrelerin üzerine bırakılıp tüp çalkalanmıştır. Son hacim 12 mL olacak şekilde medyum eklenmiştir. 300 g'de 5 dakika santrifüj yapılmıştır. Hücre peletini kaldırmadan süpernatant kısmı uzaklaştırılmıştır. Hücre peleti 10 mL medyum içerisinde çözülmüş ve T-75 kültür kabına aktarılmıştır. Hücre yoğunluğu %90 oluncaya kadar iki günde bir, 5 mL PBS ile hücreler yıkandıktan sonra hücreler taze hücre kültürü ortamı eklenmiştir. Uygulama aşaması için hücreler 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarına pasajlanmıştır. Öncelikle kültür üzerindeki ortam uzaklaştırılmıştır. PBS ile iki kez yıkama yapılmıştır. Hücre üzerine 3 mL tripsin enzimi eklenip ve 5 dakika 37°C ve %5 CO_2 'li ortamda inkübe edilmiştir. Mikroskop altında hücrelerin T-75'lik kültür kabından ayrıldıkları gözlemlendikten sonra üzerine 12 mL hücre kültür ortamı eklenip 15 mL'lik tüpe konulmuştur. 5 dakika 37°C 300g'de santrifüj edilmiştir. Hücre peletini kaldırmadan süpernatant kısmı uzaklaştırılmıştır. Pelet hücre kültürü ortamı ile çözündürülmüştür ve hücre sayımı yapılmıştır. Her kuyucuğa 6000 hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu kültür kaplarına ekim yapılmıştır. Geri kalan hücrelerin üzerine eşit hacimde 2X dondurma ortamı eklenmiştir. Önce -80°C 'de bir gece bekletilmiştir. Hücreleri uzun süre saklamak amacıyla sıvı azot ortamında (-196°C) muhafaza edilmiştir.

3.14.1. AR42J-B13 hücrelerine transfeksiyon

96 kuyucuklu hücre kültür kaplarının her bir kuyucuğuna 6000 adet AR42J-B13 hücre hattından ekim yapıldıktan 24 saat sonra antibiyotiksiz hücre kültür ortamı konulmuştur. Lipofectamine 2000 aracılığıyla transfeksiyon yapılmıştır.

- **Sentetik pmRNA transfeksiyonu+VPA uygulaması;**

10 mL antibiyotiksiz hücre kültür ortamına 10 µL B18R eklenmiştir. Her bir kuyucuğa 100 µL olacak şekilde eklenmiştir. Ayrıca son hacimde (200 µL) 0,25 mM VPA olacak şekilde hücre üzerine eklenmiştir. IVT yapıp saflık ve miktar analizi yapılan sentetik pmRNA'lerden 3 µL (100 ng/µL) ependorfa alınarak Opti-MEM (pH: 7,6) ile 50 µL'ye tamamlanmıştır ve pipetaj yapılmıştır. Oda sıcaklığında 5 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Ana karışım için başka bir ependorfa örnek başına 49,5 µL Opti-MEM (pH: 7,6) eklenmiştir ve üzerine 0,5 µL Lipofectamine 2000 konulmuştur. Pipetaj yapıp oda sıcaklığında 5 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra ana karışımdan 50 µL alınarak iki ependorf 100 µL'ye tamamlanıp ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İşlem sonunda hücre üzerine (100 µL) eklenmiştir. Bu işlem sentetik pmRNA verilen tüm kuyucuklar için yapılmıştır. Bu işlem 24 saat aralıklarla 3 kez tekrarlanmıştır. Sonrasında izolasyon aşamasına geçilmiştir. Bu deneyin biyolojik tekrar sayısı 2, teknik tekrar sayısı 2'dir.

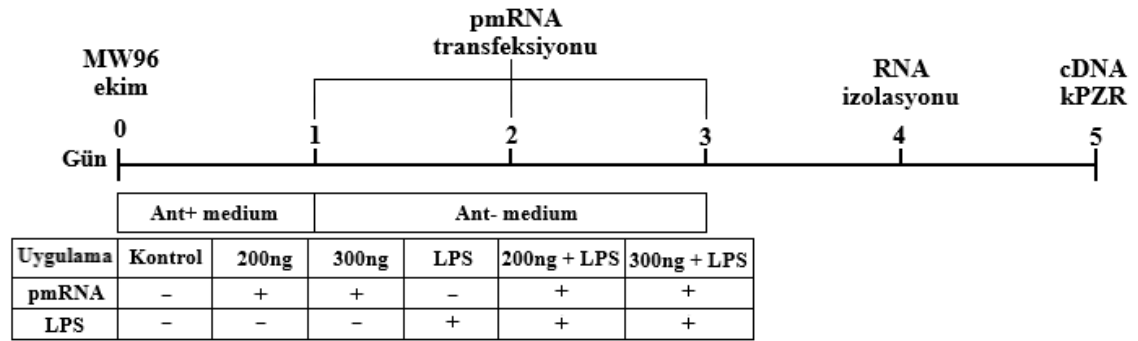


Şekil 3.4. Sentetik pmRNA transfeksiyonu+VPA uygulaması

- **Sentetik pmRNA transfeksiyonu+LPS uygulaması;**

96 kuyucuklu kültür kabına pasajlanan hücrelere 24 saat sonra son hacimde (200 µL) 0,3 µg LPS olacak şekilde uygulanmıştır. Daha sonra 37°C ve %5 CO₂'li ortamda 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. IVT yapıp saflık ve miktar analizi yapılan sentetik pmRNA'lerden 2 µL ve 3 µL (100 ng/ µL) alınarak ayrı ependorflara konulmuştur. Her bir ependorf Opti-MEM (pH: 7,6) ile 50 µL'ye tamamlanmıştır ve pipetaj yapılmıştır. Oda sıcaklığında 5 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Ana karışım için başka bir ependorfa örnek başına 49,5 µL Opti-MEM (pH: 7,6) ve 0,5 µL Lipofectamine 2000 konulmuştur. Pipetaj yapılmıştır ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra ana karışımdan 50 µL alınarak dört ependorf 100 µL'ye tamamlanmıştır ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İşlem sonunda hücre üzerine (100 µL) eklenmiştir. Bu işlem sentetik pmRNA verilen tüm kuyucuklar için yapılmıştır. Bu

işlem 24 saat aralıklarla 3 kez tekrarlanmıştır. Sonrasında RNA izolasyonu yapılmıştır. Bu deneyin biyolojik tekrar sayısı 3, teknik tekrar sayı 2'dir.



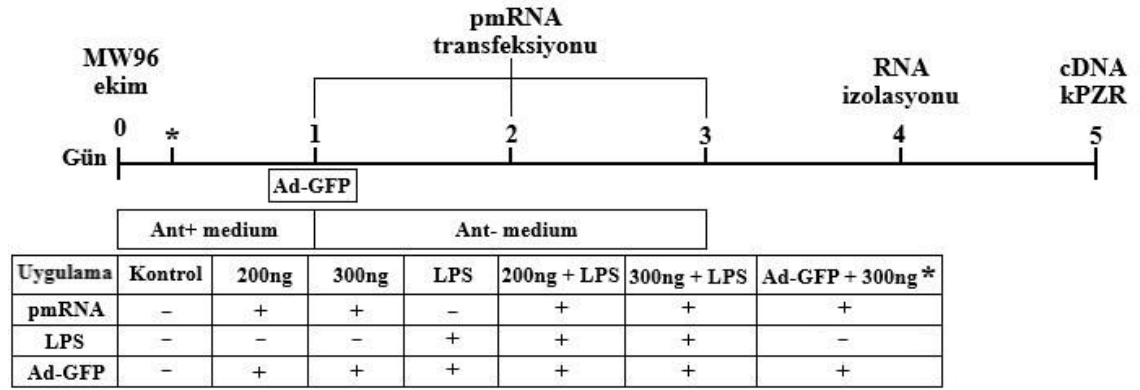
Şekil 3.5. Sentetik pmRNA tranfeksiyonu+LPS uygulaması

- **Sentetik pmRNA tranfeksiyonu+LPS uygulaması+Adenovirüs-GFP transdüksiyonu;**

Transfeksiyon aşamasından önce elimizde bulunan titresi 1×10^{12} p/mL olan adenovirüsün-GFP (Green Fluorescent Protein) optimum hücre canlılık-ölüm oranlarını bulmak için konsantrasyon taraması yapılmıştır. Bunun için farklı MOI (multiplicity of infection) değerleri (10-20-30-40-50-60-70-80-90-100-110-120-130-140-150-160-170-180-190-200-250-300-350-400-450-500) hesaplanmıştır.

$$virüs\ miktarı\ (mL) = \frac{Hücre\ sayısı \times MOI}{Virüs\ titresi}$$

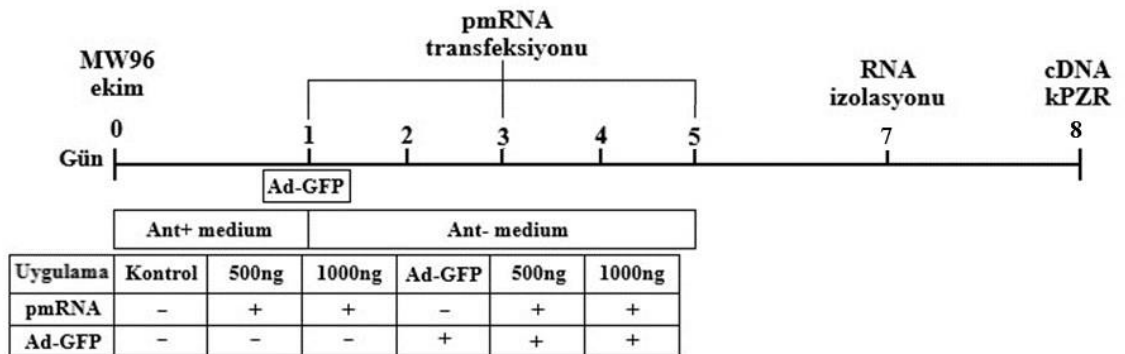
Daha sonra 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarının her bir kuyucuğuna 6000 adet AR42J-B13 hücre hattından ekim yapılmıştır. 24 saat sonunda hücrelerin kültür ortamı yenilenmiş ve hesaplanan konsantrasyon miktarlarında adenovirüs-GFP eklenmiştir. Adenovirüs-GFP uygulamasından 24 ve 48 saat sonra hücreler floresan mikroskop altında görüntülenmiştir. Ölü hücre/canlı hücre oranına bakılıp hücreleri öldürmeyen fakat en fazla floresan ışımının olduğu optimum konsantrasyon olarak 150 MOI belirlenmiştir. Adenovirüs-GFP hücrelere transfeksiyonun ilk gününde uygulanmıştır. Sonraki günlerde adenovirüs uygulanmamıştır. Sadece bir kuyucuğa transfeksiyondan 24 saat önce adenovirüs uygulanmıştır. IVT yapıp saflık ve miktar analizi yapılan sentetik sentetik pmRNA'lerden 2 μ L ve 3 μ L (100 ng/ μ L) ayrı ependorflara alınmıştır. Her bir ependorf Opti-MEM (pH: 7,6) ile 50 μ L'ye tamamlanmıştır ve pipetaj yapılmıştır. Oda sıcaklığında 5 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Ana karışım için başka bir ependorfa örnek başına 49,5 μ L Opti-MEM (pH: 7,6) ve 0,5 μ L Lipofectamine 2000 konulmuştur. Pipetaj yapılmıştır ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Ana karışımdan 50 μ L alınarak beş ependorf 100 μ L'ye tamamlanmıştır ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İşlem sonunda hücre üzerine (100 μ L) eklenmiştir. Bu işlem sentetik pmRNA verilen tüm kuyucuklar için yapılmıştır. Bu işlem 24 saat aralıklarla 3 kez tekrarlanmıştır. Sonrasında RNA izolasyonu yapılmıştır. Bu deneyin biyolojik tekrar sayısı 2, teknik tekrar sayı 4'tür.



