

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

**TNF-İLİŞKİLİ APOPTOZ-İNDÜKLEYİCİ LİGAND'IN
(TRAIL) OBEZİTE VE TİP 2 DİYABET SÜRECİNDEKİ
ETKİLERİNİN C57BL6 HAYVAN MODELLERİNDE
ARAŞTIRILMASI**

Özlem YILMAZ

DOKTORA TEZİ

2023-ANTALYA

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

**TNF-İLİŞKİLİ APOPTOZ-İNDÜKLEYİCİ LİGAND'IN
(TRAIL) OBEZİTE VE TİP 2 DİYABET SÜRECİNDEKİ
ETKİLERİNİN C57BL6 HAYVAN MODELLERİNDE
ARAŞTIRILMASI**

Özlem YILMAZ

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Ahter Dilşad ŞANLIOĞLU

Bu tez TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir (SBAG-112S450).

“Kaynakça gösterilerek tezimden yararlanılabilir”

2023-ANTALYA

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Tıbbi Biyoloji Programı'nda
Doktora tezi olarak kabul edilmiştir. / /

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Ahter Dilşad ŞANLIOĞLU
Akdeniz Üniversitesi

İmza
.....

Üye : Prof. Dr. Hasan Ali ALTUNBAŞ
Akdeniz Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Mehtap KILIÇ EREN
Aydın Adnan Menderes Üniversitesi

Üye : Doç. Dr. Ayşe Esra MANGUOĞLU
Akdeniz Üniversitesi

Üye : Doç.Dr. Çiğdem AYDIN ACAR
Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi

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

Prof. Dr. Melike CENGİZ
Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

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

Özlem YILMAZ

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Ahter Dilşad ŞANLIOĞLU

TEŞEKKÜR

Öncelikle bugün bu bilimsel çalışmayı yapabilme özgürlüğümü sağlayan Ulu Önder Mustafa Kemal ATATÜRK'e ilim ve akıl yolunda bıraktığı fikir mirası için,

Tez çalışmamın her aşamasında ve doktora eğitimim süresince mentörlüğünü benden esirgemeyen, bilimsel etkinlik açısından verimli ve çok yönlü bir eğitim süreci geçirmemi sağlayan, eğitime başladığım günden bugüne çok önemli yol kat ettiğime beni inandıran ve başarılarımı destekleyen sayın danışmanım Prof. Dr. Ahter Dilşad ŞANLIOĞLU'na tüm katkısı, emeği ve inancı için,

Akademik hayatımın bu başlangıç evresinde gerek bilimsel, gerekse manevi yönden desteklerini esirgemeyen, tez savunma sınavımda görev alan Prof. Dr. Hasan Ali ALTUNBAŞ, Prof.Dr. Mehtap KILIÇ EREN, Doç.Dr. Ayşe Esra MANGUOĞLU, Doç.Dr. Çiğdem AYDIN ACAR, Doç.Dr. Burçak YOLDAŞ ve Doç.Dr. Süray PEHLİVANOĞLU'na, akademik hayata devam kararı almamı sağlayan manevi babam dediğim Prof. Dr. Osman Nidai ÖZEŞ'e, ve Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nın tüm Öğretim Üyelerine katkıları ve destekleri için,

Başta Gen ve Hücre Tedavi Merkezi ekibi olmak üzere, eğitimim süresince beraber çalıştığımız tüm arkadaşlarıma, ve gerekli resmi işlemlerde verdikleri destek ve emekleri için Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü çalışanlarına,

Doktora eğitimim süresince tüm yorgunluklarımın ve zorlukların üstesinden gelmemde manevi desteklerini hiç bir zaman esirgemeyen, sevinç ve başarılarımı paylaşan arkadaşlarım Dr. Sevim KAHRAMAN DİRİCE ve Dr. Sergen YILDIRIM'a samimiyet ve özverileri için,

Hayata gözlerimi açtığım günden itibaren her daim bana destek olan, sahip olduğum tüm özdeğerleri bana öğreten, başarılarımın görünmez kahramanları, rahmetli babam Hasan YILMAZ'a, annem Ayşe YILMAZ'a ve kardeşim Çağdaş YILMAZ'a eğitim hayatım boyunca karşılıksız ve bitmek tükenmek bilmeyen sevgi, destek ve fedakarlıkları için sonsuz teşekkür ederim.

ÖZET

Amaç: Çalışmamızda, TNF-ilişkili apoptoz-indükleyici ligand'ın (TRAIL) diyabette olası koruyucu rolünün mekanizmasının araştırılmasına yönelik olarak lentiviral vektörlerle kalıcı ekspresyonu sağlanan TRAIL'ın ve çözülebilir TRAIL molekülünün fare obezite ve tip 2 diyabet (T2D) modellerinde antidiyabetik, antiinflamatuvar, proliferatif ve rejeneratif etkilerinin çalışılması hedeflenmiştir.

Yöntem: Yüksek yağlı diyetle obezite geliştirilen ve ek olarak Streptozotosin (STZ) uygulaması ile kısmi beta hücre hasarı ve T2D oluşturulan C57BL6 hayvan modellerinde TRAIL ligand ve reseptörlerinin ekspresyon profilleri, immunohistokimyasal analizlerle değerlendirildi. Lentiviral vektör (LV-TRAIL) aracılı olarak ve/veya çözülebilir formda TRAIL uygulamasının antidiyabetik ve antiinflamatuvar etkileri, periyodik kan şekeri ve kilo ölçümleri, intraperitoneal glukoz tolerans testi (IPGTT), intraperitoneal insülin tolerans testi (IPITT) ve IL-6 ELISA testi ile değerlendirildi. NIT-1 fare beta hücre hattında TRAIL'ın glukoz indüklü insülin salınımına etkisi test edildi. TRAIL uygulamasının karaciğer ve böbrek fonksiyonları üzerindeki etkisi, fonksiyon testleri ile araştırıldı. TRAIL'ın pankreasta proliferatif etkisi Ki67 ve MCM7 immunohistokimyasal boyamaları ile, rejeneratif etkisi ise PDX-1 ve CK20 immunohistokimyasal boyamaları ile araştırıldı.

Bulgular: Obezite ve T2D gelişim sürecinde pankreatik dokularda TRAIL ligandı ve DR5 ve DcR2 reseptörlerinin ekspresyonlarının baskılandığı görüldü. TRAIL uygulaması, yüksek yağlı diyetle beslenen hayvanlarda tokluk kan şekerlerini düşürdü, glukoz toleransını artırarak insülin direncini azaltıcı etki gösterdi, sistemik inflamasyonu baskıladı, serum alkalın fosfataz, glukoz ve total kolesterol seviyelerini düşürdü. TRAIL, NIT-1 hücrelerinde glukoz indüklü insülin salınımını artırıcı etki gösterdi. Bunun yanında, TRAIL uygulaması sonrası pankreasta insülin ekspresyonunda ve proliferatif Ki67 ve MCM7 ve rejeneratif PDX1 ekspresyonunda artış görüldü.

Sonuç: Bulgularımızın, TRAIL'ın obezite ve T2D'de henüz tam olarak karakterize edilememiş rolünün açığa çıkarılmasına ve olası bir terapötik molekül olarak değerlendirilmesine katkı sağlayacağına inanıyoruz.

Anahtar Kelimeler: TRAIL, Obezite, Tip 2 Diyabet, Beta hücre replikasyonu, Beta hücre rejenerasyonu, Lentiviral vektörler, Gen tedavisi

ABSTRACT

Aim: To investigate the mechanism of the possible protective role of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in diabetes, we studied the antidiabetic, antiinflammatory, proliferative, and regenerative roles of the lentiviral vector-mediated and/or soluble form of TRAIL in mouse obesity and type 2 diabetes (T2D) models.

Methods: Expression profiles of the TRAIL ligand and receptors throughout obesity and T2D development were investigated by immunohistochemical analysis in C57BL6 obesity models generated via a high-fat diet (HFD), and T2D models established via additional Streptozotocin (STZ) injection. The antidiabetic and antiinflammatory effects of TRAIL application via lentiviral vectors (LV-TRAIL) and/or in the form of soluble TRAIL (sTRAIL) were investigated via periodic blood glucose and weight measurements, intraperitoneal glucose tolerance test (IPGTT), intraperitoneal insulin tolerance test (IPITT), and IL-6 ELISA test. The effect of TRAIL on insulin secretion was tested in NIT-1 mouse beta cell lines. The effects of TRAIL application on liver and kidney functions were examined via functional tests. Immunohistochemical analyses for Ki67 and MCM7 were performed to investigate TRAIL's proliferative effect in the pancreas, while PDX-1 and CK20 expressions were analyzed to study its regenerative effect.

Results: Expression levels of the TRAIL ligand and DR5 and DcR2 receptors decreased throughout the development of obesity and T2D. TRAIL administration reduced non-fasting blood sugar in HFD-fed animals, had a reducing effect on insulin resistance by increasing glucose tolerance, suppressed systemic inflammation, and reduced serum alkaline phosphatase, glucose and total cholesterol levels. Furthermore, an increase in insulin expression, proliferative Ki67 and MCM7 and regenerative PDX1 expressions in the pancreas were observed following TRAIL application.

Conclusion: We believe that our results will contribute to the elucidation of the not yet clearly identified role of TRAIL in obesity and T2D, and to the evaluation of TRAIL as a candidate therapeutic molecule in obesity and diabetes.

Keywords: TRAIL, Obesity, Type 2 Diabetes, Beta cell replication, Beta cell regeneration, Lentiviral vectors, Gene therapy

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
TABLolar DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR	x
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	3
2.1 Obezite ve Diyabetin Tanımı, Prevalansı ve Sınıflandırılması	3
2.2. Pankreasın Yapısı ve Pankreasta Beta Hücre Kitlesi	5
2.3. Beta Hücre Kitlesinin Telafisi	7
2.3.1. Beta hücre proliferasyonu ve rejenerasyonu	8
2.4. TNF-İlişkili Apoptoz-İndükleyici Ligand (TRAIL)	10
2.4.1 TRAIL reseptörleri ve TRAIL'ın biyolojik fonksiyonlarındaki rolü	11
2.4.2 TRAIL molekülünün indüklediği sinyal yolları ve farklı fonksiyonları	13
2.4.3. Diyabette TRAIL ile ilişkili çalışmalar	17
2.5. Diyet İndüklü Obezite (DİO) ve Tip 2 Diyabet (T2D) Hayvan Modelleri	18
2.6. Lentiviral Vektörler	19
GEREÇ ve YÖNTEM	22
3.1. Deney Hayvan Gruplarının Oluşturulması	22
3.1.1 Yüksek yağlı yem üretimi ve obez hayvan modelinin oluşturulması	22
3.1.2. Tip 2 Diyabet hayvan modelinin oluşturulması	23
3.2. Kan Plazmalarının Toplanması	27
3.3. İzole Edilen Dokuların Fiksasyonu ve Parafine Gömme	27

3.4. Dokulardan Mikrotom Aracılığıyla Kesitlerin Alınması	28
3.5. Hematoksilen-Eozin Boyama	29
3.6. İmmunohistokimyasal Boyamalar	30
3.6.1. İmmunohistokimyasal boyamaların analizi	31
3.7. Lentiviral Vektörlerin Üretimi	31
3.7.1 Vektör üretimi için gerekli plazmidlerin izolasyonu	34
3.7.2. Lentiviral vektör üretim aşamaları	38
3.8. Fonksiyonel Viral Vektör Miktarlarının Belirlenmesi ve Viral Titrasyon ve Uygulama	42
3.9. Çözülebilir TRAIL Molekülünün (sTRAIL) Hazırlanışı ve Uygulanması	43
3.10. MTT [(Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide)] Testi	44
3.11. Glukoz İndüklü İnsülin Salınım Testi (GSIS)	44
3.12. IL-6 ELISA Testi	45
3.13. Karaciğer ve Böbrek Parametrelerine İlişkin Testler	46
3.14. Western Blot	46
3.15. İstatistiksel Analizler	48
BULGULAR	49
4.1. Obez ve Tip 2 Diyabet C57BL6 Fare Modelleri Oluşturuldu.	49
4.1.1. Obezite ve tip 2 diyabet gelişim sürecinde C57BL6 farelerde glukoz toleransının bozulduğu ve insülin direncinin geliştiği gözlemlendi.	51
4.2. Obez ve T2D Hayvan Gruplarında, TRAIL Ligandı, DR5 ve DcR2 Reseptör Ekspresyonlarının Baskılandığı Görüldü.	53
4.3. Lentiviral Vektörler Üretildi ve Titrasyon ve Fonksiyonel Analizleri Gerçekleştirildi.	58
4.3.1. LV-TRAIL'ın <i>in vitro</i> fonksiyonellik deneyleri gerçekleştirildi.	60
4.4. TRAIL, NIT-1 Hücrelerinde Glukoz-İndüklü İnsulin Salınımını Artırdı.	63
4.5. LV-TRAIL Transdüksiyonunun Yüksek Yağlı Diyetle Beslenen Hayvan Gruplarındaki Etkileri Araştırıldı.	65
4.5.1. LV-TRAIL ve LV-TRAIL+sTRAIL uygulamalarının dokularda hasara neden olmadığı gösterildi.	65

4.5.2. <i>In vivo</i> TRAIL uygulaması sonrasında pankreatik adacıklarda insülin ekspresyonunda artış gösterildi.	68
4.5.3. LV-TRAIL uygulaması, yüksek yağlı diyetle beslenen hayvan modellerinde sistemik inflamasyonu baskıladı.	70
4.5.4. LV-TRAIL uygulaması, yüksek yağlı diyetle beslenen hayvan modellerinde alkaline fosfataz, glukoz ve total kolesterol seviyelerini düşürdü.	70
4.6. LV-TRAIL ve sTRAIL Uygulamalarının Obez ve Tip 2 Diyabet Hayvan Modellerindeki Antidiyabetik Etkileri Araştırıldı.	71
4.6.1. LV-TRAIL ve sTRAIL uygulaması, obez hayvanlarda glukoz tolerans bozukluğunu iyileştirici etki gösterdi.	71
4.6.2. LV-TRAIL ve sTRAIL uygulaması, obez hayvanlarda insülin direncini iyileştirici etki gösterdi.	73
4.6.3. TRAIL uygulaması ile pankreatik dokuda Ki67 proliferasyon belirtecinin ifadesinde artış gözlemlendi.	74
4.6.4. TRAIL uygulaması ile pankreatik dokularda MCM-7 proliferasyon belirtecinin ifadesinde artış gözlemlendi.	75
4.6.5. TRAIL uygulaması sonrası, pankreasta rejeneratif PDX-1 belirtecinin ekspresyonunda belirgin artış gözlemlendi.	76
4.6.6. TRAIL uygulaması sonrası, pankreasta rejeneratif CK-20 belirtecinin ekspresyonunda artış gözlenmedi.	77
TARTIŞMA	78
SONUÇ ve ÖNERİLER	85
KAYNAKLAR	87
ÖZGEÇMİŞ	94

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 3.1. 2xHBS solüsyonunun hazırlanışı	32
Tablo 3.2. Virus üretiminde kullanılan plazmid miktarlarına yönelik örnek hesaplamalar.	38
Tablo 3.3. Lizis tamponunun hazırlanmasında kullanılan malzemeler	46
Tablo 4.1. TRAIL ligand ve reseptör boyamalarının analiz sonuçları	56

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Uluslararası Diyabet Federasyonu 2021 yılı Diyabet Atlası'na göre dünya genelinde diyabet oranları.	4
Şekil 2.2 Şematik pankreas kesiti.	6
Şekil 2.3 Pankreasın ekzokrin ve endokrin kısımları.	6
Şekil 2.4. Beta hücre kitlesinin dinamik yapısı.	8
Şekil 2.5. Multipotent pankreatik progenitör hücrelerin farklılaşma yolları.	8
Şekil 2.6. İnsan ve farede TRAIL molekülünün bağlanabildiği farklı reseptörler	12
Şekil 2.7. TRAIL molekülü ve reseptörlerinin ilişkide bulunduğu doku ve organ sistemleri	13
Şekil 2.8. TRAIL molekülünün indükleyebildiği iç ve dış apoptotik sinyal yolları	14
Şekil 2.9. TRAIL'ın apoptoz dışı sinyal yolları.	15
Şekil 2.10. TRAIL'ın indüklediği sinyal yolları ve modüle edici faktörler	16
Şekil 2.11. HIV-1 genomunun şematik görünümü.	20
Şekil 3.1. GATEWAY teknolojisi.	34
Şekil 3.2. Gateway LxR rekombinasyon reaksiyonu	36
Şekil 3.3. Üçüncü nesil lentiviral vektörlerin hazırlanmasında kullanılan plazmidler.	37
Şekil 3.4. Üçüncü nesil lentiviral vektörlerin (LVler) üretimi.	39
Şekil 3.5. Lentiviral vektör üretim aşamaları-1.	41
Şekil 3.6. Lentiviral vektör üretim aşamaları-2.	42

Şekil 4.1. Normal ve yüksek yağlı yemle beslenen C57BL6 farelerde abdominal yağlanma görüntüleri.	49
Şekil 4.2. Normal ve yüksek yağlı yemle beslenen C57BL6 farelere ait pankreas kesitleri.	50
Şekil 4.3. Yüksek yağlı yemle beslenen hayvanlarda karaciğerde yağlanmanın gösterilmesi.	50
Şekil 4.4. Tüm gruplara ait glukoz tolerans test sonuçları.	51
Şekil 4.5. Tüm gruplara ait insülin direnci testi sonuçları.	52
Şekil 4.6. Tüm gruplara ait kilo alımı ve tokluk kan şekeri grafikleri.	52
Şekil 4.7. Farklı hayvan gruplarında TRAIL ligand ekspresyonları.	54
Şekil 4.8. Farklı hayvan gruplarında DR5 reseptör ekspresyonları.	55
Şekil 4.9. Farklı hayvan gruplarında DcR1 reseptör ekspresyonları.	56
Şekil 4.10. Farklı hayvan gruplarında DcR2 reseptör ekspresyonları.	57
Şekil 4.11. LV üretim sürecinde, midi kültür ürünlerinin enzim kesim sonuçları.	58
Şekil 4.12. LV üretim sürecinde, LR rekombinasyon reaksiyonu sonrası doğrulama sonuçları.	59
Şekil 4.13. Oluşturulan pLV-TRAIL ekspresyon vektörünün haritası.	60
Şekil 4.14. LV-RFP vektörlerinin fonksiyonel etkinliğinin gösterilmesi.	61
Şekil 4.15. LV-TRAIL vektörlerinin fonksiyonel doğrulaması.	61
Şekil 4.16. Artan dozlarda LV-TRAIL ile transdükte edilen HT1080 hücrelerinde TRAIL ekspresyon miktarlarını gösteren grafik.	62
Şekil 4.17. HT1080 hücrelerinin LV-TRAIL ile transdüksiyon sonuçları.	63
Şekil 4.18. TRAIL transdüksiyonu yapılan NIT-1 fare beta hücre hattında glukoz-indüklü insülin salınımı.	64

Şekil 4.19. Karaciğer, böbrek, dalak ve pankreas dokularında LV-TRAIL ve sTRAIL uygulamaları sonrası doku bütünlüklerini gösteren görüntüler.	66
Şekil 4.20. Karaciğer, böbrek, dalak ve pankreas dokularında LV-TRAIL ve sTRAIL uygulamaları sonrası H&E boyamalar.	67
Şekil 4.21. <i>In vivo</i> TRAIL uygulamaları sonrasında pankreas dokularında insülin boyamaları.	69
Şekil 4.22. Yüksek yağlı yemle (YYY) beslenen gruplarda LV-TRAIL'ın sistemik inflamasyona etkisi.	70
Şekil 4.23. TRAIL uygulanan (L-TR) ve uygulanmayan kontrol (K) hayvan gruplarında alkalın fosfataz, tokluk glukozu ve total kolesterol oranları.	71
Şekil 4.24. TRAIL'ın obez ve T2D hayvan gruplarında glukoz tolerans bozukluğu üzerine etkileri.	72
Şekil 4.25. TRAIL'ın obez ve T2D hayvan gruplarında insülin direnci üzerine etkileri.	73
Şekil 4.26. TRAIL uygulamaları sonrası Ki67 boyamaları.	74
Şekil 4.27. TRAIL uygulamaları sonrası MCM-7 boyamaları.	75
Şekil 4.28. TRAIL uygulamaları sonrası pankreasta PDX-1 boyamaları.	76
Şekil 4.29. TRAIL uygulamaları sonrası pankreasta CK20 boyamaları.	77
Şekil 5.1. Farklı proliferasyon belirteçlerinin hücre döngüsü sırasındaki dinamik ifade paternleri.	82

SİMGELER ve KISALTMALAR

AdV:	Adenovirüs
aFGF:	Acidic Fibroblast Growth Factor
Apo2L:	Apoptosis Ligand 2
BID:	BH3 Interacting Domain
BSA:	Bovine Serum Albumin
CDK:	Cyclin Dependent Kinase
cIAP:	Cellular Inhibitors of Apoptosis Proteins
CO₂:	Karbondioksit
DcR:	Decoy Receptor (Yalancı Reseptör)
DISC:	Death-Inducing Signaling Complex
DMEM:	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DR4:	Death Receptor 4
EDTA:	Etilen Diamin Tetraasetik Asit
EGF:	Epidermal Growth Factor
ERK:	Extracellular Signal-Regulated Kinase
FADD:	Fas-Associated Death Domain
FBS:	Fetal Bovine Serum

GIP:	Gastrointestinal Peptide
GLP:	Glucagon-Like Peptide
GLUT:	Glucose Transporter
HCl:	Hidroklorik Asit
HLA:	Human Leukocyte Antigen
HRP:	Horseradish Peroxidase
HUVEC:	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
IAPP:	Islet Amyloid Polypeptide
IGF:	Insulin-Like Growth Factor
IGF1R:	Insulin-Like Growth Factor 1 Receptor
IFN:	Interferon
IKK:	Inhibitor of I κ B Kinase
IL:	Interlökin
INGAP:	Islet Neogenesis-Associated Peptide
IRS:	Insulin Receptor Substrate
JNK:	c-Jun N-terminal Kinase
KCl:	Potasyum Klorid
KH₂PO₄:	Potasyum Fosfat
MAPK:	Mitogen-Activated Protein Kinase
mDcR:	Mouse Decoy Receptor

mDR:	Mouse Death Receptor
mDcR2S:	Mouse Decoy Receptor 2 Soluble
Mg:	Magnezyum
MHC:	Major Histocompatibility Complex
MMP:	Matriks Metalloproteinaz
MOI:	Multiplicity of infection
NaCl:	Sodyum Klorid
NaH₂PO₄:	Sodyum Dihidrogen Fosfat
NaHCO₃:	Sodyum Bikarbonat
NaOH:	Sodyum Hidroksid
NFAT:	Nuclear Factor of Activated T Cells
NFκB:	Nuclear Factor Kappa B
NGF:	Nerve Growth Factor
NOD:	Non-Obese Diabetic
OPG:	Osteoprotegerin
PBS:	Phosphate Buffered Saline
PDGF:	Platelet-Derived Growth Factor
PI3K:	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-Kinase
RANKL:	Receptor Activator of Nuclear Factor-κB (NF-κB) Ligand
Rb:	Retinoblastoma

RIP1:	Receptor Interacting Protein-1
Rpm:	Revolutions Per Minute
SEM:	Standard Error of Mean
siRNA:	Small Interfering RNA
sTRAIL:	Soluble TRAIL
STZ:	Streptozotosin
T1D:	Tip 1 Diyabet
T2D:	Tip 2 Diyabet
TAK1:	Transforming Growth Factor β Activated Kinase-1
tBID:	Truncated BH3 Interacting Domain
TGF:	Transforming Growth Factor
TNF:	Tumor Necrosis Factor
TNFSF10:	Tumor Necrosis Factor Superfamily Member 10
TRADD:	TNF Receptor-Associated Death Domain
TRAF2:	TNF Receptor-Associated Factor-2
TRAIL:	TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand
TRAIL-R:	TRAIL Reseptörü
Ub:	Ubiquitin
VEGF:	Vascular Endothelial Growth Factor

1. GİRİŞ

Dünya genelinde en yaygın kronik hastalıklardan biri diyabettir. Diyabet, insülin salınımı, insülin etkisi veya bu faktörlerin her ikisinde de bozukluk sonucu ortaya çıkan, hiperglisemi ile karakterize kronik metabolik bir hastalık olarak tanımlanır. Günümüzdeki yaşam koşulları ve fiziksel aktivitede azalma ile insidansında artış görülen obezite ile birlikte diyabetli hasta sayısının da gittikçe arttığı bildirilmektedir. Diyabetin mekanizmasının ve etiyolojisinin daha iyi anlaşılması ve mevcut tedavi stratejilerine alternatif/tamamlayıcı yeni terapötik stratejilerin geliştirilmesi hedeflenmektedir. Antidiyabetik, antiinflamatuvar ve pankreatik beta hücreleri üzerinde proliferatif/rejeneratif etki sergileyebilen farklı moleküllerin etkilerinin bu anlamda detaylı olarak çalışılması önem taşımaktadır.

Tüm diyabetli hastaların yaklaşık %90 kadarını tip 2 diyabetli (T2D) hastalar oluşturur. T2D, pankreatik beta hücrelerinde fonksiyon bozukluğu ve insülin direnci ile karakterizedir; ileri dönemlerde beta hücre yıkımı ve kalp damar hastalıkları, retinopati ve nöropati gibi önemli sekonder komplikasyonların gözlenebildiği bilinmektedir. Sıklığı dünya genelinde artmakta olan obezite, T2D gelişim sürecinde en önemli risk faktörü olarak bildirilmektedir. Ancak obezite ve T2D'nin ortaya çıkış mekanizmaları henüz tam olarak aydınlatılamamıştır ve mevcut tedavi yöntemlerinin de yeterli olmadığı ve bu alanda yeni moleküler çalışmalara ihtiyaç duyulduğu bildirilmektedir. Bu alandaki araştırmaların önemli hedefleri, beta hücre yıkımının önlenmesi ve mevcut beta hücrelerinin korunması, inflamasyonun önlenmesi ve farklı yaklaşımlarla, azalan beta hücre kitlesinin telafi edilebilmesidir.

TNF-ilişkili apoptoz-indükleyici ligand'ın (TRAIL; TNF-related apoptosis-inducing ligand) obezite ve T2D sürecinde koruyucu rolü olabileceğini düşündüren çalışmalar mevcuttur, ancak bu rol henüz tam olarak anlaşılamamıştır. TRAIL bu olası etkisini farklı yollarla gösteriyor olabilir. Çalışmamızda, obezite ve T2D gelişim süreçlerinde TRAIL ve reseptörlerinin ekspresyon seviyelerindeki değişiklikleri gözlemek, TRAIL'ın sistemik

antiinflamatuvar ve antidiyabetik etkilerini ve pankreasta proliferatif ve/veya rejeneratif etkinliğini test edebilmek için, C57BL6 obezite ve T2D hayvan modelleri oluşturduk ve lentiviral vektör aracılı TRAIL aktarımının ve bunun yanında beraberinde çözülebilir TRAIL uygulamasının da terapötik etkinliğini değerlendirdik.

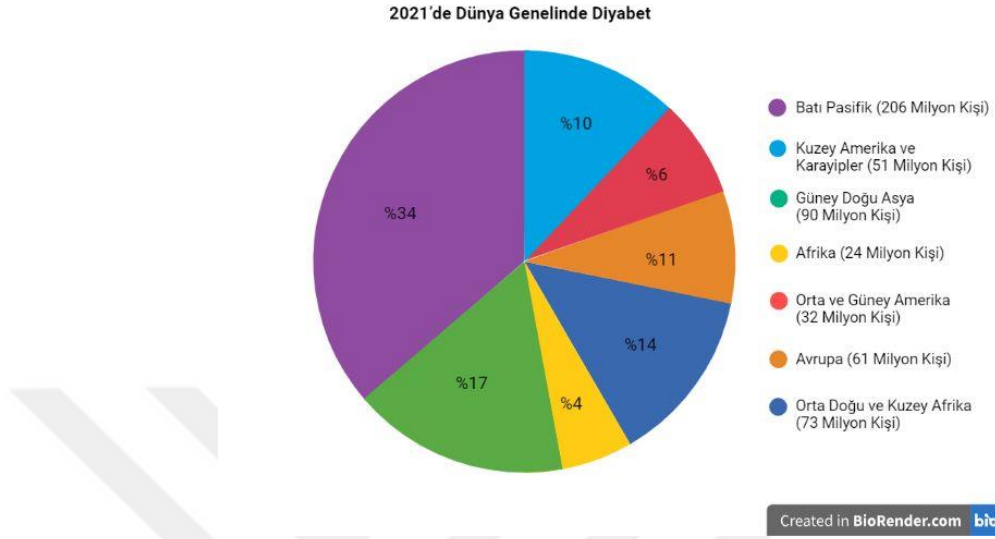


2. GENEL BİLGİLER

2.1 Obezite ve Diyabetin Tanımı, Prevalansı ve Sınıflandırılması

Obezite, vücut genelinde, bölgesel veya ektopik lipid olarak organlarda insan sağlığını tehlikeye sokabilecek komplikasyonların gelişme riskini artıracak oranda anormal ve aşırı yağ birikimi ile tanımlanır. Sağlıklı bireylerin vücut kitle indeksi (BMI: Body Mass Index) 18,5-25 kg/m² arası verilirken, BMI değeri 25-30 kg/m² arası fazla kilolu, 30-40 kg/m² arası obez, 40-50 kg/m² arası morbid obez ve 50 kg/m² ve üzeri ise süper morbid obez olarak tanımlanır. BMI 30-34.9 kg/m² arası sınıf I obezite, 35-39.9 kg/m² sınıf II obezite, 40 kg/m² üzeri ise sınıf III obezite olarak da tanımlanabilmektedir (Weir and Jan 2023). Dünya Sağlık Örgütü (WHO; World Health Organization), 1975 yılından 2016 yılına kadar, 5-19 yaş arası fazla kilolu veya obez çocuk ve ergenlerin prevalansının %4'ten %18'e yükseldiğini bildirmiştir. 2022 Dünya Obezite Atlası'nda, 2030 yılında her 5 kadından 1'inin ve her 7 erkekten 1'inin obezite ile yaşıyor olacağı ve global sayının 1 milyarı geçeceği öngörülmektedir.

