



**PANKREATİK BETA HÜCRELERİ ARASINDAKİ
KONNEKSİN 36 ARACILI İLETİŞİMİN HÜCRE İÇİ
KALSİYUM DİNAMİKLERİ VE DİYABET GELİŞİMİ
ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Mesut AKYÜZ

Doktora Tezi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Danışman: Doç. Dr. Elanur AYDIN KARATAŞ

2025
Her hakkı saklıdır.



FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DOKTORA TEZİ

**PANKREATİK BETA HÜCRELERİ ARASINDAKİ KONNEKSİN 36 ARACILI
İLETİŞİMİN HÜCRE İÇİ KALSIYUM DİNAMİKLERİ VE DİYABET
GELİŞİMİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Mesut AKYÜZ

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Elanur AYDIN KARATAŞ

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Erzurum

2025

Her hakkı saklıdır

T.C.
ERZURUM TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TEZ ONAY FORMU

**PANKREATİK BETA HÜCRELERİ ARASINDAKİ KONNEKSİN 36 ARACILI
İLETİŞİMİN HÜCRE İÇİ KALSIYUM DİNAMİKLERİ VE DİYABET
GELİŞİMİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Doç. Dr. Elanur AYDIN KARATAŞ danışmanlığında, Mesut AKYÜZ tarafından hazırlanan bu çalışma 21 / 01 / 2025 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı'nda Doktora tezi olarak **Oy birliği ile (5/5)** kabul edilmiştir.

Başkan	: Prof. Dr. Turgay ŞİŞMAN	İmza	:
Üye	: Doç. Dr. Elanur AYDIN KARATAŞ	İmza	:
Üye	: Doç. Dr. Mehmet Enes ARSLAN	İmza	:
Üye	: Doç. Dr. Özlem ÖZDEMİR TOZLU	İmza	:
Üye	: Dr. Öğr. Üyesi Vehpi YILDIRIM	İmza	:

Yukarıdaki sonucu onaylıyorum

Doç. Dr. Bünyamin ÖZGERİŞ
Enstitü Müdürü

*Bu tez çalışması TÜBİTAK tarafından 121F278 nolu proje ile desteklenmiştir.

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

Erzurum Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki tüm bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

21 / 01 / 2025

Mesut AKYÜZ

ÖZET

DOKTORA TEZİ

PANKREATİK BETA HÜCRELERİ ARASINDAKİ KONNEKSİN 36 ARACILI İLETİŞİMİN HÜCRE İÇİ KALSIYUM DİNAMİKLERİ VE DİYABET GELİŞİMİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Mesut AKYÜZ

Erzurum Teknik Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Elanur AYDIN KARATAŞ

Pankreasın Langerhans adacıklarındaki β -hücreleri transkripsiyonel aktivite, protein sentezi, hormon salınımı ve elektriksel aktivite bakımından heterojendir. Adacık içindeki heterojenlik ve bunun hormon salgılanmasının düzenlenmesi üzerindeki etkileri, son yıllarda diyabet araştırmalarına yeni bir yön kazandırmıştır. Adacık içindeki β -hücreleri arasındaki etkileşim insülin salınımının ve glukoz homeostazının düzenlenmesi için kritiktir. Bu etkileşimin merkezinde adacık hücreleri arasındaki iyonik akımları ileten ve böylece hücrelerin elektriksel aktivitelerini koordine etmelerini sağlayan gap bağlantı kanalları ve bu kanallarda görevli konneksin proteinleri yer alır. β -hücreleri, adacık boyunca Ca^{2+} ve insülin salınımının pulsatil dinamiklerini koordine eden konneksin 36 (Cx36) gap bağlantı kanalları aracılığıyla elektriksel olarak bağlanır. Mevcut tez çalışmasında insülinin bazal salınımını baskılamada heterojenliğin rolünü anlamak için bir yaklaşım olarak Ca^{2+} salınımının gözlenmesi amacıyla her biri genetik olarak fonksiyon kazandırıcı mutasyonlara sahip olan, tanımlanmış, uyarılamaz diyabetli β -hücre popülasyonları elde edildi. Fare adacıklarındaki β -hücrelerinin mutant K_{ATP} kanallarını ifade etmesi ve dolayısıyla yüksek K_{ATP} iletkenliğine sahip olması yabancı tip K_{ATP} kanallarını ifade eden β -hücreleriyle kıyaslandığında, Ca^{2+} salınımlarını tamamen susturdu. Ancak, adacıklarda Cx36 gap bağlantıları zayıflatıldığında mutant tip K_{ATP} kanallarını ifade eden diyabetli β -hücrelerinin bu baskılanması ortadan kalkarak salınımlar geri getirildi. Yine *in vitro* fare β -hücre modelinde, Kir6.1'deki fonksiyon kazanımı mutasyonunun Cx36 ekspresyonunda önemli bir artışa yol açtığı gösterildi. Birlikte ele alındığında, bu bulgular uyarılamaz β -hücrelerinin küçük popülasyonlarının adacıklar içinde Ca^{2+} salınımındaki spontan yükselmeleri bastırabileceğini ancak Cx36 aracılı iletkenliğin azaltılması ile bu baskının ortadan kaldırılarak salınım potansiyellerinin geri getirilebileceği gösterildi. Cx36'nın diyabet tedavisinde potansiyel bir hedef olarak değerlendirilebileceği görüldü desteklendi.

2025, 92 Sayfa

Anahtar Kelimeler: β -hücresi, Diyabet, Gap bağlantı kanalı, Konneksin 36, Kalsiyum salınımı

ABSTRACT

PhD Thesis

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF CONNEXIN 36 MEDIATED COMMUNICATION BETWEEN PANCREATIC B-CELLS ON INTRACELLULAR CALCIUM DYNAMICS AND DIABETES DEVELOPMENT

Mesut AKYÜZ

Erzurum Technical University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Elanur AYDIN KARATAŞ

β -cells in pancreatic islets are heterogeneous with respect to transcriptional regulation, protein synthesis, hormone secretion and electrical activity. Functional heterogeneity within the islet and its effects on the regulation of hormone secretion have brought new perspectives to diabetes research. Interactions between β -cells within a pancreatic islet are essential for the regulation of insulin secretion and glucose homeostasis. Central to this interaction are gap junction channels, which conduct ionic currents between islet cells and thus enable the cells to coordinate their electrical activity, and the connexin proteins that function in these channels. β -cells are electrically coupled via connexin 36 (Cx36) gap junction channels, which coordinate oscillatory Ca^{2+} oscillations and insulin secretion within the islet. In this thesis, we obtained genetically defined, inexcitable diabetic β -cell populations, each containing gain of function mutations, and monitored Ca^{2+} release as an approach to understand the role of heterogeneous cells in the islet in changes in insulin secretion. β -cells in mouse islets expressing mutant K_{ATP} channels and thus having high K_{ATP} conductance completely silenced Ca^{2+} release compared to β -cells expressing wild type K_{ATP} channels. However, when Cx36 gap junctions were weakened in islets, this suppression of diabetic β -cells expressing mutant type K_{ATP} channels was abolished, and oscillations were restored. Again, in an *in vitro* mouse β -cell model, it was shown that gain of function mutation in Kir6.1 resulted in a significant increase in Cx36 expression. Taken together, these findings suggest that inexcitable β -cell populations can suppress intra islet Ca^{2+} oscillations, but this suppression can be alleviated by reducing Cx36 mediated conductance, thus restoring oscillatory potential. Supporting the view that Cx36 may be considered a potential target for the treatment of diabetes.

2025, 92 Pages

Keywords: β -cell, Diabetes, Gap junction channel, Connexin 36, Calcium oscillation

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışması Erzurum Teknik Üniversitesi Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (YÜTAM) Laboratuvarlarında yürütülmüştür.

Bu araştırmanın yürütülmesinde büyük emeği geçen, her aşamasında ilgisini ve yardımlarını esirgemeyen, danışmanım, Sayın Doç. Dr. Elanur AYDIN KARATAŞ'a ve Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Ömer Faruk KARATAŞ ile Erasmus Üniversitesi'nden Sayın Dr. Öğr. Üyesi Vehpi YILDIRIM'a teşekkür ederim.

Doktora eğitimim süresince, birlikte zaman geçirdiğimiz, her birinden ayrı ayrı çok şey öğrendiğim, aynı laboratuvar ortamını paylaştığım, çalışmalarımın farklı aşamalarında bana destek olan arkadaşlarım Özel ÇAPIK, Neslişah BARLAK, Abdulmelik AYTATLI ve Cancer Therapeutics Lab'ın diğer değerli üyelerine ve ayrıca Erzurum Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü öğretim üyelerine teşekkür ederim.

Çalışmalarım süresince maddi manevi her türlü desteklerinden dolayı sevgili aileme sonsuz teşekkür ederim.

Bu tez çalışması, TÜBİTAK 121F278 numaralı proje kapsamında desteklenmiştir. Doktora sürecim boyunca sağlanan maddi destekler ve teşvikler için TÜBİTAK'a; özellikle 2211-Yurt İçi Lisansüstü Burs Programı ile beni destekleyen TÜBİTAK Bilim İnsanı Destek Programları Başkanlığı (BİDEB)'e teşekkür ederim.

Mesut AKYÜZ
Ocak 2025

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. Diyabet Hastalığı.....	1
1.1.1. Tip 1 Diyabet.....	2
1.1.2. Tip 2 Diyabet.....	3
1.1.3. Neonatal Diyabet.....	5
1.2. Pankreas Adacıkları	8
1.3. β -Hücresi.....	9
1.4. Glukoz Alımı ve Metabolizması	10
1.4.1. Glukoz Alımı.....	11
1.4.2. Glukoz Metabolizması	12
1.5. β -Hücrelerinin Elektriksel Aktivitesi	13
1.5.1. Membran Direncinin Önemi	14
1.5.2. Elektriksel Aktivite: Fare β -Hücreleri.....	14
1.5.3. Elektriksel Aktivite: İnsan β -Hücreleri	16
1.6. İyon Kanalları.....	18
1.6.1. ATP-Duyarlı K^+ Kanalı.....	18
1.6.2. Voltaj Kapılı Ca^{2+} Kanalları.....	22
1.6.3. Voltaj Kapılı Na^+ Kanalları.....	23
1.6.4. Voltaj Kapılı K^+ Kanalları	23
1.7. Hücre Bağlantıları	24
1.8. İnsülin Hormonu ve Enerji Metabolizması	27
1.9. Diyabet Metabolizması	28
1.10. β -Hücreleri ve İnsülin Salgılanması.....	29
1.11. β -Hücreleri Arasındaki İletişim Kanalları ve Senkronizasyon	33
1.12. Gap Bağlantı Kanalları.....	34
1.12.1. Cx36.....	35

1.13. Tip 2 Diyabet Modelleri.....	36
1.14. Diyabet Tedavisinde Yeni Hedefler.....	36
2. KAYNAK ÖZETLERİ	39
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	44
3.1. Materyal	44
3.2. Yöntem.....	49
3.2.1. Fare β -hücrelerinin kültür edilmesi.....	49
3.2.2. Fare β -hücrelerinde mutagenез ile diyabet modellerinin oluşturulması.....	49
3.2.3. NIT-1 hücrelerinin Kcnj8 (Kir6.1) ile stabil transfeksiyonu	50
3.2.4. Kcnj8 (Kir6.1) ile stabil transfeksiyonu gerçekleştirilen NIT-1 hücrelerinin Gjd2 (Cx36) ile stabil transfeksiyonu	51
3.2.5. RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve Real-Time PCR.....	51
3.2.6. Western blot analizi.....	52
3.2.7. Hücre içi Ca^{2+} sinyallerinin Florometrik görüntülenmesi.....	53
3.2.8. İmmünohistokimya	53
3.2.9. İstatistiksel analiz	54
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....	55
4.1. Fare β -Hücreleri Başarılı Bir Şekilde Kültüre Edildi ve Adacık Oluşturma Potansiyelleri Test Edildi	55
4.2. Mutagenез Yapılarak Diyabet Modelleri Oluşturuldu.....	56
4.3. NIT-1 Hücrelerinin Kcnj8 (Kir6.1) ile Stabil Transfeksiyonu Yapılarak Diyabet Modelleri Geliştirildi.....	58
4.4. Kcnj8 (Kir6.1) ile Stabil Transfeksiyonu Yapılarak Diyabet Modeli Oluşturulan NIT-1 Hücrelerinden RNA İzolasyonu Yapıldı.....	59
4.5. Kcnj8 (Kir6.1) ile Stabil Transfeksiyonu Yapılarak Diyabet Modeli Oluşturulan NIT-1 Hücrelerinde cDNA Sentezlenerek Real-Time PCR ile mRNA Seviyesinde Doğrulama Yapıldı.....	59
4.6. Kcnj8 (Kir6.1) ile Stabil Transfeksiyonu Yapılarak Diyabet Modeli Oluşturulan NIT-1 Hücrelerinde Western Blot ile Protein Seviyesinde Doğrulama Yapıldı.....	60
4.7. Gjd2'nin (Cx36) Stabil İnhibisyonuna Sahip NIT-1 Hücrelerinin Oluşturulması Sağlandı.....	61
4.8. Kcnj8 (Kir6.1) ile Stabil Transfeksiyonu Yapılarak Diyabet Modeli Oluşturulan NIT-1 Hücrelerinde Gjd2'nin (Cx36) Stabil İnhibisyonu Gerçekleştirildi.....	63
4.9. Transfeksiyon İşlemi Gerçekleştirildi ve Real-Time PCR ile Doğrulaması Yapıldı	64
4.10. Western Blot ile Protein Düzeyinde Doğrulama Yapıldı.....	65
4.11. Artan Kir6.1 İfadesinin Gjd2 İfadesinde Artışa Sebep Olduğu Gösterildi	66
4.12. Cx36 İfadesi Azaltılmış Diyabet Modeli β -Hücrelerinde Hücre İçi Ca^{2+} Miktarının Ölçülerek Osilasyon Geri Kazanımının Değerlendirilmesi Yapıldı	68

4.13. Kir6.1'deki Fonksiyon Kazanımı Mutasyonu Cx36 Yukarı Regölasyonuyla Sonuçlandı.....	70
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	72
KAYNAKLAR	78



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler Açıklama

α	Alfa
β	Beta
$^{\circ}$	Derece
ml	Mililitre
mM	Milimolar
mV	Milivolt
μg	Mikrogram
μL	Mikrolitre
μm	Mikrometre
μM	Mikromolar
pL	Pikolitre
%	Yüzde

Kısaltmalar

$[\text{Ca}^{2+}]_i$	Hücre İçi Kalsiyum
ATP	Adenozin Trifosfat
GLUT1	Glukoz Taşıyıcı 1
GLUT2	Glukoz Taşıyıcı 2
GSIS	Glukoz Uyarılı İnsülin Salgılanması
K^+	Potasyum
K_{ATP} kanalı	ATP'ye Duyarlı K^+ Kanalı
Konneksin	Cx
Konneksin 36	Cx36
NDM	Neonatal Diyabet
T1DM	Tip 1 Diyabet
T2DM	Tip 2 Diyabet
VGCC	Voltaj Kapılı Ca^{2+} Kanalı

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Pankreas adacıklarının genel yapısı	9
Şekil 1.2. A. İzole edilmiş fare (kırmızı) ve insan (siyah) statik inkübasyonlarında glukoz konsantrasyonu ile insülin salgılanması arasındaki ilişki. B. izole edilmiş fare adacıklarında glukoz konsantrasyonu ile şekerin oksidatif metabolizması arasındaki ilişki. C. Glukoz konsantrasyonu ile ATP içeriği (kırmızı) ve izole edilmiş fare adacıklarında β -hücrelerinin tüm hücre K_{ATP} kanal iletkenliği.	11
Şekil 1.3. Düşük (A) ve yüksek (B) glukozda K_{ATP} kanal aktivitesinin değişimi	14
Şekil 1.4. Akut olarak izole edilmiş sağlam bir fare adacığındaki bir β -hücrelerinden glukoz konsantrasyonu 1 mM'den 10 veya 20 mM'ye çıkarıldığında kaydedilen glukoz kaynaklı elektriksel aktivite.	15
Şekil 1.5. Sağlıklı ve T2DM hücrelerinde K_{ATP} kanal aktivitesinin, membran potansiyelinin ve insülin salgılanmasının şematik gösterimi.	19
Şekil 1.6. K_{ATP} kanalının yapısı	20
Şekil 1.7. Sağlıklı bir adacıktaki β hücreleri arasındaki elektriksel bağlantının şeması.	25
Şekil 1.8. Pankreas endokrin dokusu ve adacık yapısı	27
Şekil 1.9. Diyabetli ve sağlıklı kişilerde glukoz homeostazının şematik gösterimi	29
Şekil 1.10. Glukozla uyarılan insülin salgılanması	30
Şekil 1.11. İki farklı β -hücrelerinden ölçülmüş örnek elektriksel patlamalar (bursting) ve senkronize Ca^{2+} salınımları.	32
Şekil 1.12. Pankreatik adacıklardaki β -hücreleri arasındaki iyon akışı ve elektriksel bağlantıda Cx36'nın rolü.	33
Şekil 1.13. Gap bağlantıları, Hemikanallar ve Konneksinlerin yapısı	34
Şekil 4.1. NIT-1 hücre sayım sonuçları	56
Şekil 4.2. Kcnj8 [WT] plazmitte G343D mutasyonunun oluştuğunun Sanger dizileme ile gösterilmesi.	57
Şekil 4.3. Kcnj8 [G343D] plazmitte Q53R mutasyonunun oluştuğunun Sanger dizileme ile gösterilmesi.	58
Şekil 4.4. Yabancı tip ve mutant Kcnj8'i stabil olarak ifade eden hücrelerde mRNA düzeyinde Kcnj8 ifade seviyesi.	60
Şekil 4.5. Yabancı tip ve mutant Kcnj8'i stabil olarak ifade eden hücrelerde protein düzeyinde Kcnj8 ifade seviyesi.	61

Şekil 4.6. Artan dozda glukoz ile muamele edilen NIT-1 hücrelerinde mRNA ve protein düzeyinde Gjd2 ifade seviyesi.	62
Şekil 4.7. Değişen sürelerde glukoz ile muamele edilen NIT-1 hücrelerinde mRNA ve protein düzeyinde Gjd2 ifade seviyesi.	63
Şekil 4.8. 4 farklı shRNA ile transfekte edilip seçimleri yapılan NIT-1 hücrelerinde mRNA ve protein düzeyinde Gjd2 ifade seviyesi.	64
Şekil 4.9. Yabancı tip ve mutant Kcnj8'i stabil olarak ifade eden hücrelerde (Kontrol, Kcnj8 [WT], Kcnj8 [G343D] ve Kcnj8 [G343D, Q53R]) ShC ile Gjd2 ifadesinin susturulması sonrasında mRNA düzeyinde Gjd2 ifade seviyesi.	65
Şekil 4.10. Yabancı tip ve mutant Kcnj8'i stabil olarak ifade eden hücrelerde (Kontrol, Kcnj8 [WT], Kcnj8 [G343D] ve Kcnj8 [G343D, Q53R]) ShC ile Gjd2 ifadesinin susturulması sonrasında protein düzeyinde Gjd2 ifade seviyesi.	66
Şekil 4.11. Yabancı tip ve mutant Kcnj8'i stabil olarak ifade eden hücrelerde (Kontrol, Kcnj8 [WT], Kcnj8 [G343D] ve Kcnj8 [G343D, Q53R]) protein düzeyinde Gjd2 ifade seviyesi.	67
Şekil 4.12. Kcnj8 [G343D, Q53R]'i stabil olarak ifade eden hücrelerde protein düzeyinde Gjd2 ifade seviyesi.	68
Şekil 4.13. shRNA hedeflemesi, Kcnj8 fonksiyon kazanımı mutasyonları taşıyan NIT-1 hücrelerinde (Kcnj8 [G343D, Q53R]) mRNA'da (A) ve protein seviyelerinde (B) Gjd2 ekspresyonunu azalttı. Hücreler 20 mM glukoz ile uyarıldığında Gjd2 susturulması olmaksızın Kcnj8 fonksiyon kazanımı mutasyonları taşıyan NIT-1 hücrelerinde (Kcnj8 [G343D, Q53R]/shRNA kontrolü) konfokal mikroskop kullanılarak yapılan Fluo-4 [Ca ²⁺]i görüntüleme (C) ve shRNA hedefli Gjd2 susturulmuş NIT-1 hücreleri (Kcnj8 [G343D, Q53R]/shRNA Gjd2). Sağdaki paneller 10 saniyelik aralıklarla yakınlştırılmış bölgeleri göstermektedir. E. Yakınlştırılmış bölgeler içindeki temsili tek hücrelerden yakalanan Fluo-4 [Ca ²⁺]i sinyalinin görelî yoğunluğu.	69
Şekil 4.14. A. mRNA düzeyinde yabancı tip veya mutant Kcnj8'in [G343D, Q53R] stabil aşırı ekspresyonu olan hücrelerde Kcnj8'in bağıl ekspresyonu B. Protein düzeyinde yabancı tip veya mutant Kcnj8'in [G343D, Q53R] stabil aşırı ekspresyonu olan hücrelerde Kcnj8'in bağıl ekspresyonu C. mRNA düzeyinde yabancı tip veya mutant Kcnj8'in [G343D, Q53R] stabil aşırı ekspresyonu olan hücrelerde Gjd2'nin bağıl ekspresyonu D. Protein	

düzeyinde yabancı tip veya mutant Kcnj8'in [G343D, Q53R] stabil aşırı ekspresyonu olan hücrelerde Gjd2'nin bağıl ekspresyonu E. Yabancı tip veya mutant Kcnj8'in [G343D, Q53R] stabil aşırı ekspresyonu olan hücrelerde Kcnj8 ve Gjd2'nin konfokal mikroskop görüntüleri. 71



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan cihazların listesi	44
Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan kitlerin, kimyasallar ve sarf malzemelerin listesi	46
Çizelge 3.3. Kcnj8 (Kir6.1) geninin yönlendirilmiş mutagenezi için kullanılan primer dizileri.....	50
Çizelge 3.4. Real-Time PCR analizinde kullanılan primer dizileri	52



1. GİRİŞ

1.1. Diyabet Hastalığı

Diyabet, dünya genelinde 400 milyondan fazla insanı etkilemekte ve 2030 yılına kadar vakaların 500 milyona ulaşması beklenmektedir. Bu hastalık, diyabetin neden olduğu komplikasyonlar (örneğin kalp hastalığı, böbrek yetmezliği ve retinopati) nedeniyle hem morbiditeyi hem de mortaliteyi artırmakta ve sağlık sistemlerine büyük mali yükler getirmektedir. Diyabetin etkilerini azaltmak için hastalığın nedenlerini ve iyileştirme yollarını anlamak önemlidir. Diyabet, pankreasın β -hücrelerinden salgılanan insülinin yetersizliği ile karakterizedir. (Rorsman and Ashcroft 2018).

İnsülin, pankreasın Langerhans adacıklarındaki β -hücreleri tarafından, hücre içi kalsiyum ($[Ca^{2+}]_i$) seviyelerinin artışına yanıt olarak salgılanır. Bu artış, hücre dışından Ca^{2+} akışıyla sağlanır ve bu süreç, voltaj bağımlı Ca^{2+} kanalları ve elektriksel aktivite tarafından düzenlenir. Bu nedenle, elektriksel aktivite insülin salgısı için kritik öneme sahiptir (Rorsman and Ashcroft 2018).

Diyabet, genellikle Batı yaşam tarzıyla ilişkilendirilen bir hastalıktır ve kan şekerinin kısa süreli yükselmesi genellikle zararlı değildir. Ancak, kan şekerinin birkaç dakikalığına 3 mM'ye kadar düşmesi ölümcül olabilir çünkü beyin yeterli enerjiden mahrum kalır. Vücut, bu durumu önlemek için evrimsel olarak gelişmiş homeostatik mekanizmalara sahiptir. İnsülin, kan şekerini düşürebilen tek hormonken, diğer hormonlar kan şekerini artırabilir. Son 50 yılda gıdanın bol bulunmasıyla birlikte, vücudumuz kaynakları koruma ve aşırılıkla başa çıkma yeteneğini geliştirmiştir (Hales and Barker 1992; Kn 2010).

İnsülin salgılanmasıyla ilgili bilginizin çoğu, kemirgen adacıkları ve β -hücreleri üzerinde yapılan araştırmalardan elde edilmiştir. Ancak, nihai hedef insan β -hücresini anlamaktır. İnsan ve kemirgen β -hücreleri birçok özelliği paylaşıyor da, tamamen aynı oldukları varsayılmamalıdır. Kemirgenler gececi ve sürekli beslenirken, insanlar gündüzcüdür ve genellikle günde 3-4 kez beslenirler. Ayrıca, insanların ve kemirgenlerin diyetleri farklıdır, bu da insülin salgılanması ve etkisi üzerinde farklı sonuçlar yaratabilir.

Bu nedenle, kemirgenlerde elde edilen bulguların insan hücrelerinde doğrulanması önemlidir. Genetik olarak tasarlanmış fare modelleri önemli bilgiler sağlar, ancak bazı sınırlamalar unutulmamalıdır. Birincisi, gen silinmesine karşı telafi edici değişiklikler olabilir. İkincisi, fare modelleri insan fenotipini tam olarak yansıtmayabilir; örneğin, SUR1 nakavt fareler insanlara kıyasla daha hafif bir fenotip gösterir. Üçüncüsü ise iyon kanalları ve reseptörler gibi hücresel bileşenler fare ve insan hücrelerinde farklılık gösterebilir. Bu faktörler, modellerin yorumlanmasında göz önünde bulundurulmalıdır (Rorsman and Ashcroft 2018).

1.1.1. Tip 1 Diyabet

Bir otoimmün diyabet olarak tanımlanan Tip 1 diabetes mellitus (T1DM), pankreas β -hücresi kaybına bağlı insülin yetersizliğiyle karakterize kronik bir hastalıktır ve bu tanıya sahip kişilerde hiperglisemiye yol açar. Semptomatik başlangıç yaşı genellikle çocukluk veya ergenlik döneminde olsa da semptomlar bazen çok daha sonra gelişebilir. T1DM'nin etiyolojisi tam olarak anlaşılmamış olmakla birlikte hastalığın patogenezinin T hücresi aracılı β -hücresi yıkımını içerdiği düşünülmektedir (Katsarou et al. 2017).

T1DM, çocukluk çağında görülen en yaygın endokrin ve metabolik durumlardan biridir. Hastaların büyük çoğunluğunda (%70-90), β -hücrelerinin kaybı T1DM ile ilişkili otoimmünitenin sonucudur. Bu hastalarda T1DM ile ilişkili otoantikorların oluşumuyla ortaya çıkan otoimmün T1DM vardır. Hastaların daha küçük bir alt grubunda, hiçbir bağışıklık tepkisi veya otoantikor saptanmaz ve β -hücresi yıkımının nedeni bilinmemektedir (Association 2015).

T1DM, semptomların başlamasından aylar veya yıllar önce oto antikorların ortaya çıkmasıyla ilişkilidir. Bu otoantikorların patogenetik olduğu ve otoimmünitenin gelişiminin biyobelirteçleri olduğu bilinmektedir. T1DM ile ilişkili karakteristik otoantikorlar insülini, 65 kDa boyutundaki glutamik asit dekarboksilazı (GAD65), insülinoma ilişkili protein 2 (IA2)'yi veya çinko taşıyıcı 8 (ZNT8)'i hedef alırlar (Ilonen et al. 2013; Krischer et al. 2015). Erken çocukluk döneminde ortaya çıkan ilk β -hücresini hedef alan otoantikor genellikle insülini veya GAD65'i hedef alır, ancak bu

otoantikörlerin her ikisi de mevcut olabilirken, önce IA2 otoantikoru veya ZNT8 otoantikörünün gözlemlenmesi nadirdir (Ilonen et al. 2013; Krischer et al. 2015). İlk ortaya çıkan β -hücresini hedef alan otoantikörün ortaya çıkmasını neyin tetiklediği belirsizdir ancak doğumdan itibaren takip edilen çocuklar üzerinde yapılan çeşitli çalışmalar halen devam etmektedir (Katsarou et al. 2017).

T1DM'nin patogenezinin otoantikörlerin ortaya çıkışıyla β -hücresi yıkımı, ardından disglisemi ve son olarak hiperglisemiyle ilişkili semptomlara doğru ilerleyen aşamalara ayrılabilen bir süreç olduğu öne sürülmüştür (Insel et al. 2015). Tanımlanması gereken şey, muhtemelen β -hücrelerine karşı otoimmün yanıtı tetikleyen veya buna izin veren çevresel ve genetik faktörlerin bir kombinasyonunu içeren β -hücresi hedefli otoimmünitenin etiolojisi. Bu olayların genellikle disgliseminin ve semptomların nihai gelişiminden yıllar önce gerçekleştiği de öne sürülmektedir (Katsarou et al. 2017).

1.1.2. Tip 2 Diyabet

Tip 2 diabetes mellitus (T2DM) karbonhidrat, lipid ve protein metabolizmasının düzensizliği ile karakterizedir ve bozulmuş insülin salgılanması, insülin direnci veya her ikisinin bir kombinasyonundan kaynaklanır. Diğer tanımlanmış diyabet türlerinden çok daha yaygındır (tüm vakaların %90'ından fazlasını oluşturur). Son yıllarda, T2DM'nin gelişimi ve ilerlemesi hakkındaki anlayışımız hızla gelişmiştir. Başlıca nedeni genellikle iskelet kası, karaciğer ve yağ dokusunda ortaya çıkan insülin direnciyle birlikte pankreas β -hücreleri tarafından bozulmuş insülin salgılanmasıdır (DeFronzo 2009). Hiperglisemi, bireyleri T2DM gelişimine yatkın hale getiren yüksek riskli bir durum olan prediyabetten önce gelir (Abdul-Ghani et al. 2006; DeFronzo 2009). Prediyabet, bozulmuş açlık glukozu (IFG) seviyeleri, bozulmuş glukoz toleransı (IGT) veya artmış glikohemoglobin (HbA1c) seviyeleri ile karakterize edilir. IFG seviyeleri olan bireyler, normalden yüksek ancak diyabet tanısı için kriterleri karşılamayan açlık plazma glukoz seviyeleri ile karakterize edilir. IGT, kaslarda insülin direnci ve bir yemekten sonra bozulmuş geç (ikinci faz) insülin salgılanması ile karakterize edilirken, IFG seviyeleri olan bireylerde hepatik insülin direnci ve bozulmuş erken (birinci faz) insülin salgılanması görülür (Abdul-Ghani et al. 2006). Prediyabetli bireylerin HbA1c seviyeleri %5,7-6,4 arasındadır; patofizyoloji açısından heterojen bir gruba temsil ederler ve klinik olarak çok çeşitlidirler. Prediyabetin

T2DM'ye yıllık dönüşüm oranları yılda %3 ila %11 arasında değişmektedir (Gerstein et al. 2007).

İnsülin, kan glukoz seviyelerini düşürebilen tek hormon olduğu için glukoz dengesinde kritik bir rol oynar. İnsülin salgılanmasındaki sorunlar, tedavi edilmemiş T2DM ile ciddi metabolik bozukluklara yol açar. T2DM genellikle insülin salgılayan β -hücrelerinin sayısındaki azalma ile ilişkilidir, ancak bu azalma insülin salgısındaki bozulmayı tam olarak açıklamamaktadır. Bu nedenle, T2DM'deki insülin içeriğindeki azalma ve hücre fonksiyonlarındaki bozulma üzerine odaklanmak, hastalığın anlaşılması ve tedavi stratejilerinin geliştirilmesi açısından kritiktir. İnsülin salgısının düzenlenmesi ve β -hücrelerinin işlevselliğinin anlaşılması, etkili tedavi yöntemlerinin bulunmasında önemli bir adımdır (Rorsman and Ashcroft 2018).

Diyabetli hastalarda klinik sunum, altta yatan patofizyoloji ve hastalık ilerlemesi bireyler arasında önemli ölçüde farklılık gösterebilir ve zaman zaman semptomların atipik sunumu T2DM'nin net bir şekilde sınıflandırılmasını zorlaştırabilir. Tanı sırasında, T2DM'li birçok hasta asemptomatiktir, diğerleri ise şiddetli hiperglisemi veya hatta diyabetik ketoasidoz ile ortaya çıkar (DeFronzo et al. 2015). Yetişkinlerde latent otoimmün diyabet ve gençlerde olgunluk başlangıçlı diyabet, T2DM gibi görünebilir (Gardner and Tai 2012; Hawa et al. 2013). Asemptomatik bireylerde, prediyabet veya T2DM için test zamanlaması ve sıklığı risk faktörlerinin varlığına veya yokluğuna dayanır (Association 2014). Risk altındaki bireylerde tarama önemlidir çünkü prediyabet yaygındır ve T2DM'li bireylerin yaklaşık %30'u teşhis edilmemiştir. Diyabetin önlenmesi, prediyabeti olan bireylerin belirlenmesini ve yaşam tarzı değişiklikleri (kilo kaybı ve egzersiz) ile antidiyabetik ve antiobezite ilaçları ile müdahaleyi gerektirir (DeFronzo et al. 2015).

T2DM, sürekli tıbbi bakım, anormal glukoz seviyelerinin kontrolü için hastanın kendi kendine yönetimi ve kan glukoz seviyelerini, lipid profillerini ve kan basıncını normalleştirmek, akut ve uzun vadeli mikrovasküler komplikasyonları (retinopati, nefropati ve nöropati dahil) ve makrovasküler komplikasyonları (kalp krizi ve felç gibi) önlemek veya en aza indirmek için çok faktörlü risk azaltma stratejileri gerektiren karmaşık bir kronik hastalıktır. T2DM, çoklu patofizyolojik anormallikler,

komplikasyonlara karşı değişken duyarlılık ve terapötik müdahaleye değişken klinik yanıt içeren heterojen bir bozukluk olarak görülmeli ve tedavi edilmelidir (Garber et al. 2013; Inzucchi et al. 2012; Pozzilli et al. 2010). Sonuç olarak, T2DM için gerçek bir tedavi geliştirilmesi, moleküler etiyolojisinin açıklığa kavuşturulmasını ve obezite salgınıyla mücadele için etkili müdahaleleri gerektirecektir (DeFronzo et al. 2015).

1.1.3. Neonatal Diyabet

Neonatal diabetes mellitus (NDM) 90.000 canlı doğumda 1 görülen nadir bir genetik hastalıktır. Çoğunlukla 6 aylıktan önce ve nadiren 6 ay ile 1 yaş arasında ortaya çıkan, dolaşımda insülin eksikliği veya yetersizliği ile ilişkili şiddetli hipergliseminin varlığı ile tanımlanır. Bu tür hiperglisemi vakaların yaklaşık yarısında geçici insülin tedavisi veya kalıcı insülin tedavisi gerekmektedir. Hastalık iki ana mekanizma grubu ile açıklanmaktadır: birinci durumda insülin salgılayan hücrelerin değiştiği pankreasın malformasyonu söz konusu iken, ikinci durumda mevcut pankreas β -hücresinin gelişimi/sağkalımı veya anormal işlevi ile karakterizedir. Anormal β -hücre işlevine sahip NDM'nin en sık görülen genetik nedenleri 6q24 lokusundaki anormallikler ve pankreas β -hücresindeki potasyum (K^+) kanalını kodlayan ABCC8 veya KCNJ11 genlerinin mutasyonlarıdır. Diğer genler pankreas malformasyonu veya yetersiz β -hücresi gelişimi veya β -hücrelerinin yıkımı ile ilişkilidir. Klinik olarak, ABCC8 veya KCNJ11 mutasyonu olan hastalarla karşılaştırıldığında, 6q24 anormalliği olan hastaların doğum ağırlıkları ve boyları daha düşüktür, tanı ve remisyonda daha gençtirler ve daha yüksek bir malformasyon sıklığına sahiptirler. ABCC8 veya KCNJ11 mutasyonu olan hastaların dikkatlice test edilenlerin hepsinde nörolojik ve nöropsikolojik bozukluklar vardır. Remisyona giren hastaların %86'sı kadarında, genetik kökene bağlı bir fark olmaksızın, ergenliğe ulaştıklarında tekrarlayan diyabet görülür. ABCC8 veya KCNJ11 mutasyonu olan hastaların ve 6q24 anomalisi olanların %90'ı insülin enjeksiyonundan oral sülfonilürelelere başarılı bir şekilde geçiş yapmaya uygundur (Beltrand et al. 2020).

ATP'ye duyarlı potasyum kanalı (K_{ATP} kanalı), pankreas β -hücresinin glukoza yanıt olarak insülin salgılamasını uyarmada merkezi bir rol oynar. Düşük kan şekeri seviyelerinde, K_{ATP} kanalları açıktır ve aktiviteleri hiperpolarize bir dinlenme zar potansiyelini (yaklaşık -70 mV) korur. Kan şekeri seviyesindeki bir artış, glukozun β -

hücresine geçişinde artışa neden olur. Glukoz, hücre içi ATP konsantrasyonunu artıran glikoliz yoluna girer. Bu, K_{ATP} kanallarının kapanmasına (inhibisyon) neden olur ve bu da hücre içi K^+ birikimine yol açarak zar depolarizasyonuna neden olur. Bu depolarizasyon, voltaj bağımlı Ca^{2+} kanallarını aktive ederek Ca^{2+} iyonlarının β -hücresine girmesine, ardından salgı veziküllerinin ekzositozuna ve insülinin kan dolaşımına salınmasına olanak tanır (Beltrand et al. 2020). K_{ATP} kanalı, iki tip alt birimden oluşan bir oktamerdir: Kir6.2 alt birimleri ve SUR1 (Ashcroft and Gribble 1998; Clement et al. 1997). Bunlar sırasıyla KCNJ11 ve ABCC8 genleri tarafından kodlanır. Bu iki genden birindeki mutasyonları aktive etmek, normal pankreas morfolojisine sahip NDM'den sorumludur (Babenko et al. 2006; Gloyn et al. 2004; Vaxillaire et al. 2004). Bunlar K_{ATP} kanalının kalıcı olarak açık kalmasına neden olarak glukoza yanıt olarak membran potansiyelinin kontrol edilememesi ve bu nedenle insülin salınımına yol açan kaskadın engellenmesiyle sonuçlanır (Beltrand et al. 2020).