Şekil 3.6. Sentetik pmRNA tranfeksiyonu+LPS uygulaması+Adenovirüs-GFP transdüksiyonu

- Sentetik pmRNA transfeksiyonu +Adenovirüs-GFP transdüksiyonu;**

Virüs uygulaması yapılacak hücrelere transfeksiyonun ilk gününde 150 MOI adenovirüs-GFP uygulanmıştır. IVT yapıp saflık ve miktar analizi yapılan sentetik pmRNA'lerden 5 µL ve 10 µL (100 ng/µL) ayrı ependorflara alınmıştır. Her bir ependorf Opti-MEM (pH: 7,6) ile 50 µL'ye tamamlanmıştır ve pipetaj yapılmıştır. Oda sıcaklığında 5 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Ana karışım için başka bir ependorfa örnek başına 49,5 µL Opti-MEM (pH: 7,6) ve 0,5 µL Lipofectamine 2000 konulmuştur. Pipetaj yapılmıştır ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Ana karışımdan 50 µL alınarak dört ependorf 100 µL'ye tamamlanmıştır ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İşlem sonunda hücre üzerine (100 µL) eklenmiştir. Bu işlem sentetik pmRNA verilen tüm kuyucuklar için yapılmıştır. Bu işlem 24 saat aralıklarla 3 kez tekrarlanmıştır. Sonrasında RNA izolasyonu yapılmıştır. Bu deneyin biyolojik tekrar sayısı 2, teknik tekrar sayısı 2'dir.



Şekil 3.7. Sentetik pmRNA transfeksiyonu+Adenovirüs-GFP transdüksiyonu

3.14.2. RNA izolasyonu

Yapılan deneyin süresine bağlı olarak transfeksiyon işlemi bittikten 24 saat sonra RNA izolasyonu TRIzol Reagent ile üretici firmanın talimatları uygulanarak yapılmıştır. RNA örnekleri -80°C'de muhafaza edilmiştir. İzole edilen RNA örneklerinin miktar ve saflık ölçümleri yapılmıştır.

3.15. DNaz Uygulaması ve cDNA Sentezi

Elde edilen RNA örneklerinden 500 ng alınarak DNaz I enzim uygulaması yapılmıştır. Bunun için; 10X tampondan 1 µL, DNaz I enziminden 1 µL eklenmiş ve son hacim ddH₂O ile 10 µL ye tamamlanmıştır. 37°C'de 45 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Sonra üzerine 1 µL EDTA (50 mM) eklenmiştir. 65°C'de 10 dakika inkübasyona bırakılmıştır. DNaz uygulamasından sonra örnekler iScript cDNA Sentez Kit kullanılarak üretici firmanın önerdiği protokolle cDNA sentezi yapılmıştır.

3.16. Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (kPZR)

cDNA örnekleri kantitatif PZR yapılarak Light Cycler 96 system (Roche, Basel, Switzerland) cihazında analiz edilmiştir. kPZR karışımı: 5 µL iTaq Universal SYBR Green Supermix karışımı, 0,2 µL forward, 0,2 µL reverse primer (Çizelge 3.2), 1 µL cDNA (~200 ng) ve 3,6 µL dH₂O olacak şekilde hazırlanmıştır. İki tekrar halinde hazırlanan örneklerin kPZR'leri, 95°C 10 dakika başlangıç denatürasyonu, 95°C 15 saniye denatürasyon, 60°C'de 60 saniye bağlanma ve uzama, olacak şekilde 40 döngü olarak yapılmıştır. Karşılaştırmalı ölçüm -log₂ (Relative expression to β-actin-control) ile hesaplandı. Ekzogenik *Pdx1*, *Ngn3* ve *MafA* genlerinin, endogenik *Ins1* ve *Ins2* genlerinin ekspresyon seviyeleri β-aktin ekspresyonuyla normalize edilmiştir.

3.17. İmmünofloresan Boyama

Son transfeksiyon işleminden 16 saat sonra boyama yapılmıştır. Boyama işlemi için öncelikle hücre kültür ortamı uzaklaştırılmıştır. 3 kez 1X PBS ile yıkama gerçekleştirilmiştir. Hücreleri sabitlemek için 150 µL formalin (%10) eklenmiş ve oda sıcaklığında 20 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Formalin uzaklaştırılmıştır ve 1X PBS ile 3 kez 5 dakikalık inkübasyonlarla yıkama gerçekleştirilmiştir. Bu işlemin ardından 150 µL %0,2 PBS-TritonX-100 (v/v) konulup oda sıcaklığında 15 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Hücreler üzerinden PBS-TritonX-100 uzaklaştırılıp 150 µL %0,1 PBS-Tween 20 (v/v) 3 kez 5 dakikalık inkübasyonlarla yıkama gerçekleştirilmiştir. Sonrasında 150 µL %5 BSA-PBS-Tween 20 (w/v) konulup oda sıcaklığında 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında hücrelerin üzerinden %5 BSA-PBS-Tween 20 uzaklaştırılmıştır ve 150 µL %0,1 PBS-Tween 20 (v/v) 3 kez 5 dakikalık inkübasyonlarla yıkama gerçekleştirilmiştir. %1 BSA-PBS-Tween 20 çözeltisi içinde birincil antikorlar; insülin 1:200, PDX1 1:3000, NGN3 1:100 ve MAFA 1:100 oranlarında hazırlanmıştır. Her bir kuyucuğa 150 µL birincil antikor konulmuştur ve gece boyu +4°C sıcaklıkta inkübasyona bırakılmıştır. Birincil antikorlar uzaklaştırılıp 150 µL %0,1 PBS-Tween 20 (v/v) 3 kez 5 dakikalık inkübasyonlarla yıkama gerçekleştirilmiştir. Bu işlemde sonra hücre kültür kabı ışık geçirmeyen bir malzeme ile kapatılarak sadece işlem anlarında açılmıştır. %1 BSA-PBS-Tween 20 çözeltisi içerisinde 1:400 oranında sekonder antikor hazırlanmıştır. Her bir kuyucuğa 150 µL sekonder antikor konulmuştur ve oda sıcaklığında 1 saat inkübasyona bırakılmıştır. Sekonder antikorlar uzaklaştırılıp 150 µL %0,1 PBS-Tween 20 (v/v) 3 kez 5 dakikalık inkübasyonlarla yıkama gerçekleştirilmiştir. Hoechst boyası 1:400 oranında %1 BSA-PBS-Tween 20 çözeltisi içerisinde hazırlanmıştır. Her bir kuyucuğa 150 µL Hoechst boyası konulup oda sıcaklığında 20 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon aşamasından sonra 3 kez 1X PBS ile yıkama gerçekleştirilmiştir. Son olarak hücre üzerine 200 µL 1X PBS eklenilip floresan mikroskopta görüntülenmiştir.

3.18. İstatistiksel Analiz

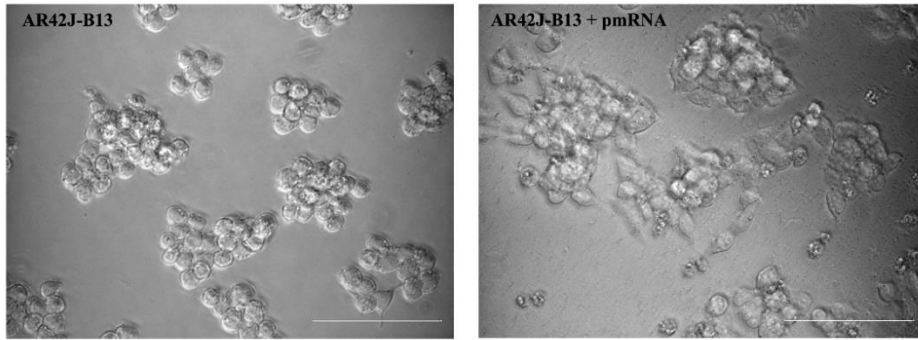
Çalışmamızda elde ettiğimiz verilerin istatistiksel analiz değerlendirmesi için, GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, Inc. USA) programı kullanılmıştır. Bulgular istatistiksel olarak değerlendirilirken Student's t-testi yapılmıştır. Sonuçlar %95'lik güven aralığında ve anlamlılık $p < 0,05$ seviyesinde değerlendirilmiştir. Verilerin ortalaması $\pm$ SEM olarak gösterilmiştir.



4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. AR42J-B13 hücrelerine sentetik pmRNA transfeksiyonu

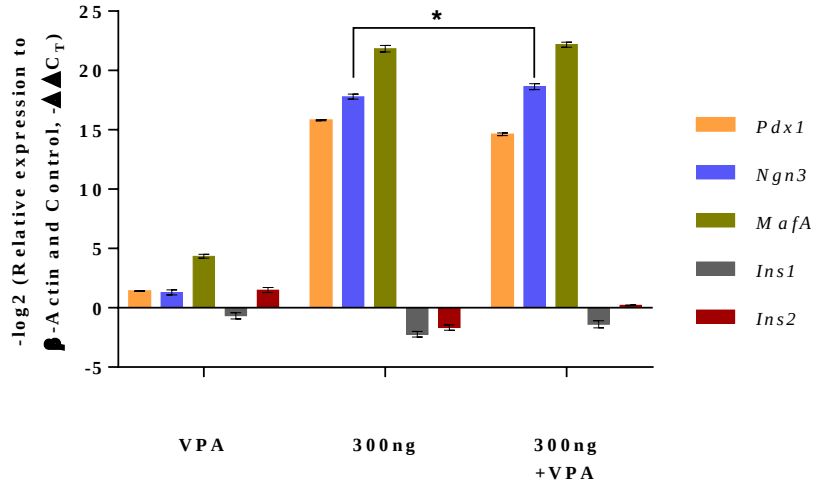
300 ng sentetik pmRNA transfekte edilen AR42J-B13 hücreleri uygulamadan 48 saat sonra mikroskopta incelenmiş ve morfolojilerinin değiştiği gözlenmiştir (Şekil 4.1). Oval bir morfolojiye sahip olan AR42J-B13 hücreleri uygulamadan sonra fibroblast-benzeri bir morfoloji kazanmışlardır. Benzer bir morfolojik değişim önceki hücre farklılaştırma çalışmalarında da gözlenmiştir (Akinci vd. 2012). Bu bulgular sonucunda sentetik pmRNA transfeksiyonunun hücreyi farklılaştırmaya başladığı düşünülmüştür.