Diyabet, pankreasın yeterli insülin üretememesi ya da vücudun üretilen insülini etkili bir şekilde kullanamaması sonucu ortaya çıkan, hiperglisemi ve ilişkili komplikasyonlarla karakterize kronik metabolik hastalıkları kapsar. Uluslararası Diyabet Federasyonu'nun (UDF) yayınladığı 2021 Diyabet Atlası'na göre, dünyada 20-79 yaş arası 537 milyon yetişkin diyabet hastası bulunmaktadır ve bu sayının 2030 yılında 643 milyona, 2045 yılında ise 783 milyona çıkacağı öngörülmektedir. Aynı merkezli verilere göre, her 4 diyabetli yetişkinden 3'ü düşük ve orta gelirli ülkelerde yaşamaktadır (Şekil 2.1). UDF, Türkiye'de 20-79 yaş arası diyabetli hasta sayısını 2021 yılı itibarıyla 9 milyon olarak vermektedir. Diyabetli hastaların, kardiyak, periferik arteriyel ve serebrovasküler hastalıklar, katarakt, erektil disfonksiyon ve non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı gibi farklı hastalıklar açısından da riskli grupta oldukları ve bu hastalarda tüberküloz gibi bazı enfeksiyöz hastalıkların gelişme riskinin de yüksek olduğu bilinmektedir.



Şekil 2.1 Uluslararası Diyabet Federasyonu 2021 yılı Diyabet Atlası'na göre dünya genelinde diyabet oranları. (<https://diabetesatlas.org/>)

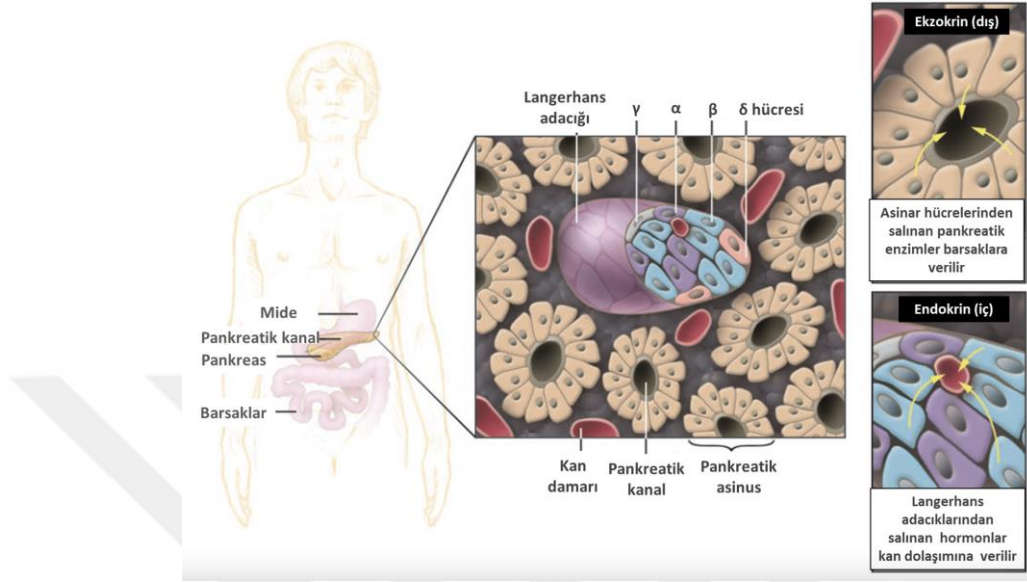
Amerikan Diyabet Birliği (ADA; American Diabetes Association), diyabeti tip 1 diyabet (T1D), tip 2 diyabet (T2D), gestasyonel diyabet ve diğer (spesifik) diyabet tipleri olarak sınıflandırmaktadır. Diyabetin başlıca iki tipi olan T1D ve T2D, genetik temelleri, olası çevresel tetikleyiciler ve hastalığın gelişim süreci açısından birbirlerinden farklılık gösterir. T1D'nin gelişiminde ana etken otoimmünite olarak bilinmektedir ve spesifik HLA (insan lökosit antijeni) alellerinin ve tümü henüz kesin olarak tanımlanamamış olan çevresel etkenlerin hastalığın ortaya çıkmasında rol oynadığı bildirilmektedir (Cnop, Welsh et al. 2005). Diyabetin en yaygın tipi olan T2D'ye yönelik risk faktörleri arasında ise obezite, fiziksel aktivite yetersizliği, yaş, birinci derece akrabada diyabet ve gestasyonel diyabet öyküsü sayılmaktadır. T2D'li bireylerin önemli bir oranının fazla kilolu veya obez olduğu, bu durumun insülin direncine yol açtığı veya insülin direncinin şiddetinde artışa neden olduğu bildirilmektedir. Obezite ve T2D sürecinde, insülin direncinin geliştiği, glukoz toleransında bozulma meydana geldiği, glukagon sekresyonun arttığı bilinmektedir. İlgili süreçlerde, toksik metabolitlerin birikimi sonucu yağ depolanmasının artmasıyla inflamasyon kaynağı oluşur, ve kronik inflamasyon kronik hiperglisemi ve insülin direncine sebep olabilir. Bu belirtilerin geliştiği hastaların kardiyovasküler hastalıklar açısından da risk grubunda olduğu bilinmektedir. Bu süreçte,

insülin direncinin özellikle genetik ve/veya çevresel faktörlerle birarada bulunduğu beta hücrelerinde fonksiyon kaybına ve ileri dönemlerde beta hücre ölümlerine de neden olabileceği bilinmektedir (Kahn 2005).

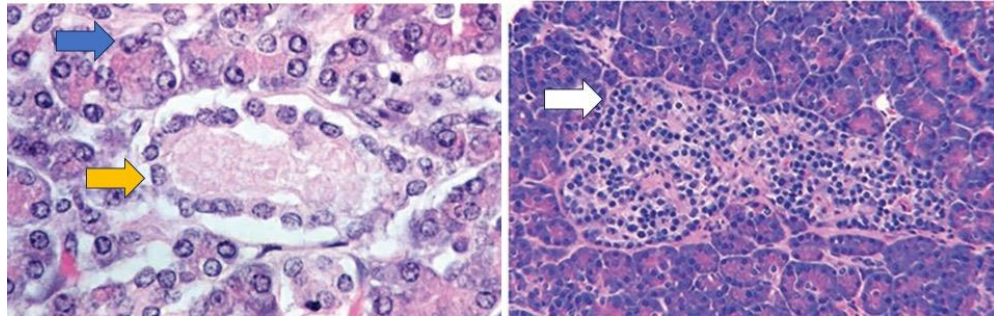
2.2. Pankreasın Yapısı ve Pankreasta Beta Hücre Kitlesi

Pankreas, omurgalılarda endokrin ve ekzokrin fonksiyonları olan, glukoz homeostazından sorumlu önemli bir salgı bezidir (Şekil 2.2, Şekil 2.3). Ekzokrin pankreasın %80'ini asinus kümeleri oluşturur. Pankreatik sekresyonlar asinüslerden lümenlere salınır; intralobuler duktalarda biriken, sindirim enzimlerini bulunduran pankreatik sıvı, pankreatik duktada ve sonrasında duodenuma gönderilir. Pankreatik sıvının içerdiği enzimler, kısmen sindirimi tamamlanmış olan karbonhidrat, protein ve yağların ileri yıkımını gerçekleştirir. Endokrin kısım ise, insülin, glukagon ve somatostatin gibi önemli hormonların üretim yeridir. Endokrin pankreas, ekzokrin doku içinde dağılmış halde bulunan Langerhans adacıklarından (pankreatik adacıklar) oluşur ve pankreasın yaklaşık %1-2'sini oluşturur; insan pankreasında yaklaşık 1 milyon adacık bulunmaktadır. Adacıklarda, insülin üreten beta hücreleri (~%70-80), glukagon üreten alfa hücreleri (~%15-20), somatostatin salgılayan delta hücreleri (~%5-10), pankreatik polipeptid üreten pankreatik polipeptid hücreleri (~%1-2) ve ghrelin salgılayan epsilon hücreleri (genelde <%1) bulunur (Kahn 2005).

Pankreasta bulunan beta hücre miktarının tümü, “beta hücre kitlesi” olarak tanımlanır. Vücutta normal glukoz homeostazının sağlanması, ancak yeterli miktarda beta hücre kitlesinin bulunması ile mümkündür. Cerrahi müdahale veya beta hücre yıkımını indükleyen ajanların uygulanmasıyla kısmi veya tüm pankreas yokluğunda diyabet geliştiğinin gözlenmesi, beta kitlesinin bu süreçteki önemini ortaya koymuştur (Bonner-Weir, Trent et al. 1983, Hayashi, Kojima et al. 2006, Nir, Melton et al. 2007). T1D’de olduğu gibi T2D’de de beta hücre kitlesinde kayıplar gözlenebilmektedir. İnsanlarda beta hücre kitlesi ölçümü *in vivo* olarak zor olsa da, diyabetik olmayan bireylerde insülin duyarlılığı ve sekresyonu ile beta hücre kitlesinin korele olduğu bilinmektedir (Weir, Gaglia et al. 2020). Bu alandaki veriler, T1D hastalarında beta hücre kitlesi kaybının, hastalığın tanısı konulduğunda %80’in üzerinde olduğunu ve T2D hastalarında bu oranın genellikle yaklaşık %24-65 olduğunu göstermiştir (Chellappan, Sivam et al. 2018).



Şekil 2.2 Şematik pankreas kesiti. Ekzokrin doku, pankreasın büyük kısmını oluşturur. Ekzokrin dokuda kanal hücreleri ve kanalın etrafını saran asinar hücreler yer alır. Asinar hücreler pankreatik kanallara sindirimi kolaylaştırıcı enzimler salgılar. Langerhans adacıkları (pankreatik adacıklar) ekzokrin dokunun içine dağılmış şekilde bulunur ve sentezledikleri hormonları kan damarları aracılığıyla dolaşıma verir (Trucco 2005, Kahraman Dirice 2014).

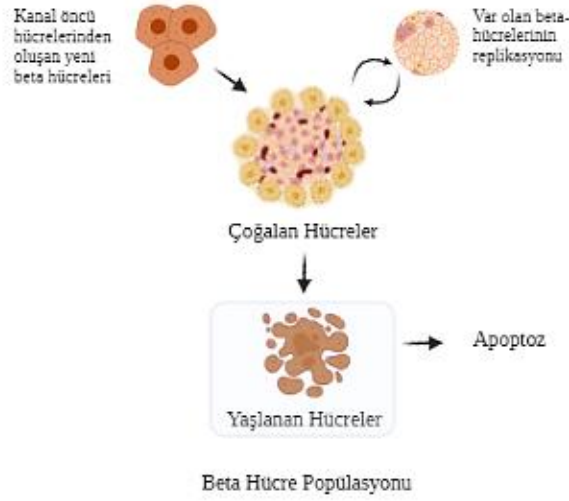


Şekil 2.3 Pankreasın ekzokrin ve endokrin kısımları. Ekzokrin kısımda (solda) mavi ok asinar hücreleri, sarı ok duktal hücreleri göstermektedir. Sağda beyaz okun ucunda, pankreasın endokrin kısmını oluşturan pankreatik adacık görülmektedir (Longnecker 2021).

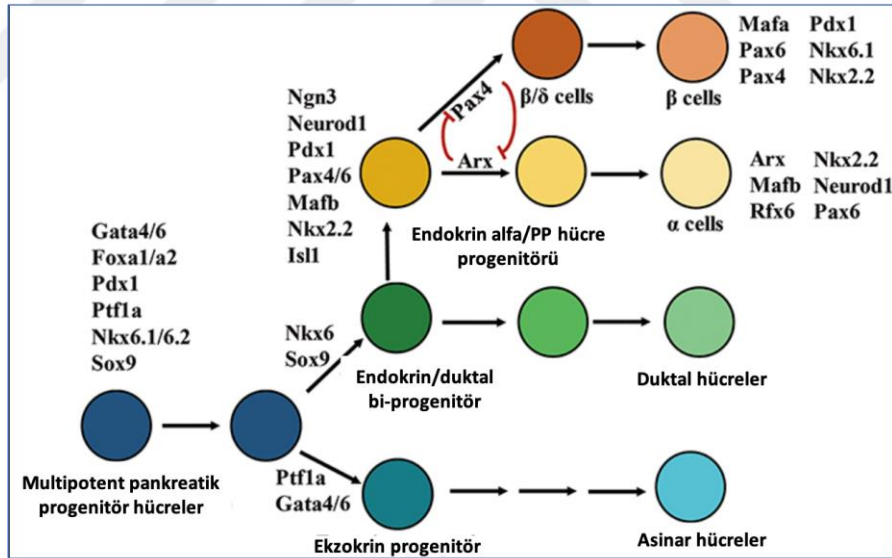
2.3. Beta Hücre Kitlesinin Telafisi

Diyabetin birçok farklı organ sistemini etkileyebildiği ve zaman içinde nefropati, nöropati, retinopati gibi mikrovasküler komplikasyonlara, ve kardiyovasküler hastalıklar, inme, periferel vasküler hastalık gibi makrovasküler ciddi komplikasyonlara yol açabileceği bilinmektedir (Deshpande, Harris-Hayes et al. 2008). Diyabette uygulanan mevcut tedavi yöntemlerinin, hastalığın tam kontrolü için ideal olmadığı kabul edilmektedir. 1922'deki ilk kullanımından bu yana diyabet kontrolünde önemli rol oynayan ekzojen insülin uygulaması, hayat kurtarıcı olması yanında, uzun dönem komplikasyonların önlenmesinde tam başarı sağlanamaması nedeniyle iki ucu keskin bıçak olarak da nitelendirilebilmektedir (Karadimos, Kapoor et al. 2012).

Diyabette, kaybolan beta hücre kitlesinin yerine konabilmesi, günümüzde T1D tedavisinde etkinlik potansiyeli en yüksek tedavi yöntemlerinden biri olarak tanımlanmaktadır (Shapiro, Lakey et al. 2000, Kondo, Toyoda et al. 2018). Ancak donör yetersizliği ve immun baskılayıcı ilaç kullanımının gerekmesi, bu uygulamalarla ilgili aşılması gereken önemli sorunlardır (Robertson 2004). Bu kapsamda, diyabette beta hücre yıkımının/disfonksiyonunun telafisini sağlayabilecek yeni/tamamlayıcı stratejilerin geliştirilmesine yönelik çalışmalar günümüzde oldukça önem kazanmıştır. Kök hücre ile ilişkili stratejilerin de, bu alandaki eksikliklerin giderilebilmesi için önemli yaklaşımlar olduğu kabul edilmektedir. Öyle ki özellikle T1D'de, tek bir hücre tipinin eksikliği, ve telafi amaçlı nakledilecek hücrelerin orijin aldığı dokudan farklı bölgelere transplante edilebilme olanağı, bu hastalığı kök hücre temelli hücre replasman terapileri için uygun konuma getirmektedir. Farklılaşmış hücrelerden geriye programlama yoluyla elde edilen indüklenmiş pluripotent kök hücrelerin fonksiyonel beta hücrelerine farklılaştırılması da, kök hücre temelli yaklaşımlar arasında önemli yer tutmaktadır (Takahashi and Yamanaka 2006, Shaer, Azarpira et al. 2014). Diyabet süreçlerinde kaybedilen beta hücre kitlesinin telafisine yönelik diğer iki önemli strateji, mevcut fonksiyonel beta hücrelerinin proliferasyonunun veya rejenerasyonunun indüklenmesidir.



Şekil 2.4. Beta hücre kitlesinin dinamik yapısı. Pankreatik adacıklarda beta hücrelerinin sayısının, kanal öncü hücreleri vb. hücrelerden rejenerasyon veya mevcut beta hücrelerinin proliferasyonu yoluyla bir yandan artarken, yaşlanma/apoptoz yoluyla diğer yandan azalma ile dengede tutulduğu düşünülmektedir.



Şekil 2.5. Multipotent pankreatik progenitör hücrelerin farklılaşma yolları. Pankreatik hücre farklılaşmasının görüldüğü grafikte, multipotent pankreatik progenitörlerden alfa veya beta hücrelerine farklılaşma ve anahtar transkripsiyon faktörleri gösterilmiştir (Zhong and Jiang 2019).

2.3.1. Beta Hücre Proliferasyonu ve Rejenerasyonu

Pankreatik adacıklarda karaciğer ve barsak epiteli gibi yüksek oranda rejenerasyon olmasa da, beta hücrelerinin çok yavaş da olsa kendilerini proliferasyon ve rejenerasyon mekanizmaları ile yenileyebildikleri, ve beta hücre kitlesinin dinamik yapısının

korunmasında bu mekanizmaların önemli olduğu bilinmektedir (Giuliani, Moritz et al. 2005) (Şekil 2.4). Beta hücre proliferasyonunun indüklenmesi, diyabette beta hücre eksikliğinin giderilmesi için önemli stratejiler arasında ele alınsa da, T1D’de beta hücrelerinin neredeyse tamamen kaybedilmesi de olası olduğundan, rejenerasyonun indüklenmesinin daha uygun bir yaklaşım olabileceği düşünülmektedir (Zhong and Jiang 2019).

İnsanda doğal süreçte beta hücre proliferasyonunu indükleyebilen ajanların etki mekanizmaları ve süreçteki genetik kontrol basamakları henüz tam olarak anlaşılamamıştır (Georgia and Bhushan 2004). Hücre döngüsünün kontrolünü sağlayan sinyal yollarının, beta hücre proliferasyonunu sağlayan faktörler tarafından kullanıldığı bilinmektedir. Beta hücre proliferasyonu için E2F1/2 transkripsiyon faktörünün zorunlu olduğu ve CDK4 ve siklin D1/D2’nin proliferasyonu tetiklediği gösterilmiştir (Amrani, Verdaguer et al. 1999, Fajas, Annicotte et al. 2004, Iglesias, Murga et al. 2004, Kushner, Ciemerych et al. 2005). Hücre döngüsünün inhibisyonunu sağlayan p27Kip1, p18Ink4c ve p15Ink4b gibi faktörlerin ise hücre replikasyonunu baskıladığı bildirilmiştir (Latres, Malumbres et al. 2000, Pei, Bai et al. 2004). Ayrıca beta hücre proliferasyonunun düzenlenmesinde IRS2, Menin, Rb ve NFAT gibi genlerin de rol oynadığı bildirilmiştir (Kubota, Tobe et al. 2000, Crabtree, Scacheri et al. 2003, Englbrecht and Facius 2005) (Harvey, Vogel et al. 1995). Pankreatik beta hücrelerinden sentezlenen otonom faktörlerin ve dolaşımdaki bazı sistemik faktörlerin beta hücre replikasyonunu indüklediği düşünülmektedir (Flier, Kulkarni et al. 2001). Glukoz, insülin, plasental laktojen, prolaktin, GLP-1, GIP ve birçok diğer faktörün, beta hücre replikasyonunu indükleyebildiği bilinmektedir (Kahraman 2014). Biz de yakın tarihli bir çalışmamızda, TNF-aracılı apoptoz-indükleyici ligandın (TRAIL) rodent pankreatik beta hücreleri üzerinde proliferatif etkisini gösterdik (Kahraman, Yilmaz et al. 2021).

İnsanda yetişkin beta hücre progenitörlerinin varlığı, diyabette tartışmalı konulardan biridir, ancak çalışmalar, duktal, endokrin ve ekzokrin hücre soylarının embriyonik multipotent progenitörlerden köken aldığını göstermiş, ve birçok çalışma, beta hücrelerinin diğer progenitör hücrelerden geliştiğine yönelik kanıt sunmuştur (Zhong and Jiang 2019). Beta hücrelerinin embriyonik gelişimde nörogenin 3 (ngn3) pozitif

progenitör hücrelerden köken aldığı bilinmektedir (Gradwohl, Dierich et al. 2000, Gu, Dubauskaite et al. 2002) (Şekil 2.5). Bu aşamada beta hücrelerinin oluşum mekanizması, kanal öncü hücrelerden neogenez yoluyla ve beta hücre kitlesindeki artış devam eder ve postnatal dönemde oldukça yavaşlar (Bouwens, Wang et al. 1994, Kushner, Ciemerych et al. 2005, Koksall, Sanlioglu et al. 2008, Meier, Butler et al. 2008). Yine de yavaş orandaki artışın beta hücre replikasyonu yoluyla olduğu düşünülmektedir (Dor, Brown et al. 2004, Dor and Melton 2004, Teta, Rankin et al. 2007, Koksall, Sanlioglu et al. 2008, Meier, Butler et al. 2008). Yetişkin beta hücre kitlesinin oranının, vücudun ihtiyaçlarına göre şekillendiği de bilinmektedir. Örneğin, gebelik, obezite, insülin direnci, pankreas hasarı ya da kısmi pankreatektomi durumunda insülin ihtiyacının artmasıyla dinamik süreç çalışır ve beta hücre sayısında artış gözlenir (Kahraman 2014). Beta hücre kitlesinin ihtiyaç durumunda artması, vücutta beta hücre telafisi olarak adlandırılır. Bu sürecin geri dönüşümlü olabildiği görülmektedir; örneğin gebelik döneminde artan beta hücre kitlesinin doğum sonrası eski haline döndüğü bilinmektedir (Parsons, Brelje et al. 1992). Sonuç olarak, beta hücrelerinin kontrollü çoğalmasını tetikleyebilecek moleküllerin bulunması ve ilgili mekanizmaların aydınlatılması, yeni/tamamlayıcı terapötik stratejilerin geliştirilebilmesi açısından önemlidir.

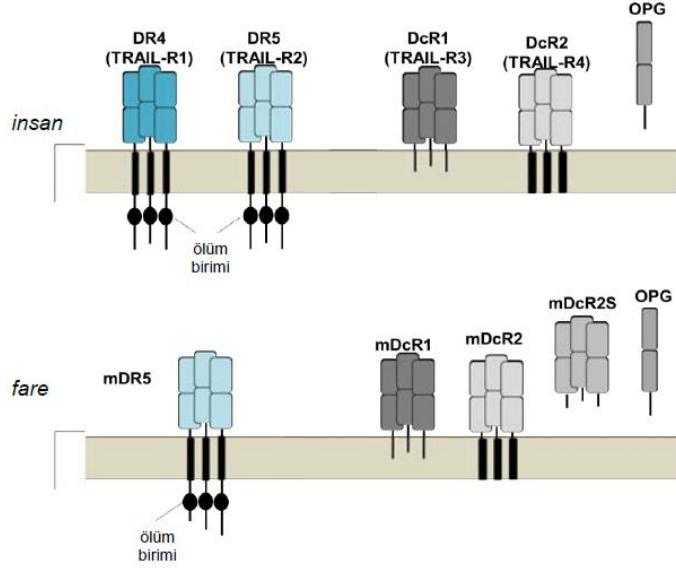
2.4. TNF-İlişkili Apoptoz-İndükleyici Ligand (TRAIL)

1995 yılında iki farklı araştırma grubu tarafından tanımlanan TNF-ilişkili apoptoz-indükleyici ligand (TRAIL; TNF-related apoptosis-inducing ligand), TNF süper ailesi üyesi bir sitokindir; amino asit dizisi %23 oranında TNF- α 'ya, %28 oranında Fas liganda benzerlik gösterir (Wiley, Schooley et al. 1995, Pitti, Marsters et al. 1996, Nagane, Huang et al. 2001). TRAIL geni (*TNFSF10*), 3 numaralı kromozomda 3q26 bölgesinde lokalizedir; 20 kb uzunluğundadır ve 5 ekzon ve 4 intron içerir (Gong and Almasan 2000). TRAIL, bir homotrimerik tip 2 transmembran protein olarak sentezlenir, ancak sistein proteazlar ve matriks-metalloproteinaz-2 (MMP-2) tarafından kesilerek 24 kDa'luk çözülebilir formda da salınabilir (Harith, Morris et al. 2013). Her iki form da farklı sinyal yollarını indükleyebilir, ancak transmembran formu daha güçlü bir ligand olarak bilinir (Mert and Sanlioglu 2017). İnsan dokularında yaygın olarak ifade edildiği bilinen TRAIL

ligandın, immun hücreler tarafından da bir homotrimerik tip 2 transmembran veya çözülebilir protein olarak ifade edildiği bilinmektedir (Pimentel, Zhou et al. 2023). TRAIL ve reseptörlerinin insan vücudunda birçok dokuda ifade ediliyor olması ve immun ve bağışıklık sistemlerindeki yüksek ekspresyonu, immun tarama sisteminin regülasyonunda da rolü olduğuna işaret etmektedir (Guicciardi and Gores 2009).

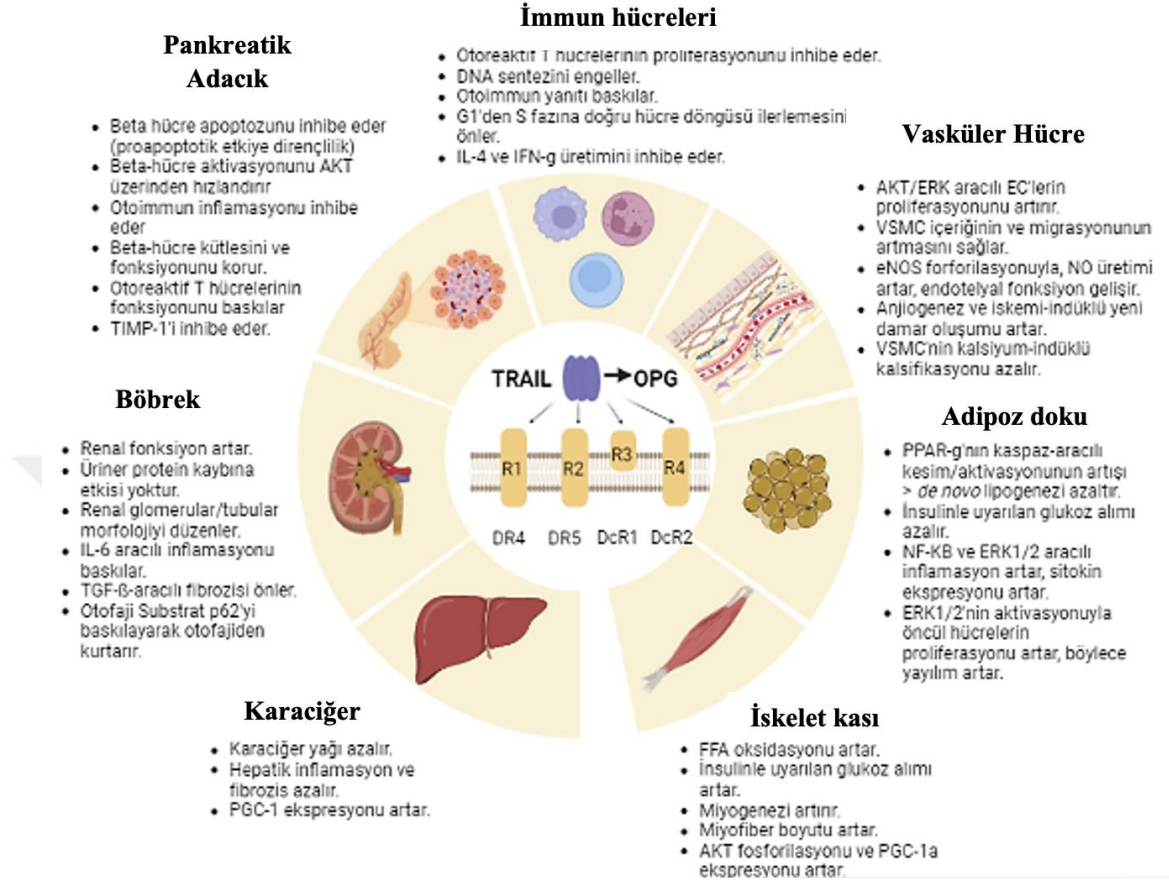
2.4.1 TRAIL reseptörleri ve TRAIL'in biyolojik fonksiyonlarındaki rolü

TRAIL'in bağlanabildiği 5 farklı reseptörünün olması ve insan dokularında yaygın ekspresyonu, bu molekülü TNF süper ailesinin diğer üyelerinden ayıran önemli özelliklerindendir (Şekil 2.6). TRAIL'in reseptörlerinden ikisi (TRAIL-R1; DR4 ve TRAIL-R2; DR5), TRAIL ligandı bağlandığında fonksiyonel sitoplazmik ölüm birimleri aracılığıyla apoptozu indükleyebilir (Pan, O'Rourke et al. 1997, Walczak, Degli-Esposti et al. 1997, Falschlehner, Emmerich et al. 2007). TRAIL-R3 (DcR1) ve TRAIL-R4 (DcR2) ise yalancı reseptörler olarak adlandırılır. Bu reseptörler, hücrelerde sağkalım, proliferasyon gibi anti-apoptotik yolları indükleyebilirler, ancak fonksiyonel ölüm birimi bulundurmadıklarından, apoptozu indükleyemezler (Degli-Esposti, Dougall et al. 1997, Degli-Esposti, Smolak et al. 1997). Farede tek ölüm reseptörü, insanda DR5 ile homoloji gösteren mDR5 reseptörüdür. Farelerdeki yalancı reseptörler, mDcR1, mDcR2, mDcR2S ve OPG olarak adlandırılır (Şekil 2.4). TRAIL'in çözülebilir reseptörü osteoprotegerin'e (OPG/TRAIL-R5) bağlanma afinitesi, transmembran reseptörlerine göre daha düşüktür (Emery, McDonnell et al. 1998). TRAIL ve reseptörlerinin yaygın ifadesi, indükleyebildiği farklı moleküler yollar ve çoklu reseptörlerinin bulunması gibi özellikleri, kanser, obezite, diyabet, romatoid artrit ve nörodejeneratif hastalıklar gibi farklı komplikasyonlarla ilişkilendirilmiş olması ile de uyumludur (Hilliard, Wilmen et al. 2001, Huang, Erdmann et al. 2005, Di Bartolo, Chan et al. 2011, Harith, Morris et al. 2013, Audo, Daien et al. 2015, de Miguel, Lemke et al. 2016).



Şekil 2.6. İnsan ve farede TRAIL molekülünün bağlanabildiği farklı reseptörler (Aktas, Schulze-Toppoff et al. 2007) (Kahraman 2014).