Çok küçük çocuklardaki diyabet veya NDM, farklı etnik gruplar arasında farklılıklar gösteren nadir bir genetik hastalıktır. Tedavi gerektiren şiddetli hipergliseminin varlığı ile tanımlanır ve neonatal dönem ile bebeklik dönemi arasında görülür. Esas olarak 6 aylıkken, nadiren de 6 ay ile 1 yaş arasında görülür (Busiah et al. 2013). Bu hiperglisemi, dolaşımda yetersiz veya hiç insülin olmaması ile ilişkilidir (Polak and Cavé 2007). Hastalık iki ana mekanizma grubuyla açıklanmaktadır: pankreasın malformasyonu veya insülin salgılayan pankreas β -hücresinin anormal fonksiyonu (Beltrand et al. 2020).

İnsülin bağımlılığının süresine göre NDM'nin iki klinik formu vardır. Geçici formda, tedavi yaşamın ilk haftalarından 5 yaşına kadar herhangi bir zamanda kesilebilir (Busiah et al. 2013). Kalıcı formlarda, yaşam boyu tedavi gereklidir. Geçici ve kalıcı NDM arasındaki klinik fark her zaman farklı moleküler mekanizmalarla desteklenmez. 6q24 lokusunun anormallikleri yalnızca geçici NDM ile bağlantılıdır. Ancak ABCC8, KCNJ11 ve INS genlerinin mutasyonları hem kalıcı hem de geçici formlarla bağlantılıdır (Babenko et al. 2006; Bonnefond et al. 2011; Støy et al. 2007). Diğer genetik nedenler kalıcı NDM ile ilişkilidir. NDM genellikle 6 aylıktan önce teşhis edilir. Ancak, teşhis yaşı genetik nedenlere bağlı olarak değişir, 6q24 lokusundaki bir anormalliğe bağlı diyabet vakaların %93'ünde 1 aylıktan önce ve vakaların %100'ünde 3 aylıktan önce ortaya çıkar.

ABCC8 ve KCNJ11 gen mutasyonlarında, vakaların %30'unda 1 aylıktan önce ve vakaların %66'sında 1 ila 6 ay arasında görülür. Doğumda, hastaların %62'sinde doğum ağırlıkları düşüktür, bu da fetal büyümede insülin salgılanmasının kritik rolünü vurgular. Bu durum intrauterin büyüme geriliği, ABCC8 veya KCNJ11 mutasyonu taşıyanlara göre 6q24 anormalliği olan hastalarda daha büyük bir oranda olmak üzere tüm genetik gruplarda bulunmuştur (Busiah et al. 2013).

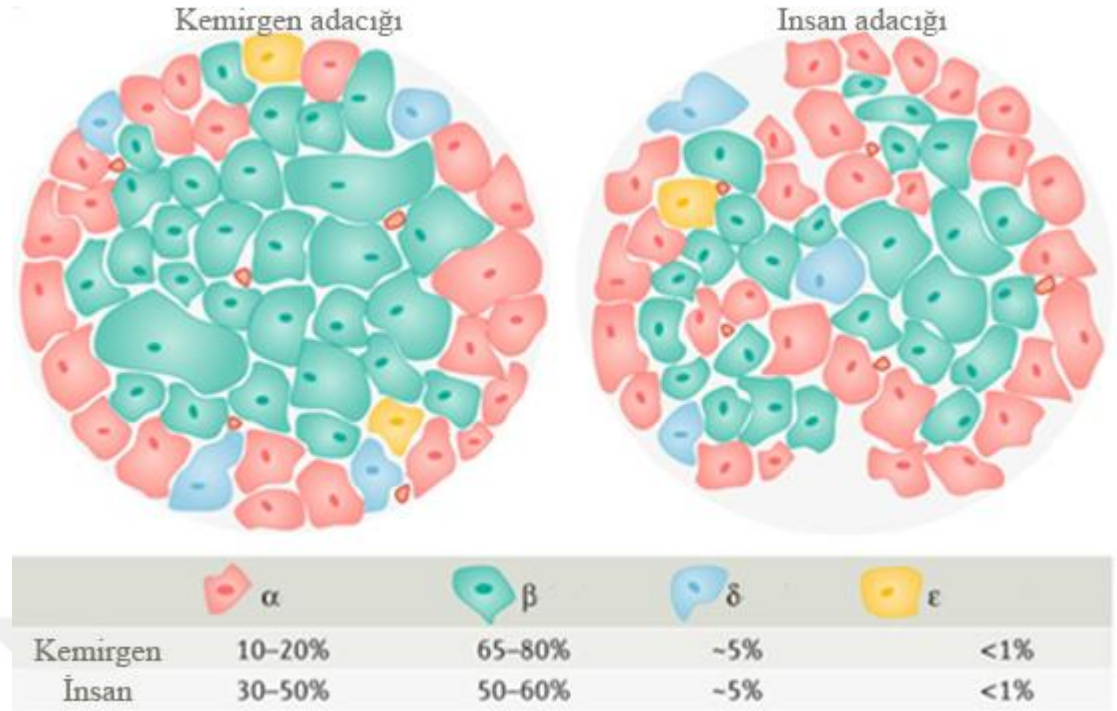
Normal pankreas morfolojisine sahip NDM'de, ilişkili nörolojik bozukluklar ve gelişimsel kusurlar vardır. ABCC8 veya KCNJ11 genlerinde mutasyon olan hastaların yaklaşık %25'inde psikomotor bozukluklardan şiddetli epilepsiyle ilişkili gecikmiş bilişsel gelişime kadar değişen nörolojik bozukluklar vardır (Slingerland et al. 2008). Hastalara detaylı nöropsikomotor ve nöropsikolojik testler uygulandığında, vakaların %100'ünde disleksiye kadar uzanan bir dikkat eksikliği veya dil bozukluğu bulunduğunu gösterilmiştir (Busiah et al. 2013). 6q24 lokus anormalliği olan hastalarda gelişimsel kusurlar (makroglossi, göbek fıtığı, kardiyak malformasyonlar, renal ve üriner malformasyonlar, otoimmün olmayan anemi, hipotiroid) ve nörolojik bozukluklar olabilir (Busiah et al. 2013; Docherty et al. 2013). Anormal pankreas morfolojisi veya β -hücre yıkımı olan NDM'de, ilişkili malformasyonlar genetik nedenlere bağlıdır ve sıklıkla tanımlanmış sendromlar halinde gruplandırılır (Beltrand et al. 2020).

NDM, pankreas β -hücresinin gelişimi ve işlevinin anlaşılmasında ve T2DM gibi daha sık görülen yetişkin diyabetinin patofizyolojisinin çözülmesine yardımcı olan nadir bir insan genetik hastalığı modelidir. NDM genellikle altta yatan genetik nedenlerin spesifik nöropsikolojik veya gelişimsel bozukluklarıyla ilişkilidir. Bu nedenle multidisipliner bir yaklaşım esastır. Bu hastalığın doğal geçmişi ve tam fenotipini bilmek, öncelikle hastalara daha iyi tedavi sunmayı ve ikinci olarak diğer organların gelişimi ve işlevinde yer alan genetik analizlerin kapsamını genişletmeyi mümkün kılar. NDM'nin geçici formları da dahil olmak üzere uzun dönemli takibi gerekmektedir (Beltrand et al. 2020).

1.2. Pankreas Adacıkları

Pankreas adacıkları, pankreasın ekzokrin dokusuna gömülü endokrin yapılar olup, özellikle kuyruk bölgesinde yoğunlaşmış haldedir. Optik projeksiyon tomografisi ile yapılan ölçümlere göre, 8 haftalık bir farede yaklaşık 1.100 adacık bulunduğu ve ortalama adacık hacminin 100 pl olduğu hesaplanmıştır. Her adacığın yaklaşık 80 hücre içerdiği tahmin edilmekte, bu sayı genellikle kabul edilen 1.000 hücre/adacık değerinden oldukça küçüktür. Adacıkların %10'u toplam hücre hacminin %50'sini oluşturur ve deneylerde kullanılan büyük adacıklara denk gelir. İnsan pankreasında ise yaklaşık 1 milyon adacık bulunur ve her biri ortalama 200 hücre içerir (Alanentalo et al. 2007; Hellman 1959; Rorsman and Braun 2013).

Olgun pankreas adacıkları insülin, glukagon ve somatostatin salgılayan çeşitli endokrin hücre tiplerinden oluşur. İnsan adacıklarındaki hücrelerin %50'si insülin salgılayan, farede bu oran %75'tir. İnsan adacıklarında glukagon salgılayan hücreler %35-40, farede %15-20 oranındadır. Somatostatin salgılayan hücreler ise insanda %10-15, farede %5'tir. Az sayıda pankreas polipeptit (PP) salgılayan hücre de bulunur. Fare adacıkları basit bir çekirdeğe sahipken, insan adacıkları daha karmaşık bir mimariye sahiptir. Her iki türde de hücreler parakrin etkileşimlerle birbirleriyle iletişim halindedir ve bu, adacık işlevini etkileyebilir (Bosco et al. 2010; Cabrera et al. 2006). Pankreas adacıklarının genel yapısı Şekil 1.1'de gösterilmiştir.



Şekil 1.1. Pankreas adacıklarının genel yapısı (Campbell and Newgard 2021)'den değiştirilerek alınmıştır.

Pankreas, dalak atardamarından zengin bir kan kaynağı alır ve adacıklar portal yerine sistemik glukoz konsantrasyonuna maruz kalır. Adacıklar pankreasın %1-2'sini oluştursa da kan akışının %20'sini alır. Fare pankreasında kan akışı 0,1-0,4 ml/dk, insan pankreasında ise 60-80 ml/dk olarak tahmin edilmektedir. Pankreas adacıkları yoğun sinir ağıyla güçlendirilir, ancak fare adacıklarında sinirler endokrin hücrelerle doğrudan temas ederken, insan adacıklarında sinirler daha seyrek olup genellikle düz kaslarla temas eder. Bu, insan adacıklarının otonomik düzenlenmesinin dolaylı olabileceğini gösterir (Rorsman and Ashcroft 2018).

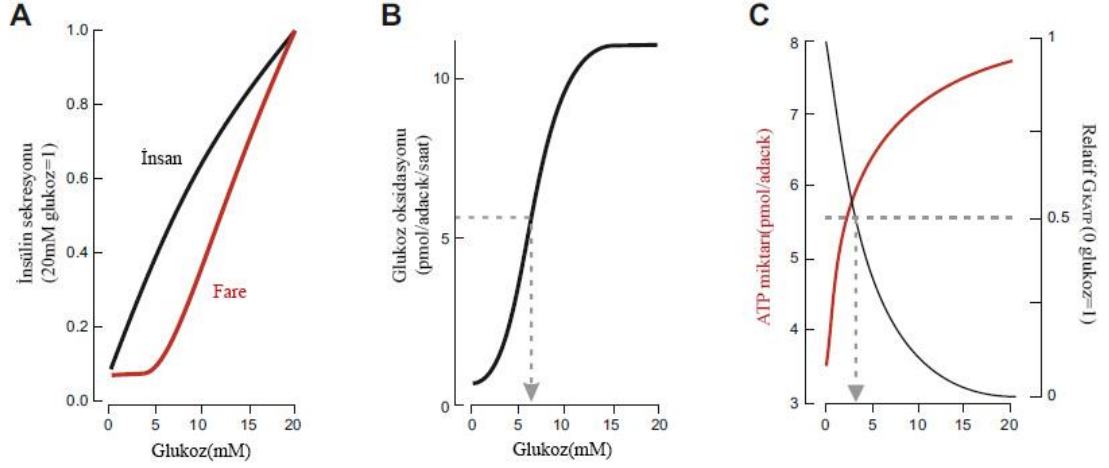
1.3. β -Hücresi

β -hücreleri, tüm türlerde pankreas adacıklarının ana bileşenidir. Ortalama 13–18 μ m çapında (Göpel et al. 1999) poligonal hücrelerdir ve her biri 8–9 petagram insülin içeren yaklaşık 10.000 salgı granülüne sahiptir (Olofsson et al. 2002). Bu, yaklaşık 100 mM'lik bir intragranüler insülin konsantrasyonuna karşılık gelir (Huang et al. 1995; Rorsman and Renström 2003).

İnsülin, salgı veziküllerinde Zn_2 -insülin₆ kompleksi olarak kristalin formda depolanır ve β -hücresinin toplam protein içeriğinin %5–10'unu oluşturur, bu da diğer tüm proteinlerden daha fazla bir miktara denk gelir. Düzenlenmiş ekzositozla salınır. Salgı granüllerinin sadece küçük bir kısmı (<%1/saat) yüksek glukoz konsantrasyonlarında bile ekzositoza uğrar (Rorsman and Renström 2003). Fare hücrelerindeki insülin granülleri tipik olarak kızarmış yumurta görünümüne sahipken, insülin çekirdeği insan hücrelerinde daha düzensizdir. İnsan β -hücreleri ayrıca hücrenin yaşını tahmin etmek için kullanılabilen lipofusin cisimcikleri (aşınma ve yıpranma pigmentleri) içerir (Cnop et al. 2010).

1.4. Glukoz Alımı ve Metabolizması

İnsan adacıklarında insülin salgılanması 3 mM'e kadar düşük glukoz konsantrasyonlarında tespit edilebilir (Braun et al. 2010; Doliba et al. 2012; Henquin et al. 2006), bu da fare adacıklarındaki salgılanma eşiğinden (~5 mM (Hedekov 1980)) önemli ölçüde düşüktür. Bu durum, insanlarda daha düşük açlık plazma glukoz konsantrasyonu (4–5 mM'ye karşı farelerde 7–10 mM) ilişkilidir (Frayn 2010; Li et al. 2009; Remedi et al. 2011). Muhtemelen, insan adacıkları diyabetik farelere nakledildiğinde, plazma glukozunu insanların normal, açlık dışı glukoz konsantrasyonunda kontrol ettikleri için içsel hücre özelliklerindeki farklılıkları yansıtır (Ricordi et al. 1991). Hem fare hem de insan adacıklarında insülin sekresyonu 10-12 mM glukozda yarı maksimumdur ve 20 mM'nin üzerindeki glukoz konsantrasyonlarında doygunluğa ulaşır. Glukoz uyarılı insülin salınımı (GSIS), hem fare hem de insan adacıklarında iki aşamalı bir zaman akışı izler. Glukozda ani bir artış, başlangıçta geçici bir yanıt olan birinci faz salınımına yol açar ve ardından daha yavaş ve kademeli bir insülin salınımı artışı (ikinci faz salınımı) izler (Nesher and Cerasi 2002) (Şekil 1.2).



Şekil 1.2. A. İzole edilmiş fare (kırmızı) ve insan (siyah) statik inkübasyonlarında glukoz konsantrasyonu ile insülin salgılanması arasındaki ilişki. B. İzole edilmiş fare adacıklarında glukoz konsantrasyonu ile şekerin oksidatif metabolizması arasındaki ilişki. C. Glukoz konsantrasyonu ile ATP içeriği (kırmızı) ve izole edilmiş fare adacıklarında β -hücrelerinin tüm hücre K_{ATP} kanal iletkenliği (GK, ATP: 0 mM glukozdaki iletkenliğe normalize edilmiştir) arasındaki ilişki. (Rorsman and Ashcroft 2018)’den değiştirilerek alınmıştır.

1.4.1. Glukoz Alımı

Glukoz, β -hücrelerine kolaylaştırılmış difüzyon yoluyla taşınır. Farelerde bu işlem, glukozu düşük afinitesi (yani, yüksek K_m 'ye sahip) ve yüksek taşıma kapasitesi olan GLUT2 tarafından gerçekleştirilir (Thorens 2015). Bu, hücre içi glukozun hücre dışı ortamla hızlı bir şekilde dengelenmesini sağlar ve glukoz alımının glikolitik akış için hız sınırlayıcı olmamasını garanti eder. İnsan β -hücrelerinde ise, temel glukoz taşıyıcılarını GLUT1 oluşturur (Heimberg et al. 1995; McCulloch et al. 2011). Bu taşıyıcı, GLUT2'den (11 mM) daha düşük bir K_m 'ye (6 mM) sahiptir (McCulloch et al. 2011), bu da insülin salınımının insan adacıklarında fare adacıklarına (6 mM) göre daha düşük glukoz konsantrasyonlarında (3 mM) başlatılmasının nedenini açıklayabilir. Bununla birlikte, GLUT2 sadece insan β -hücrelerinde ifade edilmekle kalmaz, aynı zamanda işlevsel bir rol oynadığı düşünülmektedir, çünkü GLUT2'de homozigot fonksiyon kaybı mutasyonlarına sahip hastalar geçici NDM geliştirirler (Sansbury et al. 2012). Ayrıca, insan β -hücrelerinde bile glukoz alımı, glukoz metabolizması için hız sınırlayıcı değildir (Lenzen 2014).

Gen ifadesi (RNAseq) verileri, insan β -hücrelerinin Na^+ bağımlı glukoz taşıyıcıları SGLT1 ve 2'yi (SLC5A1 ve SLC5A2) ifade ettiğini, ancak GLUT1 için bulunandan önemli ölçüde daha düşük seviyelerde ifade ettiğini göstermektedir (Blodgett et al. 2015). Buna karşılık, SGLT'lerin hiçbirisi fare β -hücrelerinde önemli miktarlarda ifade edilmemektedir (Benner et al. 2014).

1.4.2. Glukoz Metabolizması

Glukoz metabolizması, glukozun fosforilasyonu ile başlar; bu reaksiyon, glukokinaz (Gck; ayrıca heksokinaz IV olarak da bilinir) enzimi tarafından katalize edilir (Bonner et al. 2015). Heksokinazın aksine, Gck glukoz-6-fosfat tarafından ürün inhibisyonuna tabi değildir (Matschinsky 2002). Ayrıca glukozu çok daha düşük bir afinitesi vardır; Gck aktivitesi, fare adacıklarında 8 mM ve insan adacıklarında 4 mM'de yarı maksimaldir (heksokinaz 1 mM glukozda yarı maksimaldir). Glukozun fosforilasyonu, insülin salgılanmasında hız sınırlayıcı adımdır ve Gck'deki fonksiyon kaybı mutasyonları GSIS'ı bozar. Heterozigot mutasyonlar olgunlukta başlayan genç diyabetine (Mody), homozigot mutasyonlar ise NDM'ye yol açar (Gloyn et al. 2004). Benzer şekilde, farelerde glukokinazın nakavtı hiperglisemiye neden olur ve son aşamada ölümcüldür (Terauchi et al. 1995). Gck'nin GSIS'daki kritik rolü, enzimin inhibitörleri ve aktivatörlerinin etkileriyle de gösterilmiştir. Örneğin, Gck inhibitörü mannoheptüloz, GSIS'ı güçlü bir şekilde baskılar (Randle 1993); tersine, glukokinaz aktivatörleri GSIS'ı uyarır (Johnson et al. 2007). Gerçekte Gck aktivatörü piragliatin, T2DM donörlerinden izole edilen adacıklardaki GSIS'ı, diyabetik olmayan donörlerden izole edilen adacıklardakine benzer seviyelere geri getirir (Doliba et al. 2012).

GLUT2 ve Gck'nin ortak etkileri, glukoz konsantrasyonu arttıkça β -hücrelerinde glukoz metabolizmasının hızının belirgin bir şekilde artmasına neden olur. Bu nedenle, glukozun 1 mM'den 10 mM'ye yükseltilmesi, kemirgen β -hücrelerinde glukoz metabolizma hızında 10 kat artışa yol açar (Ashcroft and Rorsman 2013) (Şekil 1.2B).

β -hücreleri, kan glukoz seviyesindeki artışın hücre içi ATP düzeylerinin yükselmesine yol açması bakımından sıra dışıdır. Bu durum, K_{ATP} kanalı aktivitesini inhibe eder ve böylece membran depolarizasyonu, elektriksel aktivite ve insülin

salınımını tetikler. Glukoz kaynaklı hücre içi ATP artışı, 3 mM glukozda yarı maksimaldir ve yaklaşık 20 mM’de doygunluğa ulaşır (Şekil 1.2C). Bu glukoz bağımlılığı, glukozun K_{ATP} kanallarının kapanmasını tetiklemesiyle karşılaştırılabilir (Şekil 1.2C), ancak insülin salgılanmasından çok daha düşüktür (Şekil 1.2A). ATP üretiminin önemli bir yönü, K_{ATP} kanallarının kapanması ve β -hücrelerinde elektriksel aktivitenin başlaması yoluyla $[Ca^{2+}]_i$ seviyesinin artmasına yol açmasıdır. Bu durum, mitokondriyal matristeki kalsiyumun ($[Ca^{2+}]_m$) yükselmesine neden olur (Tarasov et al. 2012) ve oksidatif mitokondriyal metabolizmayı uyarır (Maechler et al. 1998). Mitokondriye Ca^{2+} taşınması, mitokondriyal Ca^{2+} uniporterleri (MCU) tarafından sağlanır ve β -hücrelerinde MCU’nun susturulması, glukoz tarafından üretilen hücre içi ATP/ADP artışını azaltır (Tarasov et al. 2013).

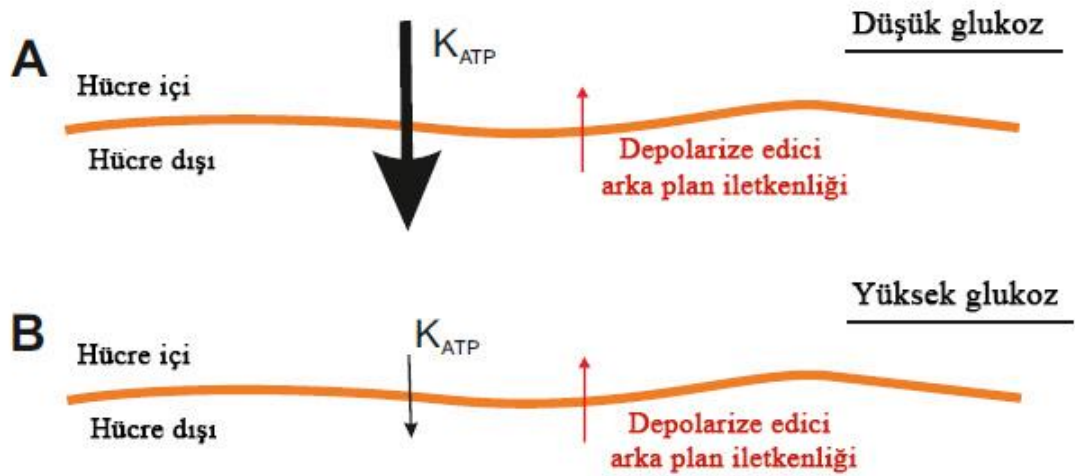
β -hücre metabolizması hakkında bilinenlerin çoğu kemirgen çalışmalarından elde edilmiştir, insan adacıkları ve özellikle T2DM’li β -hücreleri hakkında çok az veri mevcuttur. Diyabetik olmayan donörlerden alınan adacıklarda, glukoz 1 mM’den 6 mM’ye yükseltildiğinde glukoz oksidasyon hızı üç kat artar, ancak glukozun 12 mM’ye veya daha yüksek bir seviyeye çıkarılmasıyla sadece %25’lik küçük bir ek hızlanma gözlenir. Şaşırtıcı bir şekilde, fare β -hücrelerinden farklı olarak, glikolize giren glukozun yalnızca bir kısmı Krebs döngüsüne ilerler (Doliba et al. 2012). Bu bulgunun önemi henüz tam olarak anlaşılamamıştır.

1.5. β -Hücrelerinin Elektriksel Aktivitesi

Endodermal kökenli olmasına rağmen, β -hücreleri sinir hücreleriyle pek çok ortak özelliği paylaşır, bunlar arasında elektriksel uyarılabilirlik de bulunur. Membran potansiyelindeki değişiklikler, kan glukoz konsantrasyonundaki dalgalanmaları insülin salgılamasına bağlar (Drews et al. 2010; Henquin and Meissner 1984). Glukoz bağımlı insülin salgılaması ile hücrenin aksiyon potansiyelleri ürettiği zaman yüzdesi arasında yakın bir korelasyon vardır (Meissner and Atwater 1976). Bu durum, voltaj kapılı Ca^{2+} kanalları (VGCC) aracılığıyla Ca^{2+} girişinin, insülin eksositozu için gerekli olmasından kaynaklanır (Eliasson et al. 2008).

1.5.1. Membran Direncinin Önemi

Membran akımı, membranda bulunan tüm iyon kanallarının toplam aktivitesini temsil eder; iyon kanallarının aktivitesi ne kadar fazlaysa, membran akımı o kadar büyük olur. Bu akımın membran iletkenliğiyle olan ilişkisi Ohm yasasıyla açıklanır. Ohm yasasına göre, iletkenlik (G), akım (I) ile potansiyel (V) arasındaki bölme işlemi ile bulunur, yani $G = I/V$. Direnç (R) ise iletkenliğin tersidir. Bu nedenle, aynı akım büyüklüğü için, membran potansiyelinde meydana gelen değişim, membran iletkenliğine bağlıdır, iletkenlik küçük olduğunda değişim daha büyük, iletkenlik düşük olduğunda ise daha az olur. Bu durum, küçük bir arka plan içe akımının, K_{ATP} kanalları açık olduğunda β -hücresini depolarize edememesini, ancak kanallar çoğunlukla kapalı olduğunda bunu başarabilmesini açıklar (Rorsman and Ashcroft 2018). Düşük ve yüksek glukozda K_{ATP} kanal aktivitesinin değişimi Şekil 1.3'te gösterilmiştir.



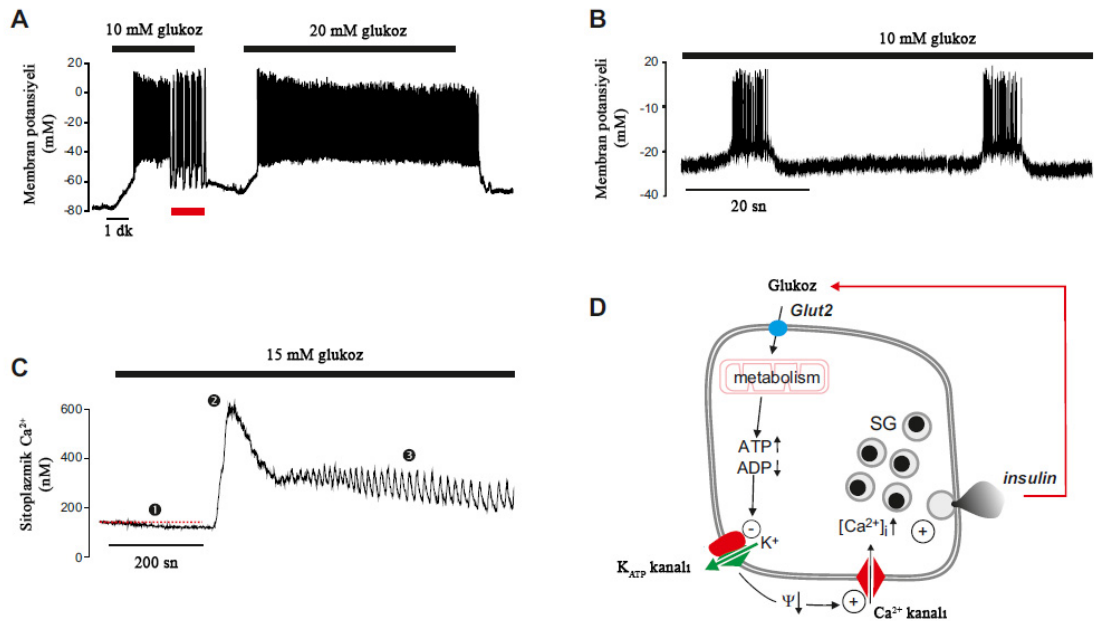
Şekil 1.3. Düşük (A) ve yüksek (B) glukozda K_{ATP} kanal aktivitesinin değişimi (Rorsman and Ashcroft 2018)'den değiştirilerek alınmıştır.

1.5.2. Elektriksel Aktivite: Fare β -Hücreleri

Uyarıcı olmayan glukoz konsantrasyonlarında, fare β -hücresi hiperpolarize ve elektriksel olarak sessizdir. Zar potansiyeli -80 mV kadar negatif olabilir, bu da saf K iletkenliği için öngörülen değere yakındır. Glukozu 5 mM'ye çıkarmak β -hücresini yaklaşık -60 mV'ye depolarize eder. Ancak, glukoz konsantrasyonu 6 mM'yi geçene

1. GİRİŞ

kadar elektriksel aktivite ortaya çıkmaz, bu da zarı -60 ile -50 mV (elektriksel aktivite eşiği) arasına depolarize eder. Fare β -hücreleri, oldukça belirgin bir glukozla bağlı elektriksel aktivite örüntüsüne sahiptir. 6 ile 20 mM arasındaki glukoz konsantrasyonlarında, bu depolarize bir plato üzerine bindirilmiş ve repolarize elektriksel olarak sessiz aralıklarla ayrılmış kısa ömürlü aksiyon potansiyeli patlamalarından oluşur. Bu aktivite örüntüsü bazen yavaş dalga aktivitesi olarak adlandırılır (Şekil 1.4, A ve B). 10 mM glukozda, aktif ve sessiz fazlar sırasıyla 5-10 saniye ve 10-20 saniye sürer ve dakikada 2-4 patlama olur (Drews et al. 2010; Henquin and Meissner 1984; Rorsman et al. 2011). Aksiyon potansiyelinin zirvesi genellikle 0 mV'u geçmez (Drews et al. 2010; Zhang et al. 2014). Genişliği biraz değişkendir ancak 20 mM glukozda, -20 mV'un (insülin granül ekzositozu ilk olarak tespit edilebilir hale geldiği voltaj (Göpel et al. 2004)) üzerinde harcanan zaman ~ 30 ms'dir (Hoppa et al. 2009). Artan glukoz konsantrasyonları, ateşlemenin genellikle ~ 20 mM glukozun üzerinde sürekli hale gelmesine kadar repolarize aralıklar ile patlama süresinde kademeli bir artışa neden olur (Drews et al. 2010; Henquin and Meissner 1984).



Şekil 1.4. Akut olarak izole edilmiş sağlam bir fare adacığındaki bir β -hücrelerinden glukoz konsantrasyonu 1 mM'den 10 veya 20 mM'ye çıkarıldığında kaydedilen glukoz kaynaklı elektriksel aktivite (Rorsman and Ashcroft 2018)'den değiştirilerek alınmıştır.

Elektriksel aktiviteye sitoplazmik serbest Ca^{2+} (Şekil 1.4C) değişiklikleri eşlik eder ve bu da sırayla salınımlı insülin salgılanmasını yönlendirir (Gilon et al. 1993;

Valdeolmillos et al. 1989). Glukoz, $[Ca^{2+}]_i$ 'de başlangıçta küçük bir düşüşten oluşan üç fazlı bir tepkiyi tetikler, ardından başlangıçta bir tepe ve ardından $[Ca^{2+}]_i$ 'deki küçük salınımların üst üste geldiği sürekli bir alt plato oluşturur. β -hücreleri elektriksel olarak bağlandıkça, elektriksel aktivite ve $[Ca^{2+}]_i$ 'deki değişiklikler adacık boyunca eşzamanlı bir şekilde yayılır ve "dalga" adacıkta bir bölümde başlatılır ve ardından hafif bir gecikmeyle diğer bölümlere yayılır (Eddlestone et al. 1984; Meda et al. 1984; Santos et al. 1991). Elektriksel aktivite eşiğinin hemen üzerindeki glukoz konsantrasyonlarında (~ 6 mM), β -hücrelerinin yalnızca %7'si $[Ca^{2+}]_i$ salınımları sergiler (Zhang et al. 2014), ancak glukoz konsantrasyonu arttıkça aktif β -hücrelerinin oranı artar. Bu nedenle, her β -hücresinin glukozu kademeli bir şekilde yanıt verme kapasitesi olmasına rağmen, adacıkların glukozu yanıtı da artan sayıda β -hücresinin toplanmasından kaynaklanır (Hibino et al. 2010; Low et al. 2013).

Glukozun elektriksel aktiviteyi başlattığı ve insülin salgılanmasını uyardığı mekanizmalar iyi anlaşılmıştır. K_{ATP} kanalları düşük glukozda kendiliğinden aktif olduğunu ve bu kanallar aracılığıyla pozitif yüklü K^+ 'nin dışarı akışının uyarılmamış hücrenin negatif membran potansiyelini oluşturduğunu ileri sürer. Glukoz, GLUT2 taşıyıcısı aracılığıyla β -hücrelerine girer ve bunun sonucunda metabolik olarak parçalanması ADP'ye oranla artan ATP oluşumuna yol açar. Bu durum K_{ATP} kanallarının kapanması, membran depolarizasyonu ve elektriksel aktivitenin başlamasıyla sonuçlanır. Aksiyon potansiyelinin ateşlenmesi VGCC'nin açılmasına ve bunun sonucunda $[Ca^{2+}]_i$ 'deki artışa, nihayetinde ise insülin granüllerinin ekzositozuna neden olur. İnsülin, kan dolaşımı yoluyla hedef organlarına glukoz alımını aktive eder ve böylece plazma glukozunu düşürür. Sonuç olarak, β -hücresi tarafından glukoz alımı azalır, glukoz metabolizması yavaşlar, K_{ATP} kanalları yeniden aktive olur ve insülin salgılanması durur. Bu mekanizma, plazma glukozundaki değişiklikler yoluyla insülin salgılanmasının geri bildirim ile düzenlemesini sağlar (Rorsman and Ashcroft 2018).

1.5.3. Elektriksel Aktivite: İnsan β -Hücreleri

İnsan β -hücrelerinde glukoz kaynaklı elektriksel aktivitenin özellikleri hakkında çok daha az bilgi bulunmaktadır. Sadece birkaç kayıt vardır ve izolasyon biçimi nedeniyle çalışmalar doku kültüründe tutulan hücreler/adacıklarla sınırlıdır. Farelerdeki benzerleri

gibi, insan β -hücreleri de düşük glukoz seviyelerinde hiperpolarize olur (-70 mV) ve elektriksel olarak sessizdir (Gilon et al. 1993; Misler et al. 1992). Glukoz, konsantrasyona bağlı bir şekilde depolarizasyona neden olur ve membran potansiyeli -60 mV'yi aştığında elektriksel aktivite ve insülin sekresyonu başlar. Fare adacıklarında olduğu gibi, aksiyon potansiyelleri genellikle patlamalar halinde gruplanır, ancak bu patlamalar daha kısa (~2 saniye) ve fare adacıklarına göre daha siktir. İnsan β -hücrelerinin aksiyon potansiyelleri, fare β -hücrelerine göre daha negatif bir membran potansiyelinden tetiklenir (-60 mV yerine -50 ila -40 mV) ve genellikle aşırı yükselir, potansiyeller 0 mV'nin üzerinde zirve yapar (Rorsman and Braun 2013).

Glukoz konsantrasyonu arttıkça, β -hücresi kademeli olarak daha fazla depolarize olur, aksiyon potansiyeli genliği yavaşça azalır ve 11 mM ve üzeri glukoz seviyelerinde sürekli ateşleme başlar. İnsan β -hücrelerindeki elektriksel aktivitenin belirgin bir özelliği, hızla başlasa da düşük glukozu geri dönüldüğünde yavaşça tersine dönmesidir; 22 mM glukozu maruz kaldıktan sonra bu süreç 30 dakika kadar sürebilir. β -hücresi repolarize olmaya başladığında, aksiyon potansiyeli genliği de artar. Bu durum, yüksek (20 mM ve üzeri) glukoz konsantrasyonlarına maruz kalındığında insülin salgısındaki geçici bir artışla ilişkilidir. Bu mekanizma tam olarak bilinmemekle birlikte, yüksek glukoz uyarımı sırasında β -hücrelerinde depolanan glikojenin mobilizasyonunu yansıtabilir (Doherty and Malaisse 2001; Henquin et al. 2015).

İnsan β -hücrelerinde glukoz kaynaklı $[Ca^{2+}]_i$ salınımları gözlemlense de, fare adacıklarına kıyasla bu salınımlar insan adacıkları arasında daha az senkronizedir (Cabrera et al. 2006). Bu, insan β -hücreleri arasındaki elektriksel bağlantının daha zayıf olabileceğini gösterir, muhtemelen fare ve insan adacıklarının farklı yapısından kaynaklanmaktadır. Fare adacıkları, elektriksel olarak bağlı β -hücrelerinden oluşan merkezi bir çekirdeğe sahipken, insan adacıkları β -hücrelerinin farklı alt bölgelerde organize olduğu ve bu bölgelerin arasında β -hücresi olmayan hücrelerle elektriksel olarak izole olduğu bir yapıdadır. Bu alt bölgelerde senkronize $[Ca^{2+}]_i$ salınımları kaydedilebilir. Glukoz ve sülfonilüreler, farelerde olduğu gibi insan β -hücrelerinde de elektriksel aktivitenin gerçek başlatıcılarıdır. Amino asitler (arjinin ve glisin), nörotransmitterler (adenin nükleotidleri, GABA ve asetilkolin) ve hormonlar da elektriksel aktiviteyi ve insülin salınımını uyartabilir, ancak sadece belirli bir glukoz konsantrasyonunda bu durum

gerçekleşir. Epinefrin ve somatostatin ise geçici repolarizasyona ve glukoz kaynaklı elektriksel aktivitenin baskılanmasına yol açar (Cabrera et al. 2006; Rorsman and Ashcroft 2018).