Şekil 4.1. PNM sentetik pmRNA'sı verilmiş hücrelerdeki morfolojik değişiklikler (Cetvel 100 μm 'dir)

4.2. AR42J-B13 hücrelerine sentetik pmRNA transfeksiyonu +VPA uygulaması

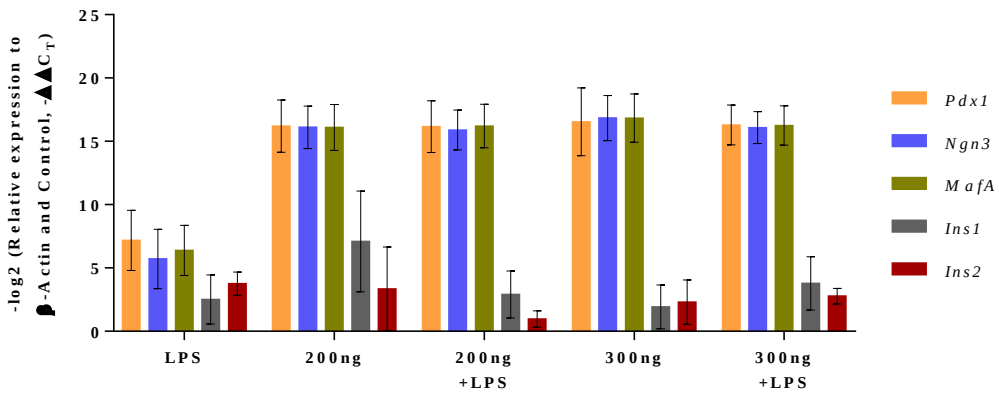
3 gün boyunca 300 ng sentetik pmRNA ve VPA uygulanan AR42J-B13 hücrelerinde *Pdx1*, *Ngn3*, *MafA*, *Ins1* ve *Ins2* genlerinin ekspresyonu gerçek zamanlı kPZR ile belirlenmiştir. Şekil 4.2'te bu genlerin ekspresyonları gösterilmiştir. 300 ng+VPA uygulamasından sonra ekzogenik *Ngn3* gen ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı, *Pdx1* ve *MafA* gen ekspresyonlarında ise istatistiksel olarak anlamlı olmayan artışlar gözlenmiştir. Sentetik pmRNA ile uygulanan VPA'nın *Ngn3*, *Pdx1* ve *MafA* gen lokuslarındaki histon protein yapısını değiştirerek kromozom yapısını gevşettiği ve böylece genlerin ekspresyonunu arttırdığı düşünülmüştür.



Şekil 4.2. AR42J-B13 hücrelerine sentetik pmRNA transfeksiyonu+VPA uygulanması sonucu hedef genlerin gerçek zamanlı kantitatif-PZR sonuçları

4.3. AR42J-B13 hücrelerine sentetik pmRNA transfeksiyonu +LPS uygulaması

3 gün boyunca farklı konsantrasyonlarda (200 ng ve 300 ng) sentetik pmRNA transfeksiyonu ve LPS uygulanan AR42J-B13 hücrelerinde *Pdx1*, *Ngn3*, *MafA*, *Ins1* ve *Ins2* genlerinin ekspresyonu gerçek zamanlı kPZR ile belirlenmiştir. Şekil 4.3'te bu genlerin ekspresyonları gösterilmiştir. 300 ng+LPS uygulamasından sonra *Ins1* ve *Ins2* genlerinde artış gözlenmiştir. Fakat bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür. Önceki farklılaştırma çalışmalarında hücrelere uzun süre sentetik pmRNA uygulama yapıldığında hücrelerin farklılaşma gösterdiği ve gen ekspresyon profillerinin değiştiği bildirilmiştir (Li W. vd. 2014; Koblas vd. 2016). Yapılan bu uygulamaların 3 gün değil de 21 gün uygulandığında bu artışların istatistiksel olarak anlamlı olabileceği düşünülmüştür.

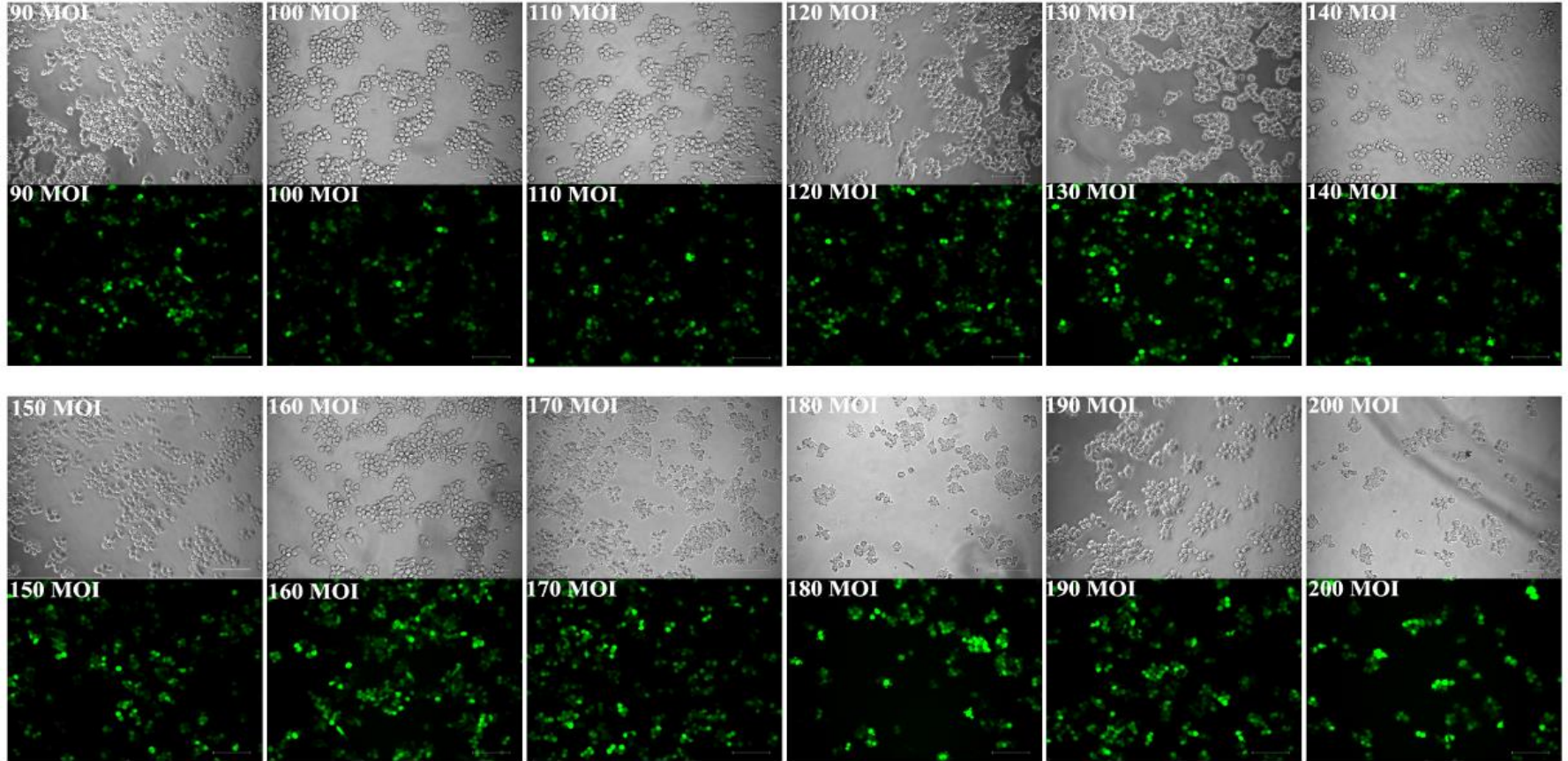


Şekil 4.3. AR42J-B13 hücrelerine sentetik pmRNA transfeksiyonu+LPS uygulanması sonucu hedef genlerin gerçek zamanlı kantitatif-PZR sonuçları

4.4. AR42J-B13 hücreleri için ideal Ad-GFP transdüksiyon konsantrasyonunun belirlenmesi

Önceki çalışmalarımızda NPM kombinasyonu hücrelere adenovirüsler yardımıyla aktarıldığında insülin üretiminde anlamlı bir artış olduğu gözlenmiştir (Unal 2018). Bu tez çalışmasında ise NPM dizisi sentetik pmRNA olarak uygulandığında insülin gen artışında düşük ekspresyon görüldüğünden viral uygulamanın hücre programlamasındaki etkisinin benzerini oluşturmak için hücrelere sentetik pmRNA ile Ad-GFP uygulaması yapılmıştır. Ad-GFP uygulaması için de optimum konsantrasyon belirlenmiştir.

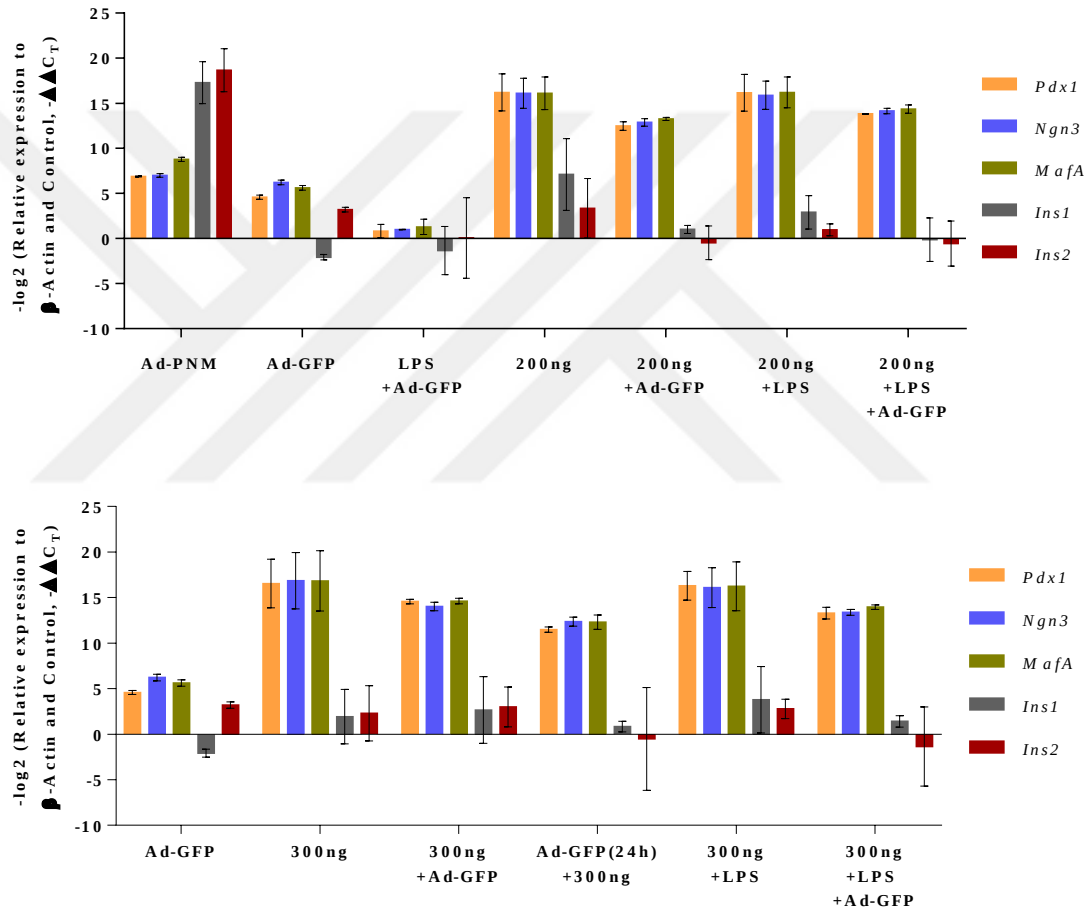
Optimum Ad-GFP konsantrasyonunun belirlenmesi için farklı MOI'larda Ad-GFP AR42J-B13 hücrelerine uygulanmıştır. Yapılan transdüksiyon çalışması sonucunda 150 MOI optimum konsantrasyon olarak bulunmuştur (Şekil 4.4). Bu konsantrasyon değeri hücreler için sitotoksik bir etki yaratmamıştır ve GFP oranı bu konsantrasyonda en yüksek seviyede bulunmuştur. Daha düşük konsantrasyonlarda GFP ışıması düşük olmuştur, daha yüksek konsantrasyonlarda Ad-GFP'nin hücreler üzerindeki sitotoksik etkisinin arttığı gözlenmiştir.