İnsan vücudunda önemli görevler üstlenen bir biyolojik molekül olarak TRAIL, reseptörleri aracılığıyla apoptotik, proliferatif, hücre sağ kalımına yönelik, ve migrasyon ve anjiyogenez tetikleyici birçok farklı fonksiyon gerçekleştirir. Grubumuzun çalışmalarında, akciğer kanseri ve prostat kanseri hücrelerinde TRAIL'ın yalancı reseptörü DcR2'nin hücre yüzey ifadesi siRNA uygulaması ile baskılanarak TRAIL'a dirençli hücreler duyarlı hale getirilebilmiştir (Aydin, Sanlioglu et al. 2007, Sanlioglu, Karacay et al. 2007). TRAIL'ın tüm transmembran reseptörlerinin, hücre sağ kalımını aktive edebildiği bilinmektedir. TRAIL'ın pankreastaki etkisinde de, sentezlenen TRAIL reseptör profili önem kazanmaktadır. Çalışma grubumuz, NOD farelerden diyabet gelişimi öncesinde izole edilen pankreas kesitlerinde, DR5 ölüm reseptörünün yanısıra, DcR1 ve DcR2 yalancı reseptörlerinin de önemli oranlarda ifade edildiğini göstermiştir (Dirice, Kahraman et al. 2011). TRAIL ligand ve reseptörlerinin, birçok insan dokusu ve organ sisteminde farklı fonksiyonları bulunduğu bilinmektedir (Şekil 2.5).



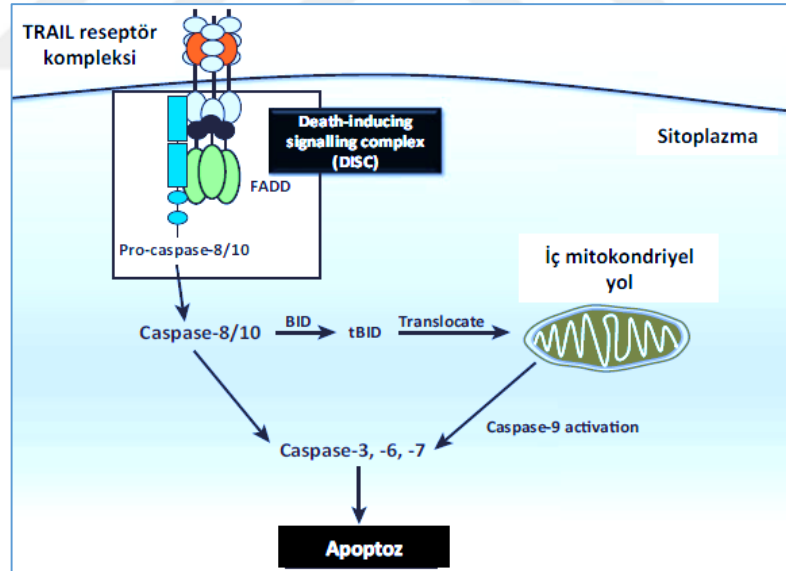
Şekil 2.7. TRAIL molekülü ve reseptörlerinin ilişkide bulunduğu doku ve organ sistemleri [(Koliaki and Katsilambros 2022)’den modifiye edilmiştir].

2.4.2 TRAIL Molekülünün İndüklediği Sinyal Yolakları ve Farklı Fonksiyonları

Sentezlenmesinden kısa bir süre sonra, TRAIL molekülü ilgili reseptörüne bağlanmak için homotrimer oluşturur. Bu komplekslerin stabilizasyonu, her bir monomerde 230 numaralı amino asitin metal bağlanma bölgesine bağlı bir çinko atomu ile sağlanır (Hymowitz, O’Connell et al. 2000). TRAIL bir ölüm reseptörlerine bağlandığında, Fas-associated protein with death domain (FADD) için bir bağlanma bölgesi açığa çıkar. FADD’ın kendi ölüm birimiyle (DD; death domain), ölüm reseptörlerinin ölüm birimi arasında etkileşim gerçekleşir (Bodmer ve ark., 2000). FADD, ölüm reseptörleri ile prokaspaz-8 arasında köprü görevi görür. Prokaspaz-8 molekülünün ölüm efektör birimleri (DED; death effector domain), bu molekülün birbirine bağlanmasına aracılık etmesinin yanı sıra, reseptörlerin ölüm birimlerine de bağlanmalarını sağlar (Dickens, Boyd et al. 2012). Böylelikle sinyal kompleksi I oluşur ve death-inducing signaling

complex (DISC) üyeleri biraraya gelmiş olur. Bu aşamadan sonra prokaspaz 8/10, efektör kaspazlardan 3,6, ve 7'yi aktive edebilir ve hücrede apoptoz süreci başlar (Şekil 2.8). Apoptotik süreci başlatan DISC gibi komplekslerin oluşumu için, TRAIL reseptörlerinin plazma membranında birer mikro birim olan lipid raflarında lokalize olması gerekir; bu süreç, hücrelerin TRAIL'a duyarlılığı açısından önemlidir (Song, Tse et al. 2007).

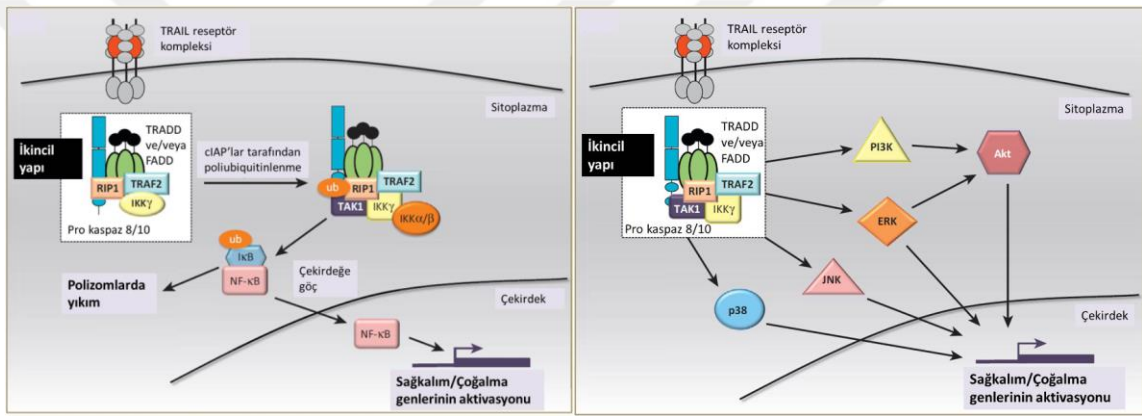
Tarif edilen bu mekanizma, tip 1 hücrelerde apoptozun tetiklenmesi için yeterli iken tip 2 hücrelerde mitokondriyel yolun da aktive olması gerekir. Mitokondriyel apoptotik yolun aktivasyonu için, kaspaz 8 molekülü Bid'i keser; Bid de Bak ve Bax proteinlerinin mitokondriyel membranda oligomerizasyonunu tetikler. Sonrasında membran bütünlüğü bozulur, permeabilizasyon ve sitokrom c salınımı gerçekleşir (Huang, Zhang et al. 2016). Sitokrom c daha sonra Apaf-1'le beraber prokaspaz-9'u bölgeye çekerek aktive eder ve efektör kaspaz aktivasyonu apoptoz ile sonuçlanır.



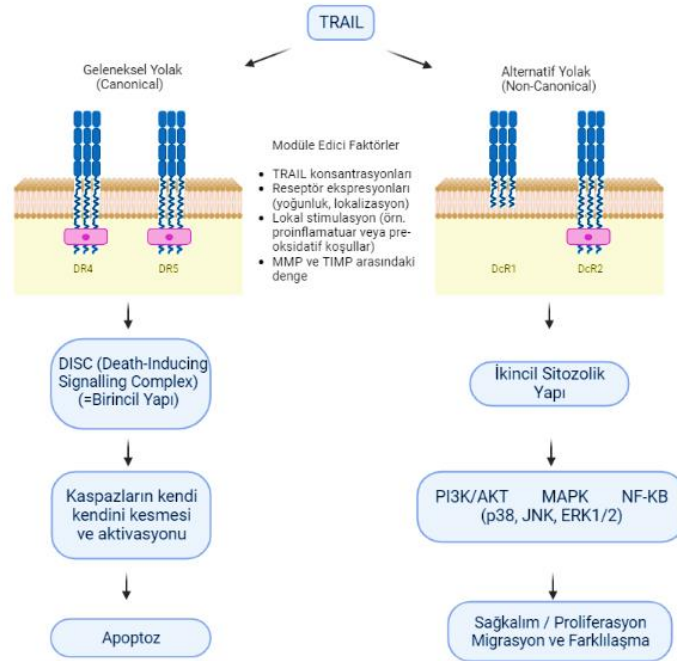
Şekil 2.8. TRAIL molekülünün indükleyebildiği iç ve dış apoptotik sinyal yolları (Harith, Morris et al. 2013).

TRAIL'ın her bir transmembran reseptörü, aynı zamanda hücre sağkalımı ve proliferasyonu ile ilişkili apoptoz dışı sinyal yollarını da indükler (Şekil 2.6). DISC kompleksinden bağımsız olarak oluşan bu ikincil sinyal komplekslerinde, TNF receptor-associated factor 2 (TRAF), receptor-interacting protein 1 (RIP1), ve transforming growth

factor-beta-activated kinase 1 (TAK1) proteinleri önemli rol oynar (Varfolomeev, Maecker et al. 2005). İkincil sinyal komplekslerinin, JNK, p38, ERK, NFkB, PI3K/AKT ve Src gibi moleküllerin aktivasyonu yoluyla sağkalımı ve proliferasyonu indükleyebildikleri, bunun yanında anjiyogenez ve migrasyon/invazyon süreçlerini de tetikleyebildikleri bilinmektedir (Azijli, Weyhenmeyer et al. 2013). TRAIL'in indüklediği birincil ve ikincil yapılar, geleneksel ve alternatif yollar olarak da tanımlanır (Koliaki and Katsilambros 2022).



Şekil 2.9. TRAIL'in apoptoz dışı sinyal yolları. TRAIL apoptoz dışı sinyal yollarında ikincil yapı, DISC, TRADD, TRAF2, prokaspaz 8/10, RIP1, IKKα, IKKβ, IKKγ ve TAK1 moleküllerini kapsar (Harith, Morris et al. 2013, Kahraman 2014).



Şekil 2.10. TRAIL’in indüklediği sinyal yolları ve modüle edici faktörler [(Koliaki and Katsilambros 2022)’den modifiye edilmiştir].

TRAIL’in normal hücrelerde apoptotik etki göstermeyip transforme hücrelerde seçici olarak apoptozu indüklemesi, kanser çalışmalarında umut verici olmuştur. TRAIL reseptör agonistleri veya rekombinant TRAIL uygulamaları ile birçok prelinik deneme yapılmış, ancak farklı limitasyonlar nedeniyle faz II aşamasına gelen çalışma sayısı fazla olmadığından, anti-tümör yaklaşımlarının başarısı TRAIL derivatifleri ve modifikasyonları ile artırılabilmiştir (Snajdauf, Havlova et al. 2021). NK ve T hücrelerinin anti-tümör etkinliklerinde TRAIL’in rolü olması, TRAIL’ı hem doğal hem de kazanılmış immün sistemde önemli bir molekül haline getirmektedir (Mirandola, Ponti et al. 2004). TRAIL’in indüklediği apoptotik yolağın asidik ekstraselüler pH’da nekroz benzeri bir sürece dönüşebildiği de bilinmektedir (Meurette, Huc et al. 2005). Dolayısıyla çalışmalar, TRAIL’in başta tahmin edilenden çok daha fazla ve farklı rolleri olabileceğini göstermiştir. Önemli bir bulgu, TRAIL’in primer insan vasküler endotel hücrelerinde (HUVEC) proanjyogenik etkisinin ve Akt ve ERK aracılı olarak sağkalımı ve proliferasyonu indüklediğinin gösterilmesi olmuştur (Zauli, Pandolfi et al. 2003,

Secchiero, Zerbinati et al. 2004). Endotel hücrelerinin TRAIL'ın apoptotik etkisine dirençli olduğu gösterilmiştir (Zhang, Nguyen et al. 2000). TRAIL'ın vasküler düz kas hücrelerinde de proinflamatuvar sitokinlerce indüklenen apoptoza karşı sağkalımı ve ERK1/2 aracılı proliferasyonu ve migrasyonu tetiklediği; ayrıca düşük dozda (1 ng/ml) NFkB aktivasyonunu, IGFR1 ifadesini ve proliferasyonu indüklediği gösterilmiştir (Secchiero, Zerbinati et al. 2004, Kavurma, Schoppet et al. 2008). TRAIL'ın adipoz dokusundaki öncü preadipoz hücrelerde de ERK1/2 aracılı proliferatif etkisi bildirilmiş, bu yolla adipoz doku homeostazının regülasyonunda görev alabileceği ileri sürülmüştür (Funcke, Zoller et al. 2015).

2.4.3. Diyabette TRAIL ile ilişkili çalışmalar

TRAIL'ın, T1D ve T2D gelişiminde, pankreas biyolojisinde ve patofizyolojisinde önemli rol oynayabileceği öne sürülmüştür. Pankreasta yıkıcı süreçler ile TRAIL ekspresyonu arasında korelasyon gösteren çalışmalar mevcut olsa da, bu durum TRAIL ekspresyonunun koruyucu bir mekanizma olarak da çalıştığını gösterebilir (Lamhamedi-Cherradi, Zheng et al. 2003, Mi, Ly et al. 2003, Sanlioglu, Dirice et al. 2008). Nitekim, TRAIL'ın diyabetteki rolüne yönelik çalışmalar, büyük oranda koruyucu rolüne işaret etmektedir. Diyabet gelişim mekanizması ve TRAIL'ın diyabet ile ilişkisine yönelik olarak bugün bilinen bilgilerin birçoğu, rodentlerin kullanıldığı çalışmalardan elde edilmiştir. TRAIL'ın diyabette koruyucu rol oynayabileceğine yönelik ilk bulgular, TRAIL ifadesi bulunmayan C57BL6 farelerde STZ uygulamasının, TRAIL ifadesi mevcut farelere oranla çok daha erken bir süreçte ve daha şiddetli T1D gelişimine neden olduğunun gösterilmesiyle elde edilmiştir (Lamhamedi-Cherradi, Zheng et al. 2003). Yine TRAIL ifade etmeyen farelerde diyabet ile ilişkili çeşitli komplikasyonlar gözlenmiştir (Di Bartolo, Chan et al. 2011). Bir başka çalışma, NOD farelerde adenoviral vektör aracılı TRAIL uygulamasının spontan diyabet gelişim insidansını düşürdüğünü göstermiştir (Kang, Park et al. 2010).

TRAIL'ın diyabetteki etkisini araştırdığımız bir çalışmamızda, NOD farelerde diyabet gelişim sürecinde TRAIL ligand ve reseptör ifadelerinin değiştiğini, diyabet gelişimi ile TRAIL ligand ve DcR1 ekspresyonlarının baskılandığını gözledik (Dirice, Kahraman et al. 2011). İlgili çalışmada ayrıca, siklofosamid (CY) aracılığıyla diyabet gelişiminin

hızlandırıldığı NOD farelerde TRAIL ifadesinde de düşüş gözlenmiştir. CY'nin diyabet oluşturuıcı etkisini regülatör T hücrelerini baskılayarak gösterdiği düşünüldüğünde, TRAIL'ın da bu süreçte baskılanması, önemli bir göstergedir. Başka bir çalışmamız, sağlıklı Wistar ratlardan elde edilerek adenoviral vektörler aracılığıyla yüksek TRAIL ekspresyonu sağlanmış pankreatik adacıkların diyabetik ratların böbrek kapsülü altına transplantasyonunun, insülitisi azalttığını ve TRAIL yüksek ekspresyonu sağlanmamış adacıkların nakledildiği kontrol grubuna oranla normogliseminin daha uzun süreli olarak korunduğunu gösterdi (Dirice, Sanlioglu et al. 2009). İlgili çalışmamızda TRAIL, adacıklardaki insülitisi, büyük olasılıkla, infiltre olan T hücre döngüsünü bloke ederek sağlamıştır (Song, Chen et al. 2000). Bir başka çalışmamızda, TRAIL'ın rat pankreatik beta hücreleri ve MIN6 fare beta hücrelerinde sağ kalımı artırıcı ve proliferatif etkisini gözledik (Kahraman, Yilmaz et al. 2021). TRAIL'ın diyabet sürecinde gözlenen koruyucu etkisi, beta hücrelerini inflamatuvar sitokinlere karşı koruma, beta hücre proliferasyonunu ve/veya rejenerasyonunu indükleme, beta hücre fonksiyonunu iyileştirme gibi farklı hücrel mekanizmalar yoluyla gerçekleşiyor olabilir.

2.5. Diyet İndüklü Obezite (DİO) ve Tip 2 Diyabet (T2D) Hayvan Modelleri

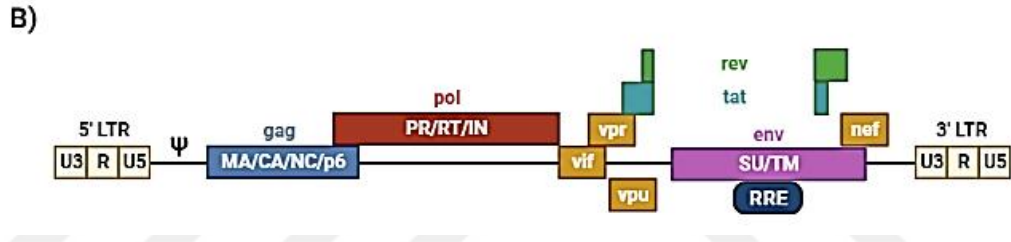
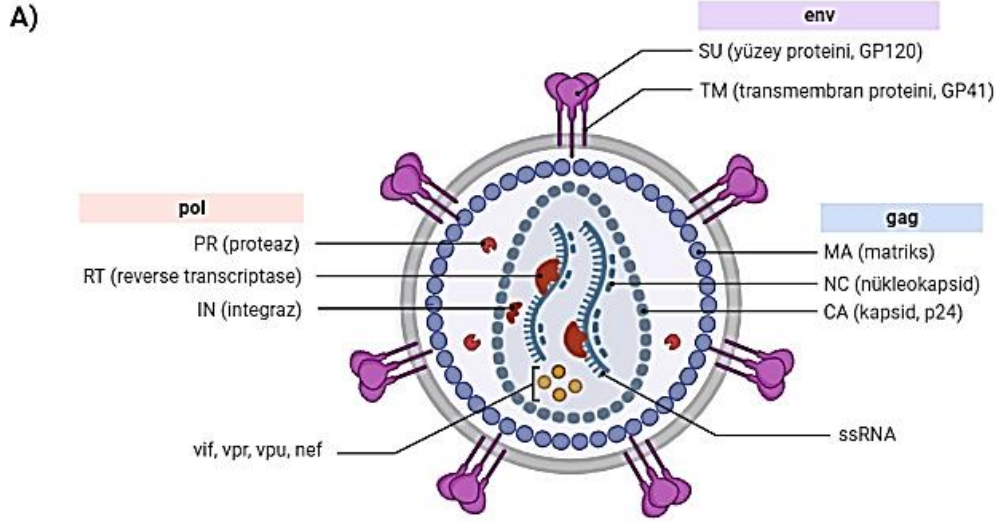
Pankreasın ve beta hücrelerinin yapı ve fonksiyonlarına ilişkin ve diyabetin gelişimi ile ilişkili mevcut bilgilerin birçoğu, insan pankreası ile çalışmanın tıbbi ve etik sorunlarından dolayı ilgili deney hayvan modellerinden elde edilmiştir. Diyet indüklü obezite (DİO) fare modelleri, bu amaçla en sık kullanılan hayvan modellerindendir. C57BL6 fareler, ilgili süreçlere yatkınlıklarından dolayı da DİO ve T2D modeli olarak sıklıkla kullanılan suşlardandır (Surwit, Kuhn et al. 1988). DİO modelleri, obeziteye yönelik olarak kullanılabilecek ilaçların denenmesinde de tercih edilebilmektedir (Murase, Aoki et al. 2002, Kamiya, Sameshima-Kamiya et al. 2012). Yüksek yağlı diyetin, bu ajanın diyabetojenik etkilerine duyarlılık kattığı bildirilmiştir. Bu diyetle beslenen C57BL6 farelerde glukoz toleransında ve insülin duyarlılığında bozulma gözlenir. Obezite yanında, insandaki T2D profiline yakın bir model oluşturmak için, kısmi beta hücre hasarı oluşturma amacıyla Streptozotosin (STZ) uygulaması sıklıkla uygulanır (Srinivasan and Ramarao 2007). STZ, *Streptomyces achromogenes* tarafından üretilen ve beta hücrelerine spesifik toksisite gösteren bir glukozamin-nitrözüre bileşiği ve glukoz analogu bir

antibiyotiktir. Food and Drug Administration (FDA) onaylı bir ilaçtır ve pankreatik adacık hücrelerinin metastatik kanserinin tedavisinde kullanılmaktadır. Beta hücrelerine alımı, Glucose Transporter-2 (GLUT2) reseptörleri yoluyla. Hücrelerde glukoz oksidasyonunu ve glukoz-indüklü insülin salınımını bloke eder; nitrik oksit oluşumu, alkilasyon veya DNA fragmentasyonu aracılı DNA hasarına neden olur (Turk, Corbett et al. 1993).

T2D hayvan modellerinin geliştirilmesinde, sıklıkla hayvanlar 8 haftalıkken bu yüksek enerjili diyetle başlanır ve en az 8 hafta devam edilir. Bu diyetin kandaki insülin seviyesini artırmasını takiben STZ uygulaması ile sağlanan kısmi beta hücre kaybı nedeniyle insülin miktarında da belirgin azalma meydana gelir. Bu kombine uygulama, farelerde belirgin hiperglisemiye yol açar ve insanda T2D gelişim sürecindeki metabolik özellikleri ve doğal hastalık sürecini iyi bir şekilde taklit eden bir modelin oluşturulmasını sağlar. C57BL6 fareler, sıçanlara oranla daha hızlı obezite geliştirir, insülin dirençliliği daha hızlı gelişir ve kan şekeri düzeyleri daha yüksek seyreder; bu kombine modelden, metformin gibi anti-diyabetik ilaçların *in vivo* test edilmesinde de yararlanıldığı bilinmektedir (Luo, Quan et al. 1998).

2.6. Lentiviral Vektörler

Lentiviral vektörler (LVler), günümüzde *in vitro* ve *in vivo* gen tedavi çalışmalarında sıklıkla kullanılan, diyabet ile ilişkili yeni stratejilerin geliştirilmesi çalışmalarında da sıklıkla yer bulan viral vektörlerdir. Hücrelere etkin gen aktarımı gerçekleştirebilmeleri, bölünen ve bölünmeyen hücreleri transdükte edebilmeleri, uzun süreli gen ekspresyonu sağlayabilmeleri, bu vektörlerin avantajlarındandır (Escors and Breckpot 2010). LVler zarflı virüsler olup 7-12 kb uzunluğunda iki kopya tek zincirli (+) anlamlı RNA genomuna sahiptirler. LVlerin büyük kısmı HIV-1 virüs tabanlıdır (Şekil 2.11).



Şekil 2.11. HIV-1 genomunun şematik görünümü. (A) HIV-1 virüslerinde viral enzimler ve tek zincirli (+) anlamlı iki RNA fragmenti p24 (kapsid proteini) ile çevrilidir; (B) Viral genom, yapısal (gag, pol, env), regülatör (rev ve tat), ve yardımcı (vif, vpr, vpu, nef) genlerden oluşur. Yüzeyde GP41 ve GP120 proteinleri bulunur [(Sakuma, Barry et al. 2012)'den modifiye edilmiştir].

Lentiviral vektör üretimi, üretim teknolojilerindeki ilerlemelerle, bugün hızlı ve güvenli süreçlerle gerçekleştirilebilmektedir. Çalışmalarda sıklıkla, replikasyon yeteneği olmayan, sadece taşıdığı geni hedef hücreye etkin şekilde taşıyabilen LVlerin üretilmesi hedeflenmektedir. LVlerin üretimi için, genellikle paketleme plazmid, transfer plazmid, ve zarf proteinlerini kodlayan plazmidler 293T hücrelerine (insan embriyonik böbrek hücre hattı) birlikte transfekte edilirler. LV üretiminde kullanılan özellikle paketleme plazmidinin yapısına göre farklı “jenerasyonlar” tanımlanır. Çalışmamızda kullandığımız “üçüncü jenerasyon” LVlerin üretiminde, viral regülatör genler *rev* ve *tat*, paketleme plazmid yerine, dördüncü bir plazmitte *trans* olarak sağlanmaktadır. Bu vektörlerde ayrıca psödotiplendirme yapılmıştır; HIV virüsüne ait viral zarfı kodlayan *env* geni, VSV-G (Vesicular Stomatitis Virus Envelope Protein) proteinini kodlayan gen ile değiştirilmiştir. Psödotiplendirme ile virüs daha yüksek tropizme sahip olur. Bunun

yanında, viral zarfı kodlayan genin ayrı bir plazmitte sağlanması ve orijinal virüsten farklı bir zarf proteini kodlaması, replikasyon kompetan LVlerin (RCL) oluşma riskini oldukça azaltmaktadır; RCL oluşumu için gerekli rekombinasyonların tümünün birden aynı viral partikülde oluşma riski bu şekilde en aza indirilmiştir.

Bahsedilen düzenlemelerin yanında, bu vektörlerde genomun 3'LTR bölgesinde enhancer/promotor bölgesinin çıkarılmış ve bu sayede kendi kendini inaktive eden self-inactivating (SIN) transfer vektörlerinin oluşumu sağlanmıştır. Bu özellik, RCL viral partiküllerin oluşumunu engellemenin yanı sıra, promotor interferansını da ortadan kaldırması açısından önemlidir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deney Hayvan Gruplarının Oluşturulması

Çalışma için Kobay deney hayvanları laboratuvarından (Ankara) 40 adet, 8-10 haftalık erkek C57BL6 hayvan temin edildi. Hayvanlar Akdeniz Üniversitesi Deney Hayvanları Ünitesi'ne getirildikten sonra her bir kafeste 10 hayvan olacak şekilde saydam, sert plastikten yapılmış kafeslere yerleştirildi ve 15 gün karantinada tutuldu. Hayvanlar daha sonra su ve besin kısıtlaması olmaksızın 8 hafta süreyle *ad libitum* peletle beslendi. Sıcaklığı 20-24°C arası odalarda tutulan hayvanlar, 12 st karanlık - 12 st aydınlık döngüde tutuldu.

3.1.1 Yüksek yağlı yem üretimi ve obez hayvan modelinin oluşturulması

Materyal:

- Toz yem (Korkuteli Yem)
- İç Yağı (Aytaç Kesimhane)
- Fruktoz (Fructofin C)

Metod:

- 900 gram (gr) yağ küçük parçalara bölünerek eritildi.
- 300 gr fruktoz ve 800 gr toz yem karıştırıldı.
- Eritilmiş yağ karışıma eklendi.
- Yağlı karışım homojen hale gelince 1 cm kalınlığında bir kaba kalıp haline gelmesi için yerleştirildi.
- Karışım +4°C'de soğumaya bırakıldı. Süre sonunda uygun boyutlara getirilerek kafeslere konuldu (Yem uzun süre muhafaza edilecekse -20 °C'de saklanabilir).

8 hafta boyunca normal yağlı yemle *ad libitum* beslenen hayvanlar, obez hayvan modelinin oluşturulması için bu süreden sonra (en az 8 hafta boyunca) yalnızca yağlı yemle beslendi. Kullanılan yüksek yağlı yemin yağ oranı %40-60'tır, ve Akdeniz Üniversitesi Gen ve Hücre Tedavisi Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde 111S157 no.lu TÜBİTAK projesi kapsamında geliştirilmiş olan patentli bir üründür. Hayvanlara verilen normal (chow) besinin yağ oranı %5-10 arasındadır.

3.1.2 Tip 2 Diyabet hayvan modelinin oluşturulması

Tip 2 Diyabet (T2D) modeli, insandakine en yakın patofizyolojinin taklit edilebilmesi için, en az 8 hafta süreyle yüksek yağlı diyetle beslenmeyi takiben kısmi beta hücre hasarını indükleyen bir alkilleyici ajan olan Streptozotosin (STZ) kullanılarak oluşturuldu (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ABD). Yapısal olarak glukozu benzer olması nedeniyle STZ, GLUT2 reseptörü ile hücre içine girer ve beta hücrelerine spesifik olarak sitotoksik etki yapar. Daha önceki çalışmalarımızda da kullandığımız bir uygulama olarak, hayvanlara intraperitoneal tek doz STZ enjeksiyonu (150 mg/kg) yapıldı. Sitrata tamponu enjeksiyondan hemen önce çözöldü ve enjeksiyon yapıłana kadar buz üzerinde bekletildi.

Materyal:

- STZ
- Trisodyum sitrat dihidrat
- Steril distile su
- Enjektör

Metod:

Sitrata tamponunun hazırlanışı:

- 0.1 M sodyum sitrat çözeltisi hazırlamak üzere istenen hacme göre trisodyum sitrat dihidrat miktarı hesaplanarak istenen hacmin yarısı kadar steril distile suda çözöldü.
- Taze hazırlanan sitrik asit çözeltisi (sitrata tamponu) ile pH 4,5'e ayarlandı.
- Karışım steril distile su ile istenilen hacme tamamlandı.
- +4°C' de saklandı.

0.1 M sitrata tamponu için;

- 1,92 gr sitrik asit monohidrat tartıldı ve 100 ml'ye tamamlandı.
- 2,94 gr sitrik asit trisodyum sitrat dihidrat, ayrı bir beherde tartıldı. Yaklaşık 50 ml steril distile su ile karıştırıldı.

- Sitrik asit monohidrat çözeltisi hazırlandıktan sonra pH 4,5'e ayarlandı ve çözelti 100 ml'ye tamamlandı.