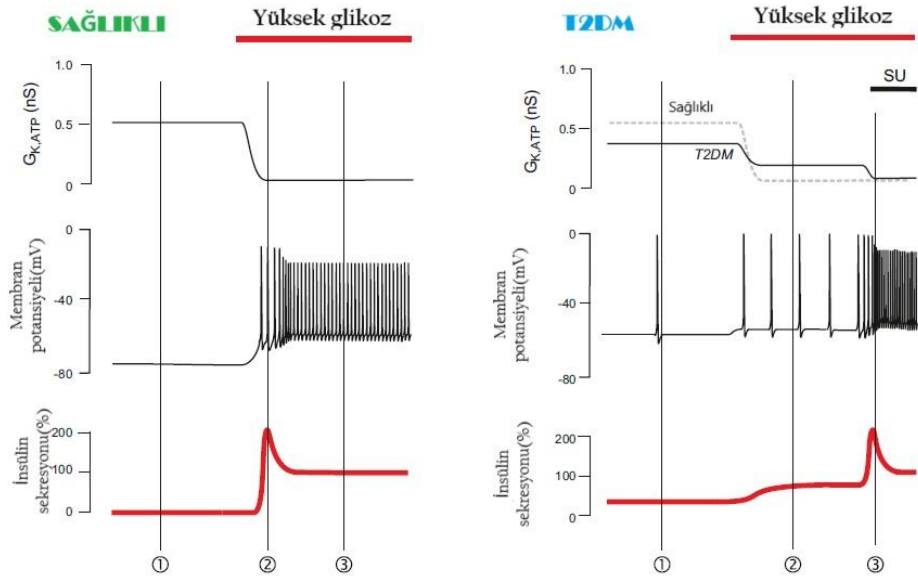
1.6. İyon Kanalları

Hem fare hem de insan β -hücrelerinde, elektriksel aktivite voltaja bağlı ve voltajdan bağımsız iletkenlikler arasındaki karmaşık bir etkileşimden kaynaklanır. Dinlenme halinde (yani düşük glukoz varlığında) aktif olan iyon kanalları, glukozla bağlı depolarizasyona neden olan kanallar ve son olarak aksiyon potansiyeli ateşlemesinde ve patlamasında yer alan voltaj kapılı iyon kanalları bu sınıftadır (Rorsman and Ashcroft 2018).

1.6.1. ATP-Duyarlı K^+ Kanalı

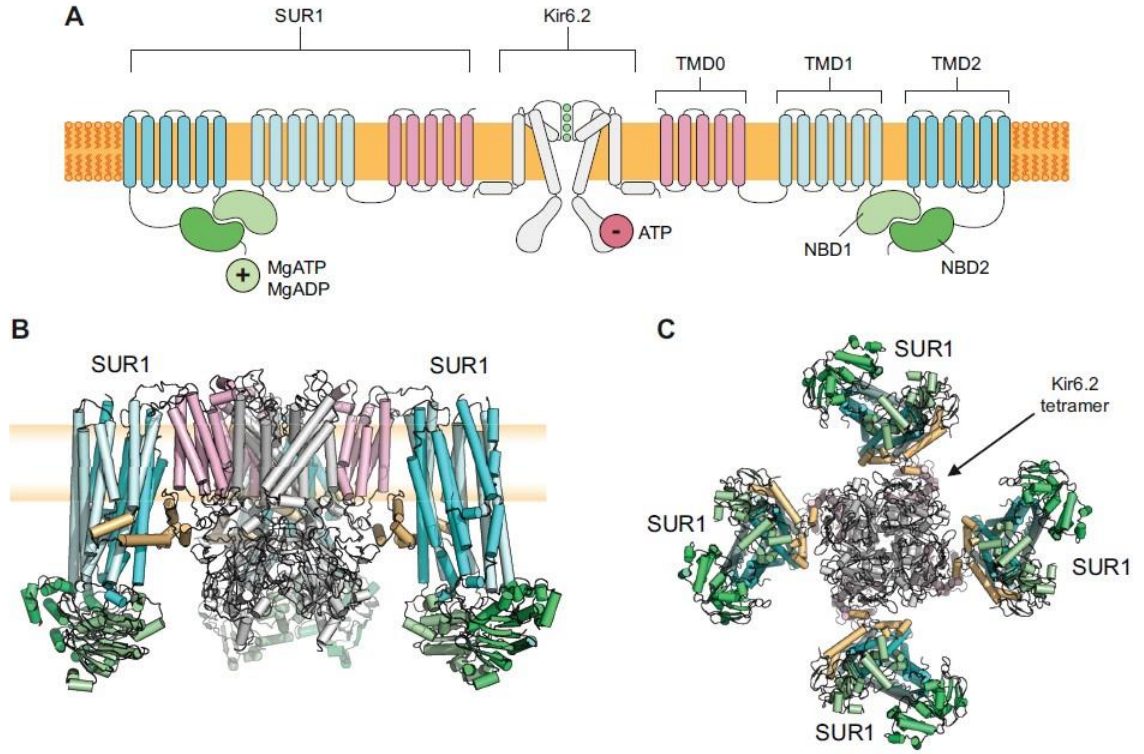
K_{ATP} kanalı, tüm türlerde β -hücrelerinde dinlenme durumunda açık olan baskın iyon kanalıdır. Bu nedenle, β -hücresi glukoz yokluğunda hiperpolarize olur ve zar potansiyeli K^+ denge potansiyeline yakın olan K_{ATP} akımının ters potansiyeline yaklaşır. Glukoz metabolizması, K_{ATP} kanalını kapatır, böylece β -hücresinin depolarize olmasına ve β -hücrelerinin elektriksel aktivitesinin, Ca^{2+} girişinin ve insülin salınımının başlamasına neden olur (Ashcroft et al. 1984; Rorsman and Trube 1985).

Kanalın metabolik düzenlemesi, ATP ve magnezyum ADP(MgADP)'nin hücre içi konsantrasyonlarındaki değişikliklerle sağlanır; ATP kanalın inhibisyonuna, MgADP ise stimülasyonuna yol açar (Cook and Hales 1984; Dunne and Petersen 1986; Kakei et al. 1986). Kanalın adı, bu karakteristik nükleotid düzenlemesinden türetilmiştir. K_{ATP} kanal genlerindeki mutasyonlar, insülinin aşırı veya az salınımına yol açar. K_{ATP} kanalı ayrıca, 60 yılı aşkın süredir T2DM tedavisinde kullanılan sülfonilüre ilaçlarının moleküler hedefidir (Henquin 1992) (Şekil 1.5). Bu nedenle, insülin salınımı için kritik öneme sahiptir.



Şekil 1.5. Sağlıklı ve T2DM hücrelerinde K_{ATP} kanal aktivitesinin, membran potansiyelinin ve insülin salgılanmasının şematik gösterimi (Rorsman and Ashcroft 2018)’den değiştirilerek alınmıştır.

K_{ATP} kanalının başarılı klonlanması ve moleküler karakterizasyonu, kanalın dört adet por oluşturan Kir6.2 ve dört adet düzenleyici SUR1 alt biriminden oluşan bir oktamerik kompleks olduğunu ortaya koymuştur (Aguilar-Bryan et al. 1998; Inagaki et al. 1995; Sakura et al. 1995). Membran topolojileri Şekil 1.6A’da gösterilmiştir. Kir6.2 (Kcnj11/KCNJ11), içe doğru doğrultucu (KIR) K^+ kanal ailesinin bir üyesidir, ancak yalnızca zayıf bir doğrultma gösterir. ATP (veya ADP) bağlanması Kir6.2’yi inhibe eder (Tucker et al. 1997).



Şekil 1.6. K_{ATP} kanalının yapısı (Rorsman and Ashcroft 2018)'den değiştirilerek alınmıştır.

SUR1 (ABCC8), ATP bağlama kaset taşıyıcı ailesine aittir (Aguilar-Bryan et al. 1995), ancak çoğu diğer ABC taşıyıcısının aksine, bilinen bir taşıyıcı fonksiyonu yoktur. Bunun yerine Kir6.2 porlarının aktivitesini düzenler ve bu porlara inhibitör sülfonilüre ilaçlarına, diazoksit gibi K⁺ kanal açıcılarına ve Mg-nükleotidlerin uyarıcı etkilerine karşı duyarlılık kazandırır (Aguilar-Bryan et al. 1995; Gribble et al. 1997a; Shyng et al. 1997; Tucker et al. 1997). Kanalın metabolik düzenlemesi, adenin nükleotidlerinin hem Kir6.2 (4 bölge) hem de SUR1 (8 bölge) ile etkileşimlerini içerir. Her iki alt birim de kanalın plazma membranına doğru şekilde taşınması için gereklidir (Zerangue et al. 1999).

K_{ATP} kanal kompleksinin yapısı, SUR1 alt birimlerinin merkezi bir tetramerik Kir6.2 por etrafında düzenlendiğini ortaya koymaktadır (Li et al. 2017; Martin et al. 2017; Mikhailov et al. 2005) (Şekil 1.6B ve C). Her bir SUR1, Kir6.2'nin ilk transmembran domaini ile etkileşime giren NH₂ terminal transmembran domain (TMD0) aracılığıyla bir Kir6.2'ye bağlanır. Diğer ABC proteinlerinde olduğu gibi, SUR1 iki sitoplazmik nükleotid bağlama domaini (NBD) içerir ve bunlar uç uca dizilmiş bir dimer halinde düzenlenmiştir. Bu bölgeler, ara yüzeyde iki nükleotid bağlama alanı (NBS1 ve NBS2)

1. GİRİŞ

oluşturur (Şekil 1.6A). SUR1'in NBS2'sine MgADP bağlanmasının, kanalın açık kalmasını artırdığı düşünülmektedir (Rorsman and Ashcroft 2018).

Sağlam bir hücrede, K_{ATP} kanalının aktivitesi nükleotitlerin uyarıcı ve baskılayıcı etkileri arasındaki denge ile belirlenir. Hücre içi ATP (veya ADP), Mg^{2+} gerektirmeyen bir reaksiyonla Kir6.2'ye bağlanarak K_{ATP} kanalını inhibe eder. İzole edilen hücrelerde, Mg^{2+} yokluğunda ATP inhibisyonu yarı maksimum düzeyde $\sim 10 \mu M$ 'de gerçekleşir, ancak Mg^{2+} varlığında SUR1 üzerinden Mg-nükleotit uyarımı nedeniyle bu değer 20-30 μM 'ye çıkar. Bu nükleotit duyarlılığı, β -hücredeki dinlenme ATP konsantrasyonlarında (0.5-6 mM) K_{ATP} kanalının sürekli kapalı olması gerektiğini düşündürse de, durum böyle değildir. Bu sorunun çözümü, tam hücre konfigürasyonunda kanalın MgATP'ye duyarlılığının çok daha düşük olmasıyla açıklanır; inhibisyon, izole edilmiş hücrelere kıyasla yarı maksimum düzeyde 0.4-0.8 mM'de gerçekleşir. Benzer şekilde, plazma membranı alfa-toksin ile geçirgen hale getirilmiş β -hücrelerinde de daha düşüktür; bu koşullar altında IC_{50} 156 μM 'dir ve 1 mM MgATP'de kanal aktivitesi maksimumun %16'sıdır. Bu durum, SUR1'in NBD'lerindeki Mg-nükleotit uyarımına bağlıdır ve ATP konsantrasyon-inhibisyon eğrisini glukoz kaynaklı [ATP]'i değişikliklerinin meydana geldiği hücre içi ATP konsantrasyon aralığına kaydırır. Bu nedenle K_{ATP} kanalının metabolik modülasyonu ATP, MgADP veya her ikisindeki değişiklikleri içerebilir (Gribble et al. 1998; Rorsman and Trube 1985; Tarasov et al. 2006).

β -hücrelerinde hücre içi ATP seviyeleri glukoz yokluğunda dahi asla 1 mM'nin altına düşmediğinden (Detimary et al. 1998; Meissner and Atwater 1976), K_{ATP} kanalları dinlenme glukoz konsantrasyonlarında büyük ölçüde açıktır. 5 mM glukozda iletkenlik maksimumun %7'sidir ve glukoz 10 mM'ye çıkarıldığında bu maksimumun %3'üne düşer (Tarasov et al. 2006). Yine de iletkenlikteki bu küçük değişiklik, glukoz konsantrasyonlarında hücre zarının yüksek giriş direnci nedeniyle zar potansiyelinde belirgin bir değişikliğe neden olabilir. Glukoz düzenlemesinin, birçok kanalın açık olma olasılığındaki küçük değişikliklerle sağlanması avantajlıdır çünkü yüksek glukoz seviyelerinde (girdi direnci yüksek olduğunda) tek bir K_{ATP} kanalının rastgele açılmasının zarı hiperpolarize etmesini ve böylece insülin salgılanmasını engellemesini önler (Cook et al. 1988).

K_{ATP} kanalları, sülfonilüreler (gliklazid, glibenklamid ve tolbutamid gibi), glinidler (repaglinid ve nateglinid gibi) ve benzamido türevleri (meglitinid gibi) tarafından bloklanır ve K⁺ kanal açıcıları (örneğin; diazoksit) tarafından aktive edilir (Gribble and Reimann 2003). *In vivo* koşullarda, çoğu sülfonilürenin %90'ından fazlasının plazma proteinlerine bağlandığını unutmamak önemlidir. Bu dikkate alındığında, ilaç bağlanması ile β -hücre membranları, K_{ATP} kanal inhibisyonu ve T2DM hastalarının plazmasındaki serbest ilaç konsantrasyonu arasında iyi bir korelasyon vardır (Zünkler et al. 1988). K_{ATP} kanalının farmakolojik düzenlemesinin çoğu SUR1 aracılığıyla gerçekleşir. SUR1 üzerindeki yüksek afiniteli bir bağlanma bölgesi, sülfonilürelerin terapötik etkilerini sağlar (Gribble et al. 1997b).

1.6.2. Voltaj Kapılı Ca²⁺ Kanalları

İnsülin salınımını tetiklemek için sitoplazmik Ca²⁺ konsantrasyonunda bir artış esastır (Wollheim and Sharp 1981). En azından fare hücrelerinde, GSIS'dan sorumlu olan [Ca²⁺]_i'deki artış neredeyse tamamen hücre dışı Ca²⁺ ve hücre içi Ca²⁺ depolarının akışından kaynaklanır. VGCC, hücre dışı Ca²⁺ girişi için birincil kanaldır. Açılmaları hücre içi aksiyon potansiyelinin yükselmesinde kritik bir rol oynar ve blokajları aksiyon potansiyelinin ateşlenmesinin ve insülin salgılanmasının inhibisyonuna yol açar (Rorsman et al. 2011). Ancak, GSIS'ın esas olarak Ca²⁺ akışına bağlı olduğu ve hücre içi Ca²⁺ depolarının da hücre içi elektriksel aktivitenin şekillenmesine katkısını bilmek önemlidir (Worley et al. 1994). Ayrıca, hücre içi Ca²⁺ depolarından Ca²⁺ salınımı, asetilkolin gibi ajanlar tarafından tetiklenen insülin salgılanmasına katkıda bulunur (Rorsman and Ashcroft 2018).

Farklı Ca²⁺ kanal tipleri, biyofiziksel özellikleri ve seçici inhibitörlerin etkileriyle tanımlanabilir. Bu nedenle L tipi Ca²⁺ kanalları, nifedipin ve isradipin gibi dihidropiridinler (DHP'ler) tarafından, R tipi SNX482 tarafından, N tipi ω -konotoksin tarafından ve P/Q tipi ω -agatoksin tarafından bloke edilir. Isradipin, SNX482, ω -konotoksin ve ω -agatoksin karışımı, β -hücresinin bütün hücre Ca²⁺ akımını neredeyse tamamen inhibe eder (Schulla et al. 2003). Isradipin akımın %50'sini, SNX482 %20'sini, ω -konotoksin %10 inhibisyonunu ve ω -agatoksin %20'sini bloke eder. Bu, L-tipi kanalların fare β -hücrelerindeki Ca²⁺ akımına baskın bir katkı sağladığını, R-, N- ve P/Q-

tipi kanalların ise daha az katkıda bulunduğunu göstermektedir (Rorsman and Ashcroft 2018).

1.6.3. Voltaj Kapılı Na⁺ Kanalları

Çoğu uyarılabilir hücrede, aksiyon potansiyelinin depolarize edici fazı hem VGCC'nin hem de Na⁺ kanallarının aktivasyonunu yansıtır (Hille 2001). Bu, pankreas β -hücresi için de geçerlidir, ancak Na⁺ akımının göreceli katkısı türler arasında değişir. Na⁺ kanalları, voltaja bağlı gözenek oluşturan bir alfa alt biriminden ve sitoskeletonla kapıyı, protein trafiğini ve etkileşimi düzenleyen bir yardımcı β alt biriminden oluşur (Catterall 2014). Dokuz farklı alfa alt birimi (Nav1.1-Nav1.9) ve dört farklı β alt birimi (B1-4) vardır. Bunlar sırasıyla SCN1A-SCN5A ve SCN8A-SCN11A (alfa alt birimleri) ve SCN1B-SCN4B (β alt birimleri) tarafından kodlanır. Fare β -hücreleri, Nav1.3 (Scn3a) ve Nav1.6 (Scn8a)'nın küçük bir katkısıyla baskın olarak Nav1.7 (Scn9a) ifade eder. B alt birimlerinden B1 (Scn1b), B3'ten (Scn3b) çok daha yüksek seviyelerde ifade edilir (Zhang et al. 2014).

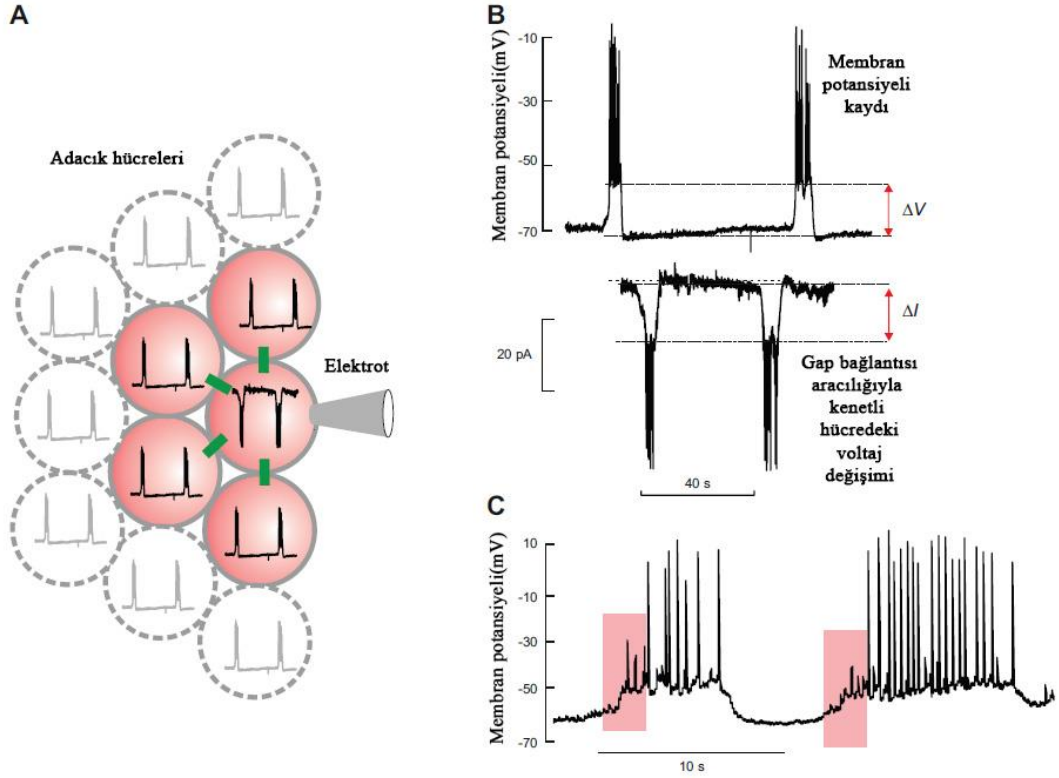
1.6.4. Voltaj Kapılı K⁺ Kanalları

Hem fare hem de insan hücrelerinin aksiyon potansiyelleri kısadır ve 5 ms (insan) ile 30-40 ms (fare) arasında değişir (Rorsman and Braun 2013; Rorsman et al. 2011). Hızlı repolarizasyon, voltaj kapılı K⁺ kanallarının aktivasyonu ile sağlanır. Aksiyon potansiyeli repolarizasyonu, voltaj kapılı Na⁺ veya Ca²⁺ kanallarının inaktivasyonu nedeniyle K⁺ kanalı aktivasyonu olmadığında bile meydana gelir, ancak bu koşullar altında aksiyon potansiyelleri yüzlerce milisaniye sürebilir (Rorsman et al. 2011). Voltaj kapılı K⁺ kanalları, bazen gecikmeli dış akım olarak bilinen, Na⁺ akımından daha yavaş aktive olan bir dış K⁺ akımı taşır. Dışa doğru doğrultma gösterdiğinden, bu akım aynı zamanda gecikmiş doğrultucu olarak adlandırılır. Ca²⁺ ile aktive edilen K⁺ kanalları da voltaja bağlıdır. Voltaj kapılı Na⁺ ve Ca²⁺ kanalları dört homolog alandan oluşan tek bir alt birimden oluşurken, voltaj kapılı K⁺ kanalları her biri Na⁺ kanalının tek bir alanına karşılık gelen dört ayrı alt birimden oluşur. Bunlar tetramerik bir gözenek oluşturmak üzere bir araya gelir (Gutman et al. 2005). Voltaj kapılı K⁺ kanalları en büyük iyon kanalı ailesidir ve genom çeşitli işlevsel özelliklere sahip alt birimleri kodlayan yaklaşık 40 gen

içerir. Bu çeşitlilik, heteromerik kanalların iki tür yakın ilişkili alt birimin birleşmesiyle oluşabileceği gerçeğiyle daha da artar (Rorsman and Ashcroft 2018).

1.7. Hücre Bağlantıları

Fare adacıklarında, glukoz kaynaklı $[Ca^{2+}]_i$ salınımları tüm adacık boyunca senkronize olma eğilimindedir (Santos et al. 1991), bu da β -hücreleri arasındaki elektriksel bağlantının göstergesidir. Bu durum aynı adacıktaki iki β -hücrelerinden alınan paralel elektrofizyolojik ölçümlerle belgelenmiştir (Eddlestone et al. 1984; Meissner 1976). Senkronizasyon o kadar güçlüdür ki, tek tek hücrelerdeki $[Ca^{2+}]_i$ tepkileri tüm adacık düzeyinde görülen tepkilerle neredeyse üst üste binebilir. Buna karşılık, tüm adacık boyunca eşzamanlı $[Ca^{2+}]_i$ salınımları genellikle insan adacıklarında gözlenmez (Cabrera et al. 2006), ancak küçük β -hücre grupları için bildirilmiştir (Quesada et al. 2006). Bu daha zayıf senkronizasyon, β -hücrelerinin β olmayan hücrelerle birbirine karıştığı insan adacığının daha az organize mimarisini yansıtabilir. Ancak, yüksek glukoz tarafından ortaya çıkarılan $[Ca^{2+}]_i$ salınımları insan adacıklarında rastgele görünse de, inkretin hormonları Glukagon benzeri peptid (GLP-1) ve Gastrik inhibitör peptid (GIP)'in varlığında koordineli salınımlar gözlemlenir (Hodson et al. 2013). Eş zamanlı $[Ca^{2+}]_i$ salınımları, bitişik β -hücreleri arasındaki elektriksel bağlantıyla yönlendirilir. Bir β -hücresindeki elektriksel aktivite, komşu hücelere akım iletilmesine ve onların elektriksel aktivitelerini tetiklemek için yeterli olabilecek bir zar depolarizasyonuna yol açar. Sağlam bir adacıktaki bir β -hücresi -70 mV'de voltajla sabitlendiğinde, elektriksel aktivitesi baskılanır ancak komşu β -hücrelerindeki patlama elektriksel aktivitesi, ters çevrilmiş aksiyon potansiyeli patlamalarına benzeyen tutma akımındaki değişiklikler olarak tespit edilebilir (Rorsman and Ashcroft 2018). Sağlıklı bir adacıktaki β -hücreleri arasındaki elektriksel bağlantının şeması Şekil 1.7'de gösterilmiştir.



Şekil 1.7. Sağlıklı bir adacıktaki β -hücreleri arasındaki elektriksel bağlantının şeması (Rorsman and Ashcroft 2018)’den değiştirilerek alınmıştır.

Elektriksel bağlantı, her bir katılımcı hücrenin zarında bulunan iki yarı kanalın birleşimiyle oluşan gap bağlantı kanalları aracılığıyla sağlanır. Her bir yarı kanal, merkezi bir poru çevreleyen altı alt birimden (konneksin (Cx) olarak bilinir) oluşan bir komplekstir. Cx36 (Gjd2/GJD2), hem fare hem de insan adacıklarında anlamlı düzeyde ifade edilen tek konneksindir ve Cx36 nakavt farelerde bütün adacık düzeyinde senkronize $[Ca^{2+}]_i$ salınımlarının gözlemlenmediği rapor edilmiştir (Ravier et al. 2005).

Cx36, düşük üniter iletkenliğiyle (10–15 pS) ayırt edilir (Srinivas et al. 1999; Teubner et al. 2000). Bir adacıktaki iki β -hücre arasındaki bağlantı iletkenliği 180 pS (Zhang et al. 2008) ve bir çift izole β -hücre arasındaki bağlantı iletkenliği 150–220 pS (Andreu et al. 1997; Saisho 2015) olarak tahmin edilmiştir. Tüm hücre ve tek kanallı bağlantı iletkenliklerinin karşılaştırılması, iki β -hücre arasındaki elektriksel bağlantının 15–20 gap bağlantısı tarafından oluşturulduğunu göstermektedir. Sağlam adacıklardaki β -hücrelerinin membran iletkenliği 20 mM glukozda ~ 1 nS’dir (Göpel et al. 1999), bu da dağınık tek β -hücrelerinde gözlenen değerden 10 kat daha yüksektir (Smith et al. 1990). Bu farkın, esas olarak sağlam adacıklardaki β -hücreleri arasındaki elektriksel bağlantıyı yansıttığı düşünülmektedir. Bunu destekler nitelikte Cx36 nakavt edilen fare

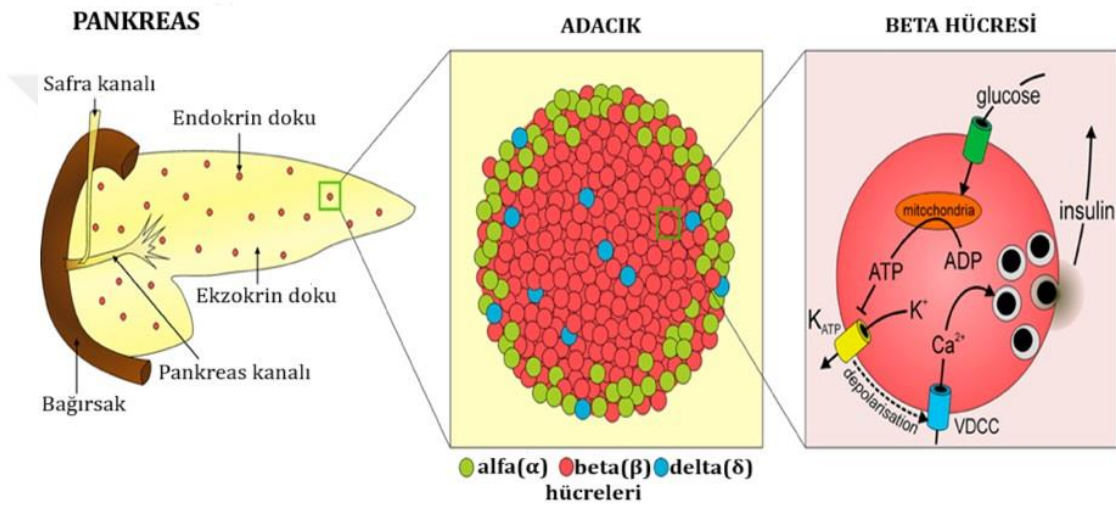
adacıklarında dinlenme iletkenliği %80 (0,2 nS'ye) azalır (Speier et al. 2007), bu da izole hücrelerde gözlenen değere (0,1– 0,2 nS) benzer bir değerdir. Daha da önemlisi, elektriksel bağlantının verimliliği β -hücresinin dinlenme iletkenliğine bağlıdır, dinlenme membran iletkenliği ne kadar büyükse, hücre-hücre bağlantısı o kadar zayıftır. Bu durum glukoz yükselmesinin bağlantıyı artıracağını düşündürür, çünkü K_{ATP} kanalının kapanması plazma membran iletkenliğini azaltır. β -hücrelerinin %70'inde işlevsiz K_{ATP} kanallarını ifade eden adacıkların bulunduğu durumda, β -hücrelerinin kalan %30'unda normal K_{ATP} kanal aktivitesinin varlığı glukozu yanıt olarak tüm adacıkta neredeyse normal $[Ca^{2+}]_i$ salınımlarını sağlamak için yeterlidir (Rocheleau et al. 2006). Tersine, K_{ATP} kanal aktivitesindeki artış, sadece bir β -hücre alt grubunda bile olsa, adacık boyunca depolarizasyonun pasif yayılımını engeller. Bu durum elektriksel olarak pik yapan hücreleri komşularından ayırarak gerçekleşir. Bu durum, işlev kazandırıcı bir K_{ATP} kanal mutasyonu taşıyan farelerden alınan adacıklardaki bazı β -hücrelerinin (~%40) glukoz kaynaklı $[Ca^{2+}]_i$ tepkileri göstermesine rağmen, bu tepkilerin adacık genelinde senkronize olmamasının nedenini açıklayabilir (Girard et al. 2009).

Fare adacıklarındaki β -hücreleri arasındaki elektriksel bağlantı, 80 $\mu m/s$ hıza sahip olan $[Ca^{2+}]_i$ dalgalarının adacık boyunca yayılmasını açıklamak için yeterlidir (Zhang et al. 2008). Elektriksel aktivitenin ve $[Ca^{2+}]_i$ salınımlarının senkronizasyonu, esas olarak, bitişik β -hücresinde membran potansiyelini değiştirmek ve bir aksiyon potansiyeli başlatmak için gereken zamanla belirlenir (~150 ms). Bazı β -hücreleri, $[Ca^{2+}]_i$ dalgalarını başlatan merkezler gibi davranır ve tek bir fare adacığında birden fazla merkez olabilir (Johnston et al. 2016).

Gap bağlantılarının $[Ca^{2+}]_i$ salınımların senkronizasyonu için gerekli olduğu açık olsa da, insülin salgılanması için işlevsel olarak önemli olup olmadıkları belirsizliğini korumaktadır. İnsan adacıklarında çok az senkronizasyon görülür, ancak mükemmel GSIS sergilerler. Bu sonuçlar bazal $[Ca^{2+}]_i$ 'de ve hem bazal hem de GSIS'da artış gösteren Cx36 nakavt farelerdeki gözlemlerden elde edilir. Muhtemelen, hücre bağlantısının rolü insülin salgılanmasını artırmak değil, insülinin aşırı salgılanmamasını sağlamaktır. Sonuçta, çok fazla insülin hızla ölümcül sonuçlara yol açabilir (Rorsman and Ashcroft 2018).

1.8. İnsülin Hormonu ve Enerji Metabolizması

İnsülin hormonu karbonhidrat ve lipid metabolizmalarının düzenlenmesinde kilit bir rol oynar. İnsülin, plazma glukoz değerlerinin yükselmesiyle birlikte, pankreastaki Langerhans adacıkları (islet) içerisinde yer alan β -hücrelerinden salgılanır (MacDonald and Rorsman 2006) (Şekil 1.8). Sağlıklı bir yetişkin pankreasında 250 bin ile 1 milyon arasında adacık bulunur ve her adacık üzerinde, çoğunluğunu β -hücrelerinin oluşturduğu yaklaşık 1000 endokrin hücre yer alır (Tomita 2002).



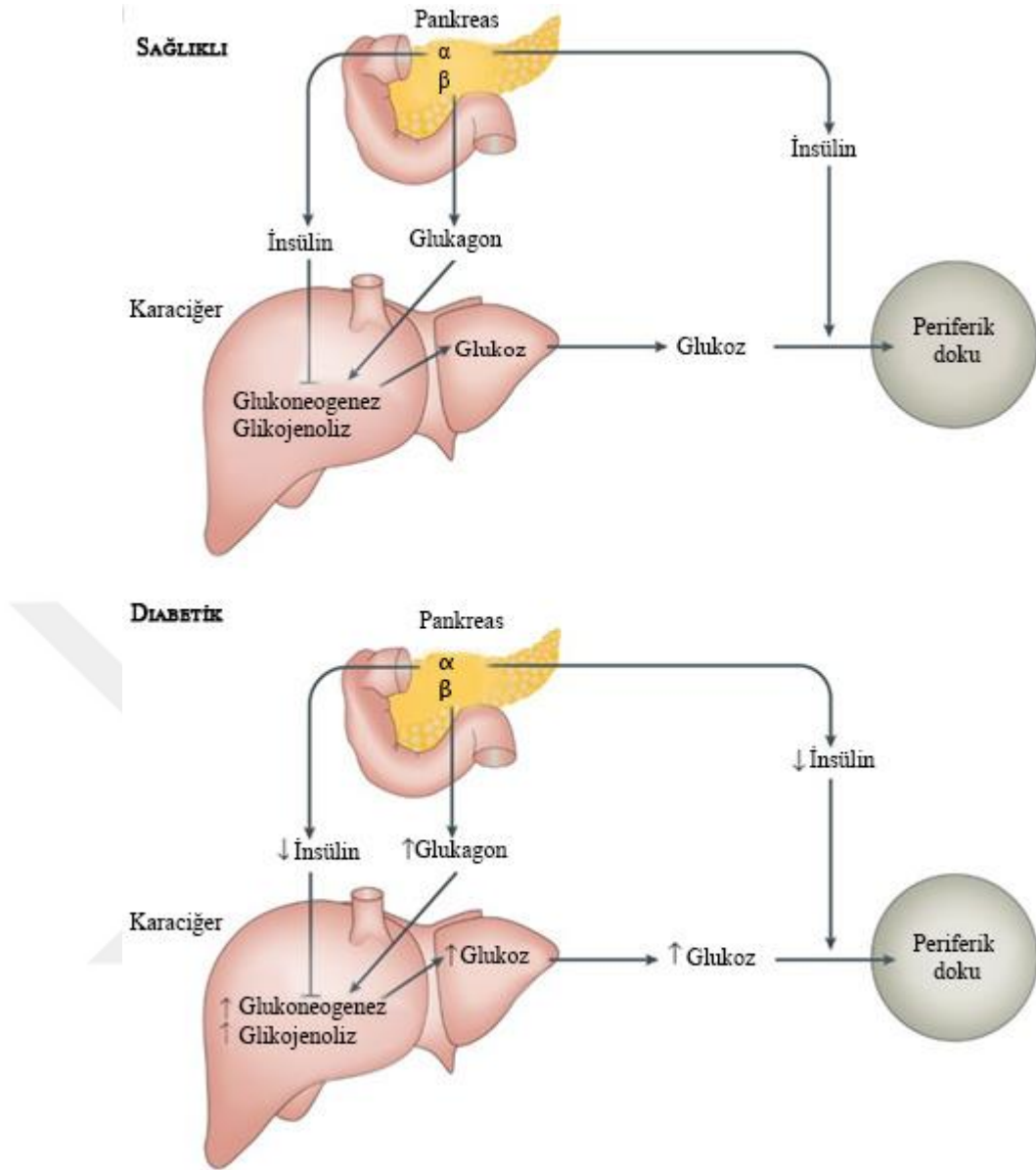
Şekil 1.8. Pankreas endokrin dokusu ve adacık yapısı (MacDonald and Rorsman 2006)'dan değiştirilerek alınmıştır.

İnsülinin temel görevi karaciğer, kas ve yağ dokusu hücrelerindeki insülin reseptörlerini aktive ederek, glukozun bu hücrelere taşınmasını sağlamak ve plazma glukoz seviyesini kontrol altında tutmaktır (Alberts 2008). Bu hücreler tarafından alınan glukoz, hücrelerin enerji ihtiyacını karşılamak için metabolize edilir veya daha sonra kullanılmak üzere depolanır. Beyin, sinir sistemi, kalp, damar ve böbrek hücreleri plazmadan glukoz alımı için insüline ihtiyaç duymazlar. Uzun süre boyunca yüksek plazma glukoz değerlerine maruz kalmaları, bu hücrelerdeki glukoz miktarının aşırı yükselmesine neden olur. Bunun sonucunda aşırı artan hücresel glukoz, toksik bir hal alarak, normal hücre işleyişini engeller ve bu dokularda geri dönüşü mümkün olmayan hasarlara neden olur. Bu nedenle, insülin salgılanmasında meydana gelen bozukluklara bağlı olarak ortaya çıkan hiperglisemi kalp-damar hastalıkları, böbrek ve sinir hasarı dahil olmak üzere, vücutta çeşitli hayati komplikasyonlara neden olur. Ayrıca, insülin-glukoz

metabolizmasında meydana gelen bozukluklar, lipoprotein metabolizmasını da olumsuz etkiler. Özellikle obez hastalarda sıklıkla görülen insülin direnci, lipoprotein metabolizmasında bozulmalara neden olarak plazma trigliserid ve kolesterol değerlerinin yükselmesine ve kalp-damar hastalıkları riskinin artmasına neden olur (Taskinen and Borén 2015).