şekil 4.4. AR42J-B13 hücreleri için ideal Ad-GFP transdüksüyon konsantrasyon taraması

4.5. AR42J-B13 hücrelerine sentetik pmRNA transfeksiyonu +LPS uygulaması +Adenovirüs-GFP transdüksiyonu

İdeal konsantrasyonu 150 MOI olarak belirlenen Ad-GFP, AR42J-B13 hücrelerine sentetik pmRNA ve LPS ile aynı anda sadece birinci gün uygulanmıştır. Bu kuyucuklara ikinci ve üçüncü günde Ad-GFP uygulanmayıp sadece sentetik pmRNA ve LPS uygulanmıştır. Aynı bir kuyucuğa sentetik pmRNA ve LPS uygulanmadan 24 saat önce Ad-GFP uygulaması yapılmıştır. 3 gün boyunca farklı konsantrasyonlarda sentetik pmRNA, LPS ve Ad-GFP uygulanan AR42J-B13 hücrelerinde ekzogenik *Pdx1*, *Ngn3*, *MafA*, endojenik *Ins1* ve *Ins2* genlerinin ekspresyonu gerçek zamanlı kPZR ile belirlenmiştir. Şekil 4.5'te bu genlerin ekspresyon seviyeleri gösterilmiştir.



Şekil 4.5. AR42J-B13 hücrelerine sentetik pmRNA transfeksiyonu +LPS uygulaması +Adenovirüs-GFP transdüksiyonu sonucu hedef genlerin gerçek zamanlı kantitatif-PZR sonuçları

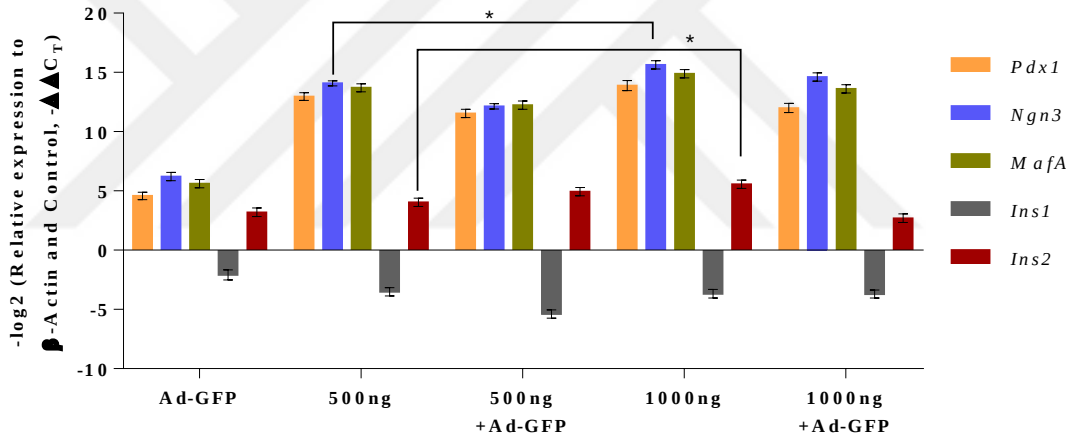
Yapılan uygulamalarda sentetik pmRNA kullanıldığında *Pdx1*, *Ngn3* ve *MafA* ekspresyon seviyesinin Ad-PNM uygulamasına göre daha fazla eksprese olduğu görülmüştür. Fakat *Ins1* ve *Ins2* genlerinin ekspresyon seviyesi Ad-PNM uygulaması yapıldığında sentetik pmRNA uygulamasına göre aşırı eksprese olmuştur. Sentetik pmRNA ile üretilen *Pdx1*, *Ngn3* ve *MafA* genleri insülin üretimi için gerekli olan etkiyi

oluşturamamıştır.

Ad-PNM olarak uygulama yapıldığında hücrelerde insülin genlerinin ekspresyonunun anlamlı olarak arttığı sentetik pmRNA olarak uygulandığında ise anlamlı bir artışın olmadığı görülmüştür. Sentetik pmRNA ve sentetik pmRNA+Ad-GFP uygulaması yapıldığında genler arası ekspresyon seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış görülmemiştir. Ayrıca Ad-GFP'nin 24 saat önce (Ad-GFP(24h)+300ng) verilmesinin gen ekspresyon seviyesinde bir değişikliğe yol açmadığı görülmüştür. 200 ng uygulamasının ise *Ins1* ve *Ins2* genlerindeki artışının diğer uygulamalara göre daha yüksek ekspresyonla sonuçlandığı belirlenmiştir.

4.6. AR42J-B13 hücrelerine sentetik pmRNA transfeksiyonu+Adenovirüs-GFP transdüksiyonu

5 gün boyunca farklı konsantrasyonlarda (500 ng ve 1000 ng) sentetik pmRNA ve Ad-GFP uygulanan AR42J-B13 hücrelerinde ekzogenik *Pdx1*, *Ngn3*, *MafA*, endojenik *Ins1* ve *Ins2* genlerinin ekspresyonu gerçek zamanlı kantitatif-PZR ile belirlenmiştir. Şekil 4.6'da bu genlerin ekspresyonları gösterilmiştir.

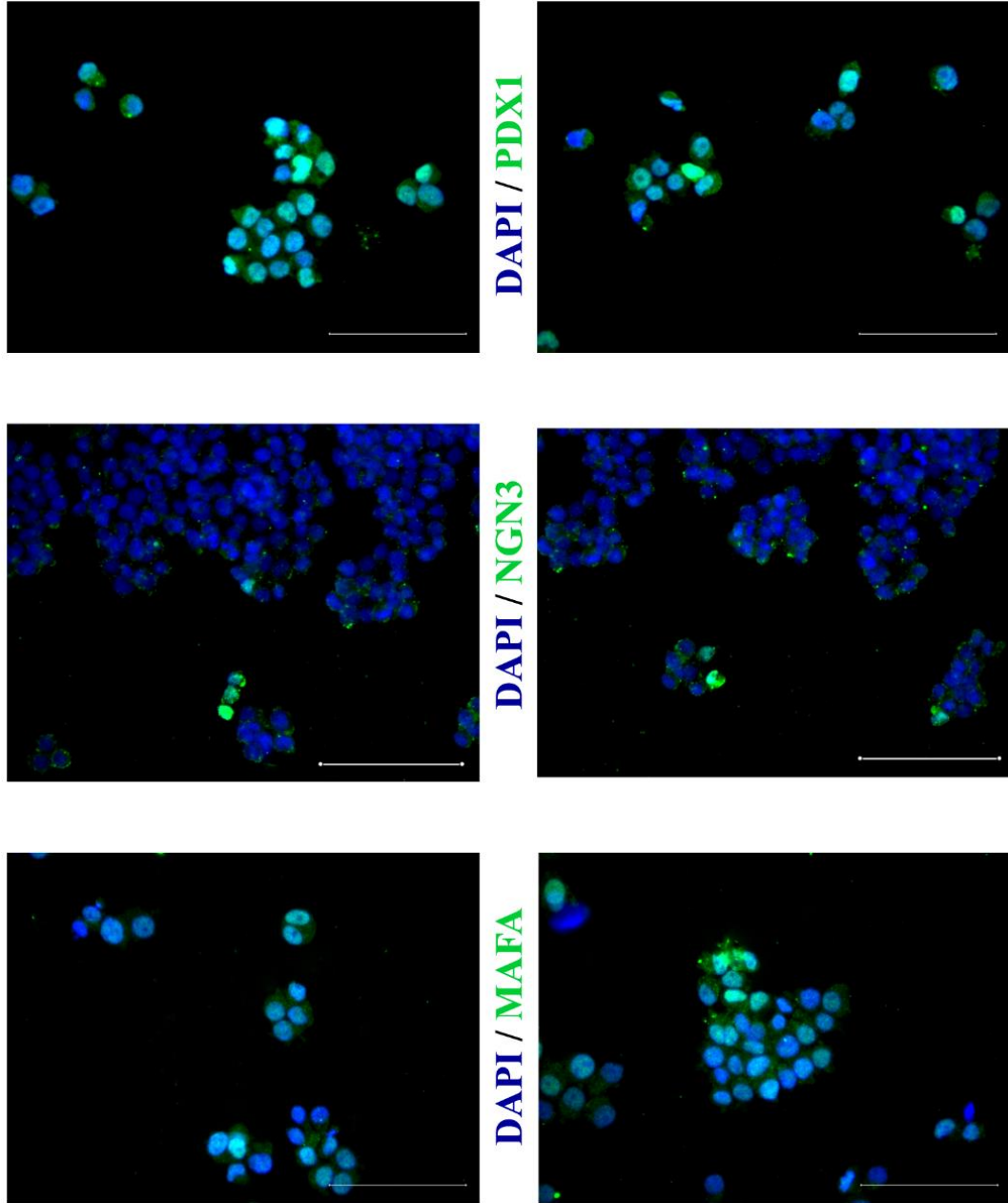


Şekil 4.6. AR42J-B13 hücrelerine sentetik pmRNA transfeksiyonu+Adenovirüs-GFP transdüksiyonu sonucu hedef genlerin gerçek zamanlı kantitatif-PZR sonuçları

Yapılan çalışmalarda 200 ng ve 300 ng olarak uygulanan sentetik pmRNA'nın yeterli olmadığı düşünülüp 500 ng ve 1000 ng konsantrasyonlarında sentetik pmRNA uygulanmıştır. kPZR analizi sonucu 500 ng ve 500 ng+Ad-GFP arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir. Aynı zamanda 1000 ng ve 1000 ng+Ad-GFP arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir. Ancak 500 ng ve 1000 ng sentetik pmRNA verildiğinde ekzogenik *Ngn3* ve endojenik *Ins2* genlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış görülmüştür.