STZ hazırlanışı ve uygulanışı:

- Hayvanlar tartıldı ve ortalama ağırlık belirlendi.
- Toplam hayvan sayısı ile ortalama ağırlık çarpılarak toplam ağırlık hesaplandı.
- Verilecek STZ dozu ile bu ağırlık çarpılarak STZ dozu hesaplandı.
- Her hayvan için yaklaşık 200 µl sitrat tamponu içinde STZ çözöldü.
- Sitrat tamponu taze hazırlandı. Hayvanlar enjeksiyon öncesi 6 st aç bırakıldı. STZ dozları hesaplandıktan sonra, gereken STZ miktarı tartıldıktan sonra ependorf tüpe kondu.
- Uygulama yapılacak tüm hayvanlar için sitrat tamponu miktarı hesaplandı ve falkon tüpe konularak STZ tampon içinde çözöldü. (STZ çözeltisi hazırlandıktan sonra hızlı degradasyondan dolayı en geç 10 dk içinde hayvana uygulanmalıdır).
- Hipoglisemi riskine karşı glukoz çözeltisi hazır bulunduruldu.

Bu doğrultuda oluşturulan deney grupları şunlardır:

1. Normal yağlı yemle beslenen grup (Chow besin) (n=5)
2. Yüksek yağlı yemle beslenen grup (n=7)
3. Yüksek yağlı yemle beslendikten sonra STZ enjeksiyonu yapılan grup (n=7)
4. Yüksek yağlı yemle beslendikten sonra STZ enjeksiyonu ve sTRAIL uygulanan grup (n=7)
5. Yüksek yağlı yemle beslendikten sonra STZ enjeksiyonu ve LV-TRAIL uygulanan grup (n=7)
6. Yüksek yağlı yemle beslendikten sonra LV-TRAIL'a ek olarak sTRAIL uygulanan grup (n=7)

Deney gruplarının haftalık kontrolleri:

Kilo kontrolü: Hayvanların kiloları her hafta ölçöldü ve bir çizelge oluşturuldu; her bir grup için kilo gözetimi rutin olarak yapıldı.

Kan glukozu ölçümleri: C57BL6 farelerde kan glukozu seviyeleri yaklaşık 150 mg/dl'dir. Hayvanların kan şekeri, STZ enjeksiyonu öncesinde ve sonrasında düzenli olarak kontrol edildi. Şeker ölçümleri sırasında kan şekerinde ani yükselme istenmediğinden, kan şekeri ölçümleri mümkün olduğunca hayvanlarda stres yaratmadan gerçekleştirildi. Ölçüm için kuyruk venasına kesit atıldı, gelen ilk kan temizlendi ve ikinci damla stripe emdirilerek glukometre (Abbott, Optium Freestyle) aracılığıyla ölçüm yapıldı. Kan şekeri 250 mg/dl'nin üzerinde ölçülen hayvanlar diyabetik kabul edildi.

İntraperitoneal glukoz tolerans testi:

İntraperitoneal glukoz tolerans testi (IPGTT), obez hayvanlarda obezite gelişimini takiben belirli aralıklarla, T2D hayvan modellerine STZ uygulanmasından sonra 3. ve 5. günlerde ve uygulamayı takiben 1. hafta, 1. ay ve 2. ayda uygulandı. IPGTT testi öncesi, hayvanlar 8 st aç bırakılarak açlık süresi bitiminde periton içine 2 gr/kg dekstroze enjekte edildi. Farelerin kuyruk venından 0, 15, 30, 60 ve 120. dk.larda Abbott, Optium Freestyle cihazı ve cihazın stripleri kullanılarak kan glukoz değerleri ölçüldü. Ölçülen değerlerden elde edilen grafiklerde eğri altında kalan alan (AUC; Area Under Curve) değerleri hesaplandı ve istatistiksel analizler gerçekleştirildi.

Materyal:

- D-Glukoz >%99
- Enjektör
- Glukometre
- Glukometre stripleri

Metod:

- Steril distile su ile %20–40 (w/v) oranında glukoz çözeltisi hazırlandı.
- %25 (w/v) stok glukoz solüsyonu hazırlandı: bunun için 2,5 gr D-glukoz 10 ml distile suda çözüldü.
- Hayvanlar uygulama öncesi 8 st boyunca sınırsız su erişimiyle aç bırakıldı.
- Hayvan ağırlığı başına 2 gr glukoz solüsyonu hesaplandı (%25 (w/v): her 8 µl'de 0.002 gr glukoz).

- Tüm hayvanların sayısı ve ağırlığı hesaplandı.
- Toplam enjeksiyon hacmi, hayvan sayısının iki katı olacak şekilde hesaplandı. Hayvanların toplam ağırlıkları ve ortalama ağırlıkları hesaplandı.
- Ortalama ağırlığın iki katı hayvanın toplam ağırlığına dahil edildi. Elde edilen rakam 8 µl ile çarpılarak mevcut solüsyondan alınacak miktar hesaplandı. Her bir hayvana, hazırlanan enjeksiyon solüsyonundan 200 µl çekilerek enjekte edildi.
- Kuyruktan alınan ilk kan temizlendikten sonra ikinci damladan ölçüm yapıldı. Birinci dk.da alınan ölçümler kaydedildi.

İntraperitoneal insülin duyarlılık testi:

İnsülin duyarlılık testi (IDT), tüm hayvan gruplarına 8 haftalık beslenmeyi takiben uygulandı. Hayvanlar test öncesi 4 st aç bırakıldıktan sonra kg başına 1 U olacak şekilde intraperitoneal insülin enjeksiyonunu takiben kuyruk veninden 0, 15, 30, 60 ve 90. dk.larda Abbott, Optium Freestyle cihazı ve stripleri ile kan glukoz ölçümleri gerçekleştirildi. İstatistiksel analiz yapıldı ve ölçülen değerlerden elde edilen grafikte eğri altında kalan alan (AUC) değerleri kontrol grupları ile karşılaştırıldı. Hastalığın ilerlemesini izlemek için düzenli olarak insülin duyarlılık testi uygulandı.

Materyal:

- İnsülin
- İnsülin şırıngası
- PBS

Metod:

- 20 µl Humalog ve 1980 µl PBS ile 2000 µl stok solüsyon hazırlandı (2 U Humalog mevcut solüsyonda bulunmaktadır).
- Hayvanların tartımı yapıldı ve kaydedildi.
- Her bir hayvanın ortalama ağırlığı ve toplam ağırlığı hesaplandı. Toplam hesaplama, enjeksiyon yapılacak hayvan sayısının iki katı olacak şekilde yapıldı.
- Hayvanların toplam ağırlığı için gerekli miktarda stok solüsyon çekildi. PBS ile enjeksiyon hacmi tamamlandı.

- 0. dk.da kan glukoza ölçüldü ve kaydedildi ve hemen sonrasında intraperitoneal insülin enjeksiyonu yapıldı.

3.2 Kan Plazmalarının Toplanması

Materyal:

- Venöz kanül
- Plazma ayırıştırma tüpleri
- Hamilton şırınga

Metod:

Hayvandan alınan kan, plazma ayırıştırma tüplerine konuldu.

- Kan ve serumun ayrılması için 300 rpm’de 15 dk santrifüj yapıldı.
- Plazma örnekleri ileri çalışmalarda kullanılmak üzere -20 °C’de saklandı.

3.3. İzole Edilen Dokuların Fiksasyonu ve Parafine Gömme

Materyal:

- **Formalin:** %37.5’lik formalin (Distile su ile 10 kat sulandırıldı.)
- **Alkol Serileri:** %100, %90, %80 ve %70 alkol
- **Ksilol**
- **Parafin:** (Thermo Fisher, 701543)
- 60°C etüv
- 45-50°C su banyosu
- Doku kalıpları

Metod:

Parafine gömme:

- Dokular, cerrahi işlemten sonra serum fizyolojikle yıkanarak kandan ve istenmeyen dokulardan arındırıldı, sonrasında fiksatifte gece boyu inkübasyona bırakıldı.
- Akan su altında 2 st yıkama yapıldı (Bu aşamada fazla fiksatifin uzaklaştırılması sağlandı).
- Dokular, %70, %80 ve %90 alkol serisinde bir gün boyunca tutuldu.

- Gömme işleminin son günü dokular %100 alkolde  st bırakıldı.
- Dokular sırasıyla ksilol 1, ksilol 2 ve ksilol 3'te 3 dk boyunca tutuldu.
- Dokular 1 st boyunca sırasıyla parafin 1, parafin 2 ve parafin 3'te bırakıldı.
- Dokular kalıba yerleştirildi ve stok parafin veya temiz parafin eklenerek kalıbın donması için bırakıldı.

3.4. Dokulardan Mikrotom Aracılığıyla Kesitlerin Alınması

Materyal:

- Mikrotom
- Sıcak su banyosu (40°C)
- Sıvı sabun
- Buz aks
- Sulu boya fırçaları
- Lam
- Ksilol
- Pamuk ya da gazlı bez

Metod:

Sıcak su banyosu 40°C'ye getirildi. Mikrotom bıçağı ve doku kaseti yerleştirildi. nce 5 mikronluk kesitlerle çalışılmaya başlanıp, dokulara gelene kadar 10-20 mikron arasında bir değerde çalışıldı. Dokuya gelindiğinde tekrar 5 mikronluk kesitler alınmaya başlandı. Kesitler mikrotomdan suluboya fırçalarının ucuyla taşınarak uzaklaştırıldı ve tabla üzerinde açıldı. Kesit almaya başladıktan bir süre sonra parafin dokular iplikçik şeklinde veya kesik kesik gelirse kesit alınan parafin bloğa buz aks ve fırça ucuyla sıvı sabun köpüğü uygulandı. Mikrotom bıçağı, parafin artıklarının bıakta kalmaması için ksiloll gazlı bezle ya da pamukla silindi. Kesitler suluboya fırçaları yardımıyla sıcak su banyosuna alındı. Lam zerine etiketlemeler yapıldıktan sonra yüzen kesitler, bütünlükleri bozulmadan lam üzerine alındı.

3.5. Hematoksilen/Eozin Boyama

Materyal ve Cihazlar:

- Etüv (60°C)
- Hematoksilen (1/6 oranında 1xPBS ile sulandırıldı).
- Eozin solüsyonu (200 ml Eosin Y'ye 1 ml glasiyel asetik asit eklenerek hazırlandı.)

Metod:

- Dokular deparafinizasyon ve hidratasyon amacıyla şu serilerden geçirildi: ksilol 1'de 4 dk, ksilol 2'de 3 dk, %100 EtOH'da 3 dk, %100 EtOH'da 3 dk, %95 EtOH'da 3 dk, %95 EtOH'da 3 dk, %70 EtOH'da 10 dk, dH₂O'da 5 dk.
- Dokular hematoksilen içinde 5 dk bekletildi ve suya alındı.
- Dokular, suyun direk dokuya gelmemesine dikkat edilerek 10 dk akan su altında bekletildi.
- Kesitler %95 EtOH'a 10 kez daldırıldı ve sonrasında 10 saniye süreyle eozinde bekletildi.
- Dokular %95 EtOH'da 3 dk, %100 EtOH'da 3 dk, %100 EtOH'da 3 dk, ve ardından ksilol 1'de 3 dk, ksilol 2'de 4 dk bekletilerek çıkış serisi tamamlandı. Preparata entellan damlatılarak lamel ile üzeri kapatıldı.

3.6. İmmunohistokimyasal Boyamalar

Materyal:

- Sitrat tamponu (1X)
- Sitrik Asit Monohidrat
- Distile su
- NaOH
- Tris-EDTA pH 9,0 (10 mM Tris-Base, 1 mM EDTA, %0.05 Tween 20, 1,21 g Tris-Base, 0,37 g EDTA, 1000 ml dH₂O ve 500 µl Tween 20 karıştırılarak hazırlandı, pH 9'a ayarlandı).
- PBS (10X) pH 7,4 (160 g NaCl, 4 g KCl, 28,8 g Na₂HPO₄, 4,8 g KH₂PO₄ tartıldı). Tüm malzemeler balon jojede 1,5 litre dH₂O ile tuz çözünene kadar karıştırıldı ve pH

7,4'e ayarlandı. Solüsyon 2 L'ye tamamlandı. Kullanım için 10X PBS'ten 100 ml alınarak 900 ml dH₂O ile 1X solüsyon elde edildi.

- ProSci TRAIL ligand ve reseptör antikor seti PSI-1801 (1/200)
- MCM7 antikor, 11225-1-AP (1/100)
- PDX-1 antikor, pa5-78024 (1/500)
- CK20 antikor, orb606233 (1/500)
- Ki67 antikor, bd556003 (1/500)
- Goat Anti-Rabbit HRP, sekonder antikor (BioRad, 1/1000)

Metod:

Parafine gömülen doku bloklarından mikrotom yardımıyla 5 mikronluk kesitler alındıktan sonra, hematoksilen ve eozin boyamaları takiben, seri kesitlerde immunohistokimyasal analizler gerçekleştirildi. Farklı aşamalarda, anestezi altında pankreasları çıkarılan ve sakrifiye edilen kontrol hayvanlar ve deney gruplarına ait hayvanların pankreas dokularında TRAIL ligand ve reseptörlerinin ve Ki67, MCM7, PDX-1 ve CK20 belirteçlerinin ifade oranları belirlendi. Diğer organların dokuları da (karaciğer, dalak, böbrek) farklı boyamalar için izole edildi. İmmunohistokimyasal deney protokolünde kısaca şu işlemler gerçekleştirildi: Mikrotomda kesit alma işlemini takiben preparatlar, dokuların pozitif yüklü lamlara bağlanma miktarının artırılması ve parafin uzaklaştırma işlemine başlanabilmesi için önce 60°C'de 1 st tutuldu. Daha sonra preparatlar alkol serisinden geçirildi (%100, %90, %80 ve %70'lik alkolde 5'er dk). Mikrodalga fırında sitrik asit içinde kaynatma yoluyla antijen açığa çıkarma aşamasını takiben endojen peroksidaz aktivitesinin baskılanması amacıyla kesitler H₂O₂'de 30 dk bekletildi. Antijen açığa çıkarma aşamasında, 2,1 g sitrik asit monohidrat tartılarak 900 ml dH₂O'da çözdürüldü, daha sonra NaOH ile pH 6.0'a ayarlandı. Deparafinizasyon işleminden sonra preparatlar sitrat tamponunda 700 W'de 15 dk fırın içerisinde bekletildi. Alternatif metod olarak Tris-EDTA pH 9.0 kullanıldı. Kullanılacak sekonder antikorun spesifik olmayan bağlanmalarını önlemek amacıyla Ultra V Blok uygulandı. Kesitler, primer antikorların uygun dilusyonları uygulanarak geceboyu +4°C'de bekletildi. Sekonder antikor uygulamasından sonra kesitlerin üzerine DAB kromojen damlatıldı, daha sonra

hematoksilen ile zıt boyama yapılarak hücre nükleuslarının mor boyanması sağlandı. Preparatlar entellan solusyonu ile kapatılarak analiz için hazır hale getirildi.

3.6.1. İmmunohistokimyasal boyamaların analizi

İmmunohistokimyasal boyamalar, boyama yoğunluğu ve dağılımı (pozitif boyanan hücre yüzdesi) belirlenerek aşağıdaki şekilde değerlendirildi. Toplam immün boyama skoru, her bir boyama için iki kriterin toplamı şeklinde ifade edildi. Dokulardaki boyamanın yoğunluğu için: 0: negatif; 1: zayıf; 2: orta; 3: güçlü / Marker dağılımı için: 0= <%10; 1= <%10-40; 2= <%40-70; 3= >%70 aralıkları esas alındı.

3.7. Lentiviral Vektörlerin Üretimi

Materyal:

- **293T hücreleri** (ATCC, CRL-3216)

293T hücreleri, insan embriyonik böbrek hücre hattıdır. Simian virüs 40 (SV40) büyük T antijenini eksprese ederler ve transfeksiyon etkinlikleri yüksektir.

- **HT1080 hücreleri** (ATCC, CCL-121)

Epitel morfolojiye sahip fibrosarkoma hücre hattıdır. Viral partikül titrasyon deneylerinde kullanılmıştır.

- **DMEM Besiyeri:** DMEM (Sigma D5648) toz besiyeri satın alındı. 900 ml distile suda beher içerisinde çözdürüldü. pH 7,2'ye ayarlandı. Son hacim 1 litreye tamamlandı. Sterilizasyonu için kabinde 0,22 µm filtreden geçirildi, %1 oranında 10 ml penisilin-streptomisin-amfoterisin solüsyonu (Biological Industries) eklendi. Serumlu DMEM için %10 oranında inaktif FBS (Fetal Bovine Serum, Biochrom AG; S0115) eklendi.

- **PBS Solüsyonu:** 10X stok PBS solüsyonundan 1X distile suyla hazırlandı. pH 7.4'e ayarlandı. Hazırlanan solüsyon hücre kültürü kabininde 0,22 µm filtre ile filtrelendi.

- **Tripsin-EDTA:** 100X Tripsin-EDTA (Sigma, T9283) solüsyonu PBS ile 100 kat seyreltilerek hazırlandı.

- **IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium)**

1 litrelik toz IMDM besiyeri (Sigma, I7633) 900 ml dH₂O'da karıştırıcı yardımıyla çözdürülürken 3,024 gr NaHCO₃ eklenerek pH 7,2'ye ayarlandı. Ardından kabin

içerisinde 0,22 µm filtreden geçirildi. Besiyeri %10 serum ve %1 penisilin-streptomisin içerecek şekilde hazırlanarak +4°C’de saklandı.

- **OPTI-MEM (Opti-Minimal Essential Medium)**

13,59 gr toz OPTI-MEM (Gibco, 22600134) hassas terazide tartılarak 900 ml dH₂O’da karıştırıcıda çözdürüldükten sonra 2,4 gr NaHCO₃ eklenerek pH 7,3’e ayarlandı. Buradan sonra kabin içerisinde 0,22 µm filtreden geçirildi. Besiyeri %10 serum ve %1 penisilin-streptomisin içerecek şekilde hazırlanarak +4°C’de saklandı.

- **2XHBS**

Tablo 3.1’de verilen kimyasallar tartıldıktan sonra 500 ml’lik bir balon jojede birleştirildi. Üzerine yaklaşık 350-400 ml distile su (ddH₂O) eklendi. pH 7,05’e ayarlandı; 0,22 µm filtreden geçirildikten sonra, toplam hacim 500 ml olacak şekilde ddH₂O eklendi. Solüsyon 50 ml’lik falkonlara bölünerek alikotlandı ve -20°C’de saklandı.

Tablo 3.1. 2XHBS solüsyonunun hazırlanışı

Kullanılan Malzeme	Miktar	Konsantrasyon
NaCl	8 g	280 mM
KCl	0,38 g	10 mM
Na ₂ HPO ₄	0,1 g	1,5 mM
Hepes	5 g	50 mM
Glukoz	1 g	12 mM

- **2M CaCl₂ Solüsyonu**

Anhidre kalsiyum klorür kullanıldı. 2M CaCl₂ için 221 gr toz 1 L bidistile suda (ddH₂O) çözdürüldü ve 0,22 mikronluk filtreden geçirildi. Sonrasında solüsyon 15 ml’lik falkonlara bölünerek alikotlandı ve deney zamanına kadar -20°C’de saklandı.

- **Chloroquine**

25 µM Chloroquine (Sigma, C6628) hazırlamak için 129 mg toz chloroquine difosfat 10 ml ddH₂O içerisinde çözdürüldü. Laminar flow kabinde 0,22 µm filtreden geçirildi. 1 ml’lik ependorflara alikotlanarak -20°C’de muhafaza edildi.

- **1XTE (Tris-EDTA)**

1M Tris Base hazırlamak için, 6,05 gr toz Tris Base tartıldı, 30 ml dH₂O’da çözdürüldü, pH 7,5’e ayarlandı. Son hacim 50 ml’ye dH₂O ile tamamlandı. 1,86 gr toz EDTA 10 ml dH₂O’da çözdürüldü. pH 8.0’a ayarlandı. Laminar flow kabinde 0,22 µm filtreden

geçirildi ve 1 ml'lik ependorflara alikotlandı. 1M Tris Base solüsyonundan 1 ml, 200 µl'de 0,5 M EDTA solüsyonu ile karıştırılarak son hacim ddH₂O ile 100 ml'ye tamamlandı. Karışım -20°C'de muhafaza edildi.

- **0,1XTE: dH₂O solüsyonu**

1X steril TE 10 kat seyreltilerek 0,1X TE elde edildi. 0,1X TE solüsyonundan iki hacim ve dH₂O'dan bir hacim karıştırılarak kullanım solüsyonu elde edildi ve 0,22 µm filtreden geçirilerek steril hale getirildi. Deney zamanına kadar +4°C'de muhafaza edildi.

- **HBSS (Hank's Balanced Salt Solution)**

1. 8 g NaCl, 0,4 g KCl, 1 g glikoz tartıldı, toz karışım dH₂O ile 100 ml'ye tamamlandı.
2. 0,358 g Na₂HPO₄, 0,6 g KH₂PO₄ tartıldı, toz karışım dH₂O ile 100 ml'ye tamamlandı.
3. 0,72 g CaCl₂ tartıldı, toz karışım 50 ml dH₂O'da çözdürüldü.
4. 1,23 g MgSO₄·7H₂O tartıldı. Toz karışım 50 ml dH₂O'da çözdürüldü.
5. 0,35 g NaHCO₃ tartıldı. Toz karışım 10 ml dH₂O'da çözdürüldü.

- **Hank's Premiks**

Hazırlanan HBSS solüsyon 1'den 10 ml, 2, 3, 4'ten 1'er ml alınarak 86 ml dH₂O ile karıştırıldı. Hank's premiksten 9,9 ml ve hazırlanan 5. solüsyondan 0,1 ml alınarak 10 ml HBSS hazırlandı. Kabin içerisinde 0,22 µm filtre ile filtrelendi.

- **EDTA (500 mM)**

18,6 g EDTA dihidrat tartıldı. 100 ml dH₂O içinde çözdürüldü ve pH 8.0'a ayarlandı.

- **%50 sükröz**

125 gr sükröz tartıldı. 245 ml HBS, 5 ml 500 mM EDTA içerisinde çözdürüldü. Kabin içinde 0,22 µm'lik filtre ile filtrelendi.

- **%10 sükröz**

10 ml %50 sükröz üzerine 40 ml HBSS eklenerek hazırlandı.

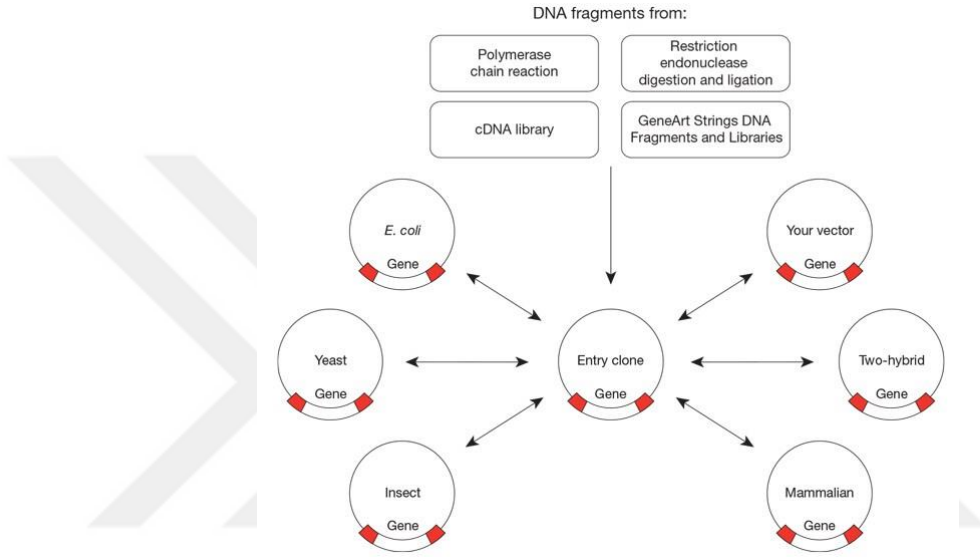
- **LB Agar:** 37 gr/L (L2897 Sigma) dH₂O ile 1 L'ye tamamlandı.

- **LB Broth:** 20 gr/L (L3022 Sigma) Systec marka otoklavda dH₂O ile 1 L'ye tamamlanarak otoklavlandı. Selektif besi yeri için ampisilin eklemesi yapıldı. Plazmid üretim aşaması için Qiagen Midi Prep (12125) izolasyonu gerçekleştirildi.

- **Ampisilin (100 mg/ml):** 1 gr ampisilin (Sigma A8351-5g) tartıldı. 10 ml enjeksiyonluk suda çözdürüldü ve 0,22 µm filtreden geçirildi. 1 ml miktarlarda alikotlandıktan sonra -20°C'de muhafaza edildi.

3.7.1. Vektör üretimi için gerekli plazmidlerin izolasyonu

Vektörlerin üretiminde, ViraPower HiPerform Promotorsuz Gateway Ekspresyon Sistemi (Invitrogen) kullanıldı (Şekil 3.1).

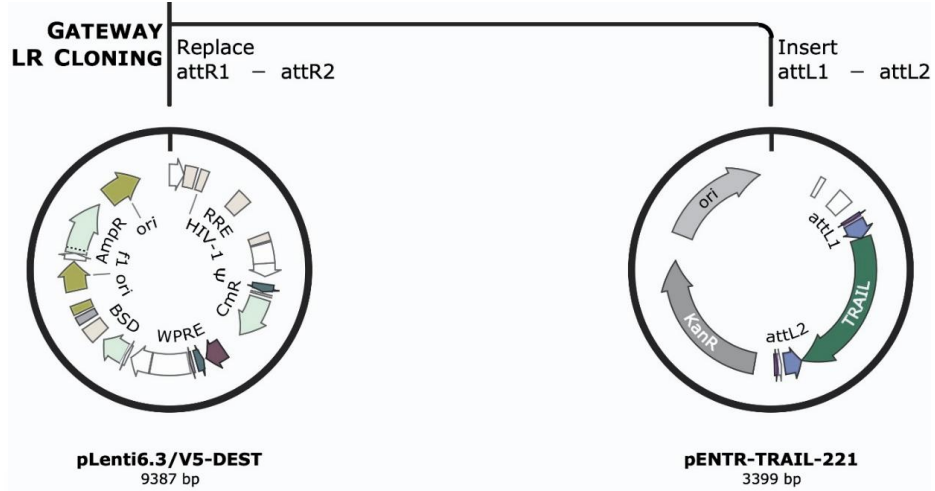


Şekil 3.1. GATEWAY teknolojisi. Bölgeye özgü kombinasyon yoluyla genlerin çoklu vektörlere girip çıkmasını kolaylaştıran bir yöntemdir. Bir gen, bir giriş vektörüne klonlandıktan sonra, DNA fragmanının aynı anda bir veya daha fazla hedef vektöre taşınabilmesini sağlar (invitrogen.com/gateway).

Çeşitli aşamalarda kullanılan lentiviral vektörlerin (TRAIL, RFP ve LacZ) üretimleri, burada tarif edilen TRAIL vektörünün üretimine benzer şekilde, ilgili genleri kodlayan plazmidlerle [LV-RFP (Plasmid 26001), LV-LacZ plazmidi (Plasmid 12108)] gerçekleştirildi. E.coli’de TNFSF10 (TRAIL) açık okuma bölgesi (ORF; open reading frame) kodlayan PENTR221 plazmidi, TRAIL kodlayan lentiviral vektörleri oluşturmak için kullanıldı. TRAIL klonunu üreten bakteri, kanamisin sülfat içeren agarlara ekildi. Ertesi gün elde edilen tek koloniler, LB Broth sıvı besiyerinde küçük bir kültür içinde 3 ml’de üretime bırakıldı. Bir sonraki gün, daha fazla plazmid üretmek için mini kültürden midi kültüre (100 ml) geçildi. Mini inkübatörde 37°C’de 180 rpm’de 8-10 st inkübasyon gerçekleştirilirken, midi kültür için mini üretimden 1 ml alınarak 12-16 st üretim için çalkalamalı inkübatörde 37°C’de 180 rpm’de inkübasyon sağlandı.

Sonraki gün, bu kültürlerden midi-prep olarak bilinen plazmid izolasyonu yapıldı ve DNA miktarı ve saflık ölçümleri, Hellma marka küvetlerde (8,5-10 mm) 5 µl plazmid DNA'sı, 495 µl Tris-EDTA ile dilüe edilerek, Thermo Multiskan Spectrum cihazında yapıldı. Enzim kesimi ile, midi kültürde üreyen ve izole edilen plazmidler içinde taşınan klonun uygun diziyi taşıyıp taşımadığı doğrulandı. Üretimi gerçekleştirilen TRAIL plazmidinin, Fast Digest enzim, Afl II (Thermo Scientific) ile kesimi sonrası, %0,8 agaroz jelde yürütülerek doğrulaması yapıldı. Beklenen kesim ürünleri 2532 baz çifti (bç) ve 867 bç idi (Şekil 4.11).

Çoğaltılan plazmidin doğru diziyi taşıdığından emin olunduktan sonra LR rekombinasyon reaksiyonu oluşturuldu. Bu reaksiyonun amacı, giriş vektörünün (plazmid) içinde bulunan TRAIL açık okuma bölgesinin destinasyon vektörüne aktarılarak ekspresyon vektörünün oluşturulmasıdır (Şekil 3.2). Reaksiyonun gerçekleştirilmesi için Invitrogen tarafından geliştirilen Gateway HiPerform Ekspresyon Sistemi kullanıldı. Bu sistem, bakteriyofaj lambda'nın bölgeye özel rekombinasyon özelliklerinden yararlanır. Bu sistemde, TRAIL dizisini taşıyan pENTR221 plazmidindeki *attL1/attL2* dizileri ile destinasyon vektörü üzerindeki *attR1/attR2* bölgeleri arasında homolog rekombinasyon gerçekleşir; bu sayede ekspresyon vektörü oluşturulur. Kit içinde sağlanan pENTR-Gus giriş vektörü, pozitif kontrol olarak kullanıldı. Bu aşamaların tamamlanmasının ardından, LR rekombinasyon ürünlerinin, yoğun tekrar dizisi içeren fargmentlerle çalışmak için önerilen Stbl3 E.coli hücrelerine transferi gerçekleştirildi. pLenti6.3/TRAIL ekspresyonu sağlayan plazmidler çoğaltıldı. Transfeksiyon için, 42°C'lik su banyosunda 45 saniyelik bir şok uygulandıktan sonra buz üzerinde inkübasyon yapıldı. Ardından, 37°C ve 225 rpm'de 1 st inkübasyon gerçekleştirildi. Daha sonra, örnekler ampisilin içeren LB-agarlara ekildi.