1.9. Diyabet Metabolizması

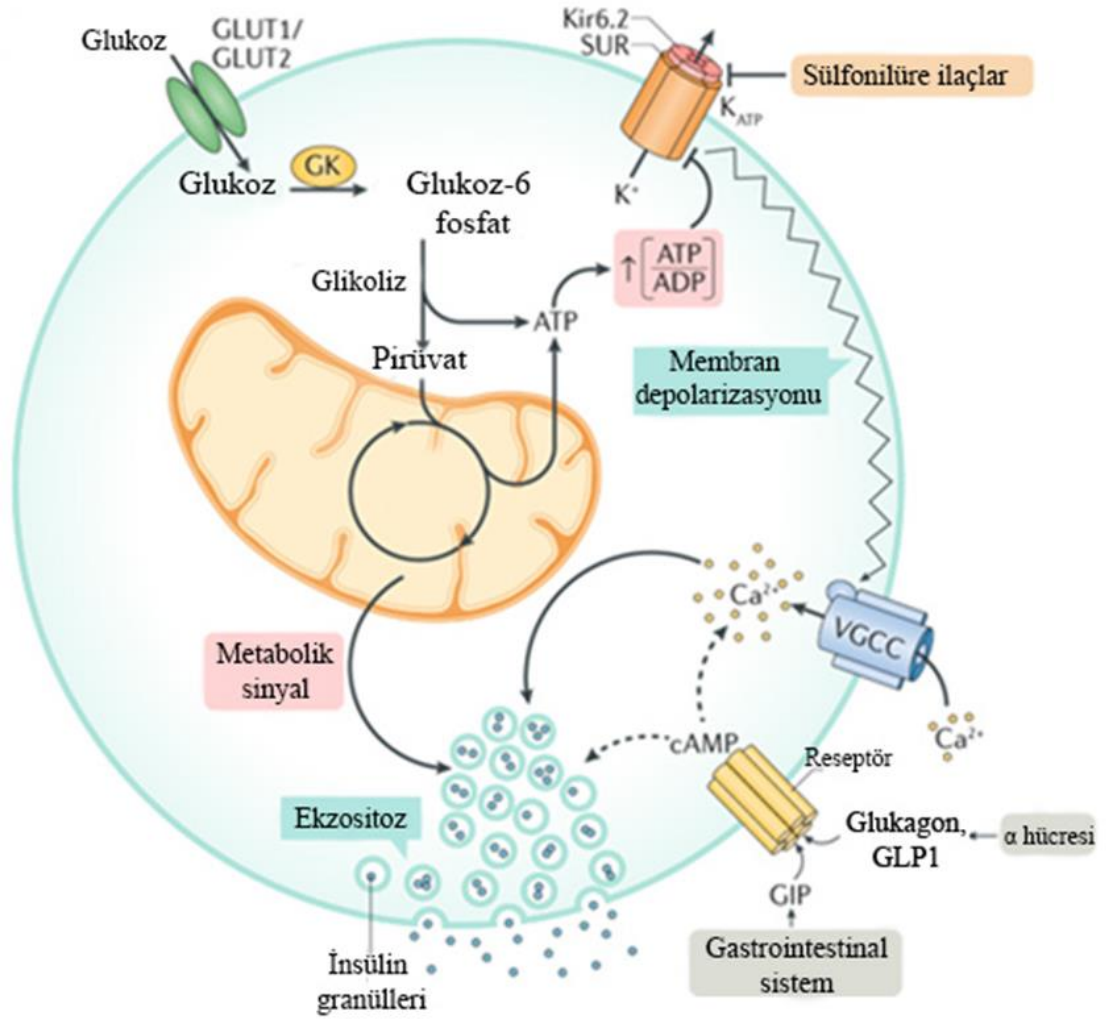
Metabolik hastalıklar arasında açık ara en yaygın görülen diyabet hastalığı, T1DM ve T2DM olmak üzere ikiye ayrılır. T1DM, genetik bir kusur nedeniyle, bağışıklık sistemi hücrelerinin β -hücrelerini tahrip etmesi sonucunda ortaya çıkar. Bu hastaların düzenli olarak insülin enjeksiyonu yapmaları gereklidir (van Belle et al. 2011). Diyabetik popülasyonun büyük çoğunluğunu oluşturan T2DM varyantı ise β -hücrelerinin insülin salgılamasındaki bozukluklardan ve vücudun salgılanan insülini verimli kullanamamasından kaynaklanır. T2DM, ileri aşamalarda β -hücrelerinin ölümüne yol açar ve bu aşamadaki hastalar insülin enjeksiyonlarına bağımlı hale gelirler (Olokoba et al. 2012). Hastalığın her iki formunun gelişiminde de diyet, yaşam tarzı, genetik ve çevresel faktörler rol oynar (Olokoba et al. 2012; van Belle et al. 2011). Diyabetli ve sağlıklı kişilerde glukoz homeostazı Şekil 1.9'da gösterilmiştir.



Şekil 1.9. Diyabetli ve sağlıklı kişilerde glukoz homeostazının şematik gösterimi (Rines et al. 2016)'dan değiştirilerek alınmıştır.

1.10. β-Hücreleri ve İnsülin Salgılanması

Beta hücreleri elektriksel olarak aktif hücreler olup, kas ve sinir dokusu hücreleri gibi, hücre zarları üzerinde yer alan iyon kanalları sayesinde elektriksel aktivite üretirler. İnsülin hormonunun β-hücrelerinden salgılanması bu elektriksel aktivitenin bir sonucudur (Rorsman et al. 2011).

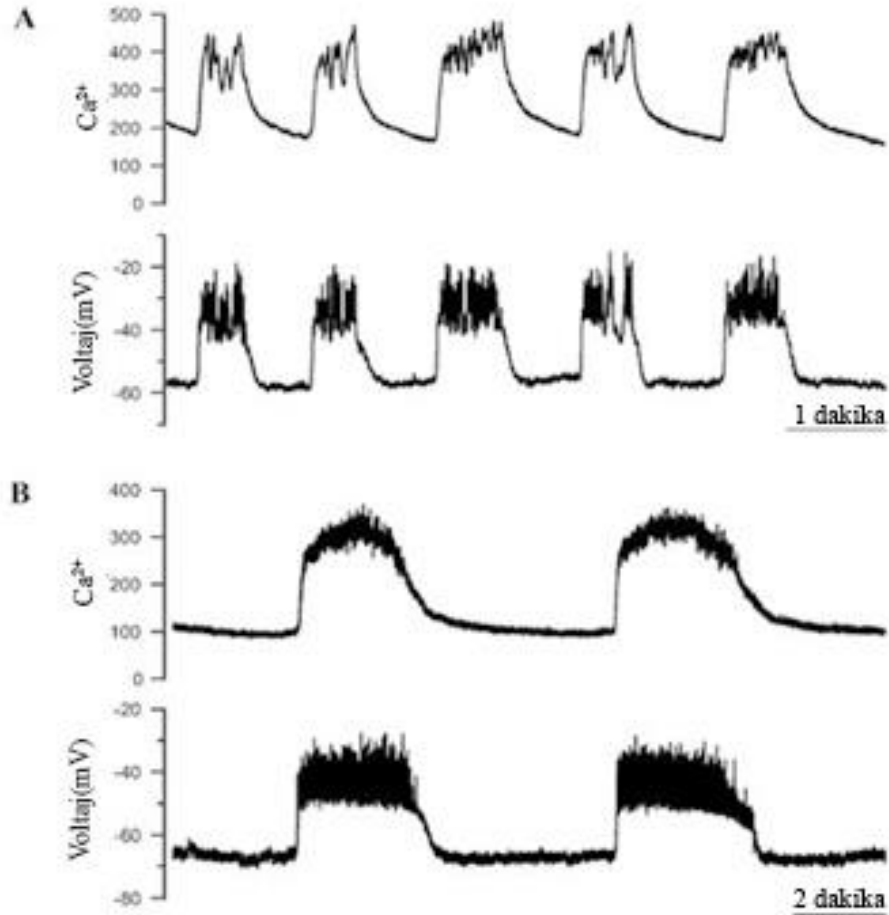


Şekil 1.10. Glukozla uyarılan insülin salgılanması (GSIS) (Campbell and Newgard 2021)'den değiştirilerek alınmıştır.

Beslenme sonrasında, plazma glukoz seviyesinin yükselmesiyle birlikte β -hücreleri üzerinde yer alan glukoz taşıyıcı reseptörler ile glukoz hücre içerisine taşınır. Hücre içerisinde, glikoliz ve sitrik asit döngüsü yollarıyla, glukoz parçalanarak ATP üretilir. Üretilen ATP, hücre içerisindeki ATP/ADP dengesini ATP lehine değiştirerek, K_{ATP} kanalını bloke eder. Normal şartlar altında, β -hücresi içerisindeki K^+ konsantrasyonu hücre dışındaki K^+ konsantrasyonundan daha yüksektir ve kimyasal difüzyon sonucunda, K^+ iyonları açık olan K_{ATP} kanallarından hücre dışına doğru akarlar. K^+ iyonları pozitif yüklü olduğundan, K_{ATP} kanalları açık olduğunda bu kanallar aracılığıyla hücre dışına doğru pozitif yük taşınır. Bu süreç, hücre zarındaki potansiyeli (voltaj, V) düşürür ve zarı hiperpolarize eder. Dolayısıyla, K_{ATP} kanalları hücreyi hiperpolarize eden kanallardır. Hücre içerisindeki ATP konsantrasyonunun artması ile, K_{ATP} kanalları bloke olduğundan, hücre dışına K^+ akışı engellenir. Bu sayede hücre zarı depolarize olur ve hücre içi voltaj

yükselir. Bunun sonucunda, hücre zarlarında yer alan voltaja duyarlı Ca^{2+} kanalları, yükselen voltaja bir tepki olarak aktif hale geçerler. K^+ iyonunun aksine hücre dışındaki Ca^{2+} konsantrasyonu hücre içerisindeki Ca^{2+} konsantrasyonundan daha yüksektir. Bu nedenle, voltajın artmasıyla aktif hale gelen voltaja duyarlı Ca^{2+} kanalları hücre içerisine doğru pozitif yüklü Ca^{2+} iyonlarının taşınmasını tetikleyerek hücre içi voltajını daha da artırırlar. Bu voltaj artışı sonucunda daha fazla voltaja duyarlı Ca^{2+} kanalının aktive olması hücre içerisine daha fazla Ca^{2+} iyonunun taşınmasına neden olur. Bu sayede, hücre içerisinde artan Ca^{2+} yoğunluğu insülin hormonu ile dolu olan insülin granüllerinin hücre zarına yönelmesini sağlayarak insülinin hücre dışına salgılanmasını sağlarlar. Pankreastan bu şekilde salgılanan insülin, portal damar aracılığı ile önce karaciğere, oradan da dolaşım sistemi aracılığı ile kas ve yağ dokularına ulaşır (Campbell and Newgard 2021; MacDonald and Rorsman 2006) (Şekil 1.10).

Sağlıklı β -hücrelerinin uyarıcı (stimulatory) plazma glukoz seviyelerinde ‘bursting’ diye adlandırılan patlamalar şeklinde, 2-10 dakika arasında değişen periyotlara sahip voltaj salınımları gerçekleştirdiği gösterilmiştir (Rorsman et al. 2011; Yildirim et al. 2017; Zhang et al. 2003). Bu salınımlar, elektriksel olarak yüksek aktivitenin görüldüğü aksiyon potansiyellerinden oluşan aktif fazların, elektriksel aktivitenin düşük olduğu uzun aralıklarla ayrıldığı salınımlardır. β -hücrelerinde, hücre içi voltajın yükselmesi hücre içerisine Ca^{2+} akışını artırır. Yapılan eşzamanlı ölçümler, hücre voltajında gerçekleşen salınımların, hücre içi Ca^{2+} konsantrasyonunda senkronize salınımlara yol açtığını ortaya koymuştur. İnsülin salgılanmasını tetikleyen en önemli faktör hücre içi Ca^{2+} olduğundan, plazma glukoz seviyesinin yükselmesiyle β -hücreleri insülini salınımlar halinde salgılar. İnsan ve hayvanlarda yapılan doğrudan portal damar ölçümleri, uyarıcı glukoz seviyelerinde portal damardaki insülin konsantrasyonunun 5-10 dakikalık periyotlarla salınımlar gösterdiğini ortaya koymuştur (Hellman 2009; Pørksen et al. 2002) (Şekil 1.11).



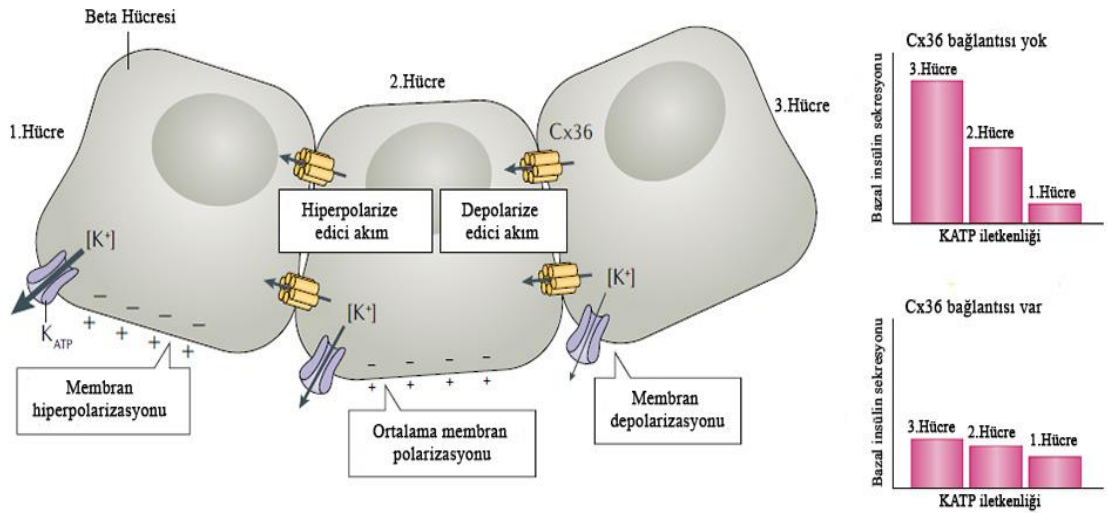
Şekil 1.11. İki farklı β -hücrelerinden ölçülmüş örnek elektriksel patlamalar (bursting) ve senkronize Ca^{2+} salınımları (Zhang et al. 2003)’den değiştirilerek alınmıştır.

İnsülin salgılanmasında meydana gelen salınımların fizyolojik bakımdan çok önemli oldukları ortaya konulmuştur. İnsanlar üzerinde yapılan çalışmalar, salınlı insülin enjeksiyonunun plazma glukoz değerlerini düşürmede sabit hızlı enjeksiyona oranla daha etkili olduğunu göstermiştir (Bratusch-Marrain et al. 1986; Matthews et al. 1983). Hayvanlar üzerinde yapılan doğrudan portal damara insülin enjeksiyonu deneylerinde, aynı miktarda insülinin fizyolojik periyotlara sahip salınımlar halinde uygulanmasının, sabit hızda enjeksiyona kıyasla plazma glukoz seviyesini düşürmede daha etkili olduğu anlaşılmıştır (Matveyenko et al. 2012). İnsülin direnci gelişen kişilerde ve diyabet hastalarının birinci derece yakın akrabalarında ise uyarıcı glukoz seviyelerinde, insülin salınımlarının bozulduğu gözlemlenmiştir (O’Rahilly et al. 1988; Polonsky et al. 1988; Schmitz et al. 1997).

1.11. β -Hücreleri Arasındaki İletişim Kanalları ve Senkronizasyon

İnsülin salgılanmasının salınımlar halinde gerçekleşebilmesi için, milyonlarca β -hücresinin eş zamanlı olarak çalışması gerekir. Plazma insülin salınımları, her bir β -hücresinin patlamalar (bursting) şeklinde gerçekleşen elektriksel aktivitesinden ve bu hücrelerin adacık-içi ve adacıklar-arası senkronizasyonundan kaynaklanır. Adacıklar-arası senkronizasyonun altında yatan biyofiziksel mekanizma tam olarak bilinmemekte olup, adacık-içi senkronizasyonun adacıklar içindeki β -hücreleri arasındaki gap-bağlantıları adı verilen bağlantı kanalları ile gerçekleştiği bilinmektedir. Gap bağlantıları, memeli canlılarda hücrelerin zarlarında yer alan ve komşu hücreler arasında iyonların veya diğer moleküllerin akışına izin veren protein yapılarıdır (Saez et al. 2003; Söhl and Willecke 2004).

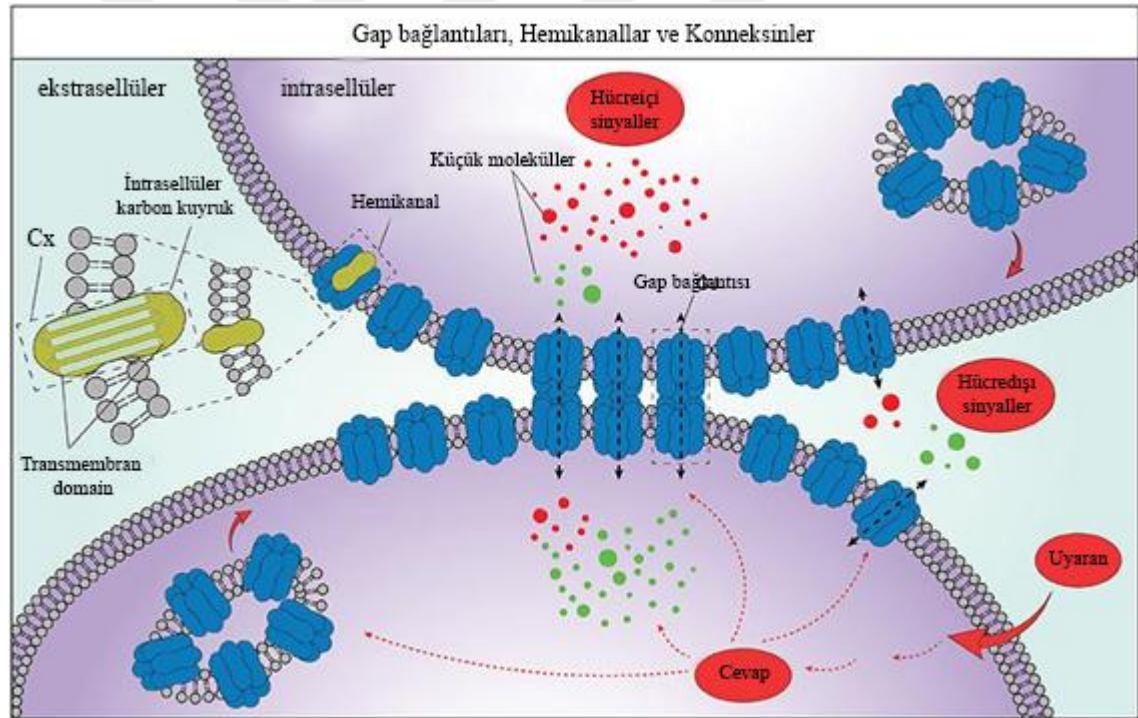
Pankreatik adacıklardaki β -hücreleri arasındaki bu iyon akışı sayesinde, komşu hücreler arasında elektriksel bağlantı sağlanır ve adacık içindeki hücreler eşzamanlı olarak çalışırlar. Bu sayede insülin salgılanması salınımlar şeklinde gerçekleşir. Gap bağlantı kanalları, Cx adı verilen transmembran protein yapılarından meydana gelirler (Söhl and Willecke 2004). İnsan β -hücrelerinde bu proteinlerin Cx36 varyantı baskın olarak görülür (Benninger et al. 2008; Serre-Beinier et al. 2009) (Şekil 1.12).



Şekil 1.12. Pankreatik adacıklardaki β -hücreleri arasındaki iyon akışı ve elektriksel bağlantıda Cx36'nın rolü (Benninger and Kravets 2022)'den değiştirilerek alınmıştır.

1.12. Gap Bağlantı Kanalları

Birçok dokudaki hücrelerin çoğu gap bağlantıları aracılığıyla komşu hücreleriyle haberleşirler. Bu kanallar, hücreleri birbirlerine bağlayan ~1.5 nm çapında Cx kanallarıdır. Komşu hücreler arasında proteinler hariç inorganik iyonlar, şekerler, amino asitler, nükleotidler gibi küçük moleküllerin hareketine izin verirler. Daima açık değildirler, komşu hücrenin ölmesi durumunda sağlıklı hücre kanalı kapatır. Her bir Cx monomeri membranı bölen dört tane segmente sahiptir. İnsanlarda 21 farklı Cx geni vardır. Altı tane monomerin bir araya gelmesiyle bir konneksin yapısı meydana gelir. Farklı Cx alt birimlerinin bir araya gelmesiyle çeşitli konneksinler meydana gelir. Komşu hücreler arasındaki konneksinlerin etkileşmesiyle hücreler arası kanallar meydana gelir (Vicario et al. 2017) (Şekil 1.13).



Şekil 1.13. Gap bağlantıları, Hemikanallar ve Konneksinlerin yapısı (Vicario et al. 2017)'den değiştirilerek alınmıştır.

Yapılan çalışmalar, aynı pankreatik adacık üzerinde yer alan β -hücrelerinin elektrofizyolojik olarak farklı özelliklere sahip olduklarını ortaya koymaktadır (Smolen et al. 1993). Bunun bir sonucu olarak, pankreatik β -hücreleri, adacık içerisinde eş zamanlı olarak salınımlı elektriksel aktivite üretirken, adacıktan ayrılarak tek başlarına incelendiklerinde bu kabiliyetlerini çoğunlukla yitirirler. Dolayısıyla aynı adacık

içerisinde yer alan farklı β -hücreleri elektriksel aktivite bakımından farklı özellikler gösterirler. Bunun temel nedeni, β -hücrelerinin zarlarındaki iyon kanalı dağılımlarının farklılık göstermesidir. Araştırmalar, β -hücreleri arasındaki gap bağlantı kanallarının, heterojen yapıda olan bir hücre popülasyonunun homojen ve düzenli bir bütün olarak çalışmasını temin ettiğini göstermektedir (Benninger et al. 2008; Speier et al. 2007) (Şekil 1.12). Bu nedenle, gap bağlantıları yalnızca salınım yapan β -hücrelerinin eşzamanlı koordinasyonunu sağlamakla kalmaz, aynı zamanda normalde salınım yapamayan β -hücrelerinin de salınım yapabilmesine olanak tanır.

1.12.1. Cx36

Cx protein ailesinin sınıflandırılması, 1974 yılında fare hepatositlerinde ilk gap bağlantı kanal proteinlerinin keşfi ile yapıldı (Goodenough 1974). Günümüze kadar, farelerde 20, insan genomunda 21 ve zebra balığında 37 olmak üzere birçok Cx izoformu tanımlanmıştır (Eastman et al. 2006). Fare ve insan genomu arasında 19 gen ortologdur. Cx protein ailesinin ileri sınıflandırması gen dizisi benzerliğine bağlı olarak alfa (α -), β (β -), gama (γ -), delta (δ) veya epsilon (ϵ -) olarak yapılır (Söhl and Willecke 2003).

Gjd2 geni tarafından kodlanan Cx36, pankreatik β -hücrelerinin ve merkezi sinir sistemindeki nöral gap bağlantılarının bir bileşeni olarak tanımlanan 321 amino asitlik bir proteindir. Cx geni oldukça korunmuştur ve sıçan, fare ve insan genomları arasında %98 dizi benzerliğine sahiptir (Belousov and Fontes 2013). Gen yapısına göre Cx36, kodlama bölgesinde bulunan bir intronun varlığına göre belirlenen gama (γ -) alt ailesine ait olarak sınıflandırılır (Abascal and Zardoya 2013).

Cx36, hem kemirgenlerde hem de insanlarda adacık β -hücrelerinin gap bağlantı zarlarında tanımlanmıştır. Cx36 nakavt farelerde yapılan fonksiyonel çalışmalar, Cx36 gap bağlantı kanallarının adacık β -hücrelerindeki $[Ca^{2+}]_i$ salınımlarının senkronizasyonu için gerekli olduğuna dair doğrudan kanıt sağlamıştır. Ayrıca, Cx36 eksikliği olan farelerin serum insülin salınım dinamiklerinin değiştiği ve glukoz intoleransı geliştiği gösterilmiştir. Cx36 yakın zamanda embriyonik β -hücrelerinde özel olarak ifade edilen erken bir gen olarak tanımlandı. Bu genin transkript ve proteini, β -hücre farklılaşmasıyla eşzamanlı olarak artış göstermektedir (Pérez-Armendariz 2013).

1.13. Tip 2 Diyabet Modelleri

K_{ATP} kanallarının gözenek oluşturan Kir6.2 ve düzenleyici SUR1 alt birimlerindeki fonksiyon kazanımı mutasyonları, insan NDM'nin en yaygın nedeni olarak tanımlanmıştır. Bu mutasyonların kritik etkisi, pankreas β -hücrelerinde Kir6.2 fonksiyon kazanımı mutasyonlarını ifade eden farelerde doğrulanmıştır (Remedi et al. 2017).

Kir6 alt birimi kodlayan tanımlanan iki gen vardır (KCNJ8, Kir6.1 ve KCNJ11, Kir6.2). Pankreas β -hücrelerinde Kir6.2, K_{ATP} kanallarının önemli bir bileşenidir. Yapılan çalışmalarla pankreas β -hücrelerinde sürekli olarak Kir6.2'de fonksiyon kazandırıcı mutasyonları ifade eden farelerde, derin NDM'nin geliştiği gösterilmiştir (Koster et al. 2000; Remedi et al. 2009). Bu farelerde hızla şiddetli diyabet gelişir ve bunu belirgin azalmış insülin içeriği ve β -hücre kütlesi kaybı da dahil olmak üzere sistemik diyabetin ikincil sonuçlarının gelişmesi izler (Girard et al. 2009; Remedi et al. 2009; Wang et al. 2014).

K_{ATP} kanalında gözenek oluşturan ikinci alt birim olan Kir6.1, başlangıçta pankreastan klonlanmıştır. Bu alt birimin vasküler sistemdeki önemi iyi belgelenmiş olsa da, pankreas β -hücrelerinde potansiyel bir rolü sonradan anlaşılmıştır. Pankreas β -hücrelerinde Kir6.1-GOF mutasyonlarını (Kir6.1[G343D] veya Kir6.1[G343D, Q53R]) ifade eden farelerin (sıçan insülin promotörü [Rip] kontrolü altında) azalmış insülin salgılanmasından kaynaklanan glukoz intoleransı ve diyabet geliştirdiği gösterilmiştir. Ayrıca, Kir6.1[G343D] içeren bir bakteriyel yapay kromozomun (BAC) dahil edildiği ve transgenin yalnızca Kir6.1'in normalde mevcut olduğu dokularda ifade edildiği transgenik fareler de üretilmiştir. BAC-Kir6.1[G343D] fareleri de bozulmuş glukoz toleransı ve azalmış glukoz ve sülfonilüre bağımlı insülin salgılanması göstermektedir (Remedi et al. 2017).

1.14. Diyabet Tedavisinde Yeni Hedefler

Diyabetin tedavisinde en yaygın olarak antidiyabetik ilaç kullanımı ön plana çıkmaktadır. Sülfonilüreler insülin salgısını artırır ve ortaya çıkan hiperinsülinemi insülin direncini yenerek açlık plazma glukoz seviyelerinde ve HbA1c'de düşüşe neden olur.

Ancak, başlangıçtaki düşüşten sonra HbA1c giderek yükselir çünkü sülfonilürelerin β -hücresi fonksiyonu üzerinde uzun süreli koruyucu etkisi yoktur (DeFronzo 2009; Kahn et al. 2006; Turner et al. 1999) ve hatta β -hücre fonksiyonunun azalmasını hızlandırabilir (Maedler et al. 2005). Sülfonilüreler genellikle hipoglisemiye neden olur ve kilo alımı ile ilişkilidir. Bazı retrospektif çalışmalar bunların kardiyovasküler sorunları artırabileceğini öne sürmektedir (Roumie et al. 2012; Simpson et al. 2006). Kısa etkili sülfonilüre olan glibenklamid ile karşılaştırıldığında gliklazid, her türlü ölüm ve kardiyovasküler ölüm riskinin azalmasıyla ilişkilendirilmiştir ve kilo alımına ve hipoglisemiye neden olma olasılığı daha düşüktür (Simpson et al. 2015). Sülfonilürelerin metformine adım adım eklenmesi ya da tam tersi, β -hücre fonksiyonunda ilerleyici bir bozulma ve HbA1c seviyesinde artış ile ilişkilidir. Ancak, ucuz oldukları için metformin ve sülfonilüreler dünya çapında en sık reçete edilen oral antidiyabetik ajanlar olmaya devam etmektedir. Meglitinidler (repaglinid ve nateglinid) her öğünden önce uygulanması gereken kısa etkili insülin salgılatıcılardır. Sülfonilürelere göre daha az hipoglisemiyle ilişkili olmalarına rağmen, T2DM ile ilişkili olan β -hücre fonksiyonundaki ilerleyici düşüşü ve HbA1c'deki artışı engellemezler (DeFronzo et al. 2015).

K_{ATP} kanal aktivitesini hedefleyen sülfonilüre ve insülin salgılatıcı diğer antidiyabetik ilaçların diyabet tedavisinde artı ve eksi yönleri göz önüne alındığında hem hedef hem de etken maddeler için yeni alternatiflerin öne sürülmesi önem arz etmektedir. Bir hücre bağlantı proteini olan Cx36 aracılı tedavi geliştirilmesi için yapılan çalışmalar bu kapsamda değerlendirilmelidir. Çalışmamızın bu hedef molekülün potansiyelini ortaya çıkarmaya yardımcı olacağını öne sürmekteyiz.

İnsülin salınımlarının fizyolojik önemi bilinmektedir. Bu nedenle, insülinin salınımlı bir şekilde salgılanma mekanizmasının biyofiziksel temellerinin ve bu salınımların bozulmasına yol açan patolojik faktörlerin kapsamlı bir şekilde incelenmesi büyük önem taşımaktadır. Deneysel bulgular ışığında, diyabet başlangıcında plazma glukoz seviyelerinin artmasının β -hücreleri arasındaki gap bağlantılarını zayıflatması, bu hastalarda diyabetin ilerlemesini yavaşlatabilecek potansiyel bir doğal mekanizma olarak görülebilir. Bu çalışmanın temel amacı, insülin direnci ve diyabetin başlangıç aşamalarında yükselen plazma glukoz düzeylerinin β -hücreleri arasındaki gap bağlantılarını nasıl değiştirdiğini ve bu bağlantıların belirli bir ölçüde zayıflatılmasının Ca^{2+} salınımlarını canlandırıp canlandıramayacağını araştırmaktır. Bu hipotezin

1. GİRİŞ

doğrulanması, diyabetin erken döneminde hastalığın ilerleyişini yavaşlatabilecek bir mekanizmayı ortaya koyacağı gibi, potansiyel tedavi yaklaşımlarında da yeni bir hedef belirlemeye olanak tanıyacaktır.



2. KAYNAK ÖZETLERİ

Diyabet genellikle Batı yaşam tarzıyla ilişkilendirilir ve kısa süreli kan şekeri yükselmeleri genellikle zararlı olmazken, 3 mM'ye kadar düşmesi beyin için ölümcül olabilir. Vücut, bu durumu önlemek için homeostatik mekanizmalar geliştirmiştir. İnsülin, kan şekerini düşüren tek hormonken, diğer hormonlar artırıcı rol oynar. Son 50 yılda gıdanın bol bulunmasıyla, vücut aşırılıkla başa çıkma ve kaynakları koruma yeteneğini geliştirmiştir (Hales and Barker 1992; Kn 2010).

Bir otoimmün komplikasyon olarak tanımlanan T1DM, pankreas β -hücresi kaybına bağlı insülin yetersizliğiyle karakterize kronik bir hastalıktır ve bu tanıya sahip kişilerde hiperglisemiye yol açar. Semptomatik başlangıç yaşı genellikle çocukluk veya ergenlik dönemidir. T1DM'nin etiyolojisi tam olarak anlaşılmamış olmakla birlikte hastalığın patogenezinin T hücresi aracılı β -hücresi yıkımını içerdiği düşünülmektedir (Katsarou et al. 2017).

T2DM karbonhidrat, lipid ve protein metabolizmasının düzensizliği ile karakterizedir ve bozulmuş insülin salgılanması, insülin direnci veya her ikisinin bir kombinasyonundan kaynaklanır. Tanımlanmış diyabet türlerinden en yaygın olanıdır. Son yıllarda, T2DM'nin gelişimi ve ilerlemesi hakkındaki anlayışımız hızla gelişmiştir. Başlıca nedeni genellikle iskelet kası, karaciğer ve yağ dokusunda ortaya çıkan insülin direnciyle birlikte pankreas β -hücreleri tarafından bozulmuş insülin salgılanmasıdır (DeFronzo 2009).

Pankreas adacıkları, farede özellikle kuyruk bölgesinde yoğunlaşmış endokrin yapılar olup, 8 haftalık farelerde yaklaşık 1.100 adacık bulunduğu ve ortalama hacimlerinin 100 μ l olduğu hesaplanmıştır. Her adacığın yaklaşık 80 hücre içerdiği tahmin edilmekte, bu sayı genelde kabul edilen 1.000 hücre/adacık değerinden oldukça küçüktür. Adacıkların %10'u, toplam hücre hacminin %50'sini oluşturur. İnsan pankreasında ise yaklaşık 1 milyon adacık bulunur ve her adacık ortalama 200 hücre içerir (Alantalo et al. 2007; Hellman 1959; Rorsman and Braun 2013).

Glukoz, β -hücrelerine kolaylaştırılmış difüzyon yoluyla taşınır. Farelerde bu taşıma, düşük afiniteli ve yüksek kapasitelere sahip GLUT2 taşıyıcısı tarafından yapılır, bu da hücre içi ve dışı glukozun hızlı dengelenmesini sağlar. İnsan β -hücrelerinde ise ana glukoz taşıyıcısı GLUT1'dir (Heimberg et al. 1995; McCulloch et al. 2011; Thorens 2011).

Endodermal kökenli olmasına rağmen, β -hücreleri sinir hücreleriyle birçok ortak özelliğe sahiptir, bunlar arasında elektriksel uyarılabilirlik de yer alır. Membran potansiyelindeki değişiklikler, kan glukoz konsantrasyonundaki dalgalanmaları insülin salınımına bağlayan kritik bir mekanizma oluşturur (Drews et al. 2010; Henquin and Meissner 1984).

β -hücreleri elektriksel olarak aktif hücreler olup, kas ve sinir dokusu hücreleri gibi, hücre zarları üzerinde yer alan iyon kanalları sayesinde elektriksel aktivite üretirler. İnsülin hormonunun β -hücrelerinden salgılanması bu elektriksel aktivitenin bir sonucudur (Rorsman et al. 2011).

Elektriksel aktiviteye sitoplazmik serbest Ca^{2+} değişiklikleri eşlik eder ve bu da sırayla salınımlı insülin salgılanmasını yönlendirir (Gilon et al. 1993; Valdeolmillos et al. 1989).

K_{ATP} kanalı, tüm türlerde β -hücrelerinde dinlenme durumunda açık olan baskın iyon kanalıdır. Bu nedenle, glukoz yokluğunda β -hücreleri hiperpolarize olur ve zar potansiyeli, K^+ denge potansiyeline yakın olan K_{ATP} akımının ters potansiyeline yaklaşır. Glukoz metabolizması K_{ATP} kanallarını kapatarak β -hücresinin depolarize olmasına, elektriksel aktivitenin başlamasına, Ca^{2+} girişine ve böylece insülin salınımına yol açar (Ashcroft et al. 1984; Rorsman and Trube 1985).

K_{ATP} kanalının başarılı bir şekilde klonlanması ve moleküler karakterizasyonu, bu kanalın dört por oluşturan Kir6.2 ve dört düzenleyici SUR1 alt biriminden oluşan bir oktametik kompleks olduğunu ortaya koymuştur (Aguilar-Bryan et al. 1998; Inagaki et al. 1995; Sakura et al. 1995).

İnsülin salınımını tetiklemek için sitoplazmik Ca^{2+} konsantrasyonundaki artış kritik bir faktördür. Fare β -hücrelerinde, GSIS'dan sorumlu olan $[Ca^{2+}]_i$ artışı, büyük ölçüde hücre dışı Ca^{2+} girişi ve hücre içi Ca^{2+} depolarından kaynaklanır. Hücre dışı Ca^{2+} girişi için birincil yol, VGCC kanallarıdır. Bu kanalların açılması, hücre içi aksiyon potansiyelinin yükselmesinde önemli bir rol oynar ve bu kanalların bloke edilmesi aksiyon potansiyelinin oluşmasını ve insülin salınımını engeller (Wollheim and Sharp 1981; Rorsman et al. 2011).

Fare adacıklarında, glukoz kaynaklı $[Ca^{2+}]_i$ salınımları tüm adacık boyunca senkronize olma eğilimindedir, bu da β -hücreleri arasındaki elektriksel bağlantının göstergesidir. Bu, aynı adacıktaki iki β -hücresinden alınan paralel elektrofizyolojik ölçümlerle belgelenmiştir (Santos et al. 1991; Eddlestone et al. 1984; Meissner 1976).