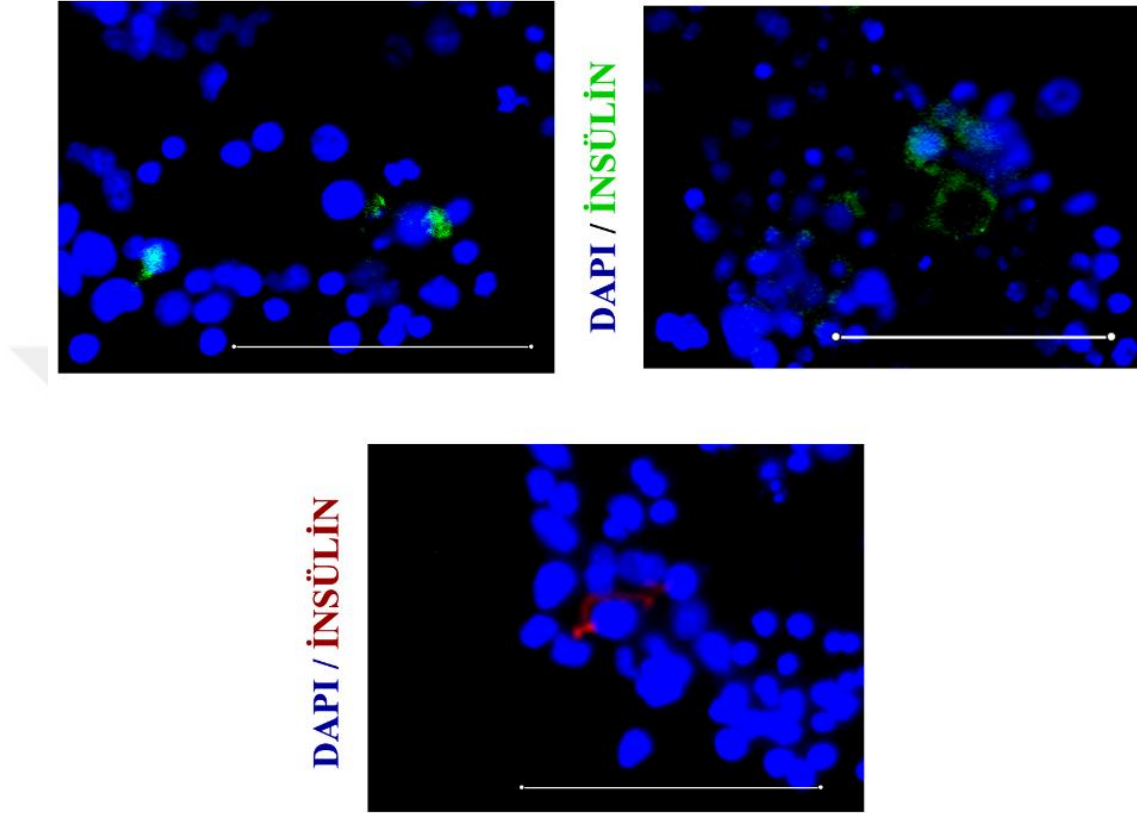
4.7. AR42J-B13 hücrelerine sentetik pmRNA uygulanması ve proteinlerin belirlenmesi

AR42J-B13 hücrelerine 24 saat boyunca 200 ng sentetik pmRNA uygulaması sonucu anti-Pdx1, anti-Ngn3 ve anti-MafA antikorlarıyla boyanarak eksprese olan *Pdx1*, *Ngn3* ve *MafA* genlerinin proteine de çevrildiği gösterilmiştir. Sentetik pmRNA uygulamasıyla *Pdx1*, *Ngn3* ve *MafA* genlerinin ifadesi gerçekleşmiş ve PDX1, NGN3 ve MAFA proteinlerin çekirdeğe lokalize olduğu gösterilmiştir (şekil 4.7).



şekil 4.7. PNM sentetik pmRNA'sı verilmiş hücrelerde Anti-Pdx1 (yeşil), Anti-Ngn3 (yeşil), Anti-MafA (yeşil) ve DAPI (mavi) immün boyaması (Cetvel 100 μ m'dir)

72 saat boyunca 300 ng sentetik pmRNA verilen AR42J-B13 hücrelerinin anti-İnsülin antikorlarıyla boyanarak eksprese olan *Ins* geninin insülin proteini ürettiği gösterilmiştir. Sentetik pmRNA uygulamasıyla aktive edilen endogenik insülin geninin ifadesi gerçekleşmiş ve endogenik proteinlerin beklendiği üzere sitoplazmaya lokalize olduğu gösterilmiştir.



şekil 4.8. PNM pmRNA'sı uygulanmış hücrelerde anti-insülin (yeşil), anti-insülin (kırmızı) ve DAPI (mavi) immün boyaması (Cetvel 100 μm'dir)

5. SONUÇLAR

Bu çalışmada 2A linkerlar kullanılarak *Pdx1*, *Ngn3* ve *MafA* genlerinin ORF bölgeleri başarılı bir şekilde birleştirilmiştir. Oluşturulan dizi daha sonra IVT işlemi için uygun olan pTNT vektörüne aktarılmıştır. pTNT vektörüne aktarıldıktan sonra vektör kısaltılarak IVT için optimum uzunluğa getirilmiştir ve böylece IVT verimi artırılmıştır. Daha sonra IVT yapılarak sentetik pmRNA üretilmiştir. Yapılan ölçüm sonucunda yüksek miktar ve saflıkta sentetik pmRNA elde edilmiştir. Sentetik pmRNA dizaynı ve *in vitro* sentezi başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. IVT ile üretilen sentetik pmRNA'ların AR42J-B13 hücrelerindeki ekspresyon seviyeleri kPZR ile analiz edilmiştir. Sentetik pmRNA'nın karakterizasyon çalışmalarında *Pdx1*, *Ngn3* ve *MafA* ekzogenik genlerinin aktivasyonu gösterilmiştir. Mikroskop altında incelenen hücrelerde sentetik pmRNA uygulamasının hücre morfolojisini değiştirdiği de görülmüştür.

Ad-PNM ile yapılan çalışmalarda *Pdx1*, *Ngn3* ve *MafA* genlerinin hücrelere aktarılması sonucu beta hücre benzeri hücrelerin olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Fakat adenovirüslerin kullanılmasının içerdiği riskler nedeniyle güvenli olmadığı düşünülmektedir. Bundan dolayı bu tez çalışmasında *Pdx1*, *Ngn3* ve *MafA* genleri sentetik pmRNA şeklinde üretilmiştir. Viral vektörler kullanılarak gerçekleştirilen çalışmalarda hücrelerin gerek kromatin yapısının yeniden düzenlendiği gerekse transkripsiyon faktörlerinin hedef DNA sekanslarına daha kolay erişebildiği düşünülmektedir. Bu yüzden sentetik pmRNA uygulamasında kromatin yapısının yeniden modellenmesi ve transkripsiyon faktörlerinin genoma daha kolay erişebilmesi için VPA kullanılmıştır. Ayrıca viral vektörlerin immün sistemi aktif hale getirmesinin hücre programlamasına etkisinin belirlenmesi için sentetik pmRNA ile LPS kullanılmıştır.

Yapılan gen ekspresyon analizi sonucunda sentetik pmRNA ile VPA kullanımında; 300 ng sentetik pmRNA uygulamasında, 300 ng sentetik pmRNA+VPA uygulamasına göre *Ngn3* geninde istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu görülmüştür. LPS uygulamasında ise gen ekspresyon seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış olmamıştır. Ayrıca sentetik pmRNA ile transfekte edilen AR42J-B13 hücrelerinde *Pdx1*, *Ngn3*, *MafA*, *Ins1* ve *Ins2* genlerinin eksprese olduğu gösterilmiştir.

Elde edilen sonuçlardan viral vektör kullanılarak yapılan gen aktarım çalışmalarında daha iyi sonuçlar gözlenmiştir. Bundan dolayı viral vektörün etkisine bakılmak için boş bir Ad-GFP virüsü temin edilip sentetik pmRNA ile uygulanıp hücreler üzerindeki etkisine bakılmıştır. Bunun sonucunda gen ekspresyon seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış söz konusu olmamıştır. 300 ng sentetik pmRNA+150 MOI Ad-GFP uygulamasının gen ekspresyon seviyesini arttırdığı ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür. Yüksek konsantrasyonda 5 gün boyunca sentetik pmRNA verildiğinde ise hedef genlerin ekspresyonlarında bir artış görülmüştür. Bu artış *Ngn3* ve *Ins2* geni için istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

AR42J-B13 hücrelerine sentetik pmRNA uygulanmasından sonra yapılan immüno floresan boyamasında PDX1, NGN3, MAFA ve INS proteinlerinin boyaması

gerçekleştirilmiştir. Bunun sonucunda PDX1, NGN3 ve MAFA proteinlerinin çekirdekte ve INS proteinlerinin sitoplazmada lokalize olduğu gösterilmiştir.

kPZR ve immüno Floresan boyamalarında elde edilen sonuçlar neticesinde oluşturulan sentetik pmRNA'ların hücre programlamasında ekzogenik genlerin ekspresyonu için kullanılabileceği sonucuna ulaşılmıştır. Bununla beraber sentetik pmRNA'ların rekombinant protein ve aşı üretim çalışmalarında da kullanılabileceği düşünülmektedir. Çünkü oluşturduğumuz sentetik pmRNA'dan her üç proteinin üretimi başarıyla gerçekleşmiştir.

Bu tez çalışmasıyla *Pdx1*, *Ngn3* ve *MafA* genlerini içeren sentetik pmRNA oluşturulmuştur. Sentetik pmRNA ile ekzogenik genlerin ekspresyonu ve protein üretimi başarıyla gerçekleşmiştir. Bu sonuçlar ile sentetik pmRNA'nın başarılı bir şekilde oluşturulduğu ve hücre içerisindeki translasyonunda herhangi bir sorunun olmadığı gösterilmiştir. Bu tez sentetik pmRNA ile *Pdx1*, *Ngn3* ve *MafA* genleri kullanılarak hücre programlama çalışmaları için bir ön çalışma olmuştur. Yapılan bu çalışmalara ek olarak daha uzun süreli sentetik pmRNA uygulaması yapılarak hücre programlama verimliliğine bakılmalıdır. Sentetik pmRNA ile farklılaşan hücrelerin glikoza duyarlı olup olmadığına, insülin pozitif hücre karakterlerini ne kadar koruyabildiklerine bakılmalıdır. Bu tez çalışmasında yapılan *in vitro* karakterizasyon çalışmalarına ek olarak deney hayvanlarında *in vivo* karakterizasyon çalışmaları da yapılmalıdır.