Şekil 3.2. Gateway LxR rekombinasyon reaksiyonu. Bu reaksiyon, LR Rekombinaz II enzim karışımı yardımıyla, destinasyon vektörü (pLenti6.3/V5-Dest) üzerindeki attR1/attR2 bölgeleri ve giriş plazmidindeki attL1/attL2 bölgeleri arasında parça değişimi gerçekleştirir. Örneğin TRAIL kodlayan vektörlerin üretim sürecinde, klonaz enzim karışımının varlığında TRAIL giriş klonuyla destinasyon vektörünün LxR rekombinasyon reaksiyonu sonucu TRAIL transgenini taşıyan ekspresyon vektörü oluşur.

Destinasyon vektörü, tipik olarak kloramfenikol direnci ve ccdB genlerini içerir. Bu diziler, LR rekombinasyon reaksiyonu sırasında vektörden çıkar ve bu bölgeye TRAIL açık okuma dizisi gelir. TRAIL'ı almayan vektörleri taşıyan bakteriler, hazırlanan agar ortamında ccdB geni nedeniyle yaşayamaz. Ampisilin dirençli genler, pENTR plazmitleri tarafından kodlanmaz; dolayısıyla bu plazmitleri taşıyan bakteriler, rekombinasyon ürünü olan plazmitlere sahip bakterilerdir. Agarda gece boyu inkübasyondan sonra 24 koloni seçildi ve seçilen 24 koloni için LB Broth besi yerinde mini kültürler kuruldu. Ertesi gün üreyen bakteriler midi kültürlerle alındı ve uygun şekilde çoğaldıktan sonra midi-prep uygulanarak plazmid izolasyonu gerçekleştirildi. Elde edilen plazmidlerin saflığını ve konsantrasyonlarını belirlemek için spektrofotometre kullanıldı. Plazmidlerde Xho1 ve Af1II restriksiyon enzimleri ile kesim yapıldı. Hedeflenen bantları taşıyan 9 koloni seçilerek agara ekildi. Kültür hacmi 250 ml'ye çıkarıldı. Konsantrasyon ve saflık açısından en uygun olan 4 klon, sekans reaksiyonu ve PCR ile doğrulandı. Qiagen TaqCore kiti, PureLink Quick PCR saflaştırma kiti ve Big Dye Terminator (v3.1 Cycle Sequencing Kit) ile sekans reaksiyonu kurularak, sekansla doğrulanacak bölge saflaştırıldı. Virüs yapımında kullanılan ve lentivirüs paketlenmesi için ilgili transgeni kodlayan plazmid ve diğer gerekli plazmidler şunlardır:

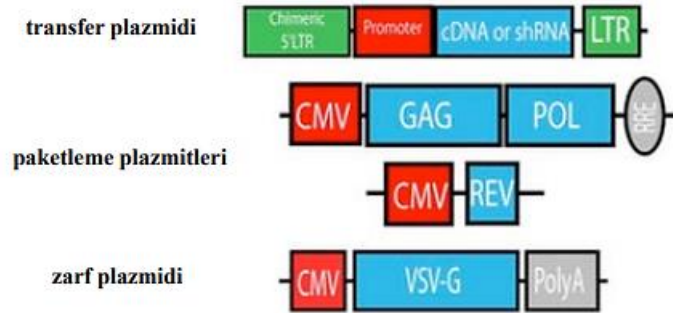
-Lentiviruse ait “gag” ve “pol” genlerini kodlayan pMDLg/pRRE: 8895 bç uzunluğundadır.

- Lentivirüse ait “rev” genini kodlayan pRSV/Rev: 4174 bç uzunluğundadır.

- VSV-G genini kodlayan pMD2.G: 5824 bç uzunluğundadır (VSV-G, Vesicular Stomatitis Virüs’e ait zarf proteinidir, virüsün tropizmini artırır, ve pseudotiplendirilmiş virüsün stabilitesini sağlar).

Transgenin paketlenebilmesi ve viral vektör oluşumu için, pLenti/TRAIL, pMDLg/pRRE, pRSV/Rev, ve pMD2.G plazmidleri, paketleyici hücrelere aktarıldı (Şekil 3.3).

TRAIL genini kodlayan ekspresyon plazmidini, oluşturulduktan sonra, yüksek miktarlarda üretilen paketleme plazmidleriyle birlikte, TRAIL eksprese eden lentiviral vektörlerin oluşturulması için kullanıldı. LacZ ve RFP kodlayan plazmidler de aynı şekilde üretildi.



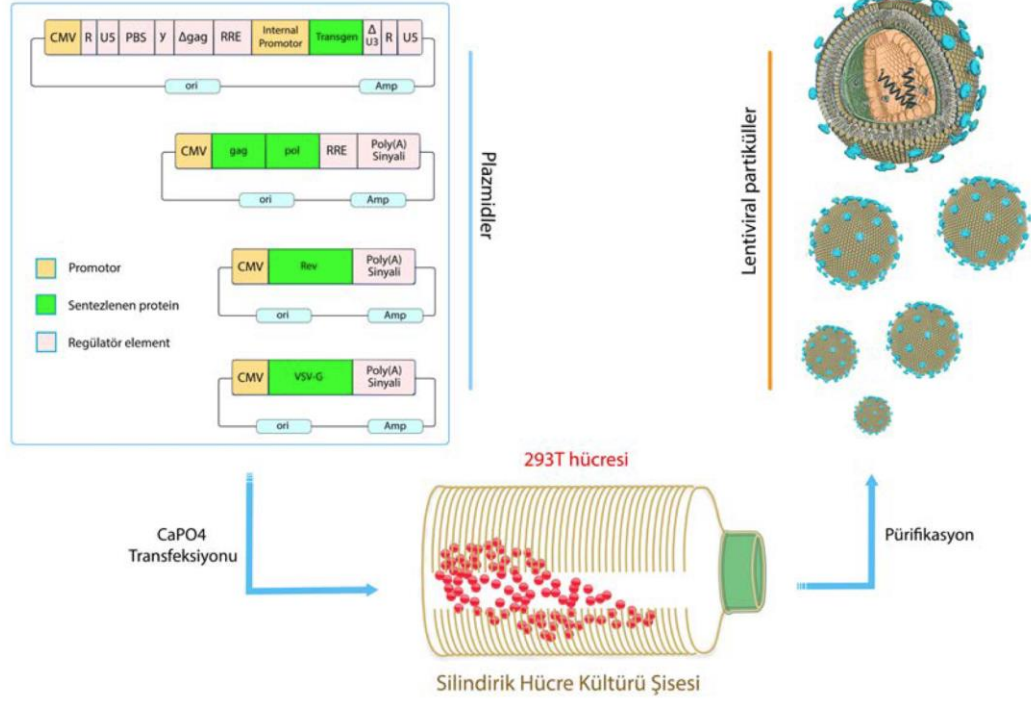
Şekil 3.3. Üçüncü nesil lentiviral vektörlerin hazırlanmasında kullanılan plazmidler. Paketleme işlemini iki farklı plazmid gerçekleştirir (Rev ve Gag-Pol). Zarf plazmid genellikle VSV-G kodlar (www.addgene.org).

3.7.2. Lentiviral vektör üretim aşamaları

Lentiviral vektörlerin üretim protokolü, Şekil 3.4'te şematize edilmiştir. Bunun için, 4 adet 15 cm kültür kabında bulunan 293T hücreleri, tripsinize edilerek döner şişelere (roller bottle) (Cell Master™ roller bottles, 681 062) aktarıldı. Kültür hacmi toplam 200 ml olacak şekilde 293T-DMEM ile tamamlandı. 24 st 0.3 rpm'de kültüre bırakıldı; hücrelerin yüzeye tutunması sağlandıktan sonra dönme hızı 1 rpm'e yükseltildi. 1 rpm hızda HERAcell 240i CO₂ inkübatörde (Thermo Scientific) 12-16 st inkübasyon gerçekleştirildi. Hücreler döner şişelere ekildikten 1,5 gün sonra (24 st 0.3 rpm, 12-16 st 1 rpm) transfeksiyon için uygun oranda çoğaldı. Süre sonunda besiyeri aspiratör yardımı ile çekildi. Transfeksiyon için döner şişe başına 180 ml IMDM kullanıldı. IMDM besiyerine son konsantrasyon 25 µM olacak şekilde Chloroquine eklendi. Döner şişeler inkübatöre koyuldu ve transfeksiyon için karışım hazırlanmasına geçildi. IMDM eklenen hücreler plazmid karışımı hazırlanana kadar 37°C inkübatörde 1 rpm hızda döndürülmeye devam edildi, daha sonra 50 ml'lik steril bir falkona alındı. Plazmid izolasyonu sonucunda elde edilen plazmidlerin konsantrasyonları göz önüne alınarak gereken miktarlarda plazmid -20°C'den çıkarıldı. Örnek hesaplama Tablo 3.2'de verilmiştir.

Tablo 3.2. Virus üretiminde kullanılan plazmid miktarlarına yönelik örnek hesaplamalar.

Plazmid adı	Gereken miktar (µg)	Konsantrasyon (İzolasyon sonucunda) µg/µl	Kullanılacak hacim (µl)
Transfer Vektörü (TRAIL)	270	3.5	78
rev	68	4	17
Gag / pol	176	3.40	52
VSV G	95	5	19

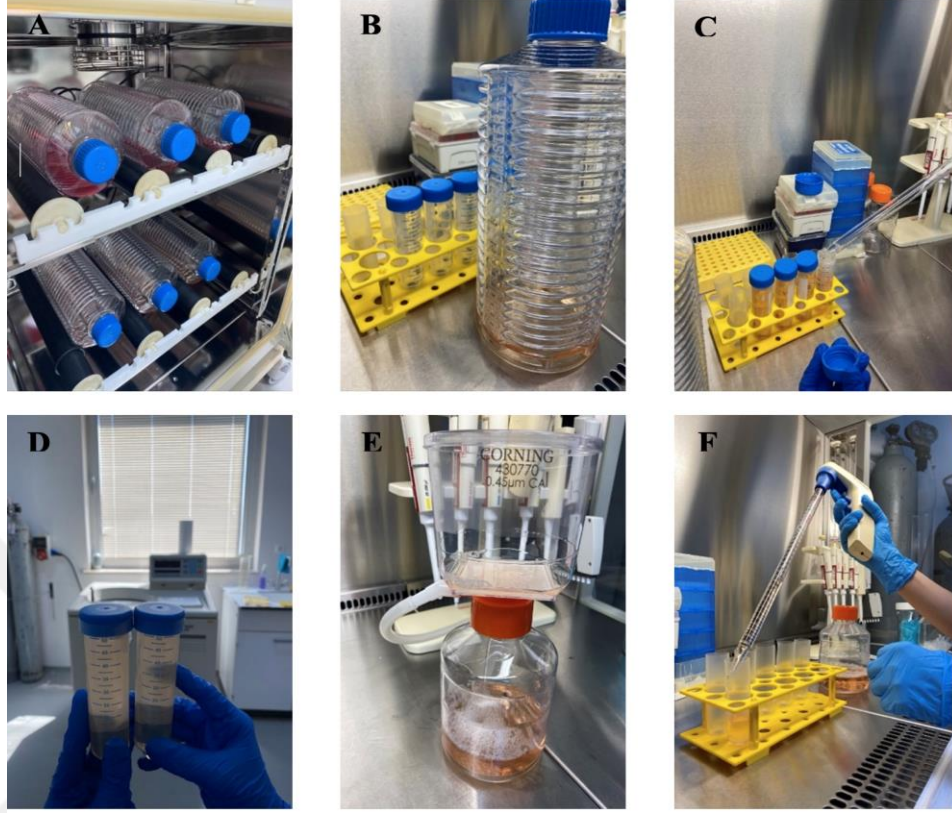


Şekil 3.4. Üçüncü nesil lentiviral vektörlerin (LVler) üretimi. LVlerin CaPO₄ transfeksiyon yöntemi kullanılarak tırtıklı yüzeyli döner hücre kültürü şişelerinde üretimi şematik olarak gösterilmiştir (Olgun, Tasyurek et al. 2019).

Transfeksiyonun başarılı bir şekilde gerçekleşmesi, viral üretimde esansiyeldir. Bu süreci etkileyen önemli bir kriter, transfeksiyon karışımının hazırlanış şeklidir. Transfeksiyon karışımının hazırlanmasında, vorteks veya kabarcık (bubble) oluşturma tekniği kullanılabilir. Çalışmalarımızda, kabarcık oluşturma tekniğinin daha iyi sonuç verdiğini gözledik ve mevcut çalışmamızda da bu tekniği kullandık (Olgun, Tasyurek et al. 2018). Bunun için, buz üzerinde çözüldükten sonra gereken miktarlarda plazmid sırasıyla alındı ve 50 ml'lik falkon içinde karıştırıldı. Hacim 0.1XTE: dH₂O solüsyonu ile 10,500 µl'ye tamamlandı. Üzerine 1,5 ml 2M CaCl₂ eklendi. Böylece toplam 12 ml DNA+CaCl₂ karışımı elde edildi. Farklı bir falkona 12 ml 2XHBS eklendi. 2XHBS şişesinin kapağı açık halde iken içine 5 ml'lik disposable pipet yerleştirildi. DNA-CaCl₂ karışımını içeren falkonun kapağı açık olarak yanına yerleştirildi. 1000 µl'lik mikropipet alınarak HBS'nin içindeki 5 ml'lik pipete otomatik pipetboy takıldı ve hava verilerek kabarcık oluşumu sağlandı. Bu sırada 1000 µl'lik mikropipetle DNA+CaCl₂ karışımından çekilerek kabarcıkların üzerine orta hızda damla damla eklendi. Tüm solüsyon bitene kadar kabarcık yapma işlemine hiç ara verilmeden iki solüsyonun karıştırılması sağlandı.

İşlem bittikten sonra 5 dk süreyle oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon süresinin sonunda, falkonda beklenen hafif bulanıklık gözlemlendi. Süre sonunda IMDM eklenmiş döner şişe kabine alındı. DNA karışımına birkaç defa pipetaj yapılarak tüm solüsyon çekildi ve döner şişenin içine damla damla eklendi. Döner şişe tekrar inkübatöre kondu ve 0.3 rpm hızda 8 st süreyle döndürülmeye devam edildi.

Transfeksiyondan 8 st sonra besiyeri çekildi. 200 ml, 37°C'ye ısıtılmış OPTI-MEM (%10 FBS, %1 Pen/Strep) eklendi ve döner şişe 1 rpm hızda döndürülmeye devam edildi. Transfeksiyondan 3 gün sonra toplama (harvest) yapıldı. 6 adet ultrasantrifüj tüpü UV altında 2 st bekletildi. Toplanan tüm ürünler önce 2000 x g'de 15 dk santrifüj edildi. Süre sonunda dökelti 0,45 µm porlu vakum filtreden geçirildi. UV ile sterilize edilmiş ultrasantrifüj tüplerinden (Beckman Coulter, 326823) her tüpe tam 30 ml dökelti eklendi. Dip kısma %10 sükröz solüsyonu tabaka oluşturacak şekilde eklendi. Beckman SW28 rotoru kullanılarak, L-90 K ultrasantrifüj cihazında (Beckman Coulter Optima) 25.000 rpm'de, 2 st 30 dk, +4°C'de ultrasantrifüje tabi tutuldu (Şekil 3.5). Ultrasantrifüj bittikten sonra tüplerin üzerindeki sıvı boşaltıldı. Bir süre ters olarak steril bir peçetenin üzerinde bekletildi. Kalan bütün dökeltilerin akması sağlandı. Temiz steril ince bir peçete ile tüpün iç cidarları dibe değmeden kurulandı. Her bir tüpe 100 µl steril Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) konularak, tüplerin ağızları parafilmlendi. +4°C'de gece boyu yeniden suspanse olması sağlandı. Ertesi sabah, her bir tüp 40 kez pipetaj yapılarak virüsler toplandı ve birleştirildi. Pipetaj sırasında tüpler 50'şer µl HBSS ile yıkandı. Toplanan virüsler 80 µl hacimde cryo tüplere alikotlandıktan sonra, virüsleri içeren kalan solüsyon bir ependorf tüpe aktarıldı. Bu ependorf, ertesi gün gerçekleştirilecek titrasyon deneyi için saklandı. Bütün cyro tüpler ve ependorf, -80°C'ye kaldırıldı. Titrasyondan önce en az bir gün -80°C'de beklemesi gerekmektedir.



Şekil 3.5. Lentiviral vektör üretim aşamaları-1. A) 293T hücreleri 24 st boyunca 0.3 rpm'de döndürülerek şişelerin iç yüzeyine tutunmaları sağlandı. B, C) Besiyerinin IMDM besiyeri ile değiştirilme ve hücrelerin falkon tüplerde toplanma aşamaları. D, E) Toplanan hücrelerin 150 g'de santrifüjasyonu sonrası görüntü ve 0,45 µm filtre ile filtreleme aşaması. F) Filtrelenen 25 ml dökeltinin ultrasantrifüj tüplerine aktarımı.



Şekil 3.6. Lentiviral vektör üretim aşamaları-2. G: Sükröz cushion (sukroz yastığı) yöntemini uygulamak amacıyla HBSS içinde kullanılmadan hemen önce hazırlanan sükröz solusyonlarının viral dökelti altında bir katman oluşturacak şekilde tüplerin dip kısmına yavaşça eklenmesi. H, I) Hazırlanan vektör ve sükröz karışımı, 25.000 rpm’de 2,5 st ultrasantrifüje tabi tutuldu. J) Beckman Coulter Optima L-90 K ultrasantrifüj cihazı, K) Ultrasantrifüj sonrası viral vektörü bulunduran dökelti, L) Dökeltinin çözülmesi için tüplere 100 µl HBSS eklendi ve tüplerin ağzı parafilmlemlendi, çöktellerin süspanse olması amacıyla 1 gece +4°C’de bekletildi.

3.8. Fonksiyonel Viral Vektör Miktarlarının Belirlenmesi ve Viral Titrasyon ve Uygulama:

Üretilen viral vektörlerin fonksiyonel konsantrasyonlarının belirlenmesi, Real-Time PCR yöntemiyle, Quantitect SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Cat No: 204143) kullanılarak ABI 7500 Fast Real-Time PCR cihazında gerçekleştirildi.

Viral genomun miktar tayini için kullanılan Woodchuck Post-transkripsiyonel Regülatör Element (WPRE) primerlerinin dizileri:

Forward primer dizisi: 5’-CCGTTGTCAGGCAACGTG-3’;

Reverse primer dizisi: 5’-AGCTGACAGGTGGTGGCAAT-3’.

İnternal kontrol olarak kullanılan albumin primerlerinin dizileri:

Forward primer dizisi: 5'-GCTGTCATCTCTTGTGGGCTGT-3';

Reverse primer dizisi: 5'-ACTCATGGGAGCTGCTGGTTC-3'.

Örnek olarak, ürettiğimiz lentiviral vektörlere yönelik belirlediğimiz bir konsantrasyon, $3,7 \times 10^8$ TU'dur (Transducing Units).

HT1080 hücreleri LV-TRAIL ile transdükte edilerek viral titrasyon gerçekleştirildi. Bunun için hücreler %10 serumlu besiyerinde kültüre edildikten sonra gece boyu %2 serumlu besiyerinde tutularak senkronize edildi. Ertesi gün besiyeri transdüksiyon solüsyonu ile değiştirildi. Transdüksiyon solüsyonu, %2 serumlu besiyerine farklı konsantrasyonlarda LV-TRAIL (0, 2, 4, 8, 10 μ l/ml) eklenerek hazırlandı. Hücrelere uygulanan artan miktarlarda vektöre karşılık gelen viral MOI değerleri 0, 125, 250, 500, 1250, 2500 MOI olarak hesaplandı. MOI (Multiplicity of infection), hücre başına düşen enfeksiyöz virüs partikülünü ifade eder.

3.9. Çözülebilir TRAIL Molekülünün (sTRAIL) Hazırlanışı ve Uygulanması

Materyal:

sTRAIL (20 μ g/ml):

Liyofilize rekombinant çözülebilir insan sTRAIL proteini (R&D, Katalog no:375-TL), 500 μ l %0,1 BSA içinde çözüldü.

%0,1 BSA: 10 mg BSA (Bovine Serum Albümin, Sigma) 10 ml PBS içinde çözüldü ve steril kabinde 0,22 μ m filtreden geçirildi.

Metod:

sTRAIL uygulanacak hücreler, %2 oranında FBS içeren besiyerinde bir gece boyunca tutularak senkronize edildi. Ertesi gün besiyeri taze besiyeri ile değiştirildi. PBS ile yıkandıktan sonra farklı sTRAIL dozları (0, 0.1, 1, 10, 100 ng/ml) uygulandı ve pozitif kontrol olarak %10 ya da %15 serumlu besiyeri seçildi. İnkübatörde inkübasyona bırakıldı. sTRAIL, hayvanlara intraperitonel olarak 10 ng/ μ l dozda uygulandı.

3.10. MTT [(Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide)] Testi:

MTT (AppliChem, A2231) hassas terazide 5 mg tartılarak 10 ml 1xPBS'te 15ml'lik falkon tüpte hazırlandı. Kabinde 0,22 µm filtreleme sonrası MTT solüsyonunu içeren falkon alüminyum folyo ile sarıldı. Solüsyon karanlıkta +4°C'de muhafaza edildi.

MTT testi, hücre proliferasyonu ve canlılığının değerlendirilmesi için kullanılan bir yöntemdir. Çoğalan hücreler metabolik olarak çoğalmayan hücrelerden farklı ve daha fazla aktivite gösterir. MTT testinde, sarı tetrazolyum tuzu, metabolik olarak aktif hücreler tarafından mor renkli formazan kristallerine indirgenir. Oluşan formazanın çözünmesini sağlamak için ortama DMSO eklendi ve çalkalamalı karıştırıcıda 5 dk karanlıkta tutuldu. 540 nm dalga boyunda spektrofotometrede okumalar gerçekleştirildi.

3.11. Glukoz İndüklü İnsülin Salınım Testi (GSIS)

Materyal:

NIT-1 hücreleri (American Type Culture Collection (ATCC), CRL-2055). 10 haftalık dişi farenin Langerhans adacıklarından izole edilmiş olan fare insulinoma hücreleridir.

F12-K Ham's Besiyeri: NIT-1 hücrelerinin kültürü için toz besiyeri (Sigma, N3520) bir beherde 900 ml distile suda içine karıştırıcı (balık) atılarak çözdürüldü. 2,5 g NaHCO₃ (Sigma S5761) eklendi ve pH'sı 7.2 olacak şekilde ayarlandı. Son hacim 1 L'ye tamamlandı. 0,22 µm filtre ile filtrelendi. Besiyerine %10 FBS (Fetal Bovine Serum, Biochrom AG; S0115) eklendi ve DMEM'e konsantrasyonu %1 oranında 10 ml Penisilin-Streptomisin-Amfoterisin solüsyonu (Millipore, 516104) eklendi.

KRB (Krebs Ringer Buffer) tamponu: Tüm malzemeler NaCl 125 mM, KCl 4.74 mM, CaCl₂ 1 mM, KH₂PO₄ 1.2 mM, MgSO₄ 1.2 mM, NaHCO₃ 5 mM, ve Hepes 25 mM olacak şekilde tartılarak 1 L'ye tamamlandı ve pH 7.4'e ayarlandı. Miktarlar 10X KRB tamponu içindir. Tampon deney zamanına kadar +4°C'de saklandı. GSIS için kullanılacağı zaman 10 kat distile su ile dilüe edildi (Tablo 3.4).

D-glukoz: 2,5 M, %45 D-glucose (Sigma G8769) hazırlandı.

5% FFA (Free fatty acid) - BSA: 5 gr FFA-BSA tartıldı, 100 ml PBS içinde çözdürüldü. Kabin içerisinde 0,22 µm filtreden geçirildi. Deney zamanına kadar +4°C’de muhafaza edildi.

PBS: Kabin içerisinde 0,22 µm filtreden geçirildi. Deney zamanına kadar +4°C’de muhafaza edildi.

Pre-inkübasyon tamponu: Düşük doz glukoz (2.8 mM), 0.1% FFA-BSA KRB tampon içinde çözdürüldü.

Stimüle edici tampon: Yüksek doz glukoz (33 mM), 0.1% FFA-BSA KRB tampon içinde çözdürüldü.

Asit Etanol: 750 µl 12N HCl ve 100% Etanol 35 ml, 14,25 ml distile su ile karıştırılarak oluşturuldu.

Metod:

TRAIL uygulanmış NIT-1 hücreleri, glukoz uygulamaları sonrası insülin ELISA testine tabi tutuldu. Bunun için, hücreler öncelikle 96 kuyucuklu petrilere her bir kuyuda 1×10^5 hücre olacak şekilde ekildi. Ertesi gün NIT-1 hücreleri, polibren varlığında 5, 25 ve 100 MOI konsantrasyonlarda LV-TRAIL ve kontrol olarak 100 MOI LentiLacZ ile transdükte edildi. GSIS testi için, lentivirus ile transdüksiyona uğratılmış NIT-1 hücreleri önce PBS ile yıkandı ve sonra glukozsuz KRB’de 1 st inkübe edildi. Süre sonunda dökelti toplandı ve -20°C’de saklandı. Tüm kuyular 200 µl, 2.8 mM glukoz KRB tamponunda 1 st inkübatörde preinkübasyona bırakıldı, süre sonunda dökelti toplandı ve -20°C’de saklandı. Hücreler glukozsuz KRB ile yıkandıktan sonra 25 mM glukoz içeren farklı KRB tamponundan 200 µl eklendi ve 1 st inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda dökelti toplandı ve deney zamanına kadar -20°C’de saklandı. Deney zamanı fare IL6 ELISA Kit (Thermo Scientific, EM2IL6) kullanılarak, kit protokolüne uygun şekilde deney gerçekleştirildi.

3.12. IL-6 ELISA Testi

Fare IL6 ELISA Kit (Thermo Scientific, EM2IL6) kullanılarak, kitin protokolüne uygun şekilde gerçekleştirildi.

3.13. Karaciğer ve Böbrek Parametrelerine İlişkin Testler

Akdeniz Üniversitesi Deney Hayvanları Ünitesi bünyesindeki Biyokimya Otoanalizörü kullanılarak (Fujifilm, NX500) karaciğer paneli (ALB, GLU, TBIL, GGT, ALP, GAPT/ALT), böbrek paneli (ALB, TP, CRE, IP, BUN, Ca) ve TCHO-P kitleri ile gerçekleştirildi. Bunun için, farelerden alınan kan serumdan ayrıştırılıp kitlerde mevcut çiplere damlatılarak analizler gerçekleştirildi.

3.14. Western Blot

Kullanılan solüsyonlar:

Lizis tamponu: Tüm malzemeler 1 litre ddH₂O'ya eklendi ve pH 7.4'e ayarlandı. Deney zamanı 50 ml solüsyona bir tablet gelecek şekilde proteaz inhibitör kokteyli (Roche) eklendi (Tablo 3.3).

Tablo 3.3. Lizis tamponunun hazırlanmasında kullanılan malzemeler

Kullanılan	Konsantrasyon
NaF	100 mM
NaCl	150 mM
Hepes	50 mM
EDTA	1 mM
MgCl ₂	1 mM
Na ₃ VO ₄	1 mM
Gliserol	% 10
Triton	% 1,2

2X Yükleme tamponu: 1 ml gliserol, 3 ml %10 SDS, 1,25 ml 1 M Tris-HCl pH 6.8, 20 µl bromfenol blue ve 0,5 ml β-merkaptotanol eklenerek hazırlandı.

Alt Jel (%8): 4,6 ml bidistile su (ddH₂O), 2,7 ml %30 Akrilamid, 2,5 ml 1.5M Tris (pH 8.8), 100 µl %10 SDS, 100 µl %10 APS ve 20 µl TEMED eklenerek hazırlandı.

Üst jel (%5): 1,4 ml ddH₂O, 330 µl %30 Akrilamid, 250 µl 1M Tris (pH 6.8), 20 µl %10 SDS, 20 µl %10 APS ve 4 µl TEMED eklenerek hazırlandı.

Elektroforez tamponu (1X): 1,5 gr Tris, 9,4 gr glisin ve 5 ml %10 SDS, ddH₂O ile 1 litreye tamamlandı ve 5 ml %10 SDS eklendi.

Protein transfer tamponu (1X): 5,8 gr Tris, 3 gr glisin ve 200 ml metanol ddH₂O ile 1 L'ye tamamlandı ve 200 ml metanol eklendi.

TBST (1X): 6,05 g Tris, 8,76 g NaCl ve 1 ml Tween-20, ddH₂O ile 1 litreye tamamlandı.

Strip off solüsyonu: 33,25 ml bidistile su, 6,25 ml 0,5M Tris-HCl, 10 ml %10 SDS karıştırıldı, 55°C'ye ısıtıldı ve 350 µl β-merkaptoetanol eklendi.

Bloklama solüsyonu: 100 ml TBST'de 5 g yağsız süt tozu çözülürülerek hazırlandı.

Metod:

Hücre lizatlarının toplanması: Soğuk PBS ile hücreler iki kere yıkandı. Üzerlerine lizis tampon eklenerek kazıyıcı aparat (scraper) kullanılarak hücreler petri zemininden toplandı. Buz üzerinde 10 dk inkübe edildi ve sonrasında 12.000 rpm, 10 dk, 4°C'de santrifüje tabi tutuldu. Dökelti steril bir tüpe alındı. Yükleme yapılmadan önce, 50 µg örnek yarı hacmi kadar 2X yükleme tamponu ile karıştırılarak 95°C'de 5 dk tutuldu.