Eş zamanlı $[Ca^{2+}]_i$ salınımları, bitişik β -hücreleri arasındaki elektriksel bağlantılar aracılığıyla koordine edilir. Bir β -hücresindeki elektriksel aktivite, komşu hücelere akım aktarılmasına neden olur ve bu, yeterli zar depolarizasyonu yaratarak onların elektriksel aktivitesini tetikleyebilir. Sağlam bir adacıktaki bir β -hücresi -70 mV'de voltajla sabitlenip elektriksel aktivitesi baskılandığında bile, komşu β -hücrelerindeki patlama tarzı elektriksel aktiviteler, ters çevrilmiş aksiyon potansiyellerine benzeyen akım değişiklikleri olarak kaydedilebilir (Rorsman and Ashcroft 2018).

Elektriksel bağlantı, her hücre zarında bulunan iki yarı kanalın birleşmesiyle oluşan gap bağlantı kanalları aracılığıyla sağlanır. Her yarı kanal, merkezi bir poru çevreleyen Cx olarak adlandırılan altı alt birimden oluşan bir komplekstir. Cx36 (Gjd2/GJD2), hem fare hem de insan adacıklarında anlamlı düzeyde ifade edilen tek konneksindir. Cx36'nın nakavt edildiği farelerde, adacık düzeyinde senkronize $[Ca^{2+}]_i$ salınımları artık gözlemlenmemektedir (Ravier et al. 2005).

Yapılan çalışmalar, aynı pankreatik adacık üzerinde yer alan β -hücrelerinin elektrofizyolojik olarak farklı özelliklere sahip olduklarını ortaya koymaktadır (Smolen et al. 1993).

Araştırmalar, β -hücreleri arasındaki gap bağlantı kanallarının, heterojen yapıda olan bir hücre popülasyonunun homojen ve düzenli bir bütün olarak çalışmasını temin ettiğini göstermektedir (Benninger et al. 2008; Speier et al. 2007).

Gap bağlantılarının, $[Ca^{2+}]_i$ salınımlarının senkronizasyonu için gerekli olduğu açık olsa da, insülin salgılanması için işlevsel olarak önemli olup olmadıkları belirsizliğini korumaktadır (Rorsman and Ashcroft 2018).

Sağlıklı β -hücrelerinin uyarıcı plazma glukoz seviyelerinde ‘bursting’ diye adlandırılan patlamalar şeklinde, 2-10 dakika arasında değişen periyotlara sahip voltaj salınımları gerçekleştirdiği gösterilmiştir (Rorsman et al. 2011; Yildirim et al. 2017; Zhang et al. 2003).

Bu salınımlar, yüksek elektriksel aktiviteye sahip aksiyon potansiyellerinden oluşan aktif fazların, düşük elektriksel aktivitenin görüldüğü uzun aralıklarla ayrıldığı bir yapıdadır. β -hücrelerinde, hücre içi voltajın yükselmesi Ca^{2+} akışını artırır. Yapılan eş zamanlı ölçümler, hücre voltajındaki salınımların, hücre içi Ca^{2+} konsantrasyonunda senkronize salınımlar oluşturduğunu göstermiştir. İnsülin salgılanmasını tetikleyen en önemli faktör hücre içi Ca^{2+} olduğu için, plazma glukoz seviyesinin artmasıyla β -hücreleri insülini salınımlar halinde salgılar (Hellman 2009; Pørksen et al. 2002).

Gjd2 geni tarafından kodlanan Cx36, pankreatik β -hücrelerinin ve merkezi sinir sistemindeki nöral gap bağlantılarının bir bileşeni olarak tanımlanan 321 amino asitlik bir proteindir. Cx geni oldukça korunmuştur ve sıçan, fare ve insan genomları arasında %98 dizi benzerliğine sahiptir. Gen yapısına göre Cx36, kodlama bölgesinde bulunan bir intronun varlığına göre belirlenen gama (γ -) alt ailesine ait olarak sınıflandırılır (Belousov and Fontes 2013; Abascal and Zardoya 2013).

Pankreas β -hücrelerinde, Kir6.1’in fonksiyon kazanımlı mutasyonlarını (Kir6.1[G343D] veya Kir6.1[G343D, Q53R]) ifade eden farelerin azalmış insülin salgılanmasından kaynaklanan glukoz intoleransı ve diyabet geliştirdiği gösterilmiştir. Ayrıca, Kir6.1[G343D] içeren bir bakteriyel yapay kromozomun (BAC) dahil edildiği ve transgenin yalnızca Kir6.1’in normalde mevcut olduğu dokularda ifade edildiği

transgenik fareler de üretilmiştir. BAC-Kir6.1[G343D] fareleri de bozulmuş glukoz toleransı ve azalmış glukoz ve sülfonilüre bağımlı insülin salgılanması göstermektedir (Remedi et al. 2017).

Bir antidiyabetik ilaç olan sülfonilüreler insülin salgısını artırır ve ortaya çıkan hiperinsülinemi insülin direncini bastırarak açlık plazma glukoz seviyelerinde ve HbA1c'de düşüşe neden olur. Başlangıçtaki düşüşten sonra HbA1c giderek yükselir, çünkü sülfonilürelerin β -hücresi fonksiyonu üzerinde uzun vadeli koruyucu etkisi yoktur (DeFronzo 2009; Kahn et al. 2006; Turner et al. 1999).



3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

Tez kapsamında kullanılan cihazlar Çizelge 3.1.'de, kullanılan sarf malzemeler, kimyasal maddeler ve kitler ise Çizelge 3.2.'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan cihazların listesi

Cihaz	Marka	Kullanım Amacı
Derin Dondurucu (-20°C)	Templo	Kimyasal malzemeleri ve kitleri saklamak için kullanıldı.
Buzdolabı (4°C)	Edesa	Kimyasal malzemeleri ve kitleri saklamak için kullanıldı.
Derin Dondurucu (-80°C)	ESCO Lexicon	Hücreleri, kimyasal malzemeleri ve kitleri saklamak için kullanıldı.
Spektrofotometre	BioTek EPOCH	RNA ve protein konsantrasyonlarının ölçülmesi için kullanıldı.
Laminar Kabin (Class II Safety Cabinet)	ESCO NordicSafe™	Hücre kültürü çalışmalarının steril ve izole bir ortamda gerçekleştirilmesi için kullanıldı.
CO ₂ İnkübatör	ESCO	Hücrelere uygun büyüme ortamı sağlamak amacıyla kullanıldı.
Mikropipet	Axypet	Deneylerin tamamında kullanılacak sıvı malzemelerin miktarlarını hacimsel olarak doğru şekilde belirlemek amacıyla kullanıldı.
Mini Santrifüj	WiseSpin	Hücrelerin çöktürülmesi, RNA ve protein izolasyonunda kullanıldı.
Soğutmalı Santrifüj	Hettich Zentrifugen	Hücrelerin çöktürülmesi, RNA ve protein izolasyonunda kullanıldı.
Vorteks	Wisd Wisemix VM-10	Katı-sıvı karışımları homojenize etmek amacıyla kullanıldı.

Çizelge 3.1. (Devam)

Otoklav	Tomy SX-500E	Deneylerde kullanılan materyallerin tamamını sterilize etmek amacıyla kullanıldı.
İnvert Mikroskop	Leica	Hücrelerin görüntülenmesinde ve fotoğraflanmasında kullanıldı.
Su Banyosu	Wisd WiseBath	Kullanılacak solüsyonların belirli sıcaklıklara ısıtılması amacıyla kullanıldı.
Saf Su Cihazı-UV	Millipore Direct- Q-3	Hazırlanan çözeltilerin çözücüsü olan saf su eldesi için kullanıldı.
Isıtıcı-soğutucu Kuru Blok	Bioer, ch 202	Kullanılacak materyallerin ısıtılması-soğutulması amacıyla kullanıldı.
Dikey Jel Yürütme Sistemi	Bio-Rad	Proteinlerin SDS-PAGE jel elektroforezi ile moleküler ağırlıklarına göre ayrılmasında kullanıldı.
Yatay Jel Yürütme Sistemi	Bio-Rad	İzole edilen RNA'ların saflıklarının kontrol edilmesinde kullanıldı.
Jel Görüntüleme Sistemi	Bio-Rad ChemiDoc	Western Blot membranlarının, agaroz jellerin görüntülenmesinde kullanıldı.
Blotlama Cihazı	Bio-RadTrans-Blot Turbo	Western blot deneyinde proteinlerin jelden membrana yarı-kuru transferi için kullanıldı.
Termal Döngü Cihazı	SensQuest Labcycler	cDNA'ların sentezlenmesinde kullanıldı.
LSM 710 Konfokal lazer taramalı mikroskop	Zeiss	Hücre içi Ca^{2+} salınımını görüntülemek amacıyla kullanıldı.
Rotor-Gene Q Real-Time PCR	Qiagen	Gen ifadelerinin mRNA düzeyinde kantitatif analizi için kullanıldı.
Çalkalamalı İnkübatör	Zhicheng Zhwy-2102c	Plazmitlerin bakteri hücrelerinde çoğaltılması amacıyla kullanıldı.
İnkübatör	Memmert	Transformasyon sonrasında bakterilerin petri kaplarında büyütülmesi amacıyla kullanıldı.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan kitlerin, kimyasallar ve sarf malzemelerin listesi

Malzeme	Marka	Kullanım Amacı
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Thermo Scientific	Hücrelerden izole edilen RNA'lardan cDNA sentezlenmesinde kullanıldı.
EvaGreen PCR Master Mix	Solis Biodyne	Gen ifadesinin mRNA düzeyinde kantitatif gerçek zamanlı PCR ile belirlenmesinde kullanıldı.
Fluo-4 Direct™ Calcium Assay Kit	Invitrogen	Hücre içi Ca^{2+} osilasyonunu ölçmek için kullanıldı.
Lipofectamine 3000 Transfection Reagent	Invitrogen	Hücrelere overekspresyon ve shRNA plazmitlerinin transfeksiyonu için kullanıldı.
EcoPURE Total RNA Kit	EcoTech Biotechnology	Hücrelerden RNA izolasyonu için kullanıldı.
EcoSpin Plasmid Isolation Kit	EcoTech Biotechnology	Çoğaltılan plazmitlerin sıvı bakteri kültürlerinden izolasyonu için kullanıldı.
ClearBand ECL Western Blot Substrat	EcoTech Biotechnology	Antijen- antikor ilişkisinin ve miktarının belirlenmesi ve görüntülenmesinde kullanıldı.
Primer Antikor (β -aktin, Gjd2 ve Kcnj8)	Santa Cruz Biotechnology, Affinity Biotech	Western blot çalışmalarında spesifik bağlanmayı sağlaması amacıyla kullanıldı.
Anti-Mouse ve Anti-Rabbit SekonderAntikor	Santa Cruz Biotechnology	Western blot çalışmalarında spesifik bağlanmayı sağlaması amacıyla kullanıldı.
Hücre Kültürü Flaskları	SPL (Korea)	Hücrelerin kültüre edilmesinde kullanıldı.
Eppendorf Tüpler (0,2-0,5-1,5 ml)	LP Italiana	Sıvı örneklerle çalışmak için kullanıldı.
Amonyum Persülfat	BioShop	SDS PAGE jelinin hazırlanmasında kullanıldı.
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED)	Sigma-Aldrich	Akrilamid-Bis akrilamidin polimerizasyonunu katalizlemek amacıyla kullanıldı.
Glass Bottom Dish	Ibidi GmbH	Konfokal mikroskop ile hücre içi Ca^{2+} miktarını ölçmek için kullanıldı.
İzopropanol	Sigma-Aldrich	SDS PAGE jelinin hazırlanmasında kullanıldı.
Dimetil sülfoksit (DMSO)	EcoTech Biotechnology	Hücreleri dondurma medyumunun içerisinde kullanıldı.

Çizelge 3.2. (Devam)

Bis-akrilamid	Sigma-Aldrich	SDS PAGE jelinin polimerizasyonu için kullanıldı.
Akrilamid	BioShop	SDS PAGE jelinin polimerizasyonu için kullanıldı.
Trizma Base	Sigma-Aldrich	SDS PAGE jelinin hazırlanmasında kullanıldı.
Ponceau S	EcoTech Biotechnology	Transfer aşamasından sonra membrandaki proteinleri görünür hale getirmek için kullanıldı.
Phosphate Buffered Saline (PBS)1x	EcoTech Biotechnology	İzotonik tampon çözelti olarak hücre kültürü çalışmalarında hücreleri yıkama amaçlı kullanıldı.
ClearBand Nitroselüloz Membran	EcoTech Biotechnology	Proteinlerin jelden transferi için kullanıldı.
ClearBand RIPA Lizis Buffer	EcoTech Biotechnology	Protein izolasyonunda hücreleri parçalamak için kullanıldı.
ClearBand Laemmli Sample Buffer 10x	EcoTech Biotechnology	Protein örneklerinin hazırlanması için kullanıldı.
Etanol	Sigma-Aldrich	Sterilizasyon amacıyla kullanıldı.
Proteaz İnhibitör Kokteyl	Thermo Scientific	Protein izolasyonunda proteinleri parçalayan proteazları inhibe etmek amacıyla kullanıldı.
PMSF	Roche	Protein izolasyonu aşamasında hücre içinde proteinlerin serin proteazlar tarafından parçalanmasını önlemek amacıyla kullanıldı.
Süt Tozu	EcoTech Biotechnology	Western Blot deneylerinde spesifik olmayan antikor bağlanmalarını önlemek amacıyla membranı bloklamak için kullanıldı.
Laemli Sample Buffer 10x	EcoTech Biotechnology	Protein örneklerinin hazırlanması için kullanıldı.
RIPA Lizis Buffer	EcoTech Biotechnology	Protein izolasyonunda hücreleri parçalamak için kullanıldı.

Çizelge 3.2. (Devam)

L-Glutamin	Sigma-Aldrich	Kültürdeki hücrelerin büyümesini destekleyici olarak kullanıldı.
Penisilin-Streptomisin	Gibco	Hücreleri kontaminasyona karşı korumak amacıyla kullanıldı.
Fetal Bovine Serum (FBS)	Gibco	Hücrelerin büyümesi ve çoğalması için gerekli büyüme faktörlerini içeren serum olarak kullanıldı.
Trypsin	Gibco	Hücreleri pasajlama aşamasında bulundukları yüzeyden kaldırmak amacıyla kullanıldı.
DMEM/F-12 Medium	Gibco	NIT-1 hücrelerinin büyütülmesi için besiyeri olarak kullanıldı.
NutriCulture DMEM Low Glucose	EcoTech Biotechnology	NIT-1 hücrelerinin çoğaltıldığı besiyeri ortamı olarak kullanıldı.
Puromisin	BioShop	Memeli hücrelerine plazmitlerin transfeksiyonu sonrası hücrelerin seçilimi için kullanıldı.
Genetisin	BioShop	Memeli hücrelerine plazmitlerin transfeksiyonu sonrası hücrelerin seçilimi için kullanıldı.
Whatman Kâğıdı	Sigma-Aldrich	Western Blot deneylerinde proteinlerin jelden membrana transferi aşamasında tampon akışını sağlamak için kullanıldı.
Nitroselüloz Membran	Sigma-Aldrich	Proteinlerin jelden transferi için kullanıldı.
96 Kuyucuklu Plate	Corning Costar	Deneyler için hücrelerin kültüre edilmesi amacıyla kullanıldı.
6 Kuyucuklu Plate	Corning Costar	Deneyler için hücrelerin kültüre edilmesi amacıyla kullanıldı.
Steril Serolojik Pipetler	LP Italiana	Hücre kültürü çalışmalarında kullanıldı.
Falkon Tüpleri	LP Italiana	Sıvı formda bulunan malzemelerin, kimyasalların ve besiyerlerinin saklanması, santrifüj işlemleri için kullanıldı.

3.2. Yöntem

3.2.1. Fare β -hücrelerinin kültür edilmesi

Diyabet modeli oluşturmada kullanılan fare pankreas insülinoma β -hücre hattı olan NIT-1 (CRL-2055TM) Akdeniz Üniversitesi'nden (Antalya, Türkiye) Prof. Dr. Ahter Dilşad ŞANLIOĞLU'ndan temin edildi. NIT-1 (CRL-2055TM) hücreleri, birçok farklı memeli hücrelerinin büyümesini desteklemek için yaygın olarak kullanılan bir bazal ortam olan Dulbecco'nun Modifiye Eagle Ortamı/Besin Karışımı F-12 (DMEM/F-12)'de kültürlendi. Hücreler %10 fetal sığır serumu, %1 L-glutamin ve %1 penisilin/streptomisin içeren DMEM/F-12 ortamında başarıyla çoğaltıldı ve %5 CO₂ atmosferinde 37°C'de nemli bir inkübatörde tutuldu. Kolayca transfekte edilebilen ve glukoz konsantrasyonuna bağlı olarak artan seviyede insülin salgılayabilen bu hücreler konfluent monolayer oluşturmayıp pankreas adacıklarına benzer şekilde sıkıca paketlenmiş kümeler halinde koloniler oluşturdu.

3.2.2. Fare β -hücrelerinde mutagenез ile diyabet modellerinin oluşturulması

K_{ATP} kanalında por oluşturan Kir6.1 veya Kir6.2 alt ünitelerinin fonksiyon kazandırıcı mutasyon barındıran izoformlarının yüksek düzeyde ifade edilmesinin β -hücrelerinde azalmış insülin sekresyonuna bağlı glukoz intoleransı geliştirdiği ve bu hücrelerin diyabet modeli olarak kullanılabileceği bilinmektedir (Nguyen et al. 2014; Remedi et al. 2017). ATP'ye bağımlı olarak aktifleşen K_{ATP} kanallarının, ATP'ye duyarsız hale getirilmesi bu hücrelerde insülin salınımını da olumsuz etkilemektedir (Shimomura and Maejima 2017).

Fare β -hücrelerinde diyabet modeli oluşturulması için kullanılan Kir6.1[WT], Kir6.1[G343D] ve Kir6.1[G343D, Q53R] yabanıl tipte ve fonksiyon kazandırıcı mutasyon barındıran cDNA dizilerini içeren plazmitler Origene firmasından temin edilerek çalışmalarda kullanıldı.

Kcnj8 (Kir6.1) Fare Etiketli ORF Klonu (Origene, Kat No: MR206756) ve pCMV6-Girişli Memeli Ekspresyon Kontrol Vektörü (Origene, Kat No: PS100001)

OriGene'den satın alındı. Fonksiyon kazanımı Kcnj8 [G343D] veya Kcnj8 [G343D, Q53R] mutasyonlarının üretimi için mutagenез, üreticinin protokolüne göre QuikChange II XL Site Yönlendirilmiş Mutagenез Kiti ile gerçekleştirildi. Plazmitlerde site yönlendirilmiş mutagenез mutasyonlarının varlığını doğrulamak için Sanger dizilemesi yapıldı. Mutagenез primer dizileri QuikChange Primer Tasarım Aracı kullanılarak tasarlandı ve Çizelge 3.3'te verildi.

Çizelge 3.3. Kcnj8 (Kir6.1) geninin yönlendirilmiş mutagenезi için kullanılan primer dizileri

Primer İsmi	Primer Dizisi
Kcnj8-Mut-(G343D) Forward	CACTCTCACCGTGTTATCAAATTTGGAATAGTCCACAGAGT
Kcnj8-Mut-(G343D) Reverse	ACTCTGTGGACTATTCCAAATTTGATAACACGGTGAGAGTG
Kcnj8-Mut-(Q53R) Forward	GCAGGAAGCGACCTCCCTCTCGGATGTTC
Kcnj8-Mut-(Q53R) Reverse	GAACATCCGAGAGCGAGGTCGCTTCCTGC

3.2.3. NIT-1 hücrelerinin Kcnj8 (Kir6.1) ile stabil transfeksiyonu

Kcnj8'i stabil bir şekilde aşırı ifade eden fare β -hücrelerinde (NIT-1) diyabet modeli oluşturmak için, NIT-1 hücreleri pCMV6-Entry Memeli Ekspresyon Kontrolü, Kcnj8 (Kir6.1) Fare Etiketli ORF Klonu (Yabanıl Tip), Kcnj8-Mut-[G343D] veya Kcnj8-Mut-[G343D, Q53R] vektörleri ile üreticinin yönergelerine göre Lipofectamine 3000 reaktifi kullanılarak transfekte edildi. Daha sonra NIT-1 hücreleri en az 3-4 hafta boyunca 250 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda Geneticin (G418) ile desteklenmiş kültür ortamında seçilerek G418'e dirençli hücreler elde edildi. NIT-1 hücrelerinde Kcnj8'in mRNA ve protein düzeylerinde stabil aşırı ekspresyonu doğrulandı.

3.2.4. Kcnj8 (Kir6.1) ile stabil transfeksiyonu gerçekleştirilen NIT-1 hücrelerinin Gjd2 (Cx36) ile stabil transfeksiyonu

Diyabet modeli β -hücrelerinde Gjd2'nin azaltılmış ancak tamamen susturulmamış ekspresyonunun β -hücrelerinde insülin salgılanmasını geri getirip getirmediğini araştırmak için, Kcnj8'i stabil olarak aşırı eksprese eden NIT-1 hücrelerinde pGFP-shLenti vektörü kullanılarak stabil olarak inhibe edilmiş Gjd2 ekspresyonuna sahip hücreler elde edilmesi sağlandı. shRNA'ların etkinliğini test etmek için, Gjd2-Mouse 4 unique 29 mer shRNA retroviral etiketsiz vektör (Locus ID 14617) ve kontrol shRNA vektörü OriGene'den satın alındı. Kcnj8'i stabil olarak aşırı ifade eden NIT-1 hücreleri, üreticinin protokolüne göre Lipofectamine 3000 reaktifi kullanılarak pGFP-C-shLenti vektörü ve kontrol shRNA vektörü ile transfekte edildi. NIT-1 hücreleri, G418-Puromisin dirençli hücreler elde etmek için en az 3-4 hafta boyunca sırasıyla 250 $\mu\text{g/mL}$ ve 2 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda G418 ve Puromisin Seçici Antibiyotik ile desteklenmiş uygun kültür ortamında seçildi. NIT-1 hücrelerinde Kcnj8'in stabil aşırı ekspresyonu ve Gjd2'nin sessizliği mRNA ve protein düzeylerinde doğrulandı.

3.2.5. RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve Real-Time PCR

Toplam RNA'lar, EcoPURE Toplam RNA İzolasyon Kiti standart protokolüne göre eşit miktarda stabil transfekte edilmiş NIT-1 hücreleri kullanılarak izole edildi ve RNA örneklerinin konsantrasyonu ve saflığı Epoch Mikropilaka Spektrofotometresi kullanılarak belirlendi. Toplam RNA'dan cDNA sentezi, üreticinin önerilerine göre "Yüksek Kapasiteli cDNA Ters Transkripsiyon Kiti" ile gerçekleştirildi. Real-Time PCR reaksiyonları, üreticinin protokollerine göre 5x HOT FIREPol EvaGreen qPCR Mix Plus kullanılarak gerçekleştirildi. Real-Time PCR deneylerinde kullanılan primer dizileri Çizelge 3.4'te listelendi. Gen ifadelerinin standardizasyonu için β -aktin kullanıldı. Real-Time PCR, standart parametreler kullanılarak bir Qiagen Rotor Gene Q gerçek zamanlı termal döngü cihazında gerçekleştirildi. Tüm Real-Time PCR reaksiyonları üçlü olarak gerçekleştirildi ve bağıl ifade düzeyleri $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ yöntemi kullanılarak değerlendirildi (Livak and Schmittgen 2001).

Çizelge 3.4. Real-Time PCR analizinde kullanılan primer dizileri

Gen	Dizi
Kcnj8-Forward	CTTCGCTATCATGTGGTGGC
Kcnj8-Reverse	GCGTTGATGATCAGACCCAC
Gjd2-Forward	GCTTCAGTGTTCAGGGTTG
Gjd2-Reverse	GACTGACTTCCTCTTGGCCT
β-aktin-Forward	CCTCTATGCCAACACAGTGC
β-aktin-Reverse	CCTGCTTGCTGATCCACATC

3.2.6. Western blot analizi

Başarıyla seçimi tamamlanan eşit sayıda NIT-1 hücresi soğuk 1X PBS ile yıkandı ve proteinler 10 mM fenil metan sülfonil florür (PMSF) ve Proteaz İnhibitör Kokteyli içeren RIPA Lizis Tamponu kullanılarak toplandı. Toplam protein konsantrasyonu ClearBand Bradford Reaktifi ile ölçüldü. Hücre lizatları 10x Laemmli Sample Buffer ile karıştırıldı ve yaklaşık 5 dakika boyunca 100°C’de kaynatıldı. Daha sonra, eşit miktarda protein lizatı (30µg) %10 SDS-PAGE’de elektroforez edildi ve Trans-Blot® Turbo™ Transfer Sistemi kullanılarak bir nitroselüloz membrana aktarıldı. Membranlar 1 saat boyunca %5 yağsız süt tozu ile bloke edildi ve üç kez 20 dakika boyunca PBST (1X PBS, %0,1 Tween-20) tamponu ile yıkandı. Daha sonra, membranlar 4°C’de PBST ile seyreltilmiş spesifik primer antikorlarla bir gece boyunca inkübe edildi; Kcnj8 (Affinity Biotech, DF 9263, 1:2000), Anti-konneksin 36 Antikoru H-9 (Santa Cruz Biotechnology, sc-398063, 1:500) ve anti-β-aktin (Santa Cruz Biotechnology, sc-47778 HRP, 1:200). Membranlar en az iki kez 20 dakika boyunca PBST ile yıkandıktan sonra, 25°C’de 1 saat boyunca HRP-konjuge Anti-rabbit (Santa Cruz Biotechnology, sc-516102, 1:2500) ve Anti-mouse (Santa Cruz Biotechnology, sc-516102, 1:3000) sekonder antikorlarla inkübe edildi. Kemilüminesans sinyalleri, ChemiDoc MP Görüntüleme Sistemi kullanılarak Clear-Band ECL Western Blotting Substratı veya Clarity Max Western ECL Substratı ile tespit edildi.

3.2.7. Hücre içi Ca^{2+} sinyallerinin Florometrik görüntülenmesi

$[\text{Ca}^{2+}]_i$ konsantrasyonu, homojen bir floresan kalsiyum testi sağlamak üzere formüle edilmiş Fluo-4 Direct™ Kalsiyum Test Kiti kullanılarak ölçüldü. Fluo-4 Direct™ Kalsiyum Test Kiti üreticinin talimatlarını izleyerek seçimi başarıyla tamamlanmış NIT-1 hücrelerinde Ca^{2+} aktivitesini belirlemek için kullanıldı.

Başlangıçta, literatürde belirtildiği gibi, μ -Dish 35 mm yüksek cam tabanlı platler 0,1 $\mu\text{g/ml}$ poli-L-lizin ile önceden kaplandı (Harnett et al. 2007). NIT-1 hücreleri (3×10^5) iki tekrarlı olarak 35 mm yüksek cam tabanlı petri kabına ekildi ve 37°C 'de 24 saat inkübe edildi. 24 saatlik inkübasyondan sonra, NIT-1 hücreleri bir kez fosfat tamponlu tuzlu su ile yıkandı ve DMEM düşük glukoz ortamında (5mM) 1 saat inkübe edildi. Hücreler 5 mM probenesid konsantrasyonlu Fluo-4 Direct kalsiyum reaktif solüsyonunda 37°C 'de 30 dakika %5 CO_2 ortamında ve karanlıkta oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi. Daha sonra, hücreler 20 mM glukoz (Haefliger et al. 2013) ile uyarıldı ve görüntüleme LSM 710 Konfokal Lazer Tarama Mikroskobu kullanılarak başlatıldı. Fluo-4 Direct kalsiyum reaktifi çözeltisinin uyarılması, argon lazerinin 488 nm hattı ile sağlandı. Görüntüler 5 saniyelik aralıklarla kaydedildi ve veriler Leica LAS AF Lite yazılımı ile analiz edildi. Kayıt sonrasında alınan ölçüm sonuçları birleştirildiğinde, kontrol koşullarında lüminesans kaydedildiği takdirde hücreler "salınım yapan" olarak kabul edildi.

3.2.8. İmmünositokimya

Yabanıl tip veya fonksiyon kazanımı mutasyonlu Kcnj8'in stabil aşırı ekspresyonu olan NIT-1 hücrelerinde, Kcnj8 ve Gjd2'nin farklı ekspresyonları immünositokimya kullanılarak analiz edildi. NIT-1 hücreleri (3×10^5) 35 mm'lik cam tabanlı platlere iki tekrarlı ekildi ve adacık benzeri hücre kümelerinin oluşmasını sağlamak için 37°C 'de 72 saat inkübe edildi. Daha sonra hücreler 4°C 'de 30 dakika boyunca %4 glutaraldehit solüsyonunda fiksasyona tabi tutuldu ve 1xPBS ile üç kez yıkandı. Yıkamaların ardından hücreler, %3 BSA (sığır serum albümini) içeren %0,1 Triton X-100 ile 1xPBS'de 25°C 'de permeabilize edildi ve 1xPBS ile üç kez 5 dakika yıkandı. Daha sonra hücreler 25°C 'de 30 dakika boyunca PBST solüsyonu (1xPBS, %0,1

Tween 20) içeren %1 BSA'da bloke edildi ve 1xPBS ile üç kez 5 dakika yıkandı. Hücreler aynı anda 4°C'de gece boyunca PBST ile seyreltilmiş spesifik primer antikorlarla inkübe edildi; anti-Kcnj8 (Affinity Biotech, DF 9263, 1:500) ve anti-konneksin 36 antikoru H-9 (Santa Cruz Biotechnology, sc-398063, 1/200). Hücreler en az iki kez 5 dakika boyunca 1xPBS ile yıkandıktan sonra, floresanla konjuge edilmiş sekonder antikorlarla (Fare Anti-rabbit IgG-CFL 647, Santa Cruz Biotechnology, sc-516251: 1/200 ve Anti-fare IgG Fc BP-CFL 488, Santa Cruz Biotechnology, sc-533653: 1/100) 25°C'de 1 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyonun sonunda, hücreler tekrar üç kez 1xPBS ile yıkandı ve nükleer boyama için kullanılan 300 nM DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole) ile yaklaşık 20 dakika boyunca 4°C'de inkübe edildi. DAPI (mavi) için tespit bant genişliği 358-461 nm, anti-konneksini hedefleyen anti-mouse IgG Fc BP-CFL 488 (yeşil) için 488-514 nm, ve anti-Kcnj8'i hedefleyen Mouse anti-rabbit IgG-CFL 647 (kırmızı) için 654-669 nm olarak ayarlandı. Görüntüler LSM 710 Konfokal Lazer Tarama Mikroskobu kullanılarak görselleştirildi.

3.2.9. İstatistiksel analiz

Tüm veriler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verildi. Gruplar arasındaki istatistiksel karşılaştırmalar, kontroller ile kıyaslanarak Mann-Whitney-U testi kullanılarak yapıldı. Figürler GraphPad Prism 10 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA) ve Adobe Photoshop 21 kullanılarak oluşturuldu. Tüm istatistiksel analizler Student's t test aracılığıyla gerçekleştirildi ve 0,05'e eşit veya daha küçük değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

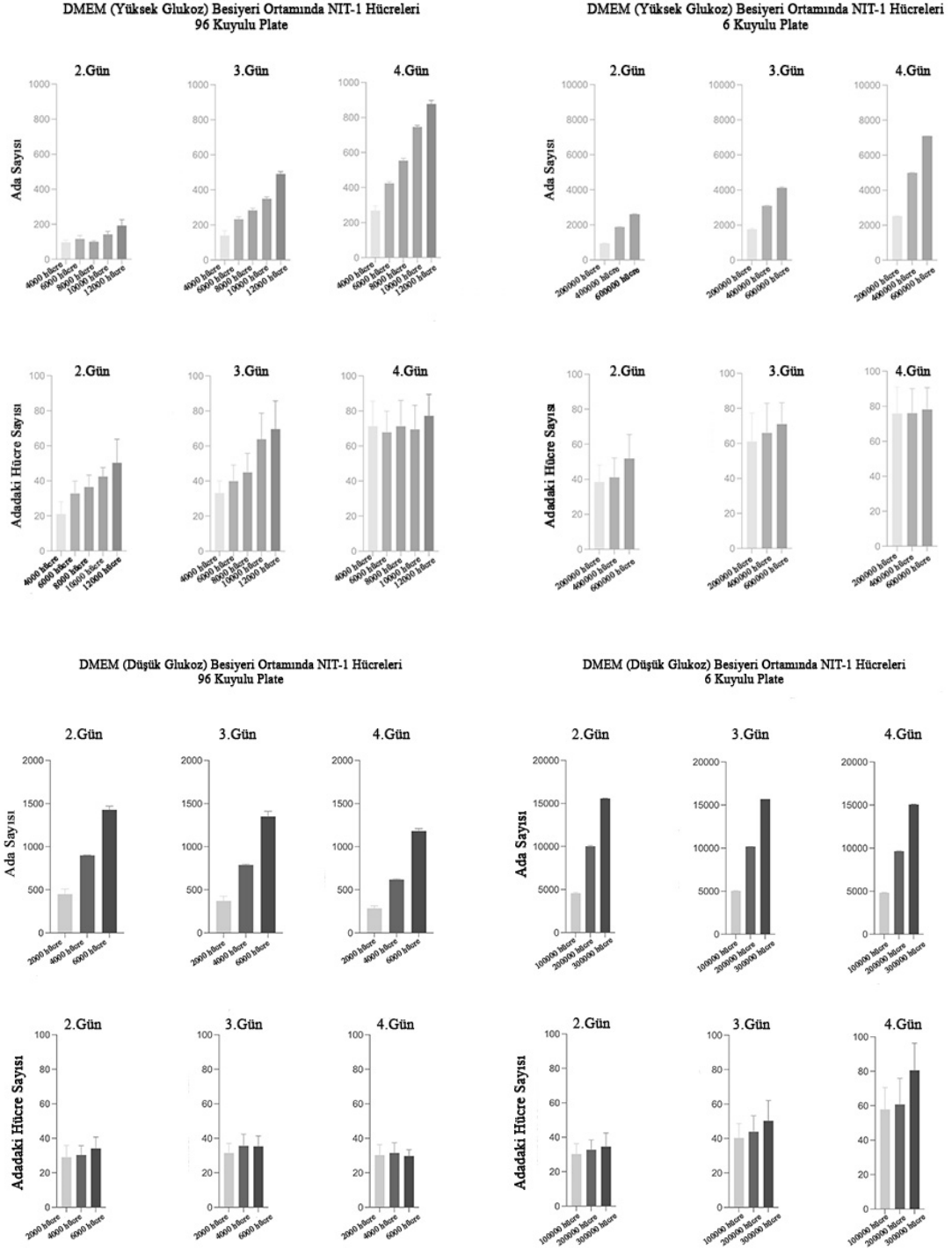
4.1. Fare β -Hücreleri Başarılı Bir Şekilde Kültüre Edildi ve Adacık Oluşturma Potansiyelleri Test Edildi

Diyabet modeli için kullanılan NIT-1 hücreleri, Prof. Dr. Ahter Dilşad Şanlıoğlu'ndan temin edilerek, DMEM/F-12 ortamında, %5 CO₂ atmosferi altında 37°C'de nemlendirilmiş bir inkübatörde kültüre edildi. Glukoz konsantrasyonuna bağlı insülin salgılayabilen bu hücreler, beklenildiği üzere konfluent monolayer yerine pankreas adacıklarına benzer sıkı koloniler oluşturdu.

NIT-1 hücrelerinin çoğalma hızlarının anlaşılması ve adacıklarda bulunan hücrelerin 4. güne kadar ulaşacakları sayısal miktarın tespiti amacıyla deneylere başlamadan önce 96-kuyulu ve 6-kuyulu platlere belli sayıda hücreler ekilerek DMEM (yüksek glukoz) içeriğine sahip besiyeri ve DMEM (düşük glukoz) içerikli besiyerinde çoğalması sağlandı. 2. günden 4. güne kadar günlük olarak platlerde çoğalan ortalama adacık sayısı ve bir adacıkta yer alan β -hücre sayıları kaydedilerek Şekil 4.1'de verildi.

Ekilen hücre sayısına göre platede tutunan ve çoğalan adaların artışının normal bir eğri çizdiği ve bir adacıkta yer alan hücrelerin 3. ve 4. günlerde 60-80 arası bir sayıya ulaştığı görüldü. Bu sebeple yapılan deneylerde ekilecek ortalama değer olarak 96-kuyu için 3000-3500 hücre, 6-kuyulu plate için ise 300.000-400.000 arası bir hücre alındı.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA



Şekil 4.1. NIT-1 hücre sayım sonuçları

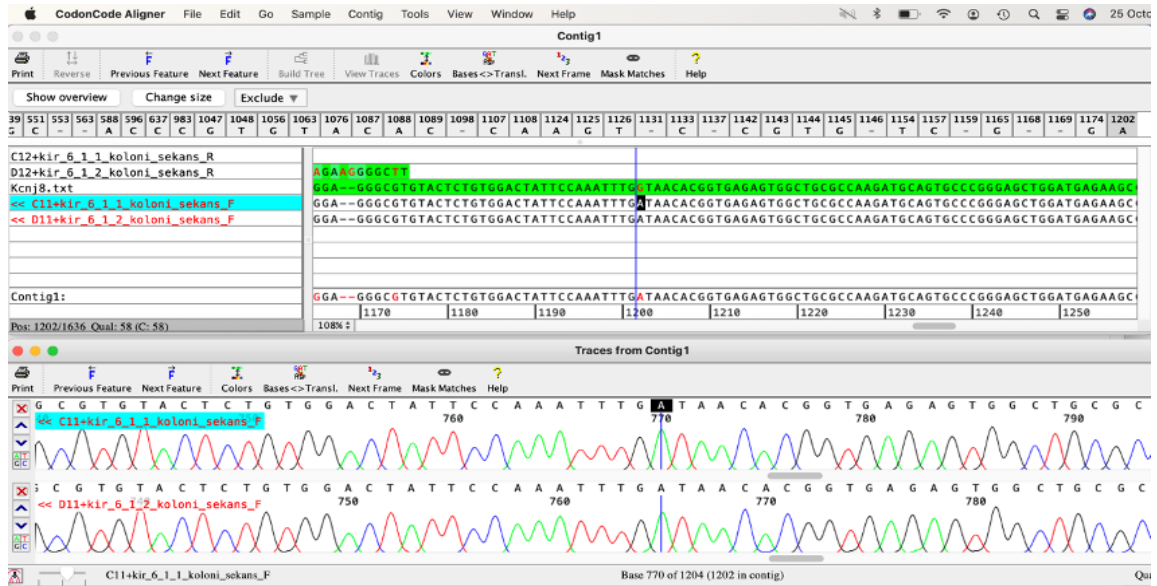
4.2. Mutagenез Yapılarak Diyabet Modelleri Oluşturuldu

KATP kanalında por oluşturan Kir6.1 veya Kir6.2 alt ünitelerinin fonksiyon kazandırıcı mutasyon içeren izoformlarının yüksek düzeyde ekspresyonunun, β -

hücrelerinde azalmış insülin sekresyonuna bağlı glukoz intoleransına yol açtığı ve bu hücrelerin diyabet modeli olarak kullanılabilirdiği bilinmektedir (Nguyen et al. 2014; Remedi et al. 2017). Bu bilgiler doğrultusunda, çalışmamızda öncelikle bir diyabet modeli geliştirildi. Ayrıca, ATP'ye bağımlı olarak aktive olan K_{ATP} kanallarının ATP'ye duyarsız hale getirilmesinin insülin salgısını olumsuz etkilediği gösterilmiş olduğundan (Shimomura ve Maejima 2017), seçilen model hipotezimize uygun bir şekilde tasarlandı.