6. KAYNAKLAR

- Ahlgren, U., Jonsson, J., Jonsson, L., Simu, K. veEdlund, H. *Beta-cell-specific inactivation of the mouse ipf1/pdx1 gene results in loss of the beta-cell phenotype and maturity onset diabetes. Genes & development.* 1998; 12 (12): 1763-1768.
- Akinci, E., Banga, A., Greder, L. V., Dutton, J. R. veSlack, J. M. *Reprogramming of pancreatic exocrine cells towards a beta (β) cell character using pdx1, ngn3 and mafa. The Biochemical journal.* 2012; 442 (3): 539-550.
- Al-Dosari, M. S. veGao, X. *Nonviral gene delivery: Principle, limitations, and recent progress. The AAPS journal.* 2009; 11 (4): 671-681.
- Alsaggar, M. veLiu, D. (2015). *Chapter one - physical methods for gene transfer.* In: L. Huang, D. Liu veE. Wagner (Eds.), *Advances in genetics.* Academic Press. Vol. 89, pp. 1-24.
- Anonymous 1: Transfection. Retrieved from <https://www.polyplus-transfection.com/about-us/what-is-transfection/>
- Anonymous 2: Ptnt vector. Retrieved from <https://worldwide.promega.com/resources/protocols/technical-bulletins/101/ptnt-vector-protocol/>
- Badiyan, Z. S. veEvans, T. *Concise review: Application of chemically modified mrna in cell fate conversion and tissue engineering. STEM CELLS Translational Medicine.* 2019; 8 (8): 833-843.
- Banga, A., Akinci, E., Greder, L. V., Dutton, J. R. veSlack, J. M. *In vivo reprogramming of sox9+ cells in the liver to insulin-secreting ducts. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2012; 109 (38): 15336-15341.
- Banga, A., Greder, L. V., Dutton, J. R. veSlack, J. M. *Stable insulin-secreting ducts formed by reprogramming of cells in the liver using a three-gene cocktail and a ppar agonist. Gene therapy.* 2014; 21 (1): 19-27.
- Ben-David, U., Arad, G., Weissbein, U., Mandefro, B., Maimon, A., Golan-Lev, T., Narwani, K., Clark, A. T., Andrews, P. W., Benvenisty, N. vd. *Aneuploidy induces profound changes in gene expression, proliferation and tumorigenicity of human pluripotent stem cells. Nature communications.* 2014; 5: 4825.
- Berkner, K. *Development of adenovirus vectors for the expression of heterologous genes. Biotechnology techniques.* 1988; 6 7: 616-629.
- Bluestone, J. A., Herold, K. veEisenbarth, G. *Genetics, pathogenesis and clinical interventions in type 1 diabetes. Nature.* 2010; 464 (7293): 1293-1300.
- Buchsacher, G. L. *Introduction to retroviruses and retroviral vectors. Somatic Cell and Molecular Genetics.* 2001; 26 (1): 1-11.
- Buchsacher Jr, G. L. *Safety considerations associated with development and clinical application of lentiviral vector systems for gene transfer. Current genomics.* 2004; 5 (1): 19-35.
- Büning, H., Braun-Falco, M. veHallek, M. *Progress in the use of adeno-associated viral vectors for gene therapy. Cells Tissues Organs.* 2004; 177 (3): 139-150.
- Can, A. 2014. *Kök hücre biyolojisi, türleri ve tedavide kullanımları.* (Akademisyen Tıp Kitapevi: Vol), Ankara, 268 s.
- Cavazzana-Calvo, M., Payen, E., Negre, O., Wang, G., Hehir, K., Fusil, F., Down, J., Denaro, M., Brady, T., Westerman, K. vd. *Transfusion independence and hmga2*

- activation after gene therapy of human β -thalassaemia. *Nature*. 2010; 467 (7313): 318-322.
- Chang, D. C. ve Reese, T. S. *Changes in membrane structure induced by electroporation as revealed by rapid-freezing electron microscopy*. *Biophysical journal*. 1990; 58 (1): 1-12.
- Dar, D. ve Sorek, R. *Extensive reshaping of bacterial operons by programmed mrna decay*. *PLoS genetics*. 2018; 14 (4): e1007354.
- Das, S. K., Menezes, M. E., Bhatia, S., Wang, X.-Y., Emdad, L., Sarkar, D. ve Fisher, P. B. *Gene therapies for cancer: Strategies, challenges and successes*. *Journal of cellular physiology*. 2015; 230 (2): 259-271.
- Diken, M., Kranz, L. M., Kreiter, S. ve Sahin, U. *Mrna: A versatile molecule for cancer vaccines*. *Current issues in molecular biology*. 2017; 22: 113-128.
- Ding, W., Zhang, L., Yan, Z. ve Engelhardt, J. F. *Intracellular trafficking of adeno-associated viral vectors*. *Gene therapy*. 2005; 12 (11): 873-880.
- Dolenšek, J., Rupnik, M. S. ve Stožer, A. *Structural similarities and differences between the human and the mouse pancreas*. *Islets*. 2015; 7 (1): e1024405.
- Dubois, P. M. (1999). *The exocrine and endocrine pancreas: Embryology and histology*. In: A. L. Baert, G. Delorme ve L. Van Hoe (Eds.), *Radiology of the pancreas*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. pp. 1-8.
- Dull, T., Zufferey, R., Kelly, M., Mandel, R. J., Nguyen, M., Trono, D. ve Naldini, L. *A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system*. *Journal of Virology*. 1998; 72 (11): 8463-8471.
- Edelstein, M. L., Abedi, M. R. ve Wixon, J. *Gene therapy clinical trials worldwide to 2007—an update*. *The journal of gene medicine*. 2007; 9 (10): 833-842.
- Ekici, A., Timur, M. ve H., B. *Transgenik canlılar ve akuakültürdeki önemi*. *E.U. Journal of Fisheries & Aquatic Sciences*. 2006; 23: 211-214.
- Elyat, A. A., el-Naggar, M. M. ve Tahir, M. *An immunocytochemical and morphometric study of the rat pancreatic islets*. *Journal of anatomy*. 1995; 186 (Pt 3) (Pt 3): 629-637.
- Endoh, M., Koibuchi, N., Sato, M., Morishita, R., Kanzaki, T., Murata, Y. ve Kaneda, Y. *Fetal gene transfer by intrauterine injection with microbubble-enhanced ultrasound*. *Molecular therapy*. 2002; 5 (5): 501-508.
- Fiedler, K., Lazzaro, S., Lutz, J., Rauch, S. ve Heidenreich, R. *Mrna cancer vaccines. Recent results in cancer research*. 2016; 209: 61-85.
- Frimpong, K. ve Spector, S. A. *Cotransduction of nondividing cells using lentiviral vectors*. *Gene therapy*. 2000; 7 (18): 1562-1569.
- Gao, T., McKenna, B., Li, C., Reichert, M., Nguyen, J., Singh, T., Yang, C., Pannikar, A., Doliba, N., Zhang, T. vd. *Pdx1 maintains β cell identity and function by repressing an α cell program*. *Cell metabolism*. 2014; 19 (2): 259-271.
- Gao, X., Kim, K. S. ve Liu, D. *Nonviral gene delivery: What we know and what is next*. *The AAPS journal*. 2007; 9 (1): E92-104.
- Gehl, J. *Electroporation: Theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research*. *Acta Physiologica Scandinavica*. 2003; 177 (4): 437-447.
- Gonçalves, M. A. *Adeno-associated virus: From defective virus to effective vector*. *Virology journal*. 2005; 2: 43.
- Goparaju, S. K., Kohda, K., Ibata, K., Soma, A., Nakatake, Y., Akiyama, T., Wakabayashi, S., Matsushita, M., Sakota, M., Kimura, H. vd. *Rapid*

- differentiation of human pluripotent stem cells into functional neurons by mrnas encoding transcription factors. *Scientific Reports*. 2017; 7: 42367.
- Gradwohl, G., Dierich, A., LeMeur, M. veGuillemot, F. *Neurogenin3 is required for the development of the four endocrine cell lineages of the pancreas. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000; 97 (4): 1607-1611.
- Gu, G., Dubauskaite, J. veMelton, D. A. *Direct evidence for the pancreatic lineage: Ngn3+ cells are islet progenitors and are distinct from duct progenitors. Development*. 2002; 129 (10): 2447-2457.
- Guo, Q. S., Zhu, M. Y., Wang, L., Fan, X. J., Lu, Y. H., Wang, Z. W., Zhu, S. J., Wang, Y. veHuang, Y. *Combined transfection of the three transcriptional factors, pdx-1, neurod1, and mafa, causes differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into insulin-producing cells. Experimental diabetes research*. 2012; 2012: 672013.
- Guo, S., Dai, C., Guo, M., Taylor, B., Harmon, J. S., Sander, M., Robertson, R. P., Powers, A. C. veStein, R. *Inactivation of specific β cell transcription factors in type 2 diabetes. The Journal of clinical investigation*. 2013; 123 (8): 3305-3316.
- Hacein-Bey-Abina, S., Von Kalle, C., Schmidt, M., McCormack, M. P., Wulffraat, N., Leboulch, P., Lim, A., Osborne, C. S., Pawliuk, R., Morillon, E. vd. *Lmo2-associated clonal t cell proliferation in two patients after gene therapy for scid-x1. Science*. 2003; 302 (5644): 415-419.
- Hadas, Y., Katz, M. G., Bridges, C. R. veZangi, L. *Modified mrna as a therapeutic tool to induce cardiac regeneration in ischemic heart disease. Wiley interdisciplinary reviews. Systems biology and medicine*. 2017; 9 (1): 10.1002/wsbm.1367.
- Happel, K. I., Lockhart, E. A., Mason, C. M., Porretta, E., Keoshkerian, E., Odden, A. R., Nelson, S. veRamsay, A. J. *Pulmonary interleukin-23 gene delivery increases local t-cell immunity and controls growth of mycobacterium tuberculosis in the lungs. Infection and immunity*. 2005; 73 (9): 5782-5788.
- Henry, B. M., Skinningsrud, B., Saganiak, K., Pękala, P. A., Walocha, J. A. veTomaszewski, K. A. *Development of the human pancreas and its vasculature - an integrated review covering anatomical, embryological, histological, and molecular aspects. Annals of anatomy*. 2019; 221: 115-124.
- Hu, W.-S. vePathak, V. K. *Design of retroviral vectors and helper cells for gene therapy. Pharmacological Reviews*. 2000; 52 (4): 493-512.
- Huber, P. E., Mann, M. J., Melo, L. G., Ehsan, A., Kong, D., Zhang, L., Rezvani, M., Peschke, P., Jolesz, F., Dzau, V. J. vd. *Focused ultrasound (hifu) induces localized enhancement of reporter gene expression in rabbit carotid artery. Gene therapy*. 2003; 10 (18): 1600-1607.
- Jo, J., Choi, M. Y. veKoh, D. S. *Size distribution of mouse langerhans islets. Biophysical journal*. 2007; 93 (8): 2655-2666.
- Kamimura, K. veLiu, D. *Physical approaches for nucleic acid delivery to liver. The AAPS journal*. 2008; 10 (4): 589-595.
- Kaneto, H., Matsuoka, T. A., Katakami, N. veMatsuhisa, M. *Combination of mafa, pdx-1 and neurod is a useful tool to efficiently induce insulin-producing surrogate beta-cells. Current medicinal chemistry*. 2009; 16 (24): 3144-3151.