Jelin hazırlanması ve elektroforez hazırlığı: Elektroforezden önce BioRad marka camlar temizlendi. Hazırlanan alt jel hava kabarcığı kalmayacak şekilde döküldü. Jelin paralel bir çizgide ve düz şekilde donması için üzeri %10 SDS ile kaplandı. Alt jel donduktan sonra bir peçete yardımıyla üzerindeki sıvı alındı. Üzerine üst jel yavaşça eklendi ve donmasına izin verilmeden tarak yerleştirildi. Tekrar üzerine jelin düzgün bir şekilde donmasını sağlamak amacıyla 1 ml %10 SDS eklendi. Jel donduktan sonra üzerindeki sıvı peçete yardımıyla alındı. Daha sonra jel elektroforez tankı içine yerleştirildi ve tank 1X elektroforez tamponu ile dolduruldu. Hazırlanmış örnekler sırasına göre yüklendi ve 100V'ta 15 dk, sonrasında 150V'ta 1 st kadar yürütüldü.

Örneklerin membrana transferi: Elektroforez bitince jel dikkatli bir şekilde çıkartıldı. Diğer taraftan blotlama sandviçi hazır tutuldu. 0,45 µm (Millipore) PVDF membran, metanolde 10 sn aktive edildi. Membranın bir kenarına işaret konularak, örnek sırası doğru bir şekilde jelin üzerine yerleştirildi. Tank yürütme ortamı protein transfer tampon 1X ile

dolduruldu. Güç kaynağında 2 st ve 100 V akım ayarı yapılarak örneklerin membrana geçmesi sağlandı.

Bloklama işlemi ve membranın antikorla işaretleme: Transfer bitiminde membranın kurumasına izin verilmeden 15 ml bloklama solüsyonu uygun bir kaba alındı. %5 yağsız süt bloklama solüsyonunda 10 dk çalkalandı. Membran önce 10 ml primer antikor solüsyonunda gece boyu 4°C’de çalkalamalı karıştırıcıda tutuldu. Primer antikor olarak TRAIL (ab231265), 1:1000 konsantrasyonda ve yükleme kontrolü olarak β -aktin (sc-81178) 1:1000 konsantrasyonda kullanıldı. Süre sonunda primer antikoru uzaklaştırılması için üç kez 10 dk TBST’te yıkama yapıldı. Yıkama sonrası oda sıcaklığında 1 st çalkalamalı karıştırıcıda sekonder antikorla inkübe edildi. Sekonder antikor fazlalığını almak ve membranı daha net görüntülemek amacıyla yine 3 kez yıkama işlemi yapıldı.

Membranın görüntülenmesi ve analizi: ECL (BioRad, 1705061) solüsyonundan 1 ml eklenerek karanlık odada 30 saniye inkübasyon gerçekleştirildi. ImageJ programı kullanılarak bantların yoğunluklarına göre bant analizi yapıldı.

3.15. İstatistiksel Analizler: Excel programı (Microsoft Office) kullanılarak Student’s *t* test, GraphPad Software (San Diego, CA) Prism programı One-Way Anova ve Dunnett Multiple Comparison testleri ile istatistiksel analizler yapıldı. Standart hata payları SEM (Standard Error of Mean) değerleri ile belirlendi ve 0.05 *p* değerinin altındaki değerler anlamlı olarak kabul edildi.

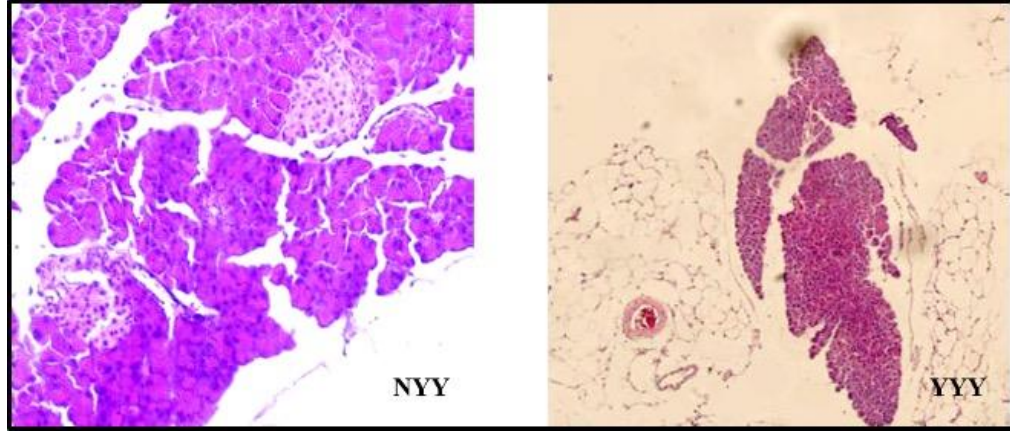
4. BULGULAR

4.1. Obez ve Tip 2 Diyabet C57BL6 Fare Modelleri Oluşturuldu.

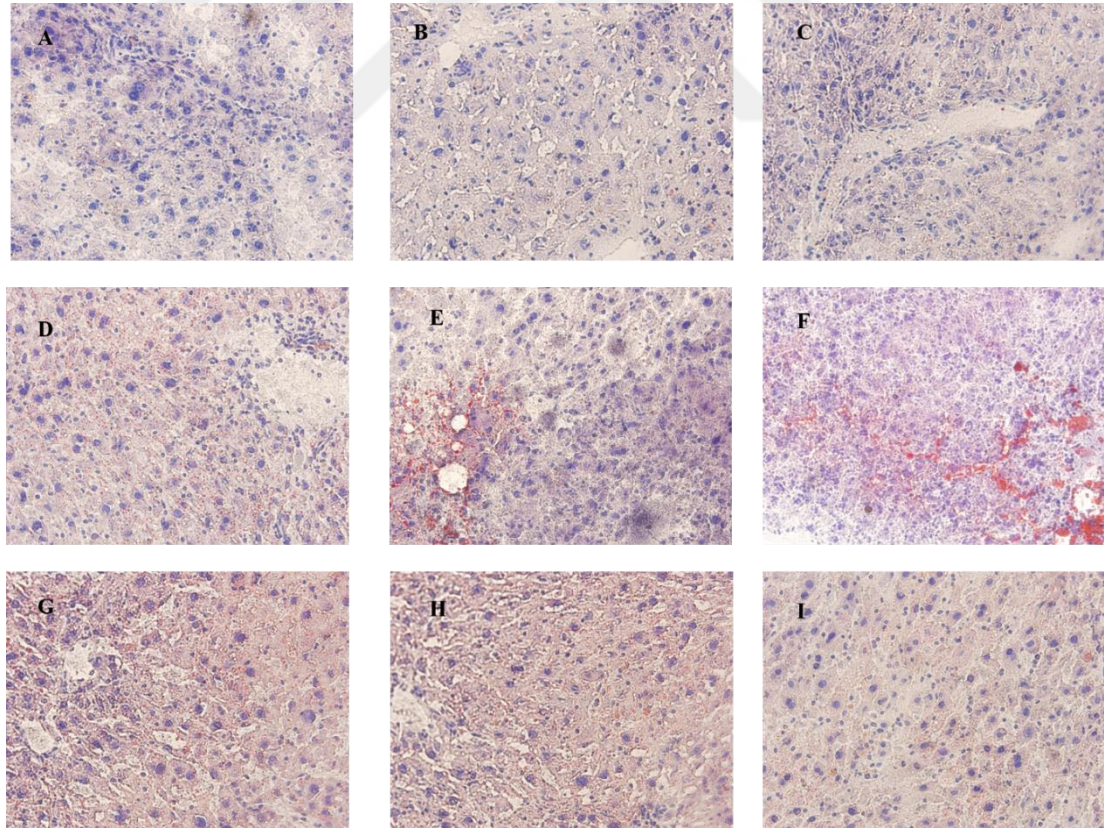
Obezite ve Tip 2 Diyabet (T2D) hayvan modellerinin oluşturulmasına y6nelik olarak literat6rde çeşitli hayvan t6rlerini kapsayan farklı uygulamalar bulunmaktadır (Hariri and Thibault 2010). Aynı hayvan t6rünün dahil edildiği çalışmalarda dahi, uygulanan y6ntemler açısından farklılık g6zlenebilmektedir. Y6ksek yağlı diyet uygulamasının, 6zellikle C57BL6 hayvan modellerinde glukoz toleransının bozulmasında ve ins6lin dirençliliğinin gelişmesinde etkili olduğu, beraberinde yağlanmanın da artması ile obez hayvan modellerinin oluşturulabildiği bilinmektedir (Hirsova ve ark., 2017) alışmamızda, biz de C57BL6 farelere, doğumlarından itibaren 8 hafta s6reyle normal yağ içerikli diyet, sonrasında en az 8 hafta s6reyle %60 yağ içerikli y6ksek yağlı diyet uyguladık ve hayvanlarda yağlanmanın abdominal b6lgede ve karaciğerde 6nemli oranda arttığını g6zledik (şekil 4.1-4.3). Y6ksek yağlı yemle beslenmeye ek olarak kısmi beta h6cre tahribatı için Streptozotosin (STZ) uygulanan hayvanlarda hastalık modelinin takibi, tokluk kan şekeri 6l6mleri, kilo kontrolleri, intraperitoneal glukoz tolerans testi (IPGTT) ve ins6lin duyarlılık testi (IDT) ile yapıldı (şekil 4.1-4.3).



şekil 4.1. Normal ve y6ksek yağlı yemle beslenen C57BL6 farelerde abdominal yağlanma g6r6nt6leri. A. Normal yağlı yemle beslenen hayvanlarda diseksiyon sonrası abdominal g6r6nt6; B. Y6ksek yağlı yemle beslenen hayvanlarda diseksiyon sonrası abdominal g6r6nt6.



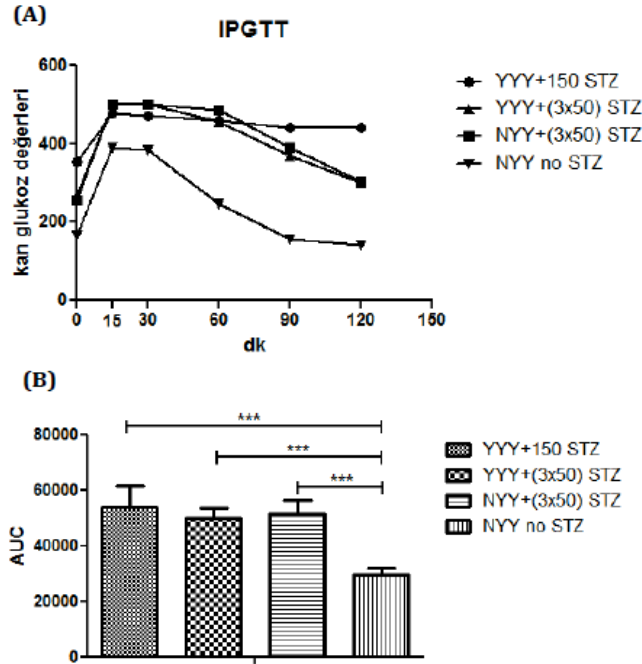
Şekil 4.2. Normal ve yüksek yağlı yemle beslenen C57BL6 farelere ait pankreas kesitleri. Solda: normal yağlı yemle (NYY) beslenen farelere ait pankreas kesit görüntüsü; sağda: yüksek yağlı yemle (YYY) beslenen farelerde pankreas kesitinde yoğun olarak gözlenen yağ dokusunu (oklar) gösteren kesit. Görüntüler 20X büyütmede kaydedildi.



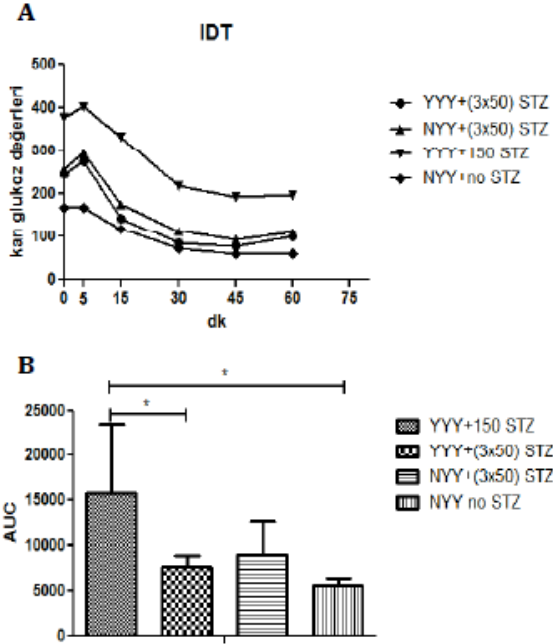
Şekil 4.3. Yüksek yağlı yemle beslenen hayvanlarda karaciğerde yağlanmanın gösterilmesi. A, B, C: Normal yağlı yemle beslenmiş hayvanların örnek karaciğer doku kesitleri; D, E, F, G, H, I: Yüksek yağlı yemle beslenmiş hayvanların örnek karaciğer doku kesitleri. Red Oil O boyama yöntemi kullanılmıştır. Görüntüler 10X büyütmede kaydedildi.

4.1.1. Obezite ve tip 2 diyabet gelişim sürecinde C57BL6 farelerde glukoz toleransının bozulduğu ve insülin direncinin geliştiği gözlemlendi.

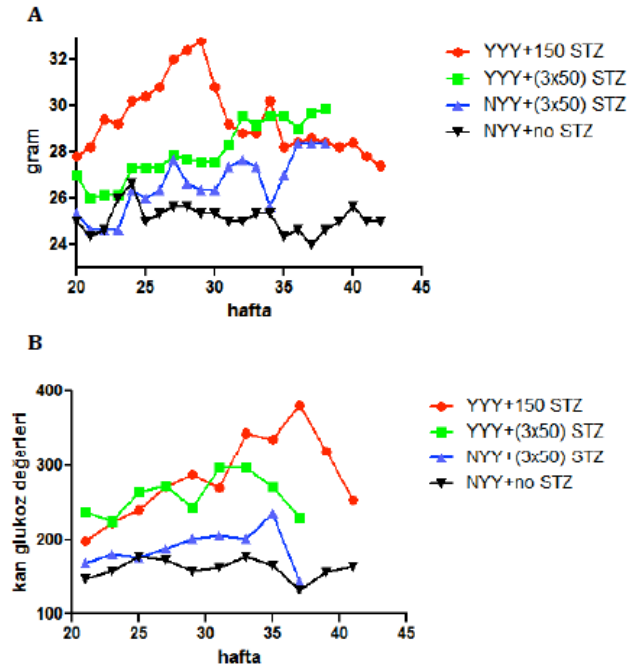
Tip 2 diyabet (T2D) hayvan modellerinin oluşturulmasında, yüksek yağlı yemle beslenmeye ek olarak 150 mg/kg tek yüksek doz STZ uygulamasının, ardarda 3 gün 50 mg/kg düşük doz STZ uygulamasına oranla daha etkin ve kalıcı olarak T2D gelişimini sağladığı gözlemlendi. Bu gruplara ait intraperitoneal glukoz tolerans testi (IPGTT) ve insülin direnci testi (IDT) sonuçları, eğri altındaki alan (area under curve: AUC) hesaplamaları ve tokluk kan şekeri ve kilo takip grafikleri aşağıda karşılaştırmalı olarak verilmiştir (Şekil 4.4-4.6). Tekli yüksek doz STZ uygulanan grupta glukoz tolerans bozukluğunun ve insülin direncinin, üçlü düşük doz STZ uygulanan gruptakine ve STZ uygulanmayan, normal yağlı yemle beslenen gruptakine oranla belirgin olarak fazla olduğu gözlemlendi (Şekil 4.4, 4.5). Bunun yanında, kilo alımlarının ve tokluk kan şekerlerinin de yine yüksek doz grubunda düşük doz grubuna göre daha yüksek seyrettiği görüldü (Şekil 4.6).



Şekil 4.4. Tüm gruplara ait glukoz tolerans test sonuçları. Tolerans test grafikleri (A) ve AUC değerleri (B) (ANOVA testi uygulanmıştır: *** P < 0,001). YYY= Yüksek Yağlı Yem, NYY= Normal Yağlı Yem



Şekil 4.5. Tüm gruplara ait insülin direnci testi sonuçları. İnsülin direnci testi grafikleri **(A)** ve AUC değerleri **(B)** (ANOVA testi uygulandı: *P < 0,05). YYY= Yüksek Yağlı Yem, NYY= Normal Yağlı Yem

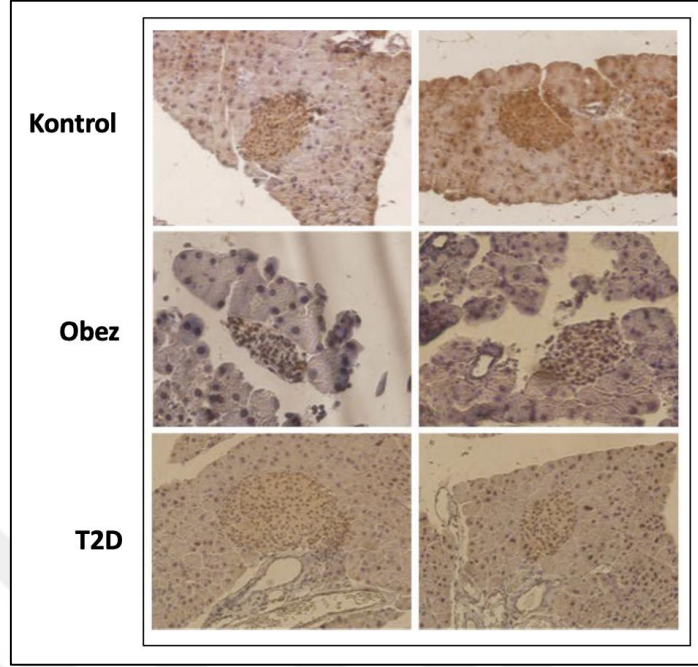


Şekil 4.6. Tüm gruplara ait kilo alımı ve tokluk kan şekeri grafikleri. Kilo alımlarının karşılaştırılması **(A)**; tokluk kan glukoz değerlerinin karşılaştırılması **(B)**. YYY= Yüksek Yağlı Yem, NYY= Normal Yağlı Yem

4.2. Obez ve T2D Hayvan Gruplarında, TRAIL Ligandı, DR5 ve DcR2 Reseptör Ekspresyonlarının Baskılandığı Görüldü.

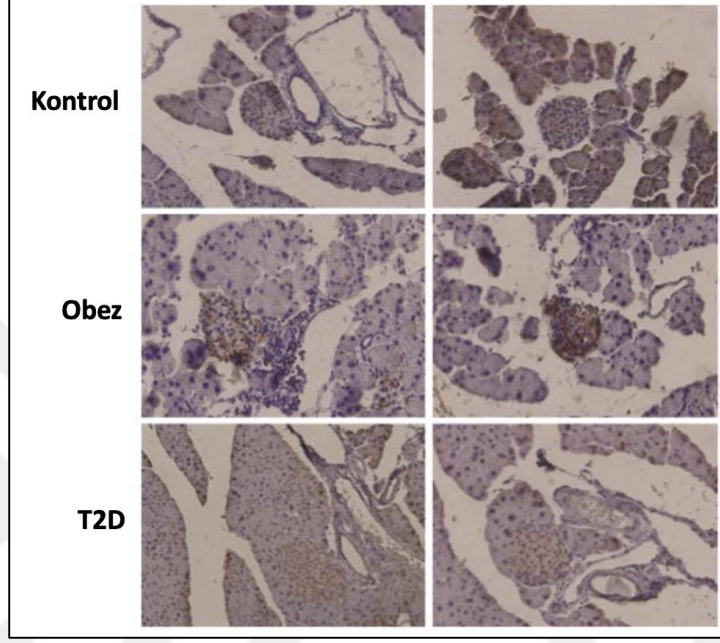
Sağlıklı kontrol, obez ve T2D hayvan gruplarında TRAIL ligand ve reseptörlerinin değişim profillerinin çıkarılması amacıyla immunohistokimyasal boyamalar gerçekleştirildi. Boyamaların değerlendirilmesinde toplam immunboyama skoru, boyama yoğunluğu (0: negatif, 1: zayıf, 2: orta, 3: güçlü) ve belirteç dağılımı (0: <%10, 1: %10-40, 2: %40-70, 3: >%70) değerlerinin toplamı ile elde edildi (Sanlioglu vd., 2007b). Ortalama boyama skorlarını temsil eden görüntüler aşağıda verilmiştir (Şekil 4.7-4.10).

İmmunohistokimyasal analiz sonuçları, TRAIL ligand ekspresyonunun normal yağlı yemle beslenen hayvan gruplarının pankreatik adacıklarında önemli seviyede, ekzokrin dokuda da orta şiddette ve yaygın olarak ifade edildiğini gösterdi (Şekil 4.7). Obez hayvan modellerinde ise, dikkat çekici olarak, TRAIL ekspresyonunun kontrol hayvanlara göre önemli oranda azaldığı gözlemlendi. Obezite gelişimi sonrası STZ uygulanarak geliştirilen T2D hayvan modellerinde, TRAIL ligandın özellikle ekzokrin dokuda kontrol hayvanlara göre baskılandığı ve adacıklarda azaldığı görüldü (Şekil 4.7, Tablo 4.1).



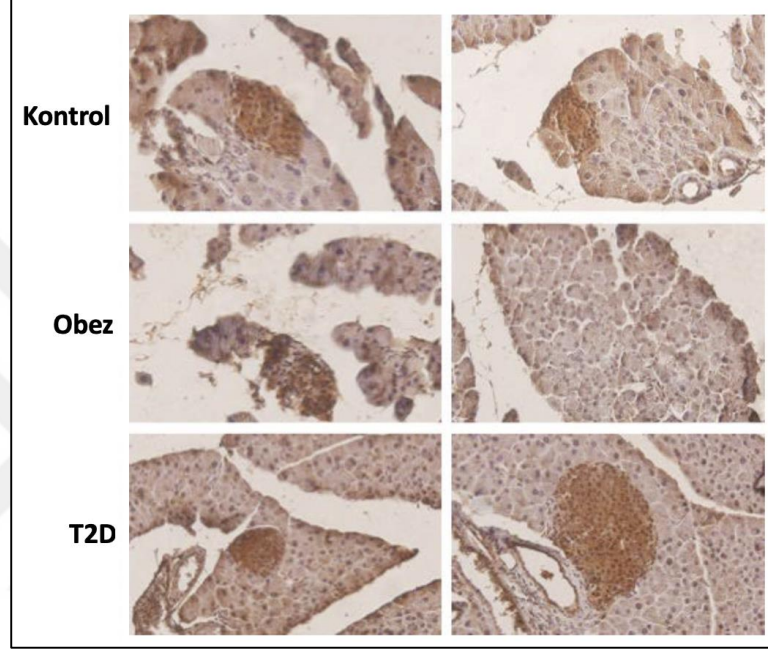
Şekil 4.7. Farklı hayvan gruplarında TRAIL ligand ekspresyonları. Normal yağlı yemle beslenen (kontrol), obez ve T2D hayvan gruplarında TRAIL ligand ekspresyon seviyelerini gösteren immunohistokimyasal boyama görüntüleri. Görüntüler 20X büyütmede kaydedildi.

Fare dokularında TRAIL'ın bağlanabildiği tek ölüm reseptörü olan DR5'in ifadesinin ise, obez (YYY) ve T2D (YYY+STZ) hayvanlarda pankreatik adacıklarda artış gösterdiği, ekzokrin dokuda ise baskılandığı görüldü (Şekil 4.8, Tablo 4.1).



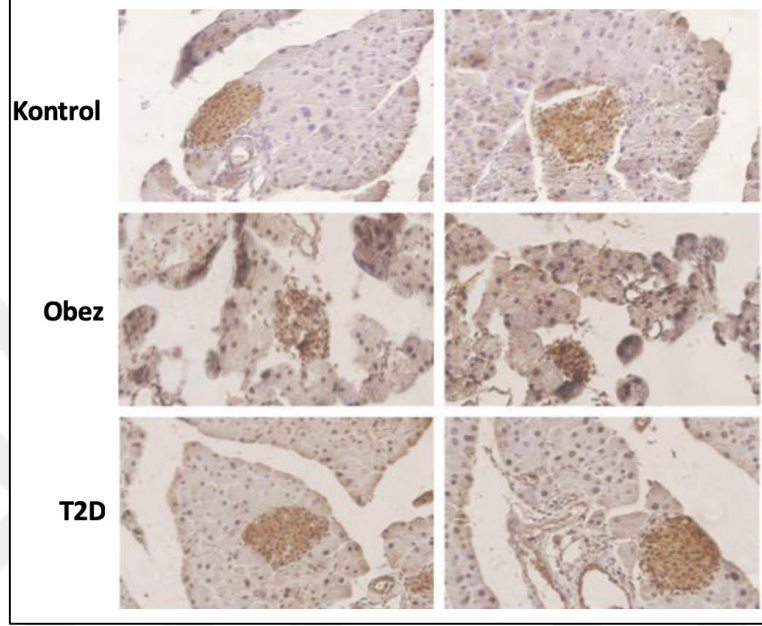
Şekil 4.8. Farklı hayvan gruplarında DR5 reseptör ekspresyonları. Normal yağlı yemle beslenen (kontrol), obez ve T2D hayvan gruplarında DR5 reseptörünün ekspresyonlarını gösteren immunohistokimyasal boyama görüntüleri. Görüntüler 20X büyütmede kaydedildi.

Fare dokularında TRAIL'ın bağlanabildiği iki yalancı reseptörden biri olan DcR1'in ekspresyonunda, obez hayvan grubunda azalma gözlemlendi; T2D hayvanlarda DcR1 ifadesinde kontrol hayvanlarla kıyaslandığında değişiklik gözlemlenmedi (Şekil 4.9, Tablo 4.1).



Şekil 4.9. Farklı hayvan gruplarında DcR1 reseptör ekspresyonları. Normal yağlı yemle beslenen (kontrol), obez ve T2D hayvan gruplarında DcR1 reseptör ekspresyonlarını gösteren immunohistokimyasal boyama görüntüleri. Görüntüler 20X büyütmede kaydedildi.

Fare dokularında TRAIL'ın bir diğer yalancı reseptörü olan DcR2 reseptörünün ekspresyon oranının da, obez ve T2D gelişim sürecinde endokrin dokuda sabit kalırken ekzokrin dokuda arttığını gözledik (Şekil 4.10, Tablo 4.1).



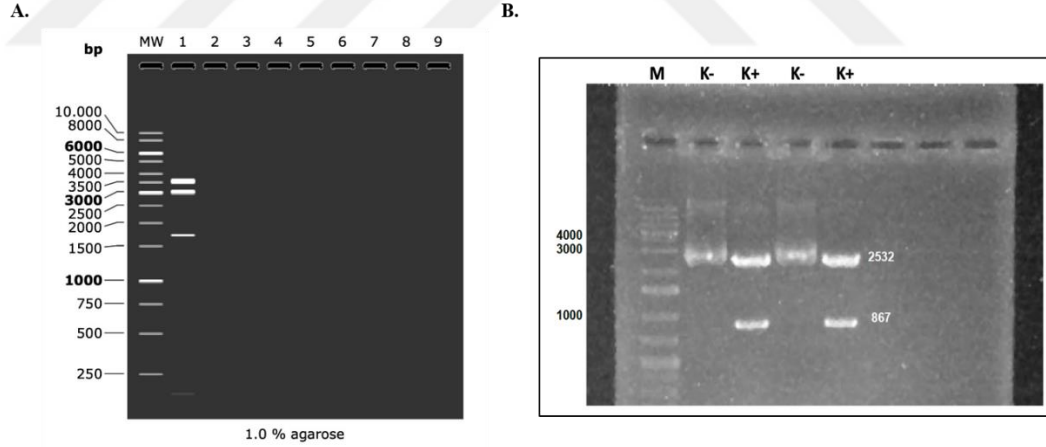
Şekil 4.10. Farklı hayvan gruplarında DcR2 reseptör ekspresyonları. Normal yağlı yemle beslenen (kontrol), obez ve T2D hayvan gruplarında DcR2 reseptör ekspresyonlarını gösteren immunohistokimyasal boyama görüntüleri. Görüntüler 20X büyütmede kaydedildi.

Tablo 4.1. TRAIL ligand ve reseptör boyamalarının analiz sonuçları

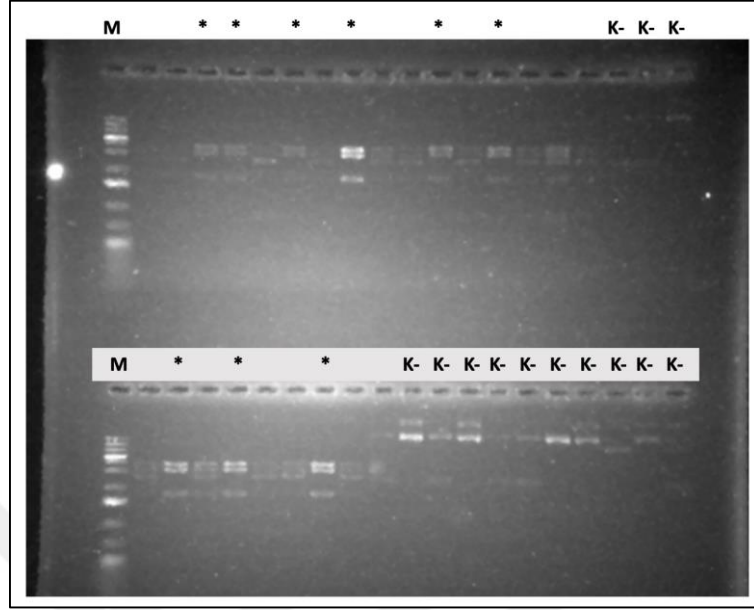
TRAIL	Adacık (Şiddet + Dağılım)	Ekzokrin Doku (Şiddet + Dağılım)
Kontrol	6	3
YYY	3	1
YYY+STZ	4	1
DR5		
Kontrol	2	2
YYY	4	0
YYY+STZ	4	1
DcR1		
Kontrol	6	4
YYY	4	4
YYY+STZ	6	4
DcR2		
Kontrol	5	1
YYY	6	4
YYY+STZ	5	3

4.3. Lentiviral Vektörler Üretildi ve Titrasyon ve Fonksiyonel Analizleri Gerçekleştirildi.

Çalışmamızda kullanılan TRAIL, ve Red Fluorescent Protein (RFP) ve Laz Z kodlayan Lentiviral vektörlerin (LV-TRAIL, LV-RFP, LV-LacZ) üretimleri, Materyal Metod bölümünde belirtildiği şekilde gerçekleştirildi ve süreç içinde doğrulama deneyleri yapıldı (Şekil 4.11-Şekil 4.13). Vektör üretimi için çoğaltılan plazmidler AflII enzim kesimi ile doğrulandı; beklenen 2532 baz çifti (bç) ve 867 bç uzunluğundaki fragmentlerin elde edildiği gözlemlendi (Şekil 4.11). Çoğaltılan plazmidlerin taşıdığı TRAIL açık okuma (open reading frame) dizisi, LR rekombinasyon reaksiyonu ile destinasyon vektörüne geçirilerek ekspresyon vektörleri oluşturuldu. Ekspresyon vektörlerini taşıyan bakteri kolonilerinin agarda gece boyu üretilmesini takiben seçilen 24 koloninin mini kültürü, ardından midi kültürü ve midi-prep aracılı izolasyonunu takiben gerçekleştirilen XhoI ve AflII enzim kesim reaksiyonlarının sonuçları Şekil 4.12’de verilmiştir.