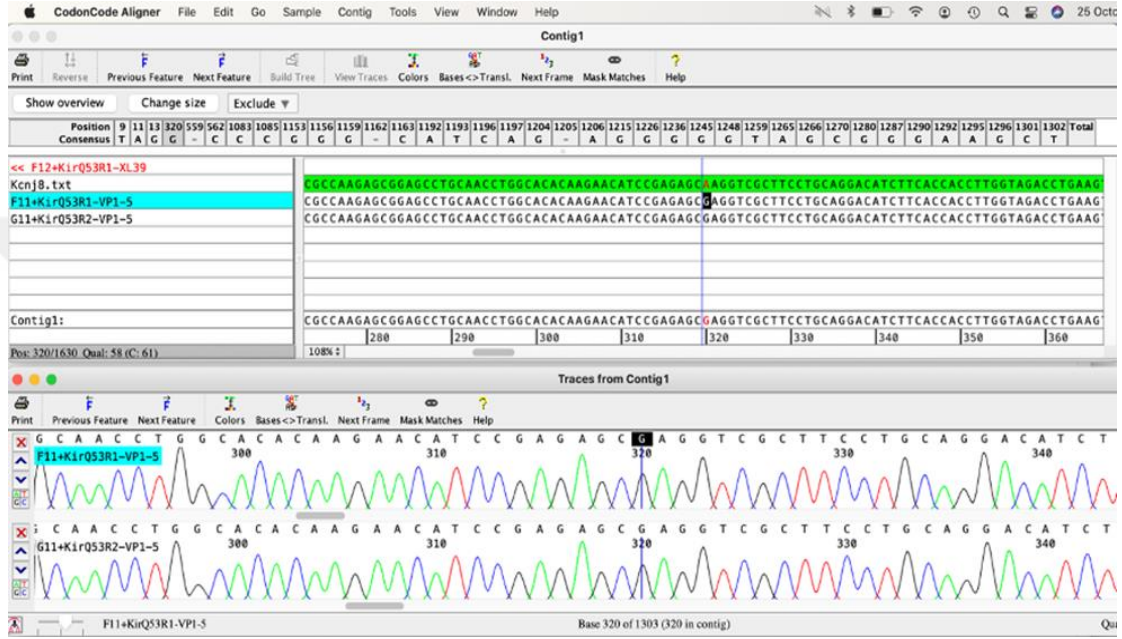
Fare β -hücrelerinde diyabet modeli oluşturulması için, fare Kir6.1[WT] genini (Kcnj8) taşıyan (Kcnj8 (NM_008428) Mouse Tagged ORF Clone) plasmit ve kontrol vektörü (pCMV6-Entry Mammalian Expression Vector) kullanıldı. Fonksiyon kazandırıcı Kcnj8 [G343D] veya Kcnj8 [G343D, Q53R] mutasyonlarının oluşturulması için mutagenез gerçekleştirildi. Çalışmada Çizelge 3.3'te verilen QuikChange Primer Design Tool kullanılarak tasarlanan mutagenез primer dizileri kullanıldı.

Mutagenез oluşturulurken öncelikle G343D mutasyonu oluşturuldu. Mutasyonun oluşturulduğu Sanger dizilemesi yapılarak teyit edildi ve Şekil 4.2'de verildi. Burada 343. pozisyonda bulunan Glisin (G) amino asidini kodlayan GGT dizisi, Aspartat (D) amino asidini kodlayan GAT nükleotit dizisine dönüştürülerek, K_{ATP} kanalında por oluşturan Kir6.1'de fonksiyon kazandırıcı ilk mutasyon oluşturuldu.



Şekil 4.2. Kcnj8 [WT] plazmitte G343D mutasyonunun oluşturulmasının Sanger dizileme ile gösterilmesi.

G343D mutasyonu yanı sıra Q53R mutasyonunu da taşıyan diğer mutant plazmiti oluşturmak için Kcnj8 [G343D] plazmiti kullanıldı ve Çizelge 3.3'te sunulan primer çifti kullanılarak mutasyon oluşturuldu. Mutasyon Sanger dizileme ile doğrulandı ve Şekil 4.3'te verildi. 53. pozisyonda bulunan Glutamin (Q) amino asidini kodlayan CAA dizisi, Arjinin (R) amino asidini kodlayan CGA nükleotit dizisine dönüştürülerek K_{ATP} kanalında por oluşturan Kir6.1'de fonksiyon kazandırıcı ikinci mutasyonda oluşturuldu.



Şekil 4.3. Kcnj8 [G343D] plazmitte Q53R mutasyonunun oluştuğunun Sanger dizileme ile gösterilmesi.

4.3. NIT-1 Hücrelerinin Kcnj8 (Kir6.1) ile Stabil Transfeksiyonu Yapılarak Diyabet Modelleri Geliştirildi

Kontrol plazmidi, Kcnj8 [WT], Kcnj8 [G343D] ve Kcnj8 [G343D, Q53R] plazmidleri, *E. coli*'ye transformasyon işlemi sonrası kolonilerden uygun şekilde izole edildi. Sonrasında, yabancıl tip ve mutant Kcnj8'i stabil olarak ifade eden hücreleri elde etmek için NIT-1 hücreleri 6-kuyulu platelere uygun sayılarda ekilerek transfeksiyon işlemine tabi tutuldu. Hücrelerin kalıcı olarak Kcnj8'i ifade edebilmesi için transfeksiyondan 1 gün sonra hücrelere selektif besi yeri (Geneticin (G418), 250µg/mL) eklenerek en az 3-4 hafta boyunca Kcnj8 genini stabil olarak ifade eden hücreler başarılı bir şekilde seçildi. Seçimi tamamlanan hücreler ile çalışmalara devam edildi.

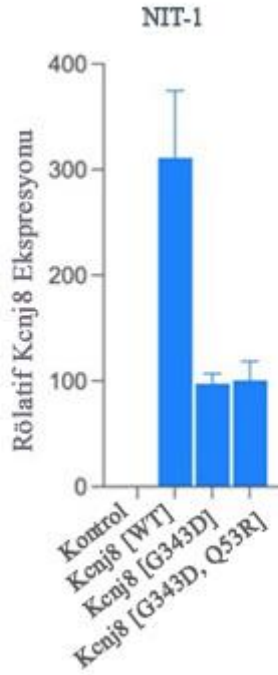
4.4. Kcnj8 (Kir6.1) ile Stabil Transfeksiyonu Yapılarak Diyabet Modeli Oluşturulan NIT-1 Hücrelerinden RNA İzolasyonu Yapıldı

Kcnj8 (Kir6.1) genini stabil olarak ifade eden hücrelerin seçilimini doğrulamak için transfeksiyonu yapılarak diyabet modeli oluşturulan NIT-1 hücrelerinden RNA izolasyonu yapıldı. Total RNA'lar seçilimi yapılmış NIT-1 hücrelerinden eşit miktarda kullanılarak izole edildi ve RNA örneklerinin konsantrasyonu ve saflığı spektrofotometre kullanılarak, saflığı ise agaroz jelde yürütülerek belirlendi.

4.5. Kcnj8 (Kir6.1) ile Stabil Transfeksiyonu Yapılarak Diyabet Modeli Oluşturulan NIT-1 Hücrelerinde cDNA Sentezlenerek Real-Time PCR ile mRNA Seviyesinde Doğrulama Yapıldı

Kcnj8'in ekspresyon analizi için, total RNA'dan cDNA sentezi gerçekleştirildi. SYBR Green PCR Master Mix ile Real-Time PCR reaksiyonları takip edildi ve ekspresyon bilgisi β -aktin ile normalize edildi. Real-Time PCR, gerçek zamanlı termal döngü cihazında, standart parametreler kullanılarak yürütüldü. Real-Time PCR primer dizileri Çizelge 3.4'te verildi.

Hücrelerin artmış Kcnj8 ifadesine sahip olduğu ve dolayısıyla K_{ATP} kanalında por oluşturan Kir6.1'de fonksiyon kazandırıcı mutasyonları barındırdığı mRNA düzeyinde gösterilerek diyabet modeli geliştirildiği doğrulandı. Yabanıl tip ve mutant Kcnj8'i stabil olarak ifade eden hücrelerde mRNA düzeyinde Kcnj8 ifade seviyesi Şekil 4.4'te gösterildi.



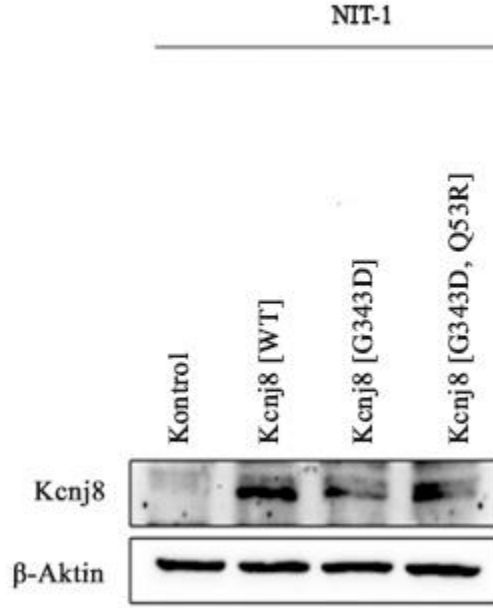
Şekil 4.4. Yabanıl tip ve mutant Kcnj8'i stabil olarak ifade eden hücrelerde mRNA düzeyinde Kcnj8 ifade seviyesi.

4.6. Kcnj8 (Kir6.1) ile Stabil Transfeksiyonu Yapılarak Diyabet Modeli

Oluşturulan NIT-1 Hücrelerinde Western Blot ile Protein Seviyesinde Doğrulama Yapıldı

Yabanıl tip ve mutant Kcnj8'i stabil olarak ifade eden hücrelerde artan Kcnj8 ifadesinin protein düzeyinde değişimi incelendi. Elde edilen bulgular Kcnj8'in protein düzeyinde de arttığını ortaya koyarak diyabet modelinin geliştirildiğini doğruladı. Yabanıl tip ve mutant Kcnj8'i stabil olarak ifade eden hücrelerde protein düzeyinde Kcnj8 ifade seviyesi Şekil 4.5'te verildi.

K_{ATP} kanalının Ca^{2+} salınımı ve insülin sekresyonu üzerindeki merkezi rolünden hareketle, Remedi ve arkadaşları (2017) tarafından literatüre kazandırılmış fonksiyon kazandırıcı mutasyonlar ile oluşturulan ve bir monogenik diyabet örneği olan NDM modeli tarafımızdan bu aşamada elde edildi ve *in vitro* ortamda bir pankreatik β -hücre hattına başarılı bir şekilde uygulanarak da model geliştirildi.



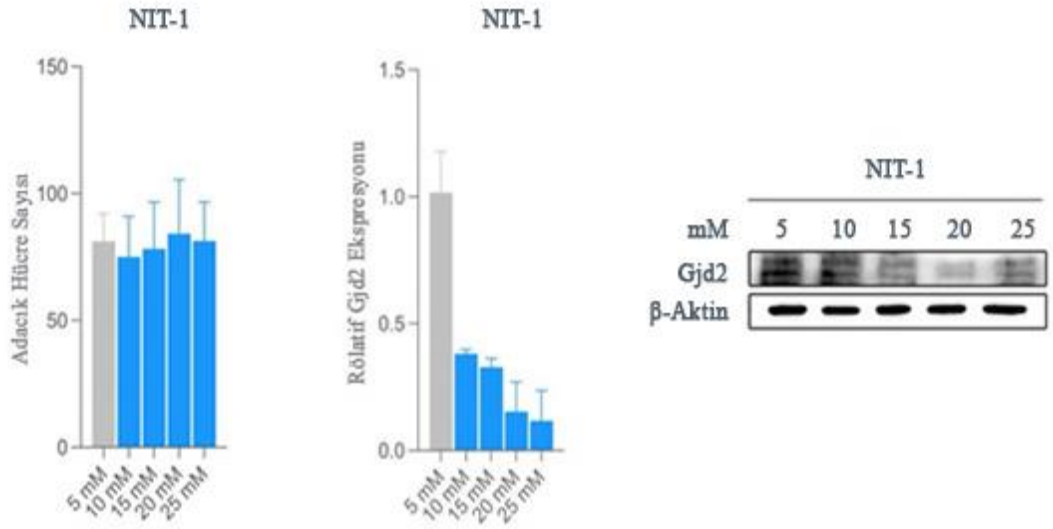
Şekil 4.5. Yabanıl tip ve mutant Kcnj8'i stabil olarak ifade eden hücrelerde protein düzeyinde Kcnj8 ifade seviyesi.

4.7. Gj2'nin (Cx36) Stabil İnhibisyonuna Sahip NIT-1 Hücrelerinin Oluşturulması Sağlandı

Yapılan *in vitro* çalışmalar, yüksek glukoz değerlerinin β -hücrelerinde Cx ifadesini maruz kalınan glukoz yoğunluğuna ve maruz kalma süresine bağlı olarak düşürdüğünü ortaya koymuştur (Allagnat et al. 2005; Sato et al. 2002). Buradan hareketle yüksek plazma glukoz değerlerine uzun süre maruz kalan adacıklarda, gap bağlantı kanallarının azaldığı gözlemlenmiştir. Hipotezimize göre sağlıklı ve sağlıklı hücrelerden oluşan heterojen bir adacıkta, hücreler arasındaki gap bağlantı kanallarının güçlü olması, sağlıklı hücrelerin sağlıklı hücreler tarafından baskılanmasına neden olabilir. Bu nedenle, glukoz seviyesi yüksek olmasına rağmen, tüm popülasyonun elektriksel aktivitesi ve Ca^{2+} konsantrasyonu düşük kalacaktır. Bu durum, düşük insülin salgılanmasını ifade etmektedir. Bu durumun devam ettiği ilerleyen safhalarında, β -hücreleri arasındaki gap bağlantılarının kuvvetini belirleyen gc değerinin kontrollü bir biçimde azaltılmasının, sağlıklı hücreleri ağına dışına iterek, sağlıklı hücrelerin salınımlar yapmasına olanak tanıyabileceği fikrini akıllara getirmiştir. Bu doğrultuda, diyabet başlangıcında yükselen plazma glukoz değerlerine bağlı olarak gap bağlantı

kanallarının ekspresyonlarında meydana gelecek düşüş, hipotezimizin doğrulanmasına katkı sağlayacaktır.

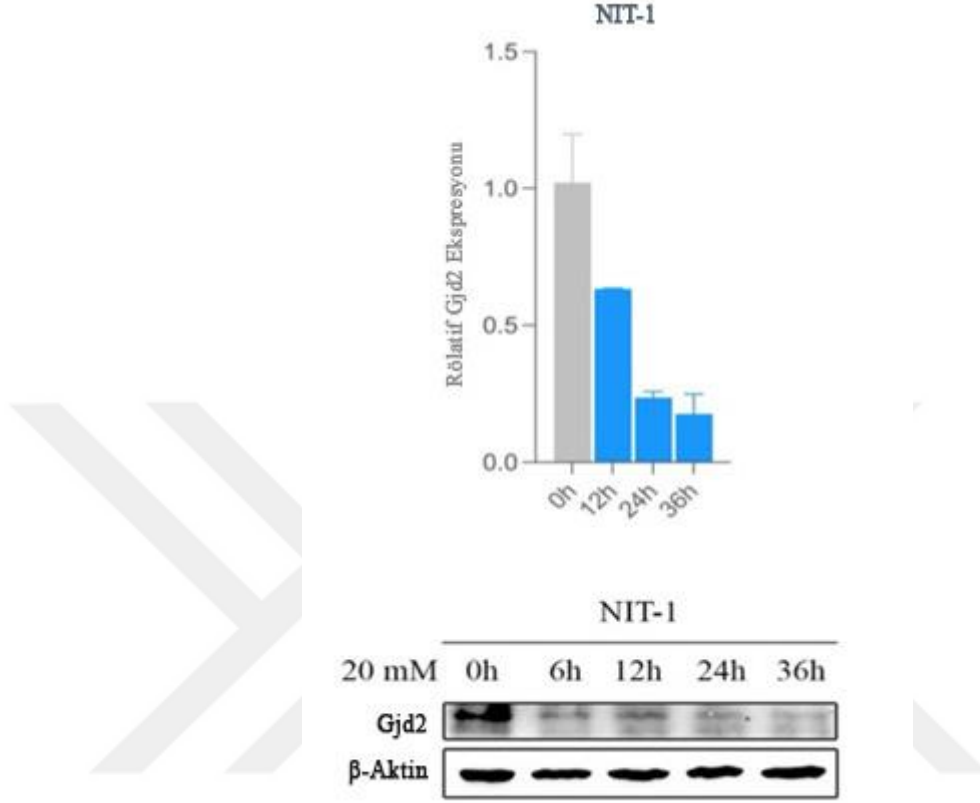
Bu amaçla hipotezimizi test etmek için, diyabet modeli oluşturduğumuz β -hücrelerinde Gjd2 (Cx36) ifadesi glukozla muamele ile ve sentetik olarak inhibe edilerek düşürülmek suretiyle hücrelerin salınımlarını geri kazanıp kazanmayacağı araştırıldı. Bu kapsamda ilk olarak glukozla zamana ve doza bağlı değişimleri içeren deneyler yapıldı. Hücreler öncelikle 5, 10, 15, 20 ve 25 mM glukoz ile 24 saat muamele edildi ve hücrelerdeki Gjd2 ifade değişimi hem mRNA hem de protein düzeyinde incelendi. Bulgularımız değişen konsantrasyonlarda glukoz ile muamele edildiğinde (5-25mM), adacıklardaki hücre sayısının değişmediğini, hücrelerde Gjd2 ifadesinin doza bağlı olarak azaldığını hem mRNA hem de protein düzeyinde gösterdi. Artan dozda glukoz ile muamele edilen NIT-1 hücrelerinde mRNA ve protein düzeyinde Gjd2 ifade seviyesi Şekil 4.6'da verildi.



Şekil 4.6. Artan dozda glukoz ile muamele edilen NIT-1 hücrelerinde mRNA ve protein düzeyinde Gjd2 ifade seviyesi.

Elde ettiğimiz verilerden ve literatürden hareketle ideal doz olarak seçtiğimiz 20 mM glukoz ile Gjd2'nin zamana bağlı değişimlerini görmek amacıyla deneyler yapıldı. 20 mM glukoz ile 36 saate kadar değişen sürelerde glukoz ile muamele edilen hücrelerde de benzer şekilde Gjd2 ifadesinin azaldığı hem protein hem de mRNA düzeyinde

gösterildi. Değişen sürelerde glukoz ile muamele edilen NIT-1 hücrelerinde mRNA ve protein düzeyinde Gjd2 ifade seviyesi Şekil 4.7’de verildi.

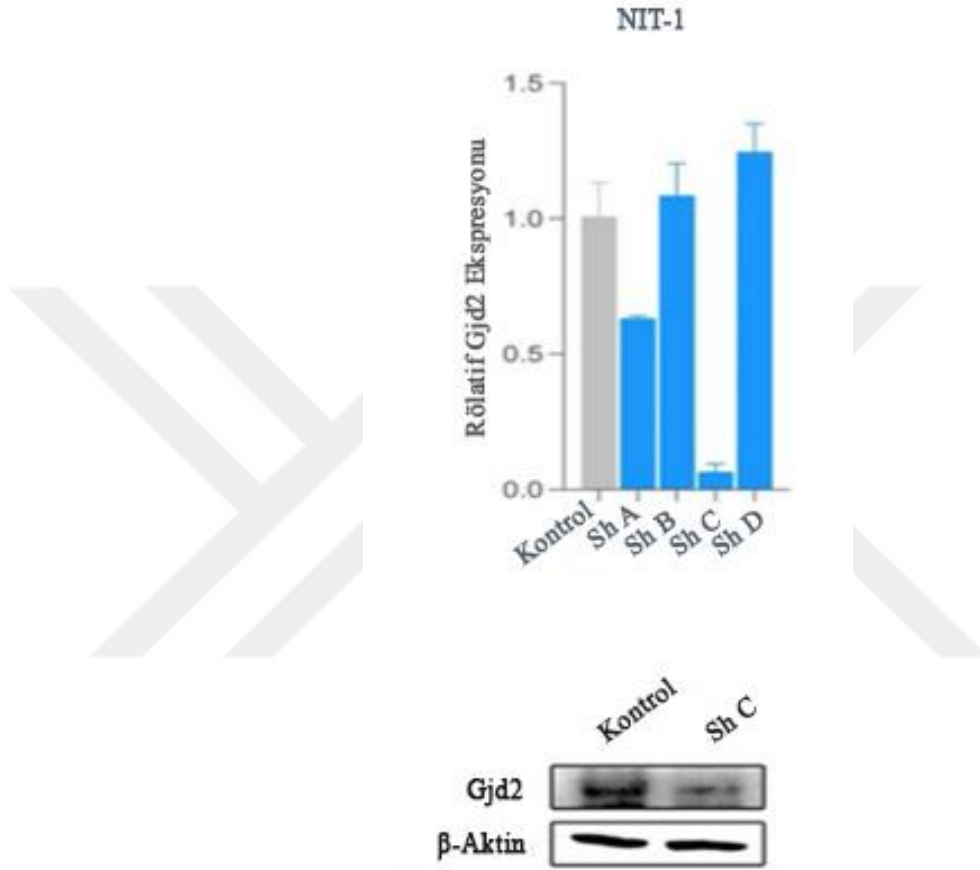


Şekil 4.7. Değişen sürelerde glukoz ile muamele edilen NIT-1 hücrelerinde mRNA ve protein düzeyinde Gjd2 ifade seviyesi.

4.8. Kcnj8 (Kir6.1) ile Stabil Transfeksiyonu Yapılarak Diyabet Modeli Oluşturulan NIT-1 Hücrelerinde Gjd2’nin (Cx36) Stabil İnhibisyonu Gerçekleştirildi

Gjd2’nin diyabet modeli β -hücrelerinde azalmış fakat tamamen susturulmamış ifadesinin β -hücrelerinden Ca^{2+} salınım osilasyonunu geri kazandırıp kazandırmadığının araştırılması için Kcnj8’i stabil olarak overeksprese eden NIT-1 hücrelerinde pGFP-C-shLenti vektörü kullanarak Gjd2 ifadesinin stabil olarak inhibe edildiği hücrelerin elde edilmesi hedeflendi. Bu kapsamda temin edilen shRNA’ların verimliliklerinin test edilmesi adına 4 adet Gjd2’yi hedefleyen ve 1 adet kontrol shRNA plazmidi NIT-1 hücrelerine transfekte edildi ve hücrelerin seçimleri yapıldı. Seçimlerini tamamlayan hücrelerde Gjd2 ifadesi hem mRNA düzeyinde, hem de protein düzeyinde incelendi.

Bulgularımız kullanılan shRNA'lar arasında en iyi susturmanın ShC ile gerçekleştirildiğini gösterdi. Bu sonuçlar dikkate alınarak sonraki çalışmalar bu shRNA kullanılarak yürütüldü. 4 farklı shRNA ile transfekte edilip seçimleri yapılan NIT-1 hücrelerinde mRNA ve protein düzeyinde Gjd2 ifade seviyesi Şekil 4.8'de verildi.

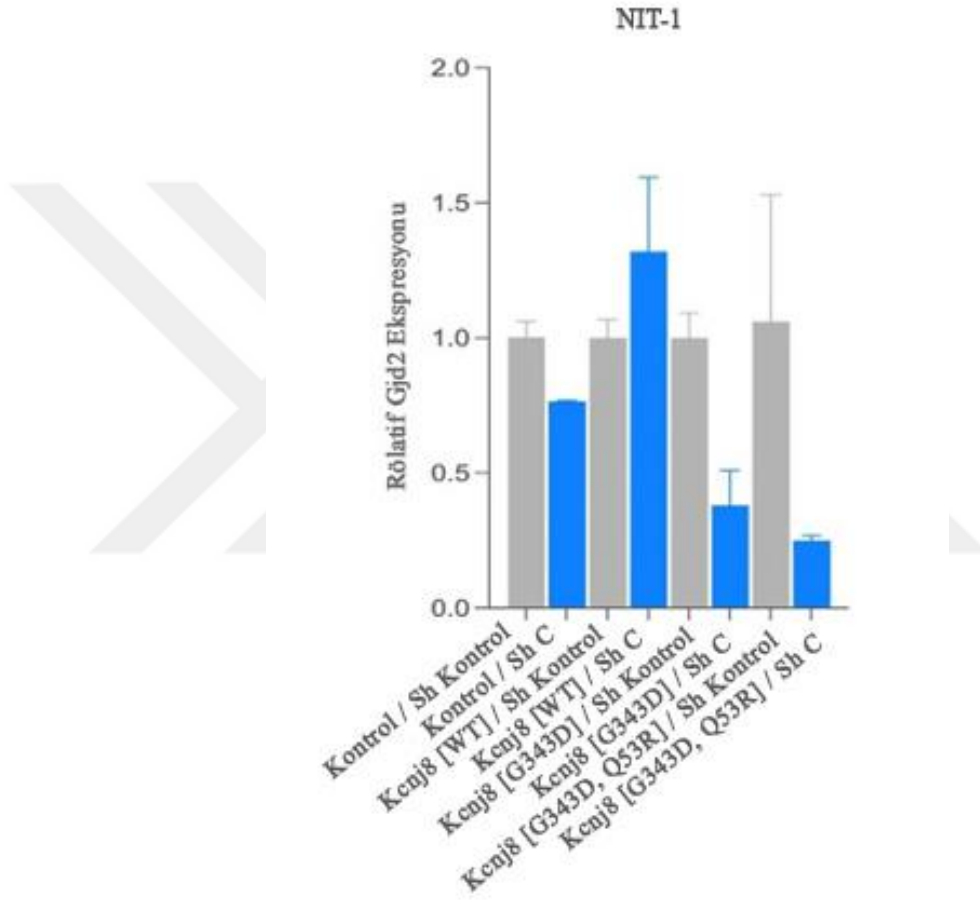


Şekil 4.8. 4 farklı shRNA ile transfekte edilip seçimleri yapılan NIT-1 hücrelerinde mRNA ve protein düzeyinde Gjd2 ifade seviyesi.

4.9. Transfeksiyon İşlemi Gerçekleştirildi ve Real-Time PCR ile Doğrulaması Yapıldı

Yabanıl tip ve mutant Kcnj8'i stabil olarak ifade eden hücrelerde (Kontrol, Kcnj8 [WT], Kcnj8 [G343D] ve Kcnj8 [G343D, Q53R]) Gjd2 ifadesinin susturulması için 1 adet kontrol shRNA plazmidi ve ShC plazmidi NIT-1 hücrelerine transfekte edildi ve hücrelerin seçimleri yapıldı. Seçimleri tamamlanan hücrelerde Gjd2 ifadesi hem mRNA düzeyinde hem de protein düzeyinde incelendi. Bulgularımız ile Kontrol, Kcnj8

[G343D] ve Kcnj8 [G343D, Q53R] gruplarında mRNA düzeyinde Gjd2 ifadesinin azaldığı gösterildi. Yabanıl tip ve mutant Kcnj8'i stabil olarak ifade eden hücrelerde (Kontrol, Kcnj8 [WT], Kcnj8 [G343D] ve Kcnj8 [G343D, Q53R]) ShC ile Gjd2 ifadesinin susturulması sonrasında mRNA düzeyinde Gjd2 ifade seviyesi Şekil 4.9'da verildi. mRNA düzeyindeki ifade analizi her ShC grubunun kendi kontrolüne göre rölatif ifade hesaplaması yapılarak gerçekleştirildi.

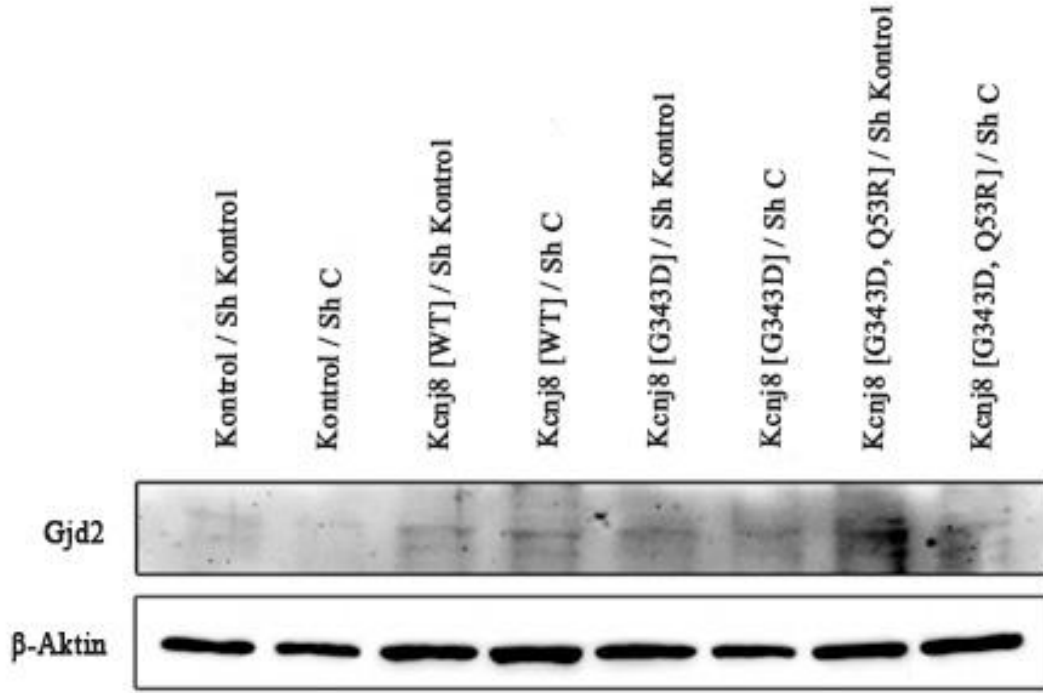


Şekil 4.9. Yabanıl tip ve mutant Kcnj8'i stabil olarak ifade eden hücrelerde (Kontrol, Kcnj8 [WT], Kcnj8 [G343D] ve Kcnj8 [G343D, Q53R]) ShC ile Gjd2 ifadesinin susturulması sonrasında mRNA düzeyinde Gjd2 ifade seviyesi.

4.10. Western Blot ile Protein Düzeyinde Doğrulama Yapıldı

Seçilimleri tamamlanan hücrelerde Gjd2 ifadesi protein düzeyinde de incelendiğinde yabanıl tip veya mutant Kir6.1'i yüksek düzeyde ifade eden gruplarda Gjd2 ifadesinin kontrol grubuna göre arttığı gözlemlendi. Ayrıca ShC gruplarında kontrol

gruplarına göre Gjd2 ifadelerinde azalma da protein düzeyinde teyit edildi. Yabanıl tip ve mutant Kcnj8'i stabil olarak ifade eden hücrelerde (Kontrol, Kcnj8 [WT], Kcnj8 [G343D] ve Kcnj8 [G343D, Q53R]) ShC ile Gjd2 ifadesinin susturulması sonrasında protein düzeyinde Gjd2 ifade seviyesi Şekil 4.10'da verildi.

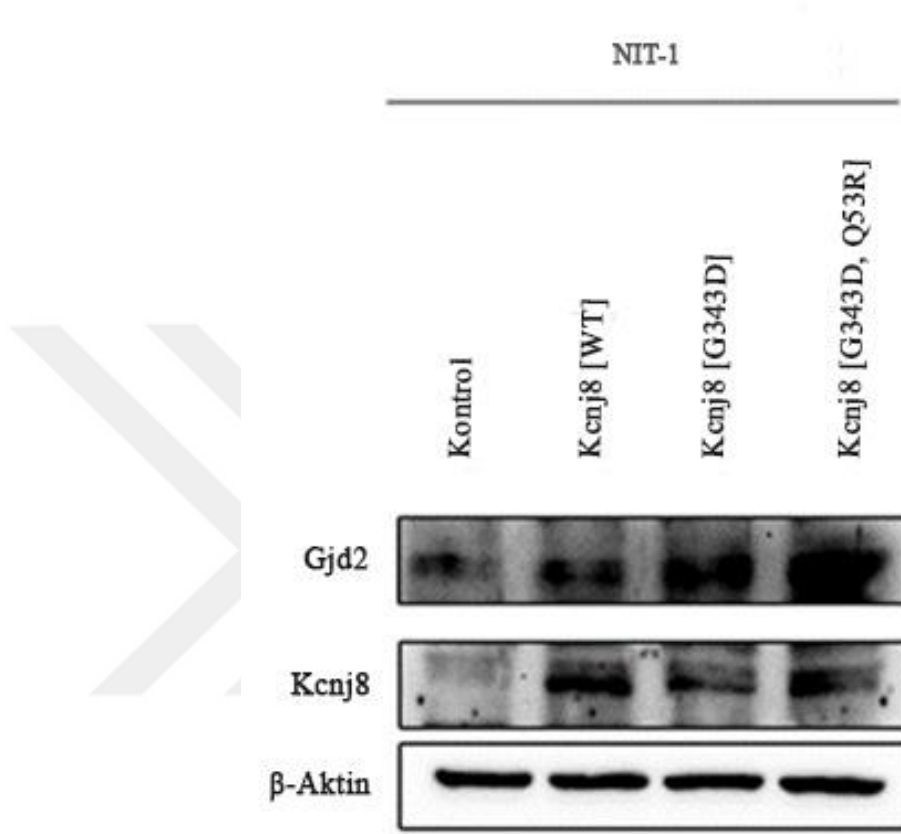


Şekil 4.10. Yabanıl tip ve mutant Kcnj8'i stabil olarak ifade eden hücrelerde (Kontrol, Kcnj8 [WT], Kcnj8 [G343D] ve Kcnj8 [G343D, Q53R]) ShC ile Gjd2 ifadesinin susturulması sonrasında protein düzeyinde Gjd2 ifade seviyesi.

4.11. Artan Kir6.1 İfadesinin Gjd2 İfadesinde Artışa Sebep Olduğu Gösterildi

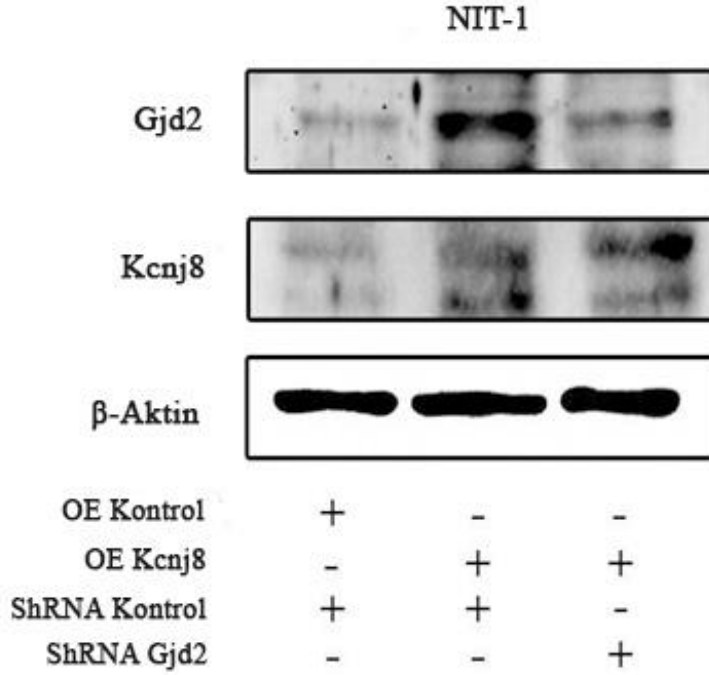
Kir6.1'in hücrelerde yüksek düzeyde ifade edilmesi sonrasında Gjd2 ifadesinin arttığı bulgusuna ulaşıldı. Bu sonucun diyabet gelişimi süreçlerinde önemli bir moleküler basamak olabileceği değerlendirilerek deneyler tekrar edildi ve artan Kir6.1 ifadesinin Gjd2 ifadesinde artışa sebep olduğu ve bu artışın 2 ayrı mutasyon barındıran Kir6.1'in yüksek düzeyde ifade edildiği hücrelerde en fazla olduğu ve yabanıl tip Kir6.1 ifade artışı sonrasında ise en az olduğu gösterildi. Yabanıl tip ve mutant Kcnj8'i stabil olarak ifade eden hücrelerde (Kontrol, Kcnj8 [WT], Kcnj8 [G343D] ve Kcnj8 [G343D, Q53R]) protein düzeyinde Gjd2 ifade seviyesi Şekil 4.11'de verildi. Bu durum diyabetik süreçlerde Gjd2 artışının önemli bir gösterge ya da moleküler katkı ile

ilişkilendirilebileceği ve hücreler arası etkileşimin bir sonucu olabileceği şeklinde değerlendirildi. Bu nedenle, fonksiyon kazandırıcı mutasyonlu β -hücrelerinde görülen Cx36 aşırı ekspresyonunun, glukoz uyarılı $[Ca^{2+}]_i$ salınımlarının bozulmasında önemli bir rol oynayabileceğini düşündürdü.