- Karikó, K., Buckstein, M., Ni, H. ve Weissman, D. *Suppression of rna recognition by toll-like receptors: The impact of nucleoside modification and the evolutionary origin of rna*. *Immunity*. 2005; 23 (2): 165-175.
- Kay, M. A., Glorioso, J. C. ve Naldini, L. *Viral vectors for gene therapy: The art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics*. *Nature medicine*. 2001; 7 (1): 33-40.
- Koblas, T., Leontovyc, I., Loukotova, S., Kosinova, L. ve Saudek, F. *Reprogramming of pancreatic exocrine cells ar42j into insulin-producing cells using mrnas for pdx1, ngn3, and mafa transcription factors*. *Molecular therapy. Nucleic acids*. 2016; 5 (5): e320.
- Kogut, I., McCarthy, S. M., Pavlova, M., Astling, D. P., Chen, X., Jakimenko, A., Jones, K. L., Getahun, A., Cambier, J. C., Pasmooij, A. M. G. vd. *High-efficiency rna-based reprogramming of human primary fibroblasts*. *Nature communications*. 2018; 9 (1): 745.
- Kondratyeva, L. G., Vinogradova, T. V., Chernov, I. P. ve Sverdlov, E. D. *Master transcription regulators specifying cell-lineage fates in development as possible therapeutic targets in oncology*. *Russian Journal of Genetics*. 2015; 51 (11): 1049-1059.
- Koolman, J. ve Röhm, K.-H. 2005. *Color atlas of biochemistry*. (2 ed. Thieme: Vol), Stuttgart, Germany, s.
- Kormann, M. S., Hasenpusch, G., Aneja, M. K., Nica, G., Flemmer, A. W., Herber-Jonat, S., Huppmann, M., Mays, L. E., Illenyi, M., Schams, A. vd. *Expression of therapeutic proteins after delivery of chemically modified mrna in mice*. *Nature biotechnology*. 2011; 29 (2): 154-157.
- Kotin, R. M., Menninger, J. C., Ward, D. C. ve Berns, K. I. *Mapping and direct visualization of a region-specific viral DNA integration site on chromosome 19q13-qter*. *Genomics*. 1991; 10 (3): 831-834.
- Kovesdi, I., Brough, D. E., Bruder, J. T. ve Wickham, T. J. *Adenoviral vectors for gene transfer*. *Current Opinion in Biotechnology*. 1997; 8 (5): 583-589.
- Kozak, M. *Regulation of translation via mrna structure in prokaryotes and eukaryotes*. *Gene*. 2005; 361: 13-37.
- Kroon, E., Martinson, L. A., Kadoya, K., Bang, A. G., Kelly, O. G., Eliazar, S., Young, H., Richardson, M., Smart, N. G., Cunningham, J. vd. *Pancreatic endoderm derived from human embryonic stem cells generates glucose-responsive insulin-secreting cells in vivo*. *Nature biotechnology*. 2008; 26 (4): 443-452.
- Langerhans, P. *Beitrage zur mikroskopischen anatomie der bauchspeicheldruse, inaugural disertation*. Gustav Lange. 1869.
- Lee, K., Yu, P., Lingampalli, N., Kim, H. J., Tang, R. ve Murthy, N. *Peptide-enhanced mrna transfection in cultured mouse cardiac fibroblasts and direct reprogramming towards cardiomyocyte-like cells*. *International journal of nanomedicine*. 2015; 10: 1841.
- Li, S. ve Huang, L. *Nonviral gene therapy: Promises and challenges*. *Gene therapy*. 2000; 7 (1): 31-34.
- Li, S. ve Ma, Z. *Nonviral gene therapy*. *Current gene therapy*. 2001; 1 (2): 201-226.
- Li, W., Cavelti-Weder, C., Zhang, Y., Clement, K., Donovan, S., Gonzalez, G., Zhu, J., Stemmann, M., Xu, K., Hashimoto, T. vd. *Long-term persistence and development of induced pancreatic beta cells generated by lineage conversion of acinar cells*. *Nature biotechnology*. 2014; 32 (12): 1223-1230.

- Lima, M., Docherty, H., Chen, Y. veDocherty, K. *Efficient differentiation of ar42j cells towards insulin-producing cells using pancreatic transcription factors in combination with growth factors. Molecular and cellular endocrinology.* 2012; 358: 69-80.
- Lois, C., Hong, E. J., Pease, S., Brown, E. J. veBaltimore, D. *Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors. Science.* 2002; 295 (5556): 868-872.
- Longnecker, D. S., Lilja, H. S., French, J., Kuhlmann, E. veNoll, W. *Transplantation of azaserine-induced carcinomas of pancreas in rats. Cancer letters.* 1979; 7 (4): 197-202.
- Lu, Q. L., Liang, H. D., Partridge, T. veBlomley, M. J. K. *Microbubble ultrasound improves the efficiency of gene transduction in skeletal muscle in vivo with reduced tissue damage. Gene therapy.* 2003; 10 (5): 396-405.
- Malone, R. W., Felgner, P. L. veVerma, I. M. *Cationic liposome-mediated rna transfection. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1989; 86 (16): 6077-6081.
- Mandal, P. K. veRossi, D. J. *Reprogramming human fibroblasts to pluripotency using modified mrna. Nature protocols.* 2013; 8 (3): 568-582.
- Mata-Espinosa, D. A., Mendoza-Rodríguez, V., Aguilar-León, D., Rosales, R., López-Casillas, F. veHernández-Pando, R. *Therapeutic effect of recombinant adenovirus encoding interferon-gamma in a murine model of progressive pulmonary tuberculosis. Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy.* 2008; 16 (6): 1065-1072.
- Matsushita, T., Elliger, S., Elliger, C., Podsakoff, G., Villarreal, L., Kurtzman, G. J., Iwaki, Y. veColosi, P. *Adeno-associated virus vectors can be efficiently produced without helper virus. Gene therapy.* 1998; 5 (7): 938-945.
- McCarty, D. M., Fu, H., Monahan, P. E., Toulson, C. E., Naik, P. veSamulski, R. J. *Adeno-associated virus terminal repeat (tr) mutant generates self-complementary vectors to overcome the rate-limiting step to transduction in vivo. Gene therapy.* 2003; 10 (26): 2112-2118.
- McGrath, P. S., Watson, C. L., Ingram, C., Helmrath, M. A. veWells, J. M. *The basic helix-loop-helix transcription factor neurog3 is required for development of the human endocrine pancreas. Diabetes.* 2015; 64 (7): 2497-2505.
- Mehier-Humbert, S. veGuy, R. H. *Physical methods for gene transfer: Improving the kinetics of gene delivery into cells. Advanced Drug Delivery Reviews.* 2005; 57 (5): 733-753.
- Miller, D. L. veSong, J. *Tumor growth reduction and DNA transfer by cavitation-enhanced high-intensity focused ultrasound in vivo. Ultrasound in Medicine and Biology.* 2003; 29 (6): 887-893.
- Naldini, L., Blömer, U., Gallay, P., Ory, D., Mulligan, R., Gage, F. H., Verma, I. M. veTrono, D. *In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. Science.* 1996; 272 (5259): 263-267.
- Nishimura, W., Takahashi, S. veYasuda, K. *Mafa is critical for maintenance of the mature beta cell phenotype in mice. Diabetologia.* 2015; 58 (3): 566-574.
- Okuda, T., Tagawa, K., Qi, M. L., Hoshio, M., Ueda, H., Kawano, H., Kanazawa, I., Muramatsu, M. veOkazawa, H. *Oct-3/4 repression accelerates differentiation of neural progenitor cells in vitro and in vivo. Brain research molecular brain research.* 2004; 132 (1): 18-30.

- Osten, P., Grinevich, V. veCetin, A. *Viral vectors: A wide range of choices and high levels of service. Handbook of experimental pharmacology.* 2007; (178): 177-202.
- Pagliuca, F. W., Millman, J. R., Gürtler, M., Segel, M., Van Dervort, A., Ryu, J. H., Peterson, Q. P., Greiner, D. veMelton, D. A. *Generation of functional human pancreatic β cells in vitro.* *Cell.* 2014; 159 (2): 428-439.
- Parker, J. (2013). *Polycistronic mrna.* In: S. Maloy veK. Hughes (Eds.), *Brenner's encyclopedia of genetics (second edition).* Academic Press, San Diego. pp. 388.
- Patel, S., Athirasala, A., Menezes, P. P., Ashwanikumar, N., Zou, T., Sahay, G. veBertassoni, L. E. *Messenger rna delivery for tissue engineering and regenerative medicine applications. Tissue engineering. Part A.* 2019; 25 (1-2): 91-112.
- Peterson, S. E. veLoring, J. F. *Genomic instability in pluripotent stem cells: Implications for clinical applications. The Journal of biological chemistry.* 2014; 289 (8): 4578-4584.
- Phua, K. K. L., Leong, K. W. veNair, S. K. *Transfection efficiency and transgene expression kinetics of mrna delivered in naked and nanoparticle format. Journal of Controlled Release.* 2013; 166 (3): 227-233.
- Puri, S., Folias, A. E. veHebrok, M. *Plasticity and dedifferentiation within the pancreas: Development, homeostasis, and disease. Cell Stem Cell.* 2015; 16 (1): 18-31.
- Roth, J. A. *Adenovirus p53 gene therapy. Expert opinion on biological therapy.* 2006; 6 (1): 55-61.
- Rowe, W. P., Huebner, R. J., Gilmore, L. K., Parrott, R. H. veWard, T. G. *Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine.* 1953; 84 (3): 570-573.
- Russell, D. W. veKay, M. A. *Adeno-associated virus vectors and hematology. Blood.* 1999; 94 (3): 864-874.
- Sahin, U., Karikó, K. veTüreci, Ö. *Mrna-based therapeutics — developing a new class of drugs. Nature Reviews Drug Discovery.* 2014; 13 (10): 759-780.
- Sarmasik, A., Chun, C. Z., Jang, I. K., Lu, J. K. veChen, T. T. *Production of transgenic live-bearing fish and crustaceans with replication-defective pantropic retroviral vectors. Marine biotechnology.* 2001; 3 (Supplement 1): S177-184.
- Schlaeger, T. M., Daheron, L., Brickler, T. R., Entwisle, S., Chan, K., Cianci, A., DeVine, A. veEttenger, A. *A comparison of non-integrating reprogramming methods. Nature biotechnology.* 2015; 33 (1): 58-63.
- Schwitzgebel, V. M., Scheel, D. W., Connors, J. R., Kalamaras, J., Lee, J. E., Anderson, D. J., Sussel, L., Johnson, J. D. veGerman, M. S. *Expression of neurogenin3 reveals an islet cell precursor population in the pancreas. Development.* 2000; 127 (16): 3533-3542.
- Sekiya, S. veSuzuki, A. *Direct conversion of mouse fibroblasts to hepatocyte-like cells by defined factors. Nature.* 2011; 475 (7356): 390-393.
- Seo, B. J., Hong, Y. J. veDo, J. T. *Cellular reprogramming using protein and cell-penetrating peptides. International journal of molecular sciences.* 2017; 18 (3): 552.
- Seth, P. 1999. *Adenoviruses: Basic biology to gene therapy.* (R.G. Landes Company: Vol s.