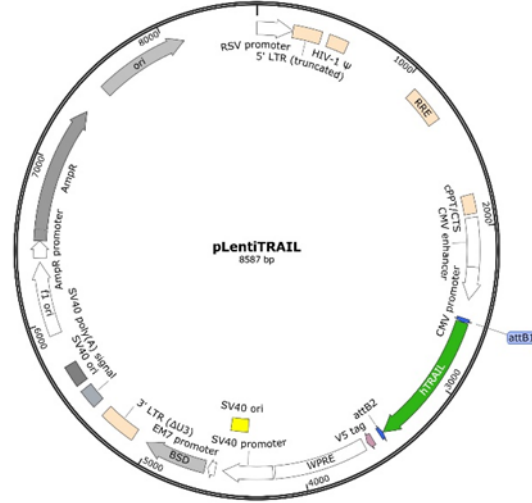


Şekil 4.11. LV üretim sürecinde, midi kültür ürünlerinin enzim kesim sonuçları. Snapgene TRAIL AflII kesim simülasyonu (A). LV üretiminde kullanılan TRAIL kodlayan plazmidlerin midi kültürü sonrası midiprep’ten elde edilen ürünlerin AflII enzim kesimi ile doğrulanma sonuçları görülmektedir (B). M: Marker (belirteç), K-: Kesim yapılmamış örnek, K+: Kesim ürünleri



Şekil 4.12. LV üretim sürecinde, LR rekombinasyon reaksiyonu sonrası doğrulama sonuçları. Ekspresyon vektörlerinin XhoI ve AflII enzim kesimleri ile doğrulamalarına ait sonuçlar verilmiştir. Beklenen bantları veren 9 koloni, (*) olarak işaretlenmiştir. M: Marker (belirteç), K-: Kesim yapılmamış örnek.

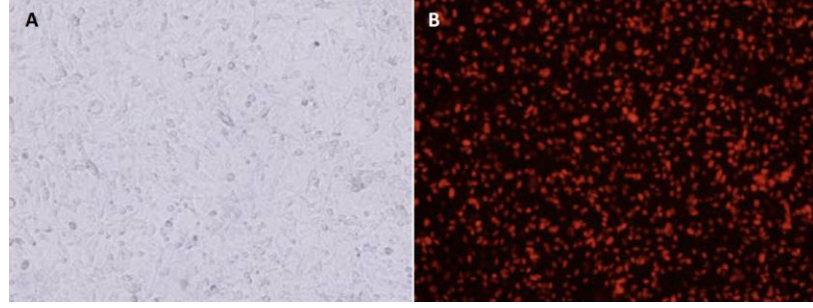
Çalışmada kullandığımız 3. jenerasyon LVlerin üretiminde gerekli plazmid vektörlerin oluşturulması için Gateway HiPerform Lentiviral Ekspresyon Sistemi'ni (Invitrogen), kullandık. Bu sistemde, bakteriyofaj lambdanın belirli dizilere özgü rekombinasyon özelliklerine sahip *att* bölgeleri kullanılarak, giriş vektörü ile destinasyon vektörü arasında bir çaprazlama reaksiyonu aracılığıyla istenilen özelliklerin ilgili genin destinasyon vektörüne klonlanması sağlanır (Şekil 3.2, Şekil 4.13).



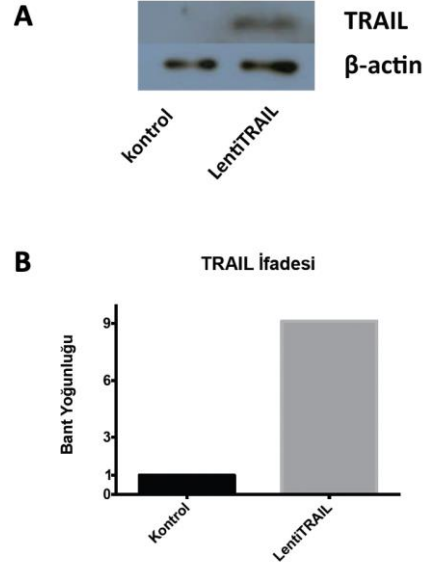
Şekil 4.13. Oluşturulan pLV-TRAIL ekspresyon vektörünün haritası. Gateway sistemi kapsamındaki LxR rekombinasyonu ile oluşturulan pLV-TRAIL vektörünün haritası görülmektedir.

4.3.1. LV-TRAIL'ın *in vitro* fonksiyonellik deneyleri gerçekleştirildi.

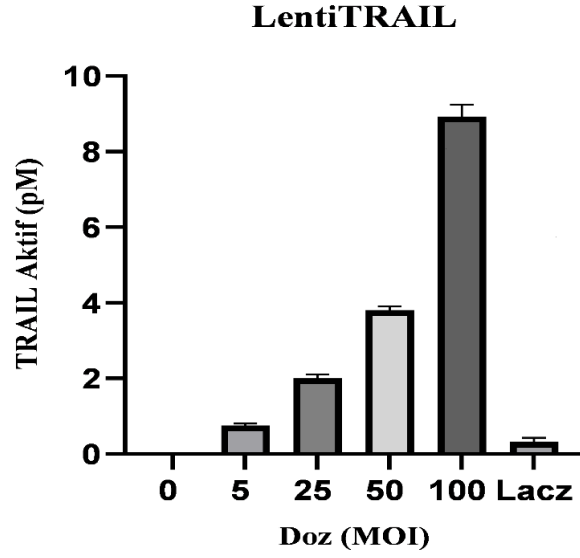
Üretilen vektörlerin *in vitro* fonksiyonelliği, öncelikle HEK293T hücrelerinin LV-RFP vektörleri ile transdüksiyonu sonrası floresan ışıma takibi ile değerlendirildi ve vektörün hücreleri yüksek etkinlikle transdüksiyona uğrattığı gözlemlendi (Şekil 4.14). LV-TRAIL vektörünün fonksiyonelliğinin değerlendirilmesi için, vektörlerin HEK293T hücrelerine transdüksiyonunu takiben 48 st sonra elde edilen lizatlarda TRAIL ekspresyon oranları test edildi LV-TRAIL transdüksiyonu ile hücrelerde yüksek seviyede TRAIL ifade edildiği gözlemlendi (Şekil 4.15). HT1080 hücrelerine transdüksiyonla fonksiyonel analiz için, LV-TRAIL transdüksiyonundan 3 gün sonra kültür ortamından toplanan süpernatandan TRAIL analizi gerçekleştirildi. Deney sonucunda yapılan analizlerle, LV-TRAIL vektörü ile transdüksiyon sonrası HT1080 hücrelerinde artan vektör dozuyla uyumlu olarak artan miktarlarda TRAIL ekspresyonu gözlemlendi (Şekil 4.16).



Şekil 4.14. LV-RFP vektörlerinin fonksiyonel etkinliğinin gösterilmesi. HEK293 hücrelerine (A) 5 ml dozda (10^{10} TU/ml) LV-RFP transdüksiyonu sonrası floresan mikroskop altında RFP ışımaya görüntüleri verilmiştir (B). Vektörün hücreleri yüksek etkinlikle transdüksiyona uğratarak, RFP geninin ekspresyonunu %100'e yakın oranda sağlayabildiği görülmektedir. Görüntüler floresan mikroskopta 10X büyütmede kaydedilmiştir.

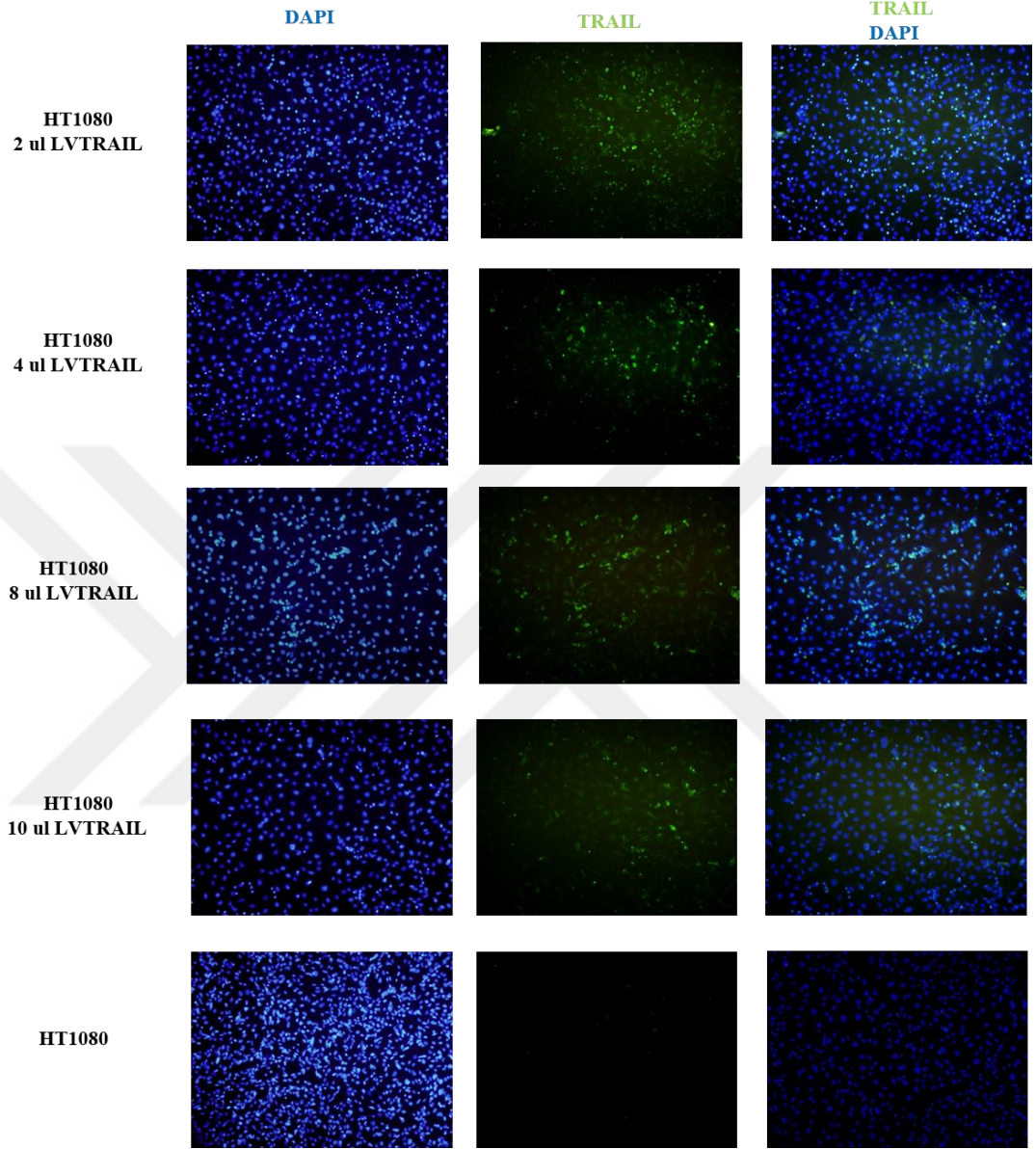


Şekil 4.15. LV-TRAIL vektörlerinin fonksiyonel doğrulaması. HEK293T hücrelerinin, 2 μ l/ml (500 MOI) LV-TRAIL ile transdüksiyonunu takiben gerçekleştirilen Western Blot analiz sonuçları (A) ve densitometrik analiz sonucuna göre TRAIL ekspresyon seviyesi (B) görülmektedir.



Şekil 4.16. Artan dozlarda LV-TRAIL ile transdükte edilen HT1080 hücrelerinde TRAIL ekspresyon miktarlarını gösteren grafik. HT1080 hücrelerinin LV-TRAIL ile transdüksiyonundan 3 gün sonra yapılan TRAIL ELISA testi sonuçları görülmektedir (n=5/grup, analiz One way Anova, $p<0.0001$).

LV-TRAIL vektörlerinin HT1080 hücrelerini transdükte etme oranlarına göre, fonksiyonelliğe yönelik de bilgi sağlayan viral titrasyon deneyleri gerçekleştirildi (Şekil 4.17). Bunun için, 6 kuyucuklu kültür kaplarına 50.000 hücre/kuyu olacak şekilde ekilen hücreler polibren varlığında artan konsantrasyonlarda vektör ile transdükte edildikten sonra ışıma düzeyleri takip edildi. Hücreler için toksik olmayan etkin viral konsantrasyonun 8 μ l olduğu gözlemlendi ve deneylerimizde bu konsantrasyon kullanıldı.

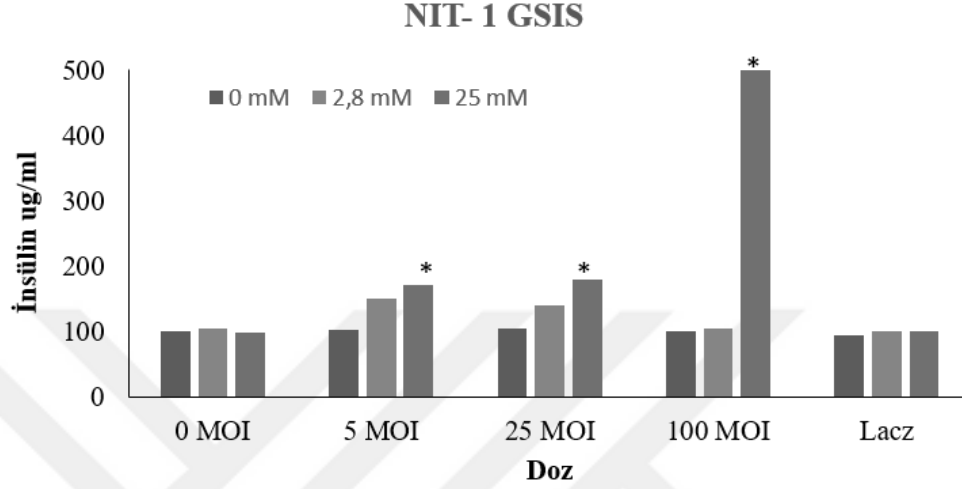


Şekil 4.17. HT1080 hücrelerinin LV-TRAIL ile transdüksiyon sonuçları. HT1080 hücreleri, LV-TRAIL’ın artan konsantrasyonları ile transdükte edildikten sonra TRAIL ekspresyonuna yönelik immunositokimya boyamaları görülmektedir. Görüntüler floresan mikroskopta 20X büyütmede kaydedilmiştir.

4.4. TRAIL, NIT-1 Hücrelerinde Glukoz-İndüklü İnsulin Salınımını Artırdı.

Diyabette koruyucu rolüne yönelik bulgular olan TRAIL’ın, glukoz indüklü insulin salınımına etkisi olabileceğini hipotez ettik ve NIT-1 fare beta hücrelerinde TRAIL uygulaması sonrası glukoz indüklü insulin salınım testi uyguladık. NIT-1 hücrelerinin LV-TRAIL ile transdüksiyonu sonrasında 3. günde farklı glukoz uygulamaları yapılan

örneklerden toplanan süpernatantlarda gerçekleştirilen analiz sonucunda TRAIL'ın yüksek glukoz konsantrasyonlu ortamda insülin salınımını artırdığı gözlemlendi (Şekil 4.18).

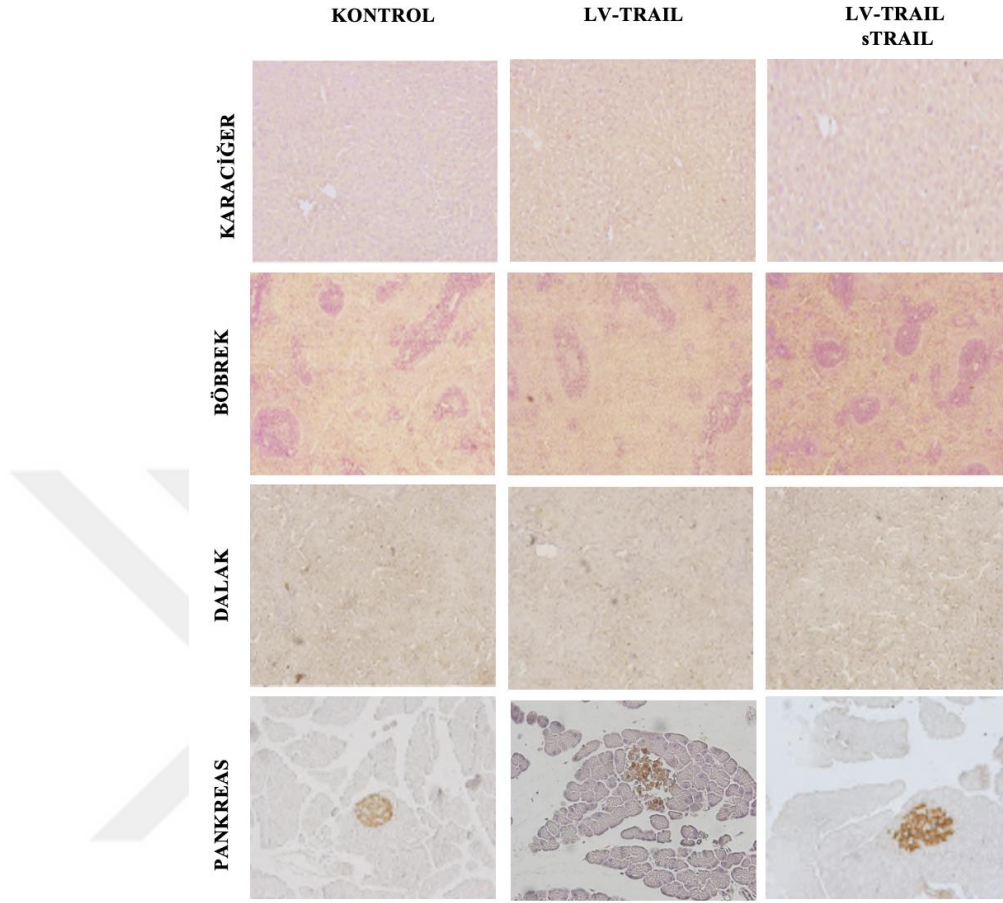


Şekil 4.18. TRAIL transdüksiyonu yapılan NIT-1 fare beta hücre hattında glukoz-indüklü insülin salınımı. Pankreatik beta hücrelerine TRAIL transdüksiyonu sonrasında farklı glukoz konsantrasyonlarında insülin sekresyonunun gözlenen artışlar görülmektedir (n=5/grup). Analiz Two Way Anova $p < 0.001$.

4.5. LV-TRAIL Transdüksiyonunun Yüksek Yağlı Diyetle Beslenen Hayvan Gruplarındaki Etkileri Araştırıldı.

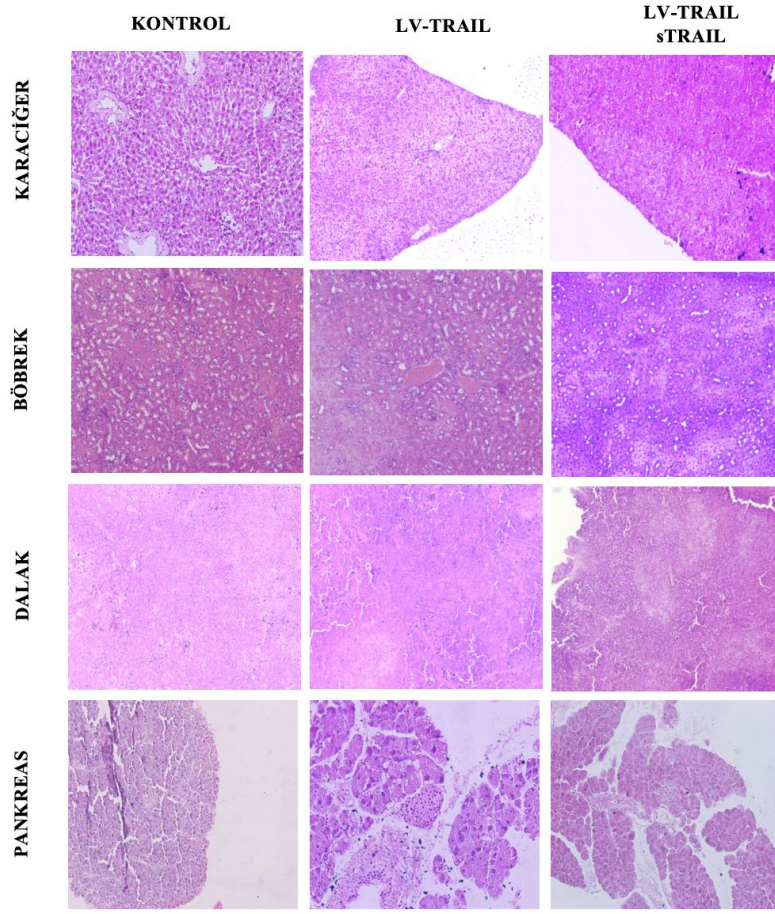
4.5.1 LV-TRAIL ve LV-TRAIL+sTRAIL uygulamalarının dokularda hasara neden olmadığı gösterildi.

LV-TRAIL ve sTRAIL uygulamalarının hayvanların dokularında hasara neden olmadığına kanıtlanması için, farklı dokulardan alınan kesitler Şekil 4.19’da görülmektedir. Dokularda yapılan hematoksil-eozin boyama sonuçları, Şekil 4.20’de verilmiştir. Bu deneyler sonucunda, karaciğer, böbrek, dalak ve pankreas dokularının, LV-TRAIL veya sTRAIL uygulaması sonrasında normal bütünlüklerini koruduğu görüldü. LV-TRAIL 5 MOI, sTRAIL 10 ng/ul dozda uygulanmıştır.



Şekil 4.19. Karaciğer, böbrek, dalak ve pankreas dokularında LV-TRAIL ve sTRAIL uygulamaları sonrası doku bütünlüklerini gösteren görüntüler. Pankreas, dalak, böbrek ve karaciğerde normal doku yapısının, LV-TRAIL veya sTRAIL uygulaması sonrası bozulmadığı görülmektedir. Pankreas dokusunda insülin boyama da gerçekleştirilmiştir. Büyütme gücü: 10X.

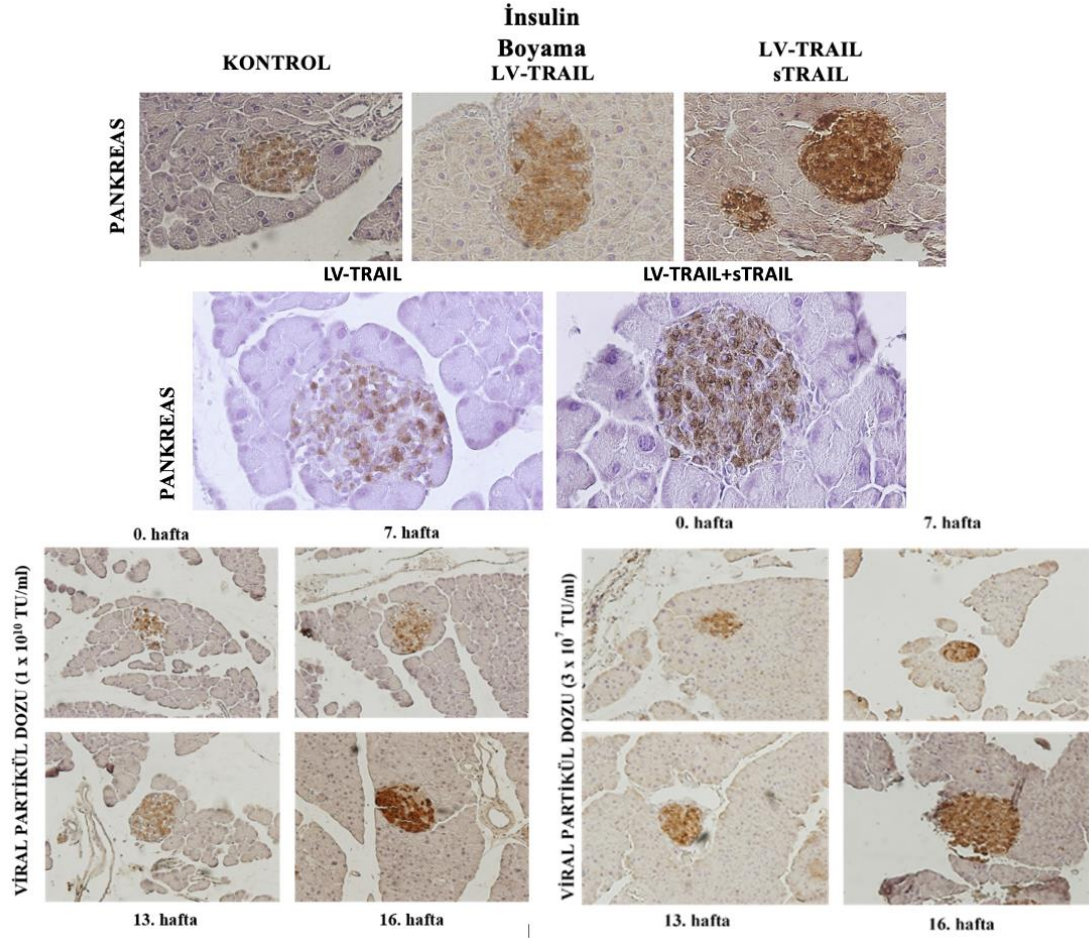
HE Boyama Tüm Gruplar



Şekil 4.20. Karaciğer, böbrek, dalak ve pankreas dokularında LV-TRAIL ve sTRAIL uygulamaları sonrası H&E boyamalar. Görüntüler, LV-TRAIL ve sTRAIL uygulamaları sonrasında pankreas, dalak, böbrek ve karaciğerde doku bütünlüğünün korunduğunu göstermektedir, 20X büyütmede kaydedilmiştir.

4.5.2. *In vivo* TRAIL uygulaması sonrasında pankreatik adacıklarda insülin ekspresyonunda artış gösterildi.

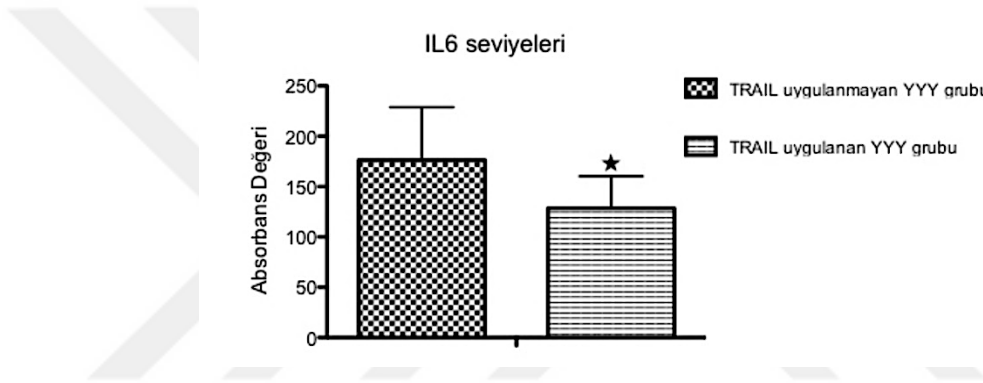
TRAIL uygulanan gruplarda insülin boyama şiddetinde, TRAIL uygulanmayan gruplara oranla artış görüldü (Şekil 4.21). LV-TRAIL'ın sTRAIL ile birlikte uygulandığı hayvanlarda bu artışın daha belirgin olduğu gözlemlendi. Hayvanlar ayrıca iki farklı LV-TRAIL dozu uygulamasını takiben (düşük doz $3,7 \times 10^7$ TU/ml ve yüksek doz 1×10^{10} TU/ml) 16 hafta boyunca takip edildi ve her iki grupta, 0, 7, ve 13. haftalara göre 16. haftada insülin ekspresyonunda belirgin artış gözlemlendi. Düşük ve yüksek doz viral vektör uygulamalarında benzer etkiler görüldü. İleri deneyler, düşük doz LV-TRAIL ile sürdürüldü.



Şekil 4.21. *In vivo* TRAIL uygulamaları sonrasında pankreas dokularında insülin boyamaları. En üst panelde, LV-TRAIL uygulaması sonrasında pankreas dokusunda insülin boyama sonuçları görülmektedir. Görüntüler 20X büyütmede kaydedildi. Orta panelde, LV-TRAIL ile birlikte sTRAIL uygulanan grupların dokularında insülin ekspresyon oranlarına yönelik ek görüntüler görülmektedir. Her iki şekilde, LV-TRAIL ile birlikte sTRAIL alan grupta insülin ekspresyonundaki artış belirgindir. Görüntüler 40X büyütmede kaydedildi. Alt panelde solda, yüksek doz (1×10^{10} TU/ml) ve alt panelde sağda düşük doz (3×10^7 TU/ml) LV-TRAIL uygulaması sonrası enjeksiyon yapılmamış (0.hafta) ve enjeksiyon sonrası (7., 13., 16. haftalarda) hayvanlarda insülin ifade oranları ve 16. haftada belirgin artan insülin oranları görülmektedir. Görüntüler 20X büyütmede kaydedildi.