Şekil 4.11. Yabancı tip ve mutant Kcnj8'i stabil olarak ifade eden hücrelerde (Kontrol, Kcnj8 [WT], Kcnj8 [G343D] ve Kcnj8 [G343D, Q53R]) protein düzeyinde Gjd2 ifade seviyesi.

Hem artmış Kcnj8 ifadesi sonrasında Gjd2 ifadesinde en fazla artışın gözlemlendiği hem de shRNA ile susturma sonrasında Gjd2 ifadesinde en fazla düşüş gözlemlendiği için sonraki çalışmalara Kcnj8 [G343D, Q53R] grubu ile devam edilmesine karar verildi. Kcnj8 [G343D, Q53R]'i stabil olarak ifade eden hücrelerde protein düzeyinde Gjd2 ifade seviyesi Şekil 4.12'de verildi.



Şekil 4.12. Kcnj8 [G343D, Q53R]’i stabil olarak ifade eden hücrelerde protein düzeyinde Gjd2 ifade seviyesi.

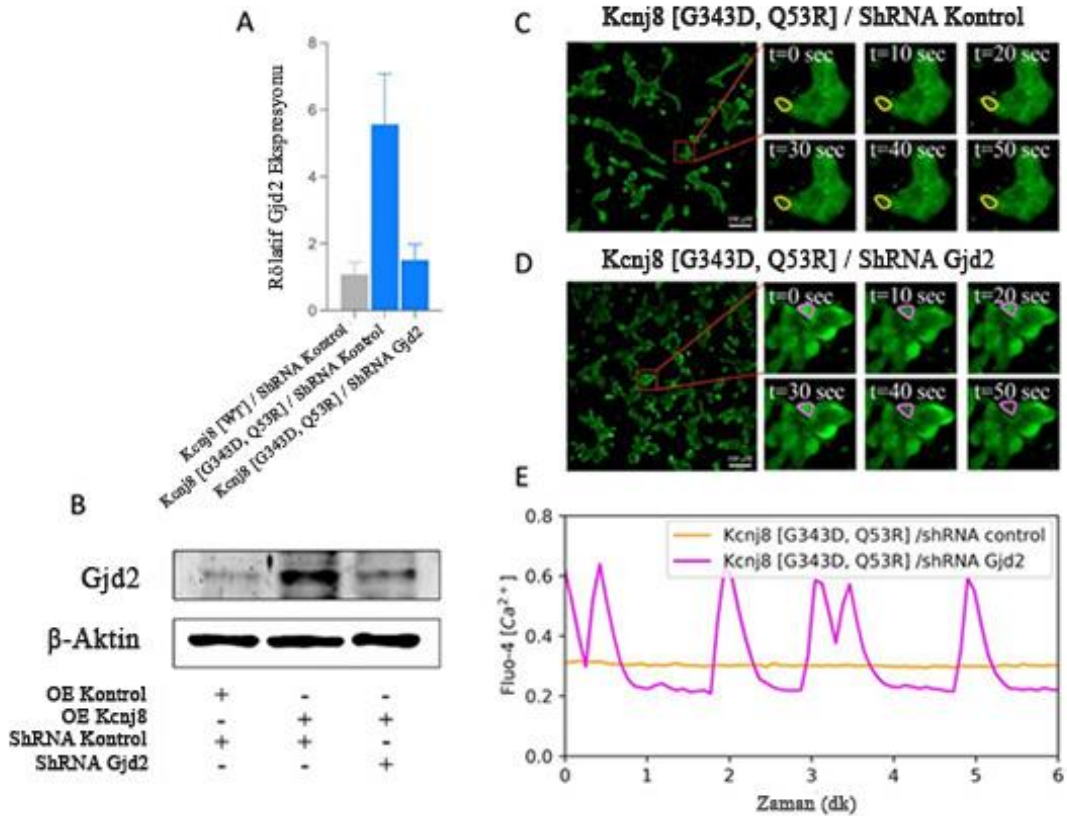
4.12. Cx36 İfadesi Azaltılmış Diyabet Modeli β-Hücrelerinde Hücre İçi Ca^{2+}

Miktarının Ölçülerek Osilasyon Geri Kazanımının Değerlendirilmesi Yapıldı

Kir6.1’deki fonksiyon kazandırıcı mutasyonlara sahip β-hücre aktivitesi üzerinde Cx36 ekspresyonunun azaltılmasının etkisini deneysel olarak test etmek amacıyla, Kcnj8 [G343D, Q53R] aşırı ekspresyonu yapılan NIT-1 hücrelerinde Gjd2’yi hedefleyen shRNA’lar kullanıldı (Kcnj8 [G343D, Q53R]/shRNA Gjd2). Bu çalışmanın sonucunda elde edilen Cx36 ifadesi azaltılmış diyabet modeli β-hücrelerinde $[Ca^{2+}]_i$ konsantrasyonları florometrik görüntüleme yöntemiyle ölçüldü.

Kcnj8 [G343D, Q53R]’i aşırı ifade eden NIT-1 hücrelerinde shRNA ile Gjd2 hedeflenerek Cx36 ekspresyonu kontrol seviyelerine düşürüldü. shRNA hedeflemesi ile Kcnj8 fonksiyon kazanımı mutasyonları taşıyan NIT-1 hücrelerinde (Kcnj8 [G343D, Q53R]) mRNA ve protein seviyelerinde Gjd2 ekspresyonunu azalttığı Şekil 4.13A ve B’de verildi. Kcnj8 [G343D, Q53R]/shRNA Kontrol ve Kcnj8 [G343D, Q53R]/shRNA Gjd2 (shRNA ile Gjd2 hedefli NIT-1) hücrelerinden 20 mM glukoz ile uyarım sonucunda florometrik Ca^{2+} ölçümleri kaydedildi. Hücreler 20 mM glukoz ile uyarıldığında Gjd2

susturulması olmaksızın Kcnj8 fonksiyon kazanımı mutasyonları taşıyan NIT-1 hücrelerinde (Kcnj8 [G343D, Q53R]/shRNA kontrolü) konfokal mikroskop kullanılarak yapılan Fluo-4 [Ca^{2+}]i görüntüleme ve shRNA hedefli Gjd2 susturulmuş NIT-1 hücreleri (Kcnj8 [G343D, Q53R]/shRNA Gjd2) Şekil 4.13C ve D’de verildi. Her grup için, $t=0-50$ saniye arasında, yakınlştırılmış bölgelerden 6 görüntü alındı (Şekil 4.13C ve D). Her yakınlştırılmış bölgede, belirtilen tek hücrelerden (Şekil 4.13C ve D, sarı ve eflatun belirteçler) normalize edilmiş [Ca^{2+}]i sinyal yoğunlukları 6 dakika boyunca kaydedildi (Şekil 4.13E). Kcnj8 [G343D, Q53R] aşırı ifadesine sahip hücreler tespit edilebilir Ca^{2+} salınımları göstermedi (Şekil 4.13E, sarı). Öte yandan, shRNA hedefli Gjd2 susturulması, Kcnj8 [G343D, Q53R] hücrelerinde glukoz uyarılı Ca^{2+} salınımlarını geri kazandırdı (Şekil 4.13E, mavi-eflatun).



Şekil 4.13. shRNA hedeflemesi, Kcnj8 fonksiyon kazanımı mutasyonları taşıyan NIT-1 hücrelerinde (Kcnj8 [G343D, Q53R]) mRNA’da (A) ve protein seviyelerinde (B) Gjd2 ekspresyonunu azalttı. Hücreler 20 mM glukoz ile uyarıldığında Gjd2 susturulması olmaksızın Kcnj8 fonksiyon kazanımı mutasyonları taşıyan NIT-1 hücrelerinde (Kcnj8 [G343D, Q53R]/shRNA kontrolü) konfokal mikroskop kullanılarak yapılan Fluo-4 [Ca^{2+}]i görüntüleme (C) ve shRNA hedefli Gjd2 susturulmuş NIT-1 hücreleri (Kcnj8 [G343D, Q53R]/shRNA Gjd2). Sağdaki paneller 10 saniyelik aralıklarla

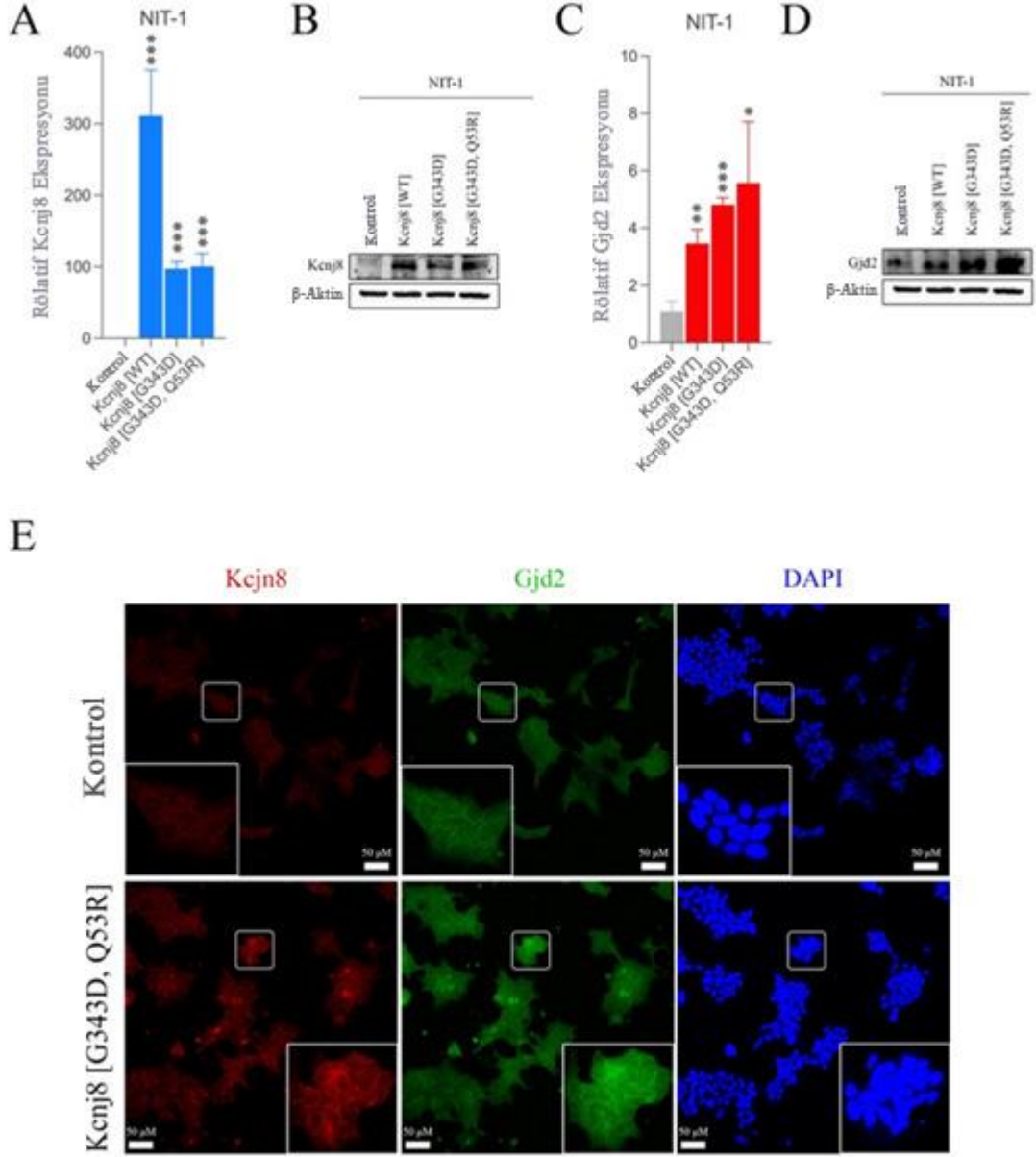
yakınlaştırılmış bölgeleri göstermektedir. E. Yakınlaştırılmış bölgeler içindeki temsili tek hücrelerden yakalanan Fluo-4 [Ca^{2+}]i sinyalinin göreceli yoğunluğu.

4.13. Kir6.1'deki Fonksiyon Kazanımı Mutasyonu Cx36 Yukarı Regülasyonu ile

Sonuçlandı

Fonksiyon kazanımı mutasyonları olan Kir6.1 alt birimini (Kcnj8) aşırı ifade eden NIT-1 hücrelerini geliştirmek için, yabancı tip Kcnj8 klonunda Q53R ile birlikte ve tek başına G343D mutasyonu üretmek için bölgeye yönlendirilmiş mutagenesis kullanıldı. Sanger dizilemesi yapılarak yönlendirilmiş mutagenesis doğrulandıktan sonra, NIT-1 hücreleri yabancı tip Kcnj8 (Kcnj8 [WT]) taşıyan vektörlerle ve Kcnj8 fonksiyon kazanımı mutasyonları olan vektörlerle (Kcnj8 [G343D] veya Kcnj8 [G343D, Q53R]) transfeğe edildi. Kcnj8'in aşırı ifadesi hem mRNA hem de protein düzeylerinde doğrulandı (Şekil 4.14A ve B). Kcnj8 aşırı ekspresyonunun Cx36 ekspresyonu üzerindeki etkisini anlamak için, fonksiyon kazanımı mutasyonları olan ve olmayan Kcnj8 aşırı ekspresyonu olan hücrelerde Gjd2 seviyeleri ölçüldü. Sonuçlarımız, WT veya mutant Kcnj8 aşırı ekspresyonu olan hücrelerin önemli bir Gjd2 yukarı regülasyonu sergilediğini gösterdi (Şekil 4.11 ve 4.12). Burada en belirgin Gjd2 yukarı regülasyonunun ise her iki Kcnj8 fonksiyon kazanımı mutasyonunu taşıyan hücrelerde bulunduğu gösterildi (Şekil 4.14C ve D).

Fonksiyon kazanımı mutasyonlarına sahip Kcnj8 aşırı ekspresyonu olan hücrelerde Gjd2 yukarı regülasyonunu ileri düzeyde doğrulamak amacıyla, mutant ve kontrol hücrelerinde Kcnj8 (Şekil 4.14E, kırmızı floresan) ve Gjd2 seviyelerini (Şekil 4.14E, yeşil floresan) yakalamak için konfokal mikroskop kullanıldı. Sonuçlarımız, mutant Kcnj8'in (Şekil 4.14E, Kcnj8 [G343D, Q53R]) kontrol grubuna (Şekil 4.14E, kontrol) kıyasla önemli ölçüde daha yüksek bir Gjd2 ifadesi gösterdiğini doğruladı.



Şekil 4.14. A. mRNA düzeyinde yabancı tip veya mutant Kcnj8'in [G343D, Q53R] stabil aşırı ekspresyonu olan hücrelerde Kcnj8'in bağıl ekspresyonu B. Protein düzeyinde yabancı tip veya mutant Kcnj8'in [G343D, Q53R] stabil aşırı ekspresyonu olan hücrelerde Kcnj8'in bağıl ekspresyonu C. mRNA düzeyinde yabancı tip veya mutant Kcnj8'in [G343D, Q53R] stabil aşırı ekspresyonu olan hücrelerde Gjd2'nin bağıl ekspresyonu D. Protein düzeyinde yabancı tip veya mutant Kcnj8'in [G343D, Q53R] stabil aşırı ekspresyonu olan hücrelerde Gjd2'nin bağıl ekspresyonu E. Yabancı tip veya mutant Kcnj8'in [G343D, Q53R] stabil aşırı ekspresyonu olan hücrelerde Kcnj8 ve Gjd2'nin konfokal mikroskop görüntüleri. (DAPI boyama hücre çekirdeklerinin yerini belirlemek için kullanıldı. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001)

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

T2DM’de, Langerhans adacıklarındaki β -hücreleri arasındaki Cx36 gap bağlantı kanallarının bozulması, Ca^{2+} dinamiklerini ve insülin salınımının koordine edilmesini olumsuz etkiler. Proinflamatuvar sitokinler ve serbest yağ asitleri, bu gap bağlantılarını *in vitro* bozarken, T2DM’li bireylerden ve farelerden alınan adacıklarda da benzer bozulmalar görülmüştür. Cx36 aşırı ekspresyonu, modafinil tedavisi ve Cx36’nın düzenleyici bölgesine yönelik bir peptit (S293), gap bağlantı iletkenliğini ve Ca^{2+} dinamiklerini iyileştirmiş, proinflamatuvar sitokinlerin neden olduğu apoptozu azaltmıştır. Bu yaklaşımlar, T2DM’de adacık fonksiyonlarını iyileştirme potansiyelini göstermektedir. Bu nedenle, Cx36 gap bağlantısının iyileştirilmesi veya güçlendirilmesi diyabette adacık fonksiyonunu düzenleyebilir (St Clair et al. 2023).

K_{ATP} kanallarındaki Kir6.2 ve SUR1 alt birimlerindeki fonksiyon kazandırıcı mutasyonlar, NDM’nin başlıca nedenlerindendir (Nguyen et al. 2014). Kir6.1 alt biriminin pankreas β -hücrelerindeki rolünü ortaya koyan başka bir çalışmada ise Kir6.1 fonksiyon kazandırıcı mutasyonlarını ifade eden farelerin azalmış insülin salgısı, glukoz intoleransı ve diyabet geliştirdiği gösterilmiştir. Transgenik farelerde, Kir6.1’in normalde bulunduğu dokularda ifade edilen mutasyonlar da benzer glukoz toleransı ve insülin salgısında sorunlara yol açmıştır. Kir6.1 alt biriminin K_{ATP} kanallarında doğal olarak bulunduğu ve insülin salgısının kontrolünde rol oynadığı, Real-Time PCR ile gösterilmiştir. Bu sonuçlar, Kir6.1’in pankreas β -hücrelerinde insülin salgısında ki önemini ortaya koymaktadır (Remedi et al. 2017).

Pankreas adacıklarındaki Cx36 gap bağlantı kanallarının glukoz metabolizması ve insülin salgısı üzerindeki etkileri de incelemiştir. Cx36, hücrelerde depolarizasyon ile ATP kaybına neden olmuş, ancak bu kayıp glukoz veya meflokin (Cx36 inhibitörü) ile engellenmiştir. Cx36 eksikliği olan (Cx36^{-/-}) adacıklarda ATP kaybı görülmezken, insülin salgısı glukozla tetiklenememiştir. Bu durum, Cx36’nın GSIS’da gerekli olduğunu ve eksikliğin glukoz intoleransına yol açabileceğini göstermektedir (Pizarro-Delgado et al. 2014).

T2DM'nin modellendiği *in vitro* bir çalışmada, β -hücre kümelerinin elektrofizyolojik bir modeli kullanılarak, β -hücre kütleindeki azalmaların ve elektriksel bağlantının bozulmasının insülin salgısı üzerindeki etkileri incelenmiştir. β -hücre kütleinin azalması, β -hücrelerinin fonksiyonel düşüşüne, senkronizasyon bozukluğuna ve Ca^{2+} dinamiklerinde değişikliklere yol açmıştır. Elektriksel bağlantının adacık fonksiyonunun düzenlenmesinde ve T2DM patogeneğinde kritik bir rol oynadığı bulunmuştur. Ayrıca, K_{ATP} kanallarındaki değişikliklerin, hücreler arası bağlantı eksikliği durumunda Ca^{2+} dinamiklerini ve insülin salgısını önemli ölçüde etkilediği öngörülmüştür (Saadati and Jamali 2021).

Diyabetle ilgili başka bir çalışmada, adacık hücreleri arasındaki gap bağlantısının, NDM gibi durumlarda adacık işlev bozukluğuna nasıl katkı sağladığı araştırılmıştır. ATP'ye duysız K_{ATP} kanalları olan hücrelerin, gap bağlantısı aracılığıyla adacık tepkisini baskılayabileceği gösterilmiş ve bu durum hesaplamalı modellerle doğrulanmıştır. Çalışma, farklı K_{ATP} kanal mutasyonlarının Ca^{2+} ve insülin salgılanmasını nasıl etkilediğini ve gap bağlantı iletkenliğindeki azalmaların GSIS'ı nasıl iyileştirdiğini göstermiştir. Bu bulgular, gap bağlantısının adacık işlevindeki rolünü anlamaya ve NDM gibi monogenik diyabet formları için yeni tedavi yaklaşımları geliştirmeye katkı sağlamaktadır (Notary et al. 2016).

Diğer bir çalışmada kalori kısıtlamasının, obezite ve prediyabet modellerinde Langerhans adacıklarındaki Cx36 gap bağlantılarını ve adacık işlevini koruyarak metabolik bozukluklara karşı koruma sağlayabildiği gösterilmiştir. Yüksek yağlı diyetle beslenen farelerde prediyabet belirtileri görülürken, %40 kalori kısıtlaması bu belirtileri tersine çevirmiş, insülin duyarlılığını artırmış ve glukoz seviyelerini iyileştirmiştir. Kalori kısıtlaması, obeziteyle ilişkili Cx36 gap bağlantısı kaybını önleyerek, Ca^{2+} sinyalini ve insülin salgılanmasını düzenlemiştir. Obezitede meydana gelen Cx36 gap bağlantı iletkenliğindeki düşüşlerin kalori kısıtlaması ve obezitenin tersine çevrilmesiyle tamamen düzeltilebileceği, Ca^{2+} dinamiklerini ve insülin salgısının düzenlenmesini iyileştirebileceği sonucuna varılmıştır (Corezola do Amaral et al. 2020).

Son yıllarda insülin sekresyonunun ve dolayısıyla Ca^{2+} salınımının bozulmasında rol alabileceği düşünülen yolak ve proteinler çalışılmış fakat çok azı diyabet tedavisinde

potansiyel bir hedef olarak gösterilmiştir. Örneğin VGCC'nin b3 alt birimi (Cavb3), pankreas β -hücrelerinde Ca^{2+} girişini ve insülin salgılanmasını düzenler, ancak diyabette aşırı ekspresyonu bu işlevleri bozar. Diyabetli farelerde Cavb3 aşırı ekspresyonu, $[Ca^{2+}]_i$ dinamiklerini ve insülin salgılanmasını bozarken, Cavb3 eksikliği (Cavb3^{-/-}) veya Cavb3 ekspresyonunun antisens oligonükleotid ile normalleştirilmesi, glukoz toleransını ve adacık işlevini iyileştirmiştir. İnsan adacıklarında da Cavb3 aşırı ekspresyonu insülin salgılanmasını bozmuştur. Bu bulgular, Cavb3'ün de diyabet tedavisinde potansiyel bir hedef olduğunu göstermektedir (Lee et al. 2018).

ATP'ye duyarsız K_{ATP} kanal mutasyonları, glukoz uyarılı Ca^{2+} aktivitesini ve insülin salgılanmasını baskılayarak NDM'ye yol açar. Cx36 gap bağlantı kanalları, adacıkların elektriksel aktivitelerini düzenler ve glukoz homeostazı üzerinde etkilidir. ATP'ye duyarsız K_{ATP} kanallarını ifade eden farelere Cx36'nın genetik nakavtının uygulandığı bir çalışmada, Cx36'nın eksikliğinin glukoz uyarılı Ca^{2+} ve insülin salgılanmasını normale yakın seviyelere geri getirdiği ve glukoz homeostazını iyileştirdiği gösterilmiştir. Bu bulgular, gap bağlantı iletkenliğinin azaltılmasının, diyabetin etkilerini hafifletmek için yeni bir mekanizma olabileceğini ortaya koymaktadır (Nguyen et al. 2014).

Tez çalışması kapsamında; NIT-1 hücrelerinde Kir6.1 alt birimini (Kcnj8) fonksiyon kazandırıcı mutasyonlarla aşırı ifade etmek amacıyla, G343D mutasyonunu hem tek başına hem de Q53R mutasyonu ile birlikte oluşturmak için yönlendirilmiş mutagenез yöntemi uygulandı. Yönlendirilmiş mutagenезin doğruluğunu Sanger dizileme ile doğruladıktan sonra NIT-1 hücrelerini yabanıl tip Kcnj8 taşıyan (Kcnj8 [WT]) veya Kcnj8 fonksiyon kazandırıcı mutasyonlarına sahip (Kcnj8 [G343D] veya Kcnj8 [G343D, Q53R]) vektörlerle transfekte edildi. Kcnj8'in aşırı ifadesinin hem mRNA hem de protein seviyelerinde arttığı gösterildi.

Kcnj8 aşırı ifadesinin Cx36 ekspresyonu üzerindeki etkisini anlamak için, fonksiyon kazandırıcı mutasyonlarla ve mutasyonsuz Kcnj8 aşırı ifadesi gösteren hücrelerde Gjd2 seviyeleri ölçüldü. Sonuçlar ile WT veya mutant Kcnj8 aşırı ifadesine sahip hücrelerin önemli ölçüde Gjd2 artışı gösterdiği ortaya konuldu. Gjd2'nin en belirgin artışının, Kcnj8'in her iki işlev kazandırıcı mutasyonunu taşıyan hücrelerde gerçekleştiği

gözlemlendi. Kcnj8'in fonksiyon kazandırıcı mutasyonları ile Gjd2 artışını doğrulamak için, konfokal mikroskop kullanarak mutant ve kontrol hücrelerinde Kcnj8 ve Gjd2 seviyeleri görüntülendi. Sonuçlar, Kcnj8 [G343D, Q53R] mutasyonlu hücrelerde Gjd2'nin kontrol hücrelerine kıyasla belirgin derecede daha yüksek bir kolokalizasyon gösterdiğini ortaya koyarak, Kcnj8 [G343D, Q53R] ekspresyonu ile Gjd2 arasındaki pozitif ilişkiyi güçlü bir şekilde ortaya koydu.

Kir6.1'de işlev kazandırıcı mutasyonlara sahip β -hücre aktivitesi üzerinde azalmış Cx36 ekspresyonunun etkisini deneysel olarak test etmek amacıyla, Kcnj8 [G343D, Q53R] aşırı ekspresyonu yapılan NIT-1 hücrelerinde Gjd2'yi hedefleyen shRNA'lar kullanıldı (Kcnj8 [G343D, Q53R]/shRNA Gjd2) ve florometrik görüntüleme yöntemiyle $[Ca^{2+}]_i$ konsantrasyonları ölçüldü. Hedeflenen shRNA, Kcnj8 [G343D, Q53R] aşırı ekspresyonu yapılan NIT-1 hücrelerinde Gjd2 ekspresyonunu kontrol seviyelerine indirdi (shRNA Gjd2). Kcnj8 [G343D, Q53R] aşırı ekspresyonu yapılmış kontrol grubunda ve Gjd2 shRNA hedefli NIT-1 hücrelerinde florometrik $[Ca^{2+}]_i$ ölçümleri kaydedildi. Her grup için $t = 0-50$ saniye arasında, yakınlştırılmış bölgelerden 6 görüntü alındı. Her yakınlştırılmış bölgede, belirtilen tek hücrelerden normalleştirilmiş $[Ca^{2+}]_i$ sinyal yoğunlukları 6 dakika boyunca gösterildi. Kcnj8 [G343D, Q53R] aşırı ekspresyonuna sahip diyabetli hücrelerde $[Ca^{2+}]_i$ salınımları tespit edilmezken, shRNA ile Gjd2'nin baskılanması, bu hücrelerde glukozla uyarılan $[Ca^{2+}]_i$ salınımlarının yeniden oluşmasını sağladı.

Bu çalışmaya, öncelikle heterojen β -hücrelerinin genel yapıları ve insülin salınımının düzenlenmesi açısından tanımlanmış β -hücre alt popülasyonlarının özellikleri dikkate alınarak başlandı. Adacık içindeki β -hücrelerinin ve onların işlevsel alt popülasyonlarının adacık işlevi üzerindeki kontrol mekanizmasının doğası hipotezimizi kurmada bize yardımcı oldu. β -hücrelerinin (ve diğer endokrin hücrelerin) işlevsel olarak heterojen olduğu göz önüne alınarak, bu hücrelerin adacık içinde birbirlerini etkileme potansiyelleri olabileceği değerlendirildi. Son olarak, β -hücreleri arasındaki işlevsel heterojenliğin diyabetli durumda kaybolan Ca^{2+} salınımını geri getirmede kullanılabileceği gösterildi.

Mevcut çalışma ve önceki deneysel verilere dayanarak, Cx36'nın azaltılmış ekspresyonunun Kir6.1 fonksiyonel mutasyonlu NIT-1 hücrelerinde Ca^{2+} salınımını iyileştirdiğini ve bu nedenle diyabet tedavisinde potansiyel bir hedef olabileceğini öne sürmekteyiz. Ayrıca, fonksiyon kazandırıcı mutasyon taşıyan β -hücrelerinde görülen Cx36 aşırı ekspresyonunun, glukoz uyarılı $[Ca^{2+}]_i$ salınımlarının bozulmasında önemli bir rol oynadığı da gösterilmiştir.

Heterojen β -hücrelerinin hormon salınımının düzenlenmesini nasıl kontrol ettiğine ve elektriksel aktivite geçirgenliğine dair çok şey öğrenmiş olsak da, daha eksiksiz bir resim elde etmek adına gen ifadesi farklılıkları gösteren β -hücre alt popülasyonlarının açıkça tanımlanması ve işlevdeki farklılıkların gösterilmesi gerekmektedir. Bazı β -hücre popülasyonlarının, yakındaki β -hücrelerinin ve diğer adacık hücrelerinin işlevini etkileyebilecek gap bağlantıları dışında farklı faktörler kullandığı da düşünülebilir. Bu nedenle, belirli faktörlerin β -hücre alt popülasyonları tarafından salınıp salınmadığını anlamak gelecekteki çalışmalar için temel bir hedeftir. Araştırmacıların β -hücre alt popülasyonlarının ayrıntılı moleküler ve işlevsel analizini kolaylaştırmak için daha fazla yol geliştirmeleri de gerekmektedir. Sonuçlarımız bir *in vitro* fare β -hücre modelinde, Kir6.1'deki fonksiyon kazanımı mutasyonunun Cx36 ekspresyonunda önemli bir artışa yol açtığını göstermektedir. Bu artışın β -hücre popülasyonlarının elektriksel aktivite farklarına etkisinin de ayrıntılı moleküler çalışmalarla ortaya konulması gerekmektedir. Ayrıca Cx36'yı hedef alan herhangi bir tedavinin iyileştirici bir etkiyi indüklemesi için çok iyi optimize edilmesi gerektiği de unutulmamalıdır.

Özetle, bu tez çalışması kapsamında aşağıdaki çıktılarına ulaşılmıştır;

1. Remedi ve arkadaşlarının (2017) fareler üzerinde ve primer kültür ortamında geliştirdiği NDM modeli, ilk kez NIT-1 hücreleri kullanılarak *in vitro* kültür koşullarında oluşturulmuş ve literatüre kazandırılmıştır.
2. Geliştirilen diyabet modelinde, β -hücreleri arasındaki gap bağlantı kanallarında rol oynayan Cx36 proteininin ekspresyon düzeyi incelenmiş ve ekspresyonda artış olduğu belirlenmiştir.
3. Artan Cx36 ifadesinin azaltılmasıyla, diyabetli hücrelerde kaybolan Ca^{2+} salınımları kontrol hücelere benzer şekilde geri getirilmiştir.

4. Cx36'nın diyabet tedavisinde yeni bir terapötik ajan olabileceği görüşü desteklenmiştir.



KAYNAKLAR

- Abascal, F., and Zardoya, R. 2013. Evolutionary analyses of gap junction protein families. *Biochim Biophys Acta*, 1828(1), 4-14.
- Abdul-Ghani, M. A., Tripathy, D., and DeFronzo, R. A. 2006. Contributions of β -cell dysfunction and insulin resistance to the pathogenesis of impaired glucose tolerance and impaired fasting glucose. *Diabetes Care*, 29(5), 1130-1139.
- Aguilar-Bryan, L., Clement, J. P., Gonzalez, G., Kunjilwar, K., Babenko, A., and Bryan, J. 1998. Toward understanding the assembly and structure of K_{ATP} channels. *Physiol Rev*, 78(1), 227-245.
- Aguilar-Bryan, L., Nichols, C. G., Wechsler, S. W., Clement, J. P., Boyd, A. E., González, G.,...Nelson, D. A. 1995. Cloning of the β -cell high-affinity sulfonylurea receptor: a regulator of insulin secretion. *Science*, 268(5209), 423-426.
- Alanentalo, T., Asayesh, A., Morrison, H., Lorén, C. E., Holmberg, D., Sharpe, J., and Ahlgren, U. 2007. Tomographic molecular imaging and 3D quantification within adult mouse organs. *Nat Methods*, 4(1), 31-33.
- Alberts, B., Johnson, a., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. 2008. *Molecular Biology of the Cell*. In.
- Allagnat, F., Martin, D., Condorelli, D. F., Waeber, G., and Haefliger, J. A. 2005. Glucose represses connexin36 in insulin-secreting cells. *J Cell Sci*, 118(Pt 22), 5335-5344.
- Andreu, E., Soria, B., and Sanchez-Andres, J. V. 1997. Oscillation of gap junction electrical coupling in the mouse pancreatic islets of Langerhans. *J Physiol*, 498 (Pt 3)(Pt 3), 753-761.
- Ashcroft, F. M., and Gribble, F. M. 1998. Correlating structure and function in ATP-sensitive K^+ channels. *Trends Neurosci*, 21(7), 288-294.
- Ashcroft, F. M., Harrison, D. E., and Ashcroft, S. J. 1984. Glucose induces closure of single potassium channels in isolated rat pancreatic β -cells. *Nature*, 312(5993), 446-448.
- Ashcroft, F. M., and Rorsman, P. 2013. $K(ATP)$ channels and islet hormone secretion: new insights and controversies. *Nat Rev Endocrinol*, 9(11), 660-669.
- Association, A. D. 2014. Standards of medical care in diabetes 2014. *Diabetes Care*, 37 Suppl 1, S14-80.
- Association, A. D. 2015. (2) Classification and diagnosis of diabetes. *Diabetes Care*, 38 Suppl, S8-S16.