- Shapiro, A. M., Ricordi, C., Hering, B. J., Auchincloss, H., Lindblad, R., Robertson, R. P., Secchi, A., Brendel, M. D., Berney, T., Brennan, D. C. vd. *International trial of the edmonton protocol for islet transplantation. The New England journal of medicine*. 2006; 355 (13): 1318-1330.
- Sheets, T. P., Park, K.-E., Park, C.-H., Swift, S. M., Powell, A., Donovan, D. M. veTelugu, B. P. *Targeted mutation of ngn3 gene disrupts pancreatic endocrine cell development in pigs. Scientific Reports*. 2018; 8 (1): 3582.
- Sheridan, C. *Gene therapy finds its niche. Nature biotechnology*. 2011; 29 (2): 121-128.
- Shih, H. P., Seymour, P. A., Patel, N. A., Xie, R., Wang, A., Liu, P. P., Yeo, G. W., Magnuson, M. A. veSander, M. *A gene regulatory network cooperatively controlled by pdx1 and sox9 governs lineage allocation of foregut progenitor cells. Cell reports*. 2015; 13 (2): 326-336.
- Shih, H. P., Wang, A. veSander, M. *Pancreas organogenesis: From lineage determination to morphogenesis. Annual review of cell and developmental biology*. 2013; 29: 81-105.
- Shiver, J. W., Fu, T. M., Chen, L., Casimiro, D. R., Davies, M. E., Evans, R. K., Zhang, Z. Q., Simon, A. J., Trigona, W. L., Dubey, S. A. vd. *Replication-incompetent adenoviral vaccine vector elicits effective anti-immunodeficiency-virus immunity. Nature*. 2002; 415 (6869): 331-335.
- Skelin, M., Rupnik, M. veCencic, A. *Pancreatic beta cell lines and their applications in diabetes mellitus research. Altex*. 2010; 27 (2): 105-113.
- Skyler, J. S. *Diabetes mellitus: Pathogenesis and treatment strategies. Journal of medicinal chemistry*. 2004; 47 (17): 4113-4117.
- Song, K., Nam, Y. J., Luo, X., Qi, X., Tan, W., Huang, G. N., Acharya, A., Smith, C. L., Tallquist, M. D., Neilson, E. G. vd. *Heart repair by reprogramming non-myocytes with cardiac transcription factors. Nature*. 2012; 485 (7400): 599-604.
- Spaeth, J. M., Walker, E. M. veStein, R. *Impact of pdx1-associated chromatin modifiers on islet β -cells. Diabetes, Obesity and Metabolism*. 2016; 18 (S1): 123-127.
- Stephen, S. L., Montini, E., Sivanandam, V. G., Al-Dhalimy, M., Kestler, H. A., Finegold, M., Grompe, M. veKochanek, S. *Chromosomal integration of adenoviral vector DNA Journal of Virology*. 2010; 84 (19): 9987-9994.
- Stephen, S. L., Sivanandam, V. G. veKochanek, S. *Homologous and heterologous recombination between adenovirus vector DNA and chromosomal DNA. The journal of gene medicine*. 2008; 10 (11): 1176-1189.
- Stepinski, J., Waddell, C., Stolarski, R., Darzynkiewicz, E. veRhoads, R. E. *Synthesis and properties of mrnas containing the novel "anti-reverse" cap analogs 7-methyl(3'-o-methyl)gpppg and 7-methyl (3'-deoxy)gpppg. Rna*. 2001; 7 (10): 1486-1495.
- Strenkowska, M., Kowalska, J., Lukaszewicz, M., Zuberek, J., Su, W., Rhoads, R., Darzynkiewicz, E. veJemielity, J. *Towards mrna with superior translational activity: Synthesis and properties of arca tetraphosphates with single phosphorothioate modifications. New journal of chemistry = Nouveau journal de chimie*. 2010; 34: 993-1007.
- Suckau, L., Fechner, H., Chemaly, E., Krohn, S., Hadri, L., Kockskämper, J., Westermann, D., Bisping, E., Ly, H., Wang, X. vd. *Long-term cardiac-targeted rna interference for the treatment of heart failure restores cardiac function and reduces pathological hypertrophy. Circulation*. 2009; 119 (9): 1241-1252.

- Szymczak, A. L. ve Vignali, D. A. *Development of 2a peptide-based strategies in the design of multicistronic vectors. Expert opinion on biological therapy.* 2005; 5 (5): 627-638.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K. ve Yamanaka, S. *Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. Cell.* 2007; 131 (5): 861-872.
- Takahashi, K. ve Yamanaka, S. *Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell.* 2006; 126 (4): 663-676.
- Taniyama, Y., Tachibana, K., Hiraoka, K., Aoki, M., Yamamoto, S., Matsumoto, K., Nakamura, T., Ogihara, T., Kaneda, Y. ve Morishita, R. *Development of safe and efficient novel nonviral gene transfer using ultrasound: Enhancement of transfection efficiency of naked plasmid DNA in skeletal muscle. Gene therapy.* 2002; 9 (6): 372-380.
- Taniyama, Y., Tachibana, K., Hiraoka, K., Namba, T., Yamasaki, K., Hashiya, N., Aoki, M., Ogihara, T., Yasufumi, K. ve Morishita, R. *Local delivery of plasmid DNA into rat carotid artery using ultrasound. Circulation.* 2002; 105 (10): 1233-1239.
- Tavernier, G., Wolfrum, K., Demeester, J., De Smedt, S. C., Adjaye, J. ve Rejman, J. *Activation of pluripotency-associated genes in mouse embryonic fibroblasts by non-viral transfection with in vitro-derived mrnas encoding oct4, sox2, klf4 and cmyc. Biomaterials.* 2012; 33 (2): 412-417.
- Teo, A. K., Tsuneyoshi, N., Hoon, S., Tan, E. K., Stanton, L. W., Wright, C. V. ve Dunn, N. R. *Pdx1 binds and represses hepatic genes to ensure robust pancreatic commitment in differentiating human embryonic stem cells. Stem Cell Reports.* 2015; 4 (4): 578-590.
- Tsuchiya, M., Tsuchiya, K., Yasuda, K., Fujita, M., Takinishi, A., Furukawa, M., Nitta, K. ve Maeda, A. *Mafa is a key molecule in glucose and energy balance in the central nervous system and peripheral organs. International journal of biomedical science : IJBS.* 2011; 7 (1): 19-26.
- Unal, P. 2018, *Myod transaktivatör bölgesinin beta hücreleri oluşumu üzerine etkilerinin araştırılması.* Akdeniz Üniversitesi, (Yüksek Lisans), Antalya (E. Akıncı): Pages.
- Unger, E. C., Hersh, E., Vannan, M. ve McCreery, T. *Gene delivery using ultrasound contrast agents. Echocardiography.* 2001; 18 (4): 355-361.
- Van Pham, P., Vu, N. B., Dao, T. T.-T., Le, H. T.-N., Phi, L. T. ve Phan, N. K. *Production of endothelial progenitor cells from skin fibroblasts by direct reprogramming for clinical usages. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal.* 2017; 53 (3): 207-216.
- Van Tendeloo, V. F., Ponsaerts, P. ve Berneman, Z. N. *Mrna-based gene transfer as a tool for gene and cell therapy. Current opinion in molecular therapeutics.* 2007; 9 (5): 423-431.
- Van Tendeloo, V. F., Ponsaerts, P., Lardon, F., Nijs, G., Lenjou, M., Van Broeckhoven, C., Van Bockstaele, D. R. ve Berneman, Z. N. *Highly efficient gene delivery by mrna electroporation in human hematopoietic cells: Superiority to lipofection and passive pulsing of mrna and to electroporation of plasmid cdna for tumor antigen loading of dendritic cells. Blood.* 2001; 98 (1): 49-56.

- Vierbuchen, T., Ostermeier, A., Pang, Z. P., Kokubu, Y., Südhof, T. C. veWernig, M. *Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. Nature.* 2010; 463 (7284): 1035-1041.
- Villemeijane, J. veMir, L. M. *Physical methods of nucleic acid transfer: General concepts and applications. British journal of pharmacology.* 2009; 157 (2): 207-219.
- Vinogradova, T. V. veSverdlov, E. D. *Pdx1: A unique pancreatic master regulator constantly changes its functions during embryonic development and progression of pancreatic cancer. Biochemistry (Moscow).* 2017; 82 (8): 887-893.
- Warnock, J. N., Daigre, C. veAl-Rubeai, M. *Introduction to viral vectors. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.).* 2011; 737: 1-25.
- Warnock, J. N., Merten, O. veAl-Rubeai, M. *Cell culture processes for the production of viral vectors for gene therapy purposes. Cytotechnology.* 2006; 50 (1-3): 141-162.
- Warren, L., Manos, P. D., Ahfeldt, T., Loh, Y.-H., Li, H., Lau, F., Ebina, W., Mandal, P. K., Smith, Z. D., Meissner, A. vd. *Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mrna. Cell Stem Cell.* 2010; 7 (5): 618-630.
- Weaver, J. C. *Electroporation theory. Concepts and mechanisms. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.).* 1995; 48: 3-28.
- Xue, H. Y., Guo, P., Wen, W. C. veWong, H. L. *Lipid-based nanocarriers for rna delivery. Current pharmaceutical design.* 2015; 21 (22): 3140-3147.
- Yamamoto, A., Kormann, M., Rosenecker, J. veRudolph, C. *Current prospects for mrna gene delivery. European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics.* 2009; 71 (3): 484-489.
- Yang, Y. P., Thorel, F., Boyer, D. F., Herrera, P. L. veWright, C. V. *Context-specific α -to- β -cell reprogramming by forced pdx1 expression. Genes & development.* 2011; 25 (16): 1680-1685.
- Ye, D. Z., Tai, M. H., Linning, K. D., Szabo, C. veOlson, L. K. *Mafa expression and insulin promoter activity are induced by nicotinamide and related compounds in ins-1 pancreatic beta-cells. Diabetes.* 2006; 55 (3): 742-750.
- Youn, H. veChung, J.-K. *Modified mrna as an alternative to plasmid DNA (pdna) for transcript replacement and vaccination therapy. Expert opinion on biological therapy.* 2015; 15 (9): 1337-1348.
- Zangi, L., Lui, K. O., Von Gise, A., Ma, Q., Ebina, W., Ptaszek, L. M., Später, D., Xu, H., Tabebordbar, M. veGorbatov, R. *Modified mrna directs the fate of heart progenitor cells and induces vascular regeneration after myocardial infarction. Nature biotechnology.* 2013; 31 (10): 898-907.
- Zhang, X. veGodbey, W. T. *Viral vectors for gene delivery in tissue engineering. Advanced Drug Delivery Reviews.* 2006; 58 (4): 515-534.
- Zhou, J., Wang, X., Pineyro, M. A. veEgan, J. M. *Glucagon-like peptide 1 and exendin-4 convert pancreatic ar42j cells into glucagon- and insulin-producing cells. Diabetes.* 1999; 48 (12): 2358-2366.
- Zhou, Q., Brown, J., Kanarek, A., Rajagopal, J. veMelton, D. A. *In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to β -cells. Nature.* 2008; 455 (7213): 627-632.
- Zhou, Q. veMelton, D. A. *Extreme makeover: Converting one cell into another. Cell Stem Cell.* 2008; 3 (4): 382-388.

- Zhu, Z., Li, Qing V., Lee, K., Rosen, Bess P., González, F., Soh, C.-L. veHuangfu, D. *Genome editing of lineage determinants in human pluripotent stem cells reveals mechanisms of pancreatic development and diabetes. Cell Stem Cell.* 2016; 18 (6): 755-768.
- Zohra, F. T., Chowdhury, E. H., Tada, S., Hoshiba, T. veAkaike, T. *Effective delivery with enhanced translational activity synergistically accelerates mrna-based transfection. Biochemical and biophysical research communications.* 2007; 358 (1): 373-378.



ÖZGEÇMİŞ

Fatma AKÇAKALE

ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi
2018-2021	Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Antalya
Lisans	Cumhuriyet Üniversitesi
2013-2017	Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Sivas

ESERLER

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

Göksu Erol, A. Y., Akıncı, E., Koçancı, F. G., Akçakale, F., Dora, D. D., & Uysal, H. (2020). Masitinib mediates TGF-Beta1 and Nitric Oxide Secretion and Ameliorates MPTP/Microglia-Induced Degeneration of Differentiated SH-SY5Y Cells. *bioRxiv*, 2020.2007.2016.206094. doi: 10.1101/2020.07.16.206094

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler

Babacan Ü., Akinci E., Kaba A., Akçakale F., Cengiz M.F., "Cell Viability Effects of Ferulic Acid on Melanoma Cell Line (SK-MEL-30)", International 8. Drug Chemistry Conference, ANTALYA, TÜRKİYE, 27 Şubat -1 Mart 2020, pp.OP65-OP65