- Babenko, A. P., Polak, M., Cavé, H., Busiah, K., Czernichow, P., Scharfmann, R., Froguel, P. 2006. Activating mutations in the ABCC8 gene in neonatal diabetes mellitus. *N Engl J Med*, 355(5), 456-466.
- Belousov, A. B., and Fontes, J. D. 2013. Neuronal gap junctions: making and breaking connections during development and injury. *Trends Neurosci*, 36(4), 227-236.
- Beltrand, J., Busiah, K., Vaivre-Douret, L., Fauret, A. L., Berdugo, M., Cavé, H., and Polak, M. 2020. Neonatal Diabetes Mellitus. *Front Pediatr*, 8, 540718.
- Benner, C., van der Meulen, T., Cacères, E., Tigyi, K., Donaldson, C. J., and Huising, M. O. 2014. The transcriptional landscape of mouse β -cells compared to human β -cells reveals notable species differences in long non-coding Rna and protein-coding gene expression. *BMC Genomics*, 15(1), 620.
- Benninger, R. K., Zhang, M., Head, W. S., Satin, L. S., and Piston, D. W. 2008. Gap junction coupling and calcium waves in the pancreatic islet. *Biophys J*, 95(11), 5048-5061.
- Benninger, R. K. P., and Kravets, V. 2022. The physiological role of β -cell heterogeneity in pancreatic islet function. *Nat Rev Endocrinol*, 18(1), 9-22.
- Blodgett, D. M., Nowosielska, A., Afik, S., Pechhold, S., Cura, A. J., Kennedy, N. J., DiIorio, P. 2015. Novel observations from next-generation Rna sequencing of highly purified human adult and fetal islet cell subsets. *Diabetes*, 64(9), 3172-3181.
- Bonnefond, A., Lomber, G., Buttar, N., Busiah, K., Vaillant, E., Lobbens, S., Urrutia, R. 2011. Disruption of a novel Kruppel-like transcription factor p300-regulated pathway for insulin biosynthesis revealed by studies of the c.-331 INS mutation found in neonatal diabetes mellitus. *J Biol Chem*, 286(32), 28414-28424.
- Bonner, C., Kerr-Conte, J., Gmyr, V., Queniat, G., Moerman, E., Thévenet, J., Pattou, F. 2015. Inhibition of the glucose transporter SglT2 with dapagliflozin in pancreatic alpha cells triggers glucagon secretion. *Nat Med*, 21(5), 512-517.
- Bosco, D., Armanet, M., Morel, P., Niclauss, N., Sgroi, A., Muller, Y. D., Berney, T. 2010. Unique arrangement of alpha- and β -cells in human islets of Langerhans. *Diabetes*, 59(5), 1202-1210.
- Bratusch-Marrain, P. R., Komjati, M., and Waldhäusl, W. K. 1986. Efficacy of pulsatile versus continuous insulin administration on hepatic glucose production and glucose utilization in type I diabetic humans. *Diabetes*, 35(8), 922-926.
- Braun, M., Ramracheya, R., Bengtsson, M., Clark, A., Walker, J. N., Johnson, P. R., and Rorsman, P. 2010. Gamma-aminobutyric acid (Gaba) is an autocrine excitatory transmitter in human pancreatic β -cells. *Diabetes*, 59(7), 1694-1701.
- Busiah, K., Drunat, S., Vaivre-Douret, L., Bonnefond, A., Simon, A., Flechtner, I., Group, F. N. s. 2013. Neuropsychological dysfunction and developmental defects

- associated with genetic changes in infants with neonatal diabetes mellitus: a prospective cohort study. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 1(3), 199-207.
- Cabrera, O., Berman, D. M., Kenyon, N. S., Ricordi, C., Berggren, P. O., and Caicedo, A. 2006. The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(7), 2334-2339.
- Campbell, J. E., and Newgard, C. B. 2021. Mechanisms controlling pancreatic islet cell function in insulin secretion. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 22(2), 142-158.
- Catterall, W. A. 2014. Sodium channels, inherited epilepsy, and antiepileptic drugs. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 54, 317-338.
- Clement, J. P., Kunjilwar, K., Gonzalez, G., Schwanstecher, M., Panten, U., Aguilar-Bryan, L., and Bryan, J. 1997. Association and stoichiometry of K_{ATP} channel subunits. *Neuron*, 18(5), 827-838.
- Cnop, M., Hughes, S. J., Igoillo-Esteve, M., Hoppa, M. B., Sayyed, F., van de Laar, L., Clark, A. 2010. The long lifespan and low turnover of human islet β -cells estimated by mathematical modelling of lipofuscin accumulation. *Diabetologia*, 53(2), 321-330.
- Cook, D. L., and Hales, C. N. 1984. Intracellular ATP directly blocks K⁺ channels in pancreatic β -cell. *Nature*, 311(5983), 271-273.
- Cook, D. L., Satin, L. S., Ashford, M. L., and Hales, C. N. 1988. ATP-sensitive K⁺ channels in pancreatic β -cells. Spare-channel hypothesis. *Diabetes*, 37(5), 495-498.
- Corezola do Amaral, M. E., Kravets, V., Dwulet, J. M., Farnsworth, N. L., Piscopio, R., Schleicher, W. E., Benninger, R. K. P. 2020. Caloric restriction recovers impaired β -cell- β -cell gap junction coupling, calcium oscillation coordination, and insulin secretion in prediabetic mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 319(4), E709-E720.
- DeFronzo, R. A. 2009. Banting Lecture. From the triumvirate to the ominous octet: a new paradigm for the treatment of Type 2 diabetes mellitus. *Diabetes*, 58(4), 773-795.
- DeFronzo, R. A., Ferrannini, E., Groop, L., Henry, R. R., Herman, W. H., Holst, J. J., Weiss, R. 2015. Type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Dis Primers*, 1, 15019.
- Detimary, P., Gilon, P., and Henquin, J. C. 1998. Interplay between cytoplasmic Ca²⁺ and the ATP/ADP ratio: a feedback control mechanism in mouse pancreatic islets. *Biochem J*, 333 (Pt 2)(Pt 2), 269-274.
- Docherty, L. E., Kabwama, S., Lehmann, A., Hawke, E., Harrison, L., Flanagan, S. E., Temple, I. K. 2013. Clinical presentation of 6q24 transient neonatal diabetes mellitus (6q24 Tndm) and genotype-phenotype correlation in an international cohort of patients. *Diabetologia*, 56(4), 758-762.

- Doherty, M., and Malaisse, W. J. 2001. Glycogen accumulation in rat pancreatic islets: in vitro experiments. *Endocrine*, 14(3), 303-309.
- Doliba, N. M., Qin, W., Najafi, H., Liu, C., Buettger, C. W., Sotiris, J., Matschinsky, F. M. 2012. Glucokinase activation repairs defective bioenergetics of islets of Langerhans isolated from Type 2 diabetics. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 302(1), E87-E102.
- Drews, G., Krippeit-Drews, P., and Düfer, M. 2010. Electrophysiology of islet cells. *Adv Exp Med Biol*, 654, 115-163.
- Dunne, M. J., and Petersen, O. H. 1986. Intracellular ADP activates K^+ channels that are inhibited by ATP in an insulin-secreting cell line. *FEBS Lett*, 208(1), 59-62.
- Eastman, S. D., Chen, T. H., Falk, M. M., Mendelson, T. C., and Iovine, M. K. 2006. Phylogenetic analysis of three complete gap junction gene families reveals lineage-specific duplications and highly supported gene classes. *Genomics*, 87(2), 265-274.
- Eddlestone, G. T., Gonçalves, A., Bangham, J. A., and Rojas, E. 1984. Electrical coupling between cells in islets of Langerhans from mouse. *J Membr Biol*, 77(1), 1-14.
- Eliasson, L., Abdulkader, F., Braun, M., Galvanovskis, J., Hoppa, M. B., and Rorsman, P. 2008. Novel aspects of the molecular mechanisms controlling insulin secretion. *J Physiol*, 586(14), 3313-3324.
- Frayn, K. N. 2010. *Metabolic Regulation: A Human Perspective* (Vol. 3rd Edition).
- Garber, A. J., Abrahamson, M. J., Barzilay, J. I., Blonde, L., Bloomgarden, Z. T., Bush, M. A., Endocrinologists, A. A. o. C. 2013. AACE comprehensive diabetes management algorithm 2013. *Endocr Pract*, 19(2), 327-336.
- Gardner, D. S., and Tai, E. S. 2012. Clinical features and treatment of maturity onset diabetes of the young (Mody). *Diabetes Metab Syndr Obes*, 5, 101-108.
- Gerstein, H. C., Santaguida, P., Raina, P., Morrison, K. M., Balion, C., Hunt, D., Booker, L. 2007. Annual incidence and relative risk of diabetes in people with various categories of dysglycemia: a systematic overview and meta-analysis of prospective studies. *Diabetes Res Clin Pract*, 78(3), 305-312.
- Gilon, P., Shepherd, R. M., and Henquin, J. C. 1993. Oscillations of secretion driven by oscillations of cytoplasmic Ca^{2+} as evidences in single pancreatic islets. *J Biol Chem*, 268(30), 22265-22268.
- Girard, C. A., Wunderlich, F. T., Shimomura, K., Collins, S., Kaizik, S., Proks, P., Ashcroft, F. M. 2009. Expression of an activating mutation in the gene encoding the K_{ATP} channel subunit Kir6.2 in mouse pancreatic β -cells recapitulates neonatal diabetes. *J Clin Invest*, 119(1), 80-90.

- Gloyn, A. L., Pearson, E. R., Antcliff, J. F., Proks, P., Bruining, G. J., Slingerland, A. S., Hattersley, A. T. 2004. Activating mutations in the gene encoding the ATP-sensitive potassium-channel subunit Kir6.2 and permanent neonatal diabetes. *N Engl J Med*, 350(18), 1838-1849.
- Goodenough, D. A. 1974. Bulk isolation of mouse hepatocyte gap junctions. Characterization of the principal protein, connexin. *J Cell Biol*, 61(2), 557-563.
- Gribble, F. M., and Reimann, F. 2003. Sulphonylurea action revisited: the post-cloning era. *Diabetologia*, 46(7), 875-891.
- Gribble, F. M., Tucker, S. J., and Ashcroft, F. M. 1997a. The essential role of the Walker A motifs of SUR1 in K_{ATP} channel activation by Mg-ADP and diazoxide. *EMBO J*, 16(6), 1145-1152.
- Gribble, F. M., Tucker, S. J., and Ashcroft, F. M. 1997b. The interaction of nucleotides with the tolbutamide block of cloned ATP-sensitive K⁺ channel currents expressed in *Xenopus* oocytes: a reinterpretation. *J Physiol*, 504 (Pt 1)(Pt 1), 35-45.
- Gribble, F. M., Tucker, S. J., Haug, T., and Ashcroft, F. M. 1998. MgATP activates the β -cell K_{ATP} channel by interaction with its SUR1 subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(12), 7185-7190.
- Gutman, G. A., Chandy, K. G., Grissmer, S., Lazdunski, M., McKinnon, D., Pardo, L. A., Wang, X. 2005. International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacol Rev*, 57(4), 473-508.
- Göpel, S., Kanno, T., Barg, S., Galvanovskis, J., and Rorsman, P. 1999. Voltage-gated and resting membrane currents recorded from B-cells in intact mouse pancreatic islets. *J Physiol*, 521 Pt 3(Pt 3), 717-728.
- Göpel, S., Zhang, Q., Eliasson, L., Ma, X. S., Galvanovskis, J., Kanno, T., Rorsman, P. 2004. Capacitance measurements of exocytosis in mouse pancreatic alpha-, beta- and delta-cells within intact islets of Langerhans. *J Physiol*, 556(Pt 3), 711-726.
- Haefliger, J. A., Rohner-Jeanrenaud, F., Caille, D., Charollais, A., Meda, P., and Allagnat, F. 2013. Hyperglycemia downregulates Connexin36 in pancreatic islets via the upregulation of Icer-1/Icer-1 γ . *J Mol Endocrinol*, 51(1), 49-58.
- Hales, C. N., and Barker, D. J. 1992. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia*, 35(7), 595-601.
- Harnett, E. M., Alderman, J., and Wood, T. 2007. The surface energy of various biomaterials coated with adhesion molecules used in cell culture. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 55(1), 90-97.

- Hawa, M. I., Kolb, H., Schloot, N., Beyan, H., Paschou, S. A., Buzzetti, R., Consortium, A. L. 2013. Adult-onset autoimmune diabetes in Europe is prevalent with a broad clinical phenotype: Action LADA 7. *Diabetes Care*, 36(4), 908-913.
- Hedekov, C. J. 1980. Mechanism of glucose-induced insulin secretion. *Physiol Rev*, 60(2), 442-509.
- Heimberg, H., De Vos, A., Pipeleers, D., Thorens, B., and Schuit, F. 1995. Differences in glucose transporter gene expression between rat pancreatic α - and β -cells are correlated to differences in glucose transport but not in glucose utilization. *J Biol Chem*, 270(15), 8971-8975.
- Hellman, B. 1959. The frequency distribution of the number and volume of the islets Langerhans in man. I. Studies on non-diabetic adults. *Acta Soc Med Ups*, 64, 432-460.
- Hellman, B. 2009. Pulsatility of insulin release-a clinically important phenomenon. *Ups J Med Sci*, 114(4), 193-205.
- Henquin, J. C. 1992. The fiftieth anniversary of hypoglycaemic sulphonamides. How did the mother compound work? *Diabetologia*, 35(10), 907-912.
- Henquin, J. C., Dufrane, D., Kerr-Conte, J., and Nenquin, M. 2015. Dynamics of glucose-induced insulin secretion in normal human islets. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 309(7), E640-650.
- Henquin, J. C., Dufrane, D., and Nenquin, M. 2006. Nutrient control of insulin secretion in isolated normal human islets. *Diabetes*, 55(12), 3470-3477.
- Henquin, J. C., and Meissner, H. P. 1984. Significance of ionic fluxes and changes in membrane potential for stimulus-secretion coupling in pancreatic β -cell. *Experientia*, 40(10), 1043-1052.
- Hibino, H., Inanobe, A., Furutani, K., Murakami, S., Findlay, I., and Kurachi, Y. 2010. Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles. *Physiol Rev*, 90(1), 291-366.
- Hille, B. 2001. Ion Channels of Excitable Membranes. In.
- Hodson, D. J., Mitchell, R. K., Bellomo, E. A., Sun, G., Vinet, L., Meda, P., Rutter, G. A. 2013. Lipotoxicity disrupts incretin-regulated human β -cell connectivity. *J Clin Invest*, 123(10), 4182-4194.
- Hoppa, M. B., Collins, S., Ramracheya, R., Hodson, L., Amisten, S., Zhang, Q., Rorsman, P. 2009. Chronic palmitate exposure inhibits insulin secretion by dissociation of Ca^{2+} channels from secretory granules. *Cell Metab*, 10(6), 455-465.
- Huang, L., Shen, H., Atkinson, M. A., and Kennedy, R. T. 1995. Detection of exocytosis at individual pancreatic β -cells by amperometry at a chemically modified microelectrode. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(21), 9608-9612.

- Ilonen, J., Hammais, A., Laine, A. P., Lempainen, J., Vaarala, O., Veijola, R., Knip, M. 2013. Patterns of β -cell autoantibody appearance and genetic associations during the first years of life. *Diabetes*, 62(10), 3636-3640.
- Inagaki, N., Gonoi, T., Clement, J. P., Namba, N., Inazawa, J., Gonzalez, G., Bryan, J. 1995. Reconstitution of IK_{ATP} : an inward rectifier subunit plus the sulfonylurea receptor. *Science*, 270(5239), 1166-1170.
- Insel, R. A., Dunne, J. L., Atkinson, M. A., Chiang, J. L., Dabelea, D., Gottlieb, P. A., Ziegler, A. G. 2015. Staging presymptomatic Type 1 diabetes: a scientific statement of JDRF, the Endocrine Society, and the American Diabetes Association. *Diabetes Care*, 38(10), 1964-1974.
- Inzucchi, S. E., Bergenstal, R. M., Buse, J. B., Diamant, M., Ferrannini, E., Nauck, M., (EASD), E. A. f. t. S. o. D. 2012. Management of hyperglycemia in Type 2 diabetes: a patient-centered approach: position statement of the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Diabetes Care*, 35(6), 1364-1379.
- Johnson, D., Shepherd, R. M., Gill, D., Gorman, T., Smith, D. M., and Dunne, M. J. 2007. Glucose-dependent modulation of insulin secretion and intracellular calcium ions by Gka50, a glucokinase activator. *Diabetes*, 56(6), 1694-1702.
- Johnston, N. R., Mitchell, R. K., Haythorne, E., Pessoa, M. P., Semplici, F., Ferrer, J., Hodson, D. J. 2016. β -cell hubs dictate pancreatic islet responses to glucose. *Cell Metab*, 24(3), 389-401.
- Kahn, S. E., Haffner, S. M., Heise, M. A., Herman, W. H., Holman, R. R., Jones, N. P., Group, A. S. 2006. Glycemic durability of rosiglitazone, metformin, or glyburide monotherapy. *N Engl J Med*, 355(23), 2427-2443.
- Kakei, M., Kelly, R. P., Ashcroft, S. J., and Ashcroft, F. M. 1986. The ATP-sensitivity of K^+ channels in rat pancreatic β -cells is modulated by ADP. *FEBS Lett*, 208(1), 63-66.
- Katsarou, A., Gudbjörnsdóttir, S., Rawshani, A., Dabelea, D., Bonifacio, E., Anderson, B. J., Lernmark, Å. 2017. Type 1 diabetes mellitus. *Nat Rev Dis Primers*, 3, 17016.
- Kn, F. 2010. *Metabolic Regulation: A Human Perspective* (Vol. 3rd Edition).
- Koster, J. C., Marshall, B. A., Ensor, N., Corbett, J. A., and Nichols, C. G. 2000. Targeted overactivity of β -cell K_{ATP} channels induces profound neonatal diabetes. *Cell*, 100(6), 645-654.
- Krischer, J. P., Lynch, K. F., Schatz, D. A., Ilonen, J., Lernmark, Å., Hagopian, W. A., Group, T. S. 2015. The 6 year incidence of diabetes-associated autoantibodies in genetically at-risk children: the Teddy study. *Diabetologia*, 58(5), 980-987.

- Lee, K., Kim, J., Köhler, M., Yu, J., Shi, Y., Yang, S. N., Berggren, P. O. 2018. Blocking Ca. *Cell Rep*, 24(4), 922-934.
- Lenzen, S. 2014. A fresh view of glycolysis and glucokinase regulation: history and current status. *J Biol Chem*, 289(18), 12189-12194.
- Li, D. Q., Jing, X., Salehi, A., Collins, S. C., Hoppa, M. B., Rosengren, A. H., Renström, E. 2009. Suppression of sulfonylurea- and glucose-induced insulin secretion in vitro and in vivo in mice lacking the chloride transport protein CLC-3. *Cell Metab*, 10(4), 309-315.
- Li, N., Wu, J. X., Ding, D., Cheng, J., Gao, N., and Chen, L. 2017. Structure of a Pancreatic ATP-Sensitive Potassium Channel. *Cell*, 168(1-2), 101-110.e110.
- Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative pcr and the 2(-delta delta c(t)) method. *Methods*, 25(4), 402-408.
- Low, J. T., Mitchell, J. M., Do, O. H., Bax, J., Rawlings, A., Zavortink, M., Thorn, P. 2013. Glucose principally regulates insulin secretion in mouse islets by controlling the numbers of granule fusion events per cell. *Diabetologia*, 56(12), 2629-2637.
- MacDonald, P. E., and Rorsman, P. 2006. Oscillations, intercellular coupling, and insulin secretion in pancreatic β -cells. *PLoS Biol*, 4(2), e49.
- Maechler, P., Kennedy, E. D., Wang, H., and Wollheim, C. B. 1998. Desensitization of mitochondrial Ca^{2+} and insulin secretion responses in the β -cell. *J Biol Chem*, 273(33), 20770-20778.
- Maedler, K., Carr, R. D., Bosco, D., Zuellig, R. A., Berney, T., and Donath, M. Y. 2005. Sulfonylurea induced β -cell apoptosis in cultured human islets. *J Clin Endocrinol Metab*, 90(1), 501-506.
- Martin, G. M., Yoshioka, C., Rex, E. A., Fay, J. F., Xie, Q., Whorton, M. R., Shyng, S. L. 2017. Cryo-EM structure of the ATP-sensitive potassium channel illuminates mechanisms of assembly and gating. *Elife*, 6.
- Matschinsky, F. M. 2002. Regulation of pancreatic β -cell glucokinase: from basics to therapeutics. *Diabetes*, 51 Suppl 3, S394-404.
- Matthews, D. R., Naylor, B. A., Jones, R. G., Ward, G. M., and Turner, R. C. 1983. Pulsatile insulin has greater hypoglycemic effect than continuous delivery. *Diabetes*, 32(7), 617-621.
- Matveyenko, A. V., Liuwantara, D., Gurlo, T., Kirakossian, D., Dalla Man, C., Cobelli, C., Butler, P. C. 2012. Pulsatile portal vein insulin delivery enhances hepatic insulin action and signaling. *Diabetes*, 61(9), 2269-2279.

- McCulloch, L. J., van de Bunt, M., Braun, M., Frayn, K. N., Clark, A., and Gloyn, A. L. 2011. Glut2 (slc2a2) is not the principal glucose transporter in human pancreatic β -cells: implications for understanding genetic association signals at this locus. *Mol Genet Metab*, 104(4), 648-653.
- Meda, P., Atwater, I., Gonçalves, A., Bangham, A., Orci, L., and Rojas, E. 1984. The topography of electrical synchrony among β -cells in the mouse islet of Langerhans. *Q J Exp Physiol*, 69(4), 719-735.
- Meissner, H. P. 1976. Electrophysiological evidence for coupling between β -cells of pancreatic islets. *Nature*, 262(5568), 502-504.
- Meissner, H. P., and Atwater, I. J. 1976. The kinetics of electrical activity of β -cells in response to a "square wave" stimulation with glucose or glibenclamide. *Horm Metab Res*, 8(1), 11-16.
- Mikhailov, M. V., Campbell, J. D., de Wet, H., Shimomura, K., Zadek, B., Collins, R. F., Ashcroft, F. M. 2005. 3-D structural and functional characterization of the purified K_{ATP} channel complex Kir6.2-SUR1. *EMBO J*, 24(23), 4166-4175.
- Misler, S., Barnett, D. W., Gillis, K. D., and Pressel, D. M. 1992. Electrophysiology of stimulus-secretion coupling in human β -cells. *Diabetes*, 41(10), 1221-1228.
- Nesher, R., and Cerasi, E. 2002. Modeling phasic insulin release: immediate and time-dependent effects of glucose. *Diabetes*, 51 Suppl 1, S53-59.
- Nguyen, L. M., Pozzoli, M., Hraha, T. H., and Benninger, R. K. 2014. Decreasing Cx36 gap junction coupling compensates for overactive K_{ATP} channels to restore insulin secretion and prevent hyperglycemia in a mouse model of neonatal diabetes. *Diabetes*, 63(5), 1685-1697.
- Notary, A. M., Westacott, M. J., Hraha, T. H., Pozzoli, M., and Benninger, R. K. 2016. Decreases in gap junction coupling recovers Ca^{2+} and Insulin secretion in neonatal diabetes mellitus, dependent on β -cell heterogeneity and noise. *PLoS Comput Biol*, 12(9), e1005116.
- O'Rahilly, S., Turner, R. C., and Matthews, D. R. 1988. Impaired pulsatile secretion of insulin in relatives of patients with non-insulin-dependent diabetes. *N Engl J Med*, 318(19), 1225-1230.
- Olofsson, C. S., Göpel, S. O., Barg, S., Galvanovskis, J., Ma, X., Salehi, A., Eliasson, L. 2002. Fast insulin secretion reflects exocytosis of docked granules in mouse pancreatic β -cells. *Pflugers Arch*, 444(1-2), 43-51.
- Olokoba, A. B., Obateru, O. A., and Olokoba, L. B. 2012. Type 2 diabetes mellitus: a review of current trends. *Oman Med J*, 27(4), 269-273.
- Pizarro-Delgado, J., Fasciani, I., Temperan, A., Romero, M., González-Nieto, D., Alonso-Magdalena, P., Tamarit-Rodríguez, J. 2014. Inhibition of connexin 36

- hemichannels by glucose contributes to the stimulation of insulin secretion. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 306(12), E1354-1366.
- Polak, M., and Cavé, H. 2007. Neonatal diabetes mellitus: a disease linked to multiple mechanisms. *Orphanet J Rare Dis*, 2, 12.
- Polonsky, K. S., Given, B. D., Hirsch, L. J., Tillil, H., Shapiro, E. T., Beebe, C., Van Cauter, E. 1988. Abnormal patterns of insulin secretion in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med*, 318(19), 1231-1239.
- Pozzilli, P., Leslie, R. D., Chan, J., De Fronzo, R., Monnier, L., Raz, I., and Del Prato, S. 2010. The A1c and Abcd of glycaemia management in Type 2 diabetes: a physician's personalized approach. *Diabetes Metab Res Rev*, 26(4), 239-244.
- Pérez-Armendariz, E. M. 2013. Connexin 36, a key element in pancreatic β -cell function. *Neuropharmacology*, 75, 557-566.
- Pørksen, N., Grøfte, T., Greisen, J., Mengel, A., Juhl, C., Veldhuis, J. D., Vilstrup, H. 2002. Human insulin release processes measured by intraportal sampling. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 282(3), E695-702.
- Quesada, I., Todorova, M. G., Alonso-Magdalena, P., Beltrá, M., Carneiro, E. M., Martin, F., Soria, B. 2006. Glucose induces opposite intracellular Ca^{2+} concentration oscillatory patterns in identified α - and β -cells within intact human islets of Langerhans. *Diabetes*, 55(9), 2463-2469.
- Randle, P. J. 1993. Glucokinase and candidate genes for Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia*, 36(4), 269-275.
- Ravier, M. A., Güldenagel, M., Charollais, A., Gjnovci, A., Caille, D., Söhl, G., Meda, P. 2005. Loss of connexin36 channels alters β -cell coupling, islet synchronization of glucose-induced Ca^{2+} and insulin oscillations, and basal insulin release. *Diabetes*, 54(6), 1798-1807.
- Remedi, M. S., Agapova, S. E., Vyas, A. K., Hruz, P. W., and Nichols, C. G. 2011. Acute sulfonylurea therapy at disease onset can cause permanent remission of K_{ATP} -induced diabetes. *Diabetes*, 60(10), 2515-2522.
- Remedi, M. S., Friedman, J. B., and Nichols, C. G. 2017. Diabetes induced by gain-of-function mutations in the Kir6.1 subunit of the K_{ATP} channel. *J Gen Physiol*, 149(1), 75-84.
- Remedi, M. S., Kurata, H. T., Scott, A., Wunderlich, F. T., Rother, E., Kleinriders, A., Nichols, C. G. 2009. Secondary consequences of β -cell inexcitability: identification and prevention in a murine model of K_{ATP} -induced neonatal diabetes mellitus. *Cell Metab*, 9(2), 140-151.
- Ricordi, C., Zeng, Y. J., Alejandro, R., Tzakis, A., Venkataramanan, R., Fung, J., Starzl, T. E. 1991. In vivo effect of FK506 on human pancreatic islets. *Transplantation*, 52(3), 519-522.

- Rines, A. K., Sharabi, K., Tavares, C. D., and Puigserver, P. 2016. Targeting hepatic glucose metabolism in the treatment of Type 2 diabetes. *Nat Rev Drug Discov*, 15(11), 786-804.
- Rocheleau, J. V., Remedi, M. S., Granada, B., Head, W. S., Koster, J. C., Nichols, C. G., and Piston, D. W. 2006. Critical role of gap junction coupled K_{ATP} channel activity for regulated insulin secretion. *PLoS Biol*, 4(2), e26.
- Rorsman, P., and Ashcroft, F. M. 2018. Pancreatic β -cell electrical activity and insulin secretion: of mice and men. *Physiol Rev*, 98(1), 117-214.
- Rorsman, P., and Braun, M. 2013. Regulation of insulin secretion in human pancreatic islets. *Annu Rev Physiol*, 75, 155-179.
- Rorsman, P., Eliasson, L., Kanno, T., Zhang, Q., and Gopel, S. 2011. Electrophysiology of pancreatic β -cells in intact mouse islets of Langerhans. *Prog Biophys Mol Biol*, 107(2), 224-235.
- Rorsman, P., and Renström, E. 2003. Insulin granule dynamics in pancreatic β -cells. *Diabetologia*, 46(8), 1029-1045.
- Rorsman, P., and Trube, G. 1985. Glucose dependent K⁺-channels in pancreatic β -cells are regulated by intracellular ATP. *Pflugers Arch*, 405(4), 305-309.
- Roumie, C. L., Hung, A. M., Greevy, R. A., Grijalva, C. G., Liu, X., Murff, H. J., Griffin, M. R. 2012. Comparative effectiveness of sulfonylurea and metformin monotherapy on cardiovascular events in Type 2 diabetes mellitus: a cohort study. *Ann Intern Med*, 157(9), 601-610.
- Saadati, M., and Jamali, Y. 2021. The effects of β -cell mass and function, intercellular coupling, and islet synchrony on dynamics. *Sci Rep*, 11(1), 10268.
- Saez, J. C., Berthoud, V. M., Branes, M. C., Martinez, A. D., and Beyer, E. C. 2003. Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions. *Physiol Rev*, 83(4), 1359-1400.
- Saisho, Y. 2015. β -cell dysfunction: Its critical role in prevention and management of Type 2 diabetes. *World J Diabetes*, 6(1), 109-124.
- Sakura, H., Ammälä, C., Smith, P. A., Gribble, F. M., and Ashcroft, F. M. 1995. Cloning and functional expression of the cDNA encoding a novel ATP-sensitive potassium channel subunit expressed in pancreatic β -cells, brain, heart and skeletal muscle. *FEBS Lett*, 377(3), 338-344.
- Sansbury, F. H., Flanagan, S. E., Houghton, J. A., Shuixian Shen, F. L., Al-Senani, A. M., Habeb, A. M., Hattersley, A. T. 2012. Slc2a2 mutations can cause neonatal diabetes, suggesting Glut2 may have a role in human insulin secretion. *Diabetologia*, 55(9), 2381-2385.

- Santos, R. M., Rosario, L. M., Nadal, A., Garcia-Sancho, J., Soria, B., and Valdeolmillos, M. 1991. Widespread synchronous $[Ca^{2+}]_i$ oscillations due to bursting electrical activity in single pancreatic islets. *Pflugers Arch*, 418(4), 417-422.
- Sato, T., Haimovici, R., Kao, R., Li, A. F., and Roy, S. 2002. Downregulation of connexin 43 expression by high glucose reduces gap junction activity in microvascular endothelial cells. *Diabetes*, 51(5), 1565-1571.
- Schmitz, O., Pøksen, N., Nyholm, B., Skjaerbaek, C., Butler, P. C., Veldhuis, J. D., and Pincus, S. M. 1997. Disorderly and nonstationary insulin secretion in relatives of patients with Niddm. *Am J Physiol*, 272(2 Pt 1), E218-226.
- Schulla, V., Renström, E., Feil, R., Feil, S., Franklin, I., Gjnovci, A., Hofmann, F. 2003. Impaired insulin secretion and glucose tolerance in β -cell-selective $Ca(v)1.2$ Ca^{2+} channel null mice. *EMBO J*, 22(15), 3844-3854.
- Serre-Beinier, V., Bosco, D., Zulianello, L., Charollais, A., Caille, D., Charpantier, E., Meda, P. 2009. Cx36 makes channels coupling human pancreatic β -cells, and correlates with insulin expression. *Hum Mol Genet*, 18(3), 428-439.
- Shimomura, K., and Maejima, Y. 2017. K. *Intern Med*, 56(18), 2387-2393.
- Shyng, S., Ferrigni, T., and Nichols, C. G. 1997. Regulation of K_{ATP} channel activity by diazoxide and MgADP. Distinct functions of the two nucleotide binding folds of the sulfonylurea receptor. *J Gen Physiol*, 110(6), 643-654.
- Simpson, S. H., Lee, J., Choi, S., Vandermeer, B., Abdelmoneim, A. S., and Featherstone, T. R. 2015. Mortality risk among sulfonylureas: a systematic review and network meta-analysis. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 3(1), 43-51.
- Simpson, S. H., Majumdar, S. R., Tsuyuki, R. T., Eurich, D. T., and Johnson, J. A. 2006. Dose-response relation between sulfonylurea drugs and mortality in Type 2 diabetes mellitus: a population-based cohort study. *Cmaj*, 174(2), 169-174.
- Slingerland, A. S., Hurkx, W., Noordam, K., Flanagan, S. E., Jukema, J. W., Meiners, L. C., Hadders-Algra, M. 2008. Sulphonylurea therapy improves cognition in a patient with the V59m *Kcnj11* mutation. *Diabet Med*, 25(3), 277-281.
- Smith, P. A., Ashcroft, F. M., and Rorsman, P. 1990. Simultaneous recordings of glucose dependent electrical activity and ATP-regulated K^+ -currents in isolated mouse pancreatic β -cells. *FEBS Lett*, 261(1), 187-190.
- Smolen, P., Rinzel, J., and Sherman, A. 1993. Why pancreatic islets burst but single β -cells do not. The heterogeneity hypothesis. *Biophys J*, 64(6), 1668-1680.
- Speier, S., Gjnovci, A., Charollais, A., Meda, P., and Rupnik, M. 2007. Cx36-mediated coupling reduces β -cell heterogeneity, confines the stimulating glucose concentration range, and affects insulin release kinetics. *Diabetes*, 56(4), 1078-1086.

- Srinivas, M., Rozental, R., Kojima, T., Dermietzel, R., Mehler, M., Condorelli, D. F., Spray, D. C. 1999. Functional properties of channels formed by the neuronal gap junction protein connexin36. *J Neurosci*, 19(22), 9848-9855.
- St Clair, J. R., Westacott, M. J., Miranda, J., Farnsworth, N. L., Kravets, V., Schleicher, W. E., Benninger, R. K. P. 2023. Restoring connexin-36 function in diabetogenic environments precludes mouse and human islet dysfunction. *J Physiol*, 601(18), 4053-4072.
- Støy, J., Edghill, E. L., Flanagan, S. E., Ye, H., Paz, V. P., Pluzhnikov, A., Group, N. D. I. C. 2007. Insulin gene mutations as a cause of permanent neonatal diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(38), 15040-15044.
- Söhl, G., and Willecke, K. 2003. An update on connexin genes and their nomenclature in mouse and man. *Cell Commun Adhes*, 10(4-6), 173-180.
- Söhl, G., and Willecke, K. 2004. Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovasc Res*, 62(2), 228-232.
- Tarasov, A. I., Girard, C. A., and Ashcroft, F. M. 2006. ATP sensitivity of the ATP-sensitive K^+ channel in intact and permeabilized pancreatic β -cells. *Diabetes*, 55(9), 2446-2454.
- Tarasov, A. I., Semplici, F., Li, D., Rizzuto, R., Ravier, M. A., Gilon, P., and Rutter, G. A. 2013. Frequency-dependent mitochondrial Ca^{2+} accumulation regulates ATP synthesis in pancreatic β -cells. *Pflugers Arch*, 465(4), 543-554.
- Tarasov, A. I., Semplici, F., Ravier, M. A., Bellomo, E. A., Pullen, T. J., Gilon, P., Rutter, G. A. 2012. The mitochondrial Ca^{2+} uniporter MCU is essential for glucose-induced ATP increases in pancreatic β -cells. *PLoS One*, 7(7), e39722.
- Taskinen, M. R., and Borén, J. 2015. New insights into the pathophysiology of dyslipidemia in Type 2 diabetes. *Atherosclerosis*, 239(2), 483-495.
- Terauchi, Y., Sakura, H., Yasuda, K., Iwamoto, K., Takahashi, N., Ito, K., Kamada, N. 1995. Pancreatic β -cell-specific targeted disruption of glucokinase gene. Diabetes mellitus due to defective insulin secretion to glucose. *J Biol Chem*, 270(51), 30253-30256.
- Teubner, B., Degen, J., Söhl, G., Güldenagel, M., Bukauskas, F. F., Trexler, E. B., Willecke, K. 2000. Functional expression of the murine connexin 36 gene coding for a neuron-specific gap junctional protein. *J Membr Biol*, 176(3), 249-262.
- Thorens, B. 2015. Glut2, glucose sensing and glucose homeostasis. *Diabetologia*, 58(2), 221-232.
- Tomita, T. 2002. New markers for pancreatic islets and islet cell tumors. *Pathol Int*, 52(7), 425-432.

- Tucker, S. J., Gribble, F. M., Zhao, C., Trapp, S., and Ashcroft, F. M. 1997. Truncation of Kir6.2 produces ATP-sensitive K⁺ channels in the absence of the sulphonylurea receptor. *Nature*, 387(6629), 179-183.
- Turner, R. C., Cull, C. A., Frighi, V., and Holman, R. R. 1999. Glycemic control with diet, sulphonylurea, metformin, or insulin in patients with Type 2 diabetes mellitus: progressive requirement for multiple therapies (Ukpds 49). UK Prospective Diabetes Study (Ukpds) Group. *JAMA*, 281(21), 2005-2012.
- Valdeolmillos, M., Santos, R. M., Contreras, D., Soria, B., and Rosario, L. M. 1989. Glucose-induced oscillations of intracellular Ca²⁺ concentration resembling bursting electrical activity in single mouse islets of Langerhans. *FEBS Lett*, 259(1), 19-23.
- van Belle, T. L., Coppieters, K. T., and von Herrath, M. G. 2011. Type 1 diabetes: etiology, immunology, and therapeutic strategies. *Physiol Rev*, 91(1), 79-118.
- Vaxillaire, M., Populaire, C., Busiah, K., Cavé, H., Gloyn, A. L., Hattersley, A. T., Polak, M. 2004. Kir6.2 mutations are a common cause of permanent neonatal diabetes in a large cohort of French patients. *Diabetes*, 53(10), 2719-2722.
- Vicario, N., Zappalà, A., Calabrese, G., Gulino, R., Parenti, C., Gulisano, M., and Parenti, R. 2017. Connexins in the Central Nervous System: Physiological Traits and Neuroprotective Targets. *Front Physiol*, 8, 1060.
- Wang, Z., York, N. W., Nichols, C. G., and Remedi, M. S. 2014. Pancreatic β -cell dedifferentiation in diabetes and redifferentiation following insulin therapy. *Cell Metab*, 19(5), 872-882.
- Wollheim, C. B., and Sharp, G. W. 1981. Regulation of insulin release by calcium. *Physiol Rev*, 61(4), 914-973.
- Worley, J. F., McIntyre, M. S., Spencer, B., Mertz, R. J., Roe, M. W., and Dukes, I. D. 1994. Endoplasmic reticulum calcium store regulates membrane potential in mouse islet β -cells. *J Biol Chem*, 269(20), 14359-14362.
- Yildirim, V., Vadrevu, S., Thompson, B., Satin, L. S., and Bertram, R. 2017. Upregulation of an inward rectifying K⁺ channel can rescue slow Ca²⁺ oscillations in K_{ATP} channel deficient pancreatic islets. *PLoS Comput Biol*, 13(7), e1005686.
- Zerangue, N., Schwappach, B., Jan, Y. N., and Jan, L. Y. 1999. A new ER trafficking signal regulates the subunit stoichiometry of plasma membrane K_{ATP} channels. *Neuron*, 22(3), 537-548.
- Zhang, M., Goforth, P., Bertram, R., Sherman, A., and Satin, L. 2003. The Ca²⁺ dynamics of isolated mouse β -cells and islets: implications for mathematical models. *Biophys J*, 84(5), 2852-2870.

- Zhang, Q., Chibalina, M. V., Bengtsson, M., Groschner, L. N., Ramracheya, R., Rorsman, N. J., Rorsman, P. 2014. Na⁺ current properties in islet α - and β -cells reflect cell-specific Scn3a and Scn9a expression. *J Physiol*, 592(21), 4677-4696.
- Zhang, Q., Galvanovskis, J., Abdulkader, F., Partridge, C. J., Göpel, S. O., Eliasson, L., and Rorsman, P. 2008. Cell coupling in mouse pancreatic β -cells measured in intact islets of Langerhans. *Philos Trans A Math Phys Eng Sci*, 366(1880), 3503-3523.
- Zünkler, B. J., Lenzen, S., Männer, K., Panten, U., and Trube, G. 1988. Concentration-dependent effects of tolbutamide, meglitinide, glipizide, glibenclamide and diazoxide on ATP-regulated K⁺ currents in pancreatic β -cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 337(2), 225-230.