4.5.3 LV-TRAIL uygulaması, yüksek yağlı diyetle beslenen hayvan modellerinde sistemik inflamasyonu baskıladı.

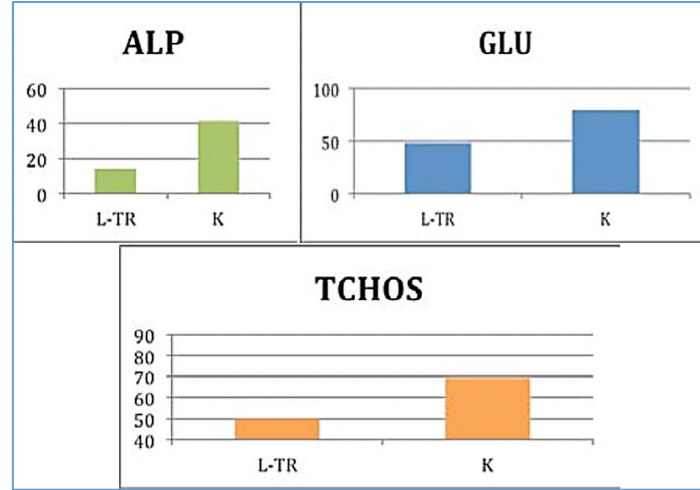
TRAIL molekülünün, TNF ailesi üyesi diğer sitokinlerden farklı olarak antiinflamatuvar etki gösterdiği bilinmektedir. Yüksek yağlı yemle (YYY) beslenen hayvanlarda, TRAIL uygulaması öncesi ve sonrasında, sistemik inflamasyonda anahtar bir sitokin olarak kabul edilen IL-6'nın dolaşımdaki miktarları ELISA testi ile değerlendirildi. TRAIL uygulanan YYY grubunda dolaşımdaki IL-6 miktarının, TRAIL uygulanmayan YYY grubuna oranla anlamlı ölçüde azaldığı gözlemlendi (Şekil 4.22).



Şekil 4.22. Yüksek yağlı yemle (YYY) beslenen gruplarda LV-TRAIL'ın sistemik inflamasyona etkisi. LV-TRAIL uygulanan ve uygulanmayan YYY gruplarında dolaşımdaki IL-6 seviyelerindeki farklılığı gösteren grafik.

4.5.4. LV-TRAIL uygulaması, yüksek yağlı diyetle beslenen hayvan modellerinde alkalın fosfataz, glukoz ve total kolesterol seviyelerini düşürdü.

Yüksek yağlı diyetin, canlı sistemlerde yol açtığı farklı hasarlar bilinmektedir. LV-TRAIL uygulamasının, yüksek yağlı yemle (YYY) beslenen hayvan gruplarında farklı parametrelere etkisinin değerlendirilmesi amacıyla, *in vivo* uygulamayı takiben total kolesterol, total bilirubin, inorganik fosfor, glutamat piruvat transaminaz, glukoz, gama glutamil tanspeptidaz, kreatinin, kalsiyum, üre azotu, alkalın fosfataz ve albumin parametrelerini içeren böbrek ve karaciğer panelleri çalışıldı. LV-TRAIL uygulanan hayvan gruplarında alkalın fosfataz, glukoz ve total kolesterol seviyelerinde kontrol hayvanlara göre düşüş gözlemlendi (Şekil 4.23). Diğer parametrelerde anlamlı değişiklik gözlemlenmedi.

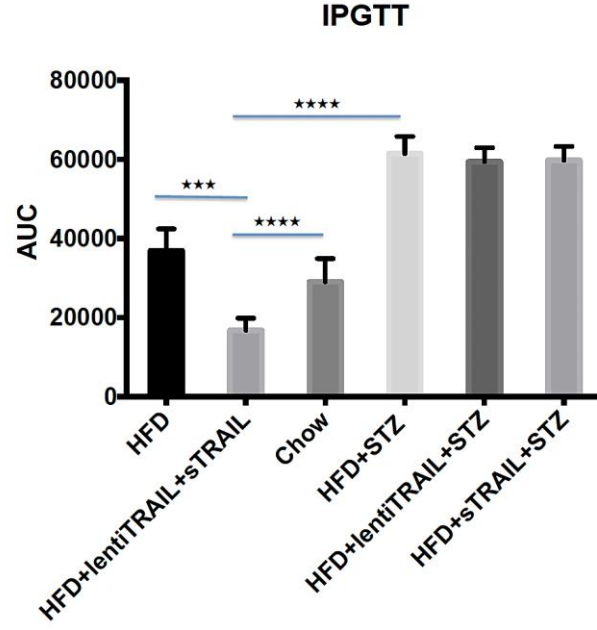


Şekil 4.23. TRAIL uygulanan (L-TR) ve uygulanmayan (K) hayvan gruplarında değişen alkalın fosfataz, tokluk glukozu ve total kolesterol oranları. ALP: alkalın fosfataz; GLU: glukoz; TCHOS: total kolesterol

4.6. LV-TRAIL ve sTRAIL Uygulamalarının Obez ve Tip 2 Diyabet Hayvan Modellerindeki Antidiyabetik Etkileri Araştırıldı.

4.6.1. LV-TRAIL ve sTRAIL uygulaması, obez hayvanlarda glukoz tolerans bozukluğunu iyileştirici etki gösterdi.

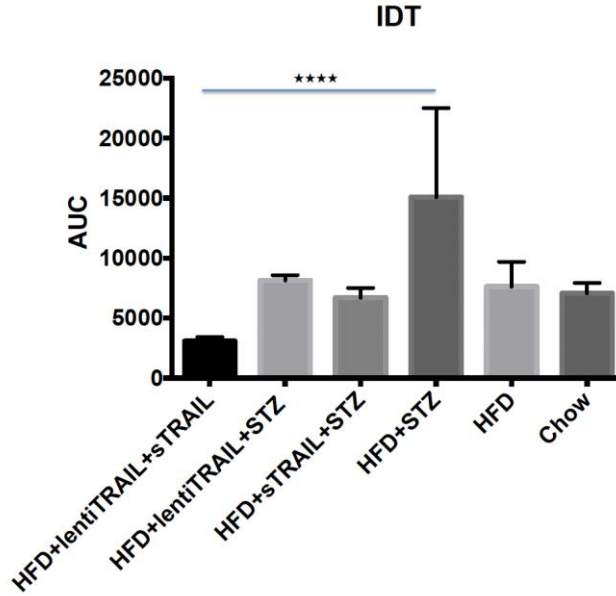
Glukoz tolerans bozukluğu ve insülin direnci geliştiren obez C57BL6 farelerde ve bu uygulamaları takiben STZ ile kısmi beta hücre hasarı oluşturulan Tip 2 Diyabet (T2D) fare modellerinde intraperitoneal LV-TRAIL (lentiTRAIL), ve/veya LV-TRAIL + sTRAIL uygulamaları gerçekleştirildi. Obezite gruplarında (HFD+LV-TRAIL+sTRAIL) TRAIL uygulamasının glukoz toleransını iyileştirici etki gösterdiği gözlemlendi; glukoz tolerans testinde eğri altındaki alanda (Area Under Curve; AUC), sadece yüksek yağlı diyet uygulanan (HFD) veya yüksek yağlı diyet+STZ uygulanan (HFD+STZ) gruplara göre anlamlı azalma görüldü. STZ verilen gruplarda (T2D), TRAIL'ın anlamlı bir iyileştirici etkisi gözlenmedi (Şekil 4.24).



Şekil 4.24. TRAIL'ın obez ve T2D hayvan gruplarında glukoz tolerans bozukluğu üzerine etkileri. Chow: normal yağlı yemle beslenen grup; HFD: yüksek yağlı diyet dışında uygulama yapılmayan grup; HFD+STZ: T2D grubu; HFD+lentiTRAIL+sTRAIL: LV-TRAIL ve sTRAIL uygulanan obezite grubu, HFD+lentiTRAIL+STZ: LV-TRAIL uygulanan T2D grubu; HFD+sTRAIL+STZ: sTRAIL uygulanan T2D grubu. Değerler ortalama $\pm$ SEM olarak ifade edilmiştir (** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$).

4.6.2. LV-TRAIL ve sTRAIL uygulaması, obez hayvanlarda insülin direncini iyileştirici etki gösterdi.

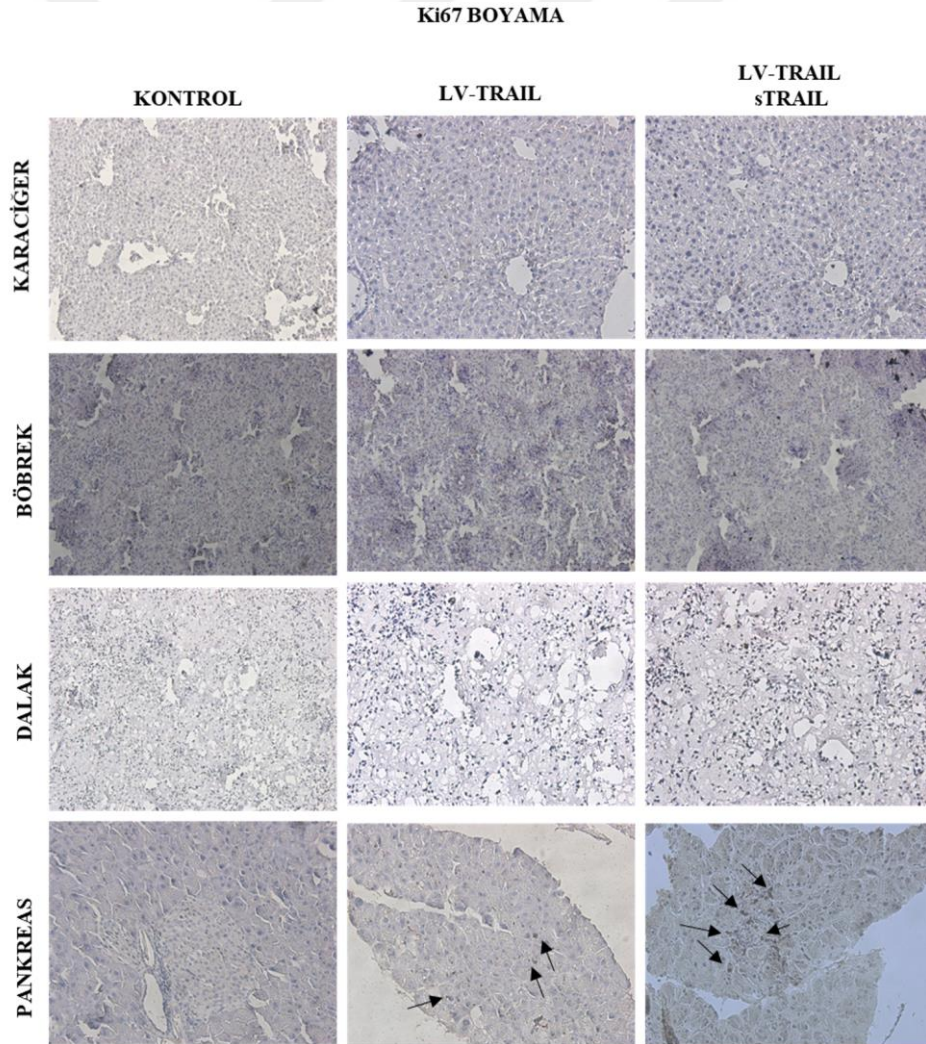
Yüksek yağlı yem (YYY) ile beslenme sonucu glukoz toleransları bozulan ve insülin direnci geliştiren obez C57BL6 farelerde ve STZ ile kısmi beta hücre hasarı da geliştirilerek oluşturulan T2D fare modellerinde intraperitoneal LV-TRAIL (lentiTRAIL) ve/veya sTRAIL uygulandı. Bu uygulamayla, sTRAIL'ın veya LV-TRAIL aracılı TRAIL aktarımının tek başına veya kombine şekilde, insülin duyarlılığını artırıcı etkisi test edildi. İnsülin duyarlılığının HFD+STZ uygulanan gruplara oranla LV-TRAIL ve sTRAIL'ın birlikte uygulandığı obez gruplarda (HFD+LV-TRAIL+sTRAIL), ve LV-TRAIL ve sTRAIL'ın tek başına uygulandığı T2D gruplarında (HFD+LV-TRAIL+STZ; HFD+sTRAIL+STZ) arttığı; yani insülin direncinde iyileşme olduğu gözlemlendi (Şekil 4.25).



Şekil 4.25. TRAIL'ın obez ve T2D hayvan gruplarında insülin direnci üzerine etkileri. Chow: normal yağlı yemle beslenen grup; HFD: yüksek yağlı diyet dışında uygulama yapılmayan grup; HFD+STZ: T2D grubu; HFD+lentiTRAIL+sTRAIL: LV-TRAIL ve sTRAIL uygulanan obezite grubu, HFD+lentiTRAIL+STZ: LV-TRAIL uygulanan T2D grubu; HFD+sTRAIL+STZ: sTRAIL uygulanan T2D grubu. Değerler ortalama $\pm$ SEM olarak ifade edilmiştir (**** $p \leq 0.0001$).

4.6.3. TRAIL uygulaması ile pankreatik dokuda Ki67 proliferasyon belirtecinin ifadesinde artış gözlemlendi.

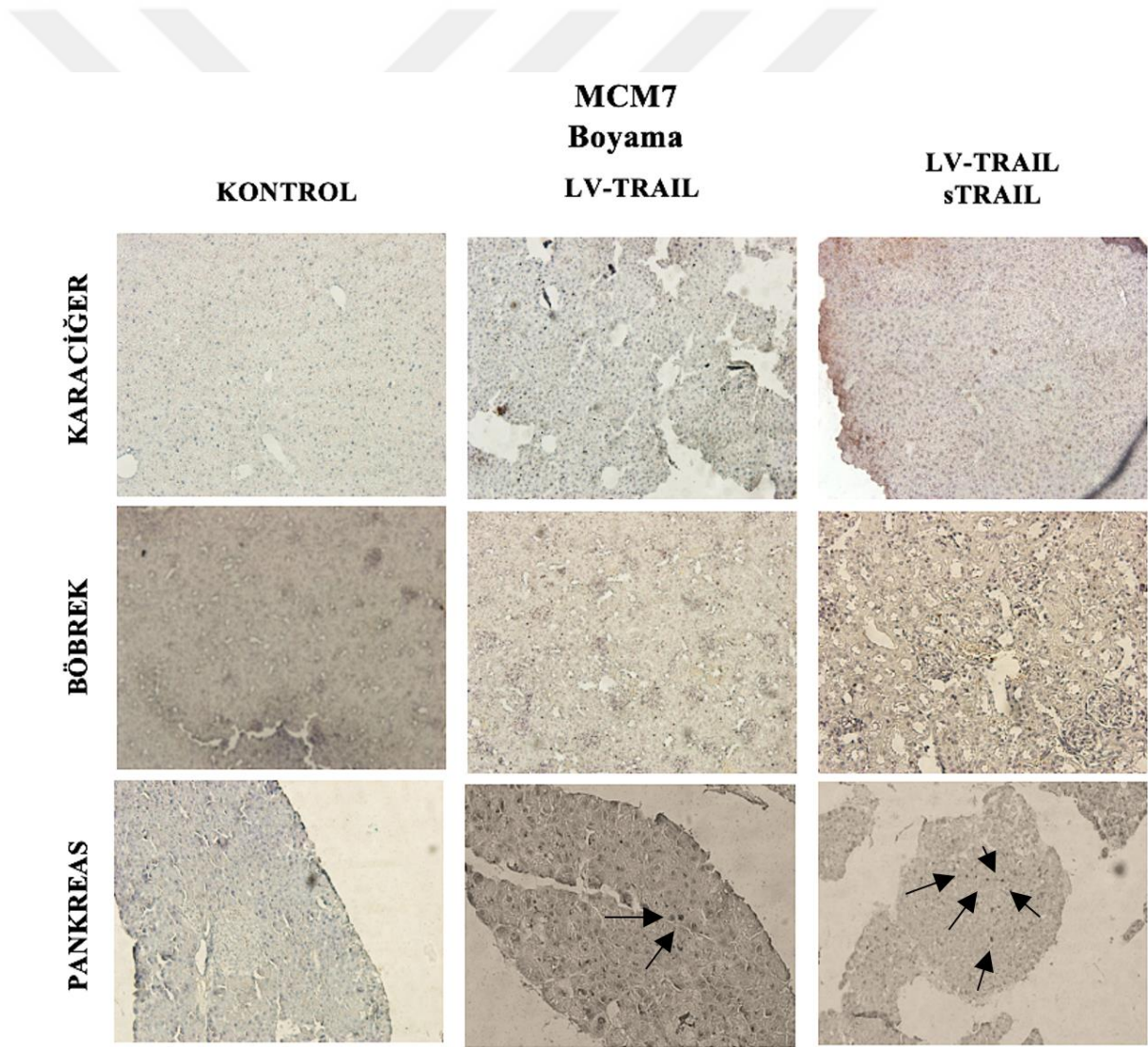
Ki67, klinikte malign tümörlerin derecelendirilmesinde de sıklıkla kullanılan replikasyon-ilişkili bir proteindir (Kohler, Kreuter et al. 2010). TRAIL'ın pankreatik doku üzerindeki olası proliferatif etkisinin test edilebilmesi için, LV-TRAIL ve sTRAIL uygulamaları sonrasında sakrifiye edilen hayvanlarda Ki67 immunohistokimyasal boyamaları gerçekleştirildi. Pankreasta hem asinar doku hem de beta hücre kitlesinde proliferasyon tespit edildi. Diğer dokularda Ki67 pozitif hücre sayısı ise az sayıda gözlemlendi. LV-TRAIL $3,7 \times 10^7$ µl dozda, sTRAIL 10 ng/µl dozda uygulanmıştır (Şekil 4.26).



Şekil 4.26. TRAIL uygulamaları sonrası Ki67 boyamaları. Pankreas dokusunda TRAIL uygulaması sonrası hücre proliferasyonunda artış gözlenen örnek bölgeler ok ile işaretlenmiştir. (LV-TRAIL: $3,7 \times 10^7$ viral partikül (5 MOI); sTRAIL: 10ng/µl; 10X büyütme).

4.6.4. TRAIL uygulaması ile pankreatik dokularda MCM-7 proliferasyon belirtecinin ifadesinde düşük şiddette artış gözlemlendi.

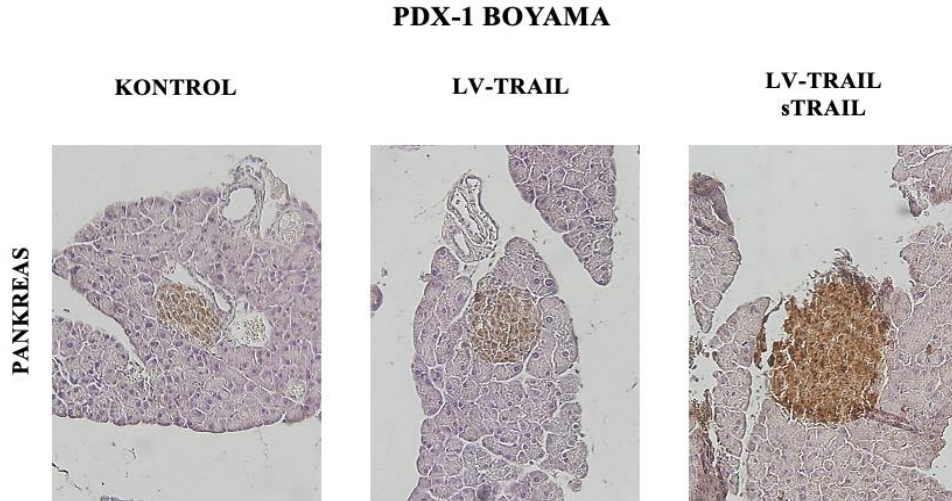
Mini Chromosome Maintenance 7 (MCM7) proteini, ökaryotik genom replikasyonunun başlatılması için gerekli olan, yüksek oranda korunmuş bir mini kromozom bakım protein kompleksi olup prereplikasyon kompleksinin bir üyesidir (Kohler, Kreuter et al. 2010). LV-TRAIL uygulaması sonrasında pankreasta MCM7 proteininin ifadesinde düşük oranda artış gözlemlendi (Şekil 4.27)



Şekil 4.27. TRAIL uygulamaları sonrası MCM-7 boyamaları. Pankreas, karaciğer, dalak ve böbrek dokularında TRAIL aktarımı sonrasında MCM-7 proliferasyon belirtecinin ifade seviyeleri görülmektedir. Hücre proliferasyonunda artış gözlenen örnek bölgeler ok ile işaretlenmiştir. (LV-TRAIL: $3,7 \times 10^7$ viral partikül, sTRAIL: 10ng/ μ l). Görüntüler 20X büyütmede kaydedildi.

4.6.5. TRAIL uygulaması sonrası, pankreasta rejeneratif PDX-1 belirtecinin ekspresyonunda belirgin artış gözlemlendi.

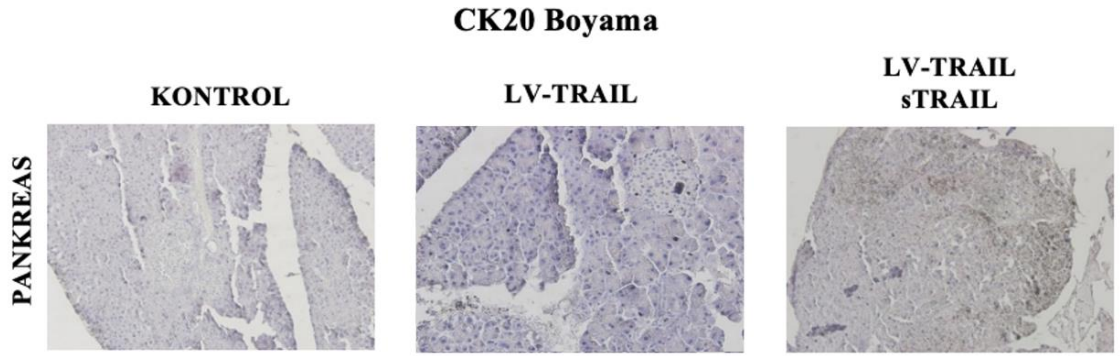
Pankreas duodenal homeobox geni PDX-1, pankreas gelişiminde esansiyel bir faktör olarak tanımlanır. En erken eksprese olan genlerden biridir ve erken rejenerasyon belirteci olarak değerlendirilir. Aynı zamanda, erişkin beta hücrelerinin fonksiyonu ve sağ kalımı için merkezi rol üstlenen bir transkripsiyon faktörüdür (Fujimoto and Polonsky 2009). TRAIL uygulaması sonrası immunohistokimyasal analizlerimizde, özellikle LV-TRAIL ve sTRAIL'ın birlikte uygulandığı pankreas dokusunda PDX-1 ekspresyonunda önemli artış gözledik (Şekil 4.28).



Şekil 4.28. TRAIL uygulamaları sonrası pankreasta PDX-1 boyamaları. Pankreasta LV-TRAIL ve sTRAIL uygulamaları sonrası rejeneratif PDX-1 belirtecinin ekspresyon oranları görülmektedir (LV-TRAIL: $3,7 \times 10^7$ MOI; sTRAIL: 10ng/ μ l). Görüntüler 20X büyütmede kaydedildi.

4.6.6. TRAIL uygulaması sonrası, pankreasta rejeneratif CK-20 belirtecinin ekspresyonunda artış gözlenmedi.

Pankreasta hala tartışmalı olan öncü hücrelerin, aktif proliferasyon gösteren ve yüksek oranda spesifik sitokeratin (CK) proteinleri salgılayan hücreler olduğu düşünülmektedir (Georgia and Bhushan 2004). CK-20'nin neogenez belirteci olarak özellikle neonatal dönemde informatif olduğu düşünülse de, yetişkin pankreasında da bu yönde ifade edilebileceği düşünülmektedir. Çalışmamızda, LV-TRAIL ve LV-TRAIL+sTRAIL uygulamaları sonrasında, pankreas dokularında CK-20 boyamaları gerçekleştirildi. LV-TRAIL+sTRAIL uygulanan grupların pankreas dokularında CK20 boyamada belirgin bir artış gözlenmedi (Şekil 4.29).



Şekil 4.29. TRAIL uygulamaları sonrası pankreasta CK20 boyamaları. Kontrol doku, LV-TRAIL ve sTRAIL+LV-TRAIL ile uygulaması sonrası ve sTRAIL+LV-TRAIL verilen grupta CK20 immunositokimyasal boyamalara yönelik örnek görüntüler verilmiştir. Görüntüler 20X büyütmede kaydedildi.

TARTIŞMA

Uluslararası Diyabet Federasyonunun (IDF; International Diabetes Federation) 2021 Diyabet Atlası verilerine göre, dünya genelinde halen 20 ila 79 yaş arası 537 milyon yetişkin diyabet hastası bulunmaktadır ve bu sayının 2030 yılında 643 milyona, 2045 yılında ise 783 milyona çıkması beklenmektedir. Aynı Kurum'un verileri, 2021 yılı içinde 6.7 milyon insanın diyabet nedeniyle hayatını kaybettiğini göstermektedir. 541 milyon insan ise bozulmuş glukoz toleransı ile yaşamaktadır; dolayısıyla tip 2 diyabet geliştirme riskleri yüksektir. Türkiye'de aynı yaş grubundaki diyabetli sayısı, Sağlık Bakanlığı tarafından 9 milyon olarak açıklanmıştır.

Diyabet, insülin sekresyonunda veya fonksiyonunda bozukluk ve sonucunda kronik hiperglisemi ile karakterize olan bir metabolik hastalıklar grubudur. İnsülinin üretildiği beta hücreleri, insan pankreatik adacıklarının %65-80'inin oluşturur ve sentezledikleri insülin ve amilin ile vücutta glukoz homeostazında önemli görev alırlar. Diyabetin iki ana grubu, tip 1 ve tip 2 diyabet'tir (T1D ve T2D). T1D'de beta hücreleri otoimmün mekanizmaların etkisiyle yıkılırken, T2D'de insülin direnci ve sonrasında ortaya çıkabilen beta hücre yıkımı önemlidir (Cnop, Welsh et al. 2005). Diyabetli hasta popülasyonunun %90'ından fazlasının T2D'li olduğu bilinmektedir. T2D'nin ortaya çıkış nedenleri arasında sosyo-ekonomik, demografik, çevresel ve genetik faktörler sayılmaktadır; T2D prevalansındaki artış ise popülasyonun yaşlanması, şehirleşmede artış, fiziksel aktivite oranındaki düşüş ve toplumda obez bireylerin sayısındaki artışa bağlanmaktadır.

1995 yılında iki ayrı araştırma grubu tarafından tanımlanan TNF-ilişkili apoptoz-indükleyici ligand (TRAIL; TNF-related apoptosis-inducing ligand), immun sistemin önemli bir bileşenidir (Wiley, Schooley et al. 1995, Pitti, Marsters et al. 1996, Nagane, Huang et al. 2001). TRAIL, TNF ailesi üyesi olan diğer sitokinlerden farklı olarak birçok transforme hücrede apoptotik etki gösterirken normal hücrelerde apoptozu indüklemeyiz. Ayrıca, diğer TNF ailesi üyelerinin aksine ekspresyonu sıkı regülasyon altında tutulmaz; birçok dokuda reseptörleri ile birlikte yaygın olarak ifade edilir (Wiley, Schooley et al. 1995). TRAIL, hücrelerde tip II transmembran proteini olarak sentezlenmekle birlikte,

sistein proteazlar ve matriks-metalloproteinaz-2 (MMP-2) aracılığıyla çözülebilir formda da salınabilir. Her iki form da hücrelerde çeşitli intraselüler sinyal yollarını indükleyebilirken, transmembran varyantın etkisinin daha güçlü olduğu bilinmektedir. TRAIL'ın farklı moleküler yolları indükleyebilmesi, insan dokularında yaygın olarak ifade edilmesi ve bağlanabildiği 5 ayrı reseptörünün bulunması, daha önce tahmin edilenden çok daha farklı fonksiyonları olabileceğini düşündürmüştü, ve elde edilen veriler bunu desteklemiştir. TRAIL'ın diyabet sürecinde de önemli bir molekül olduğuna yönelik veriler mevcuttur: öyle ki, TRAIL eksprese etmeyen hayvan modellerinde T1D normale oranla çok daha erken ortaya çıkmış ve daha şiddetli bir prognoz sergilemiştir (Mi ve ark., 2003; Lamhamedi ve ark., 2003). TRAIL'ın T2D'de de koruyucu rol alabileceği düşünülmektedir. Çalışmamızda, bu önemli molekülün lentiviral vektör aracılı aktarımının ve çözülebilir formda uygulanmasının fare modellerinde obezite ve T2D'deki terapötik potansiyelini araştırdık ve bu süreçlerle ilişkili farklı etkilerini çalıştık.

Çalışmamızda kullandığımız C57BL6 fareler, obezite ve diyabet ile ilişkili farklı çalışmalarda sıklıkla tercih edilen hayvan modelleridir. Standart yemle beslendiklerinde dahi bu hayvanların belirli koşullarda geç dönem obezite geliştirmeye yatkın oldukları bildirilmiştir (Lutz and Woods 2012). Bu hayvanlarda, yüksek yağlı yemle (YYY) beslenme sonucu insan obezitesi gelişimindeki yağlanma sürecine benzer olarak yavaş ve kademeli bir süreçle yağlanma ve patofizyolojik özellikler gözlenir. Biz de YYY ile beslenen C57BL6 farelerde abdominal bölgede ve pankreasta gözle görülür bir yağlanma, karaciğerde spesifik boyama ile gözlenebilen yağlanma, glukoz toleransında bozulma ve insülin direncinin geliştiğini gözledik (Şekil 4.1-4.5). Obezite gelişen hayvanlarda, streptozotosin (STZ) uygulaması ile kısmi beta hücre hasarı indükleyerek T2D modelleri oluşturduk (Şekil 4.4-4.6, Şekil 4.25, 4.26). Çalışma sürecinde, kullandığımız C57BL6 fare modellerinde obezite ve T2D oluşturulmasında Streptozotosin (STZ) enjeksiyonları açısından farklı uygulamaların etkisini test ettik. Bulgularımız, 8 haftalık iken başlanan ve 8-12 hafta süren YYY ile beslenme ve sonrasında uygulanan tek doz (150 mg/kg) STZ'nin, T2D modelinin oluşturulmasında en etkin yöntem olduğunu gösterdi.

TRAIL'ın farklı hücre yüzey reseptörlerinin, biyolojik fonksiyonlarını gerçekleştirmedeki önemi bilinmektedir. TRAIL ligandı ve reseptörlerinin dokulardaki ifade oranının ve farklı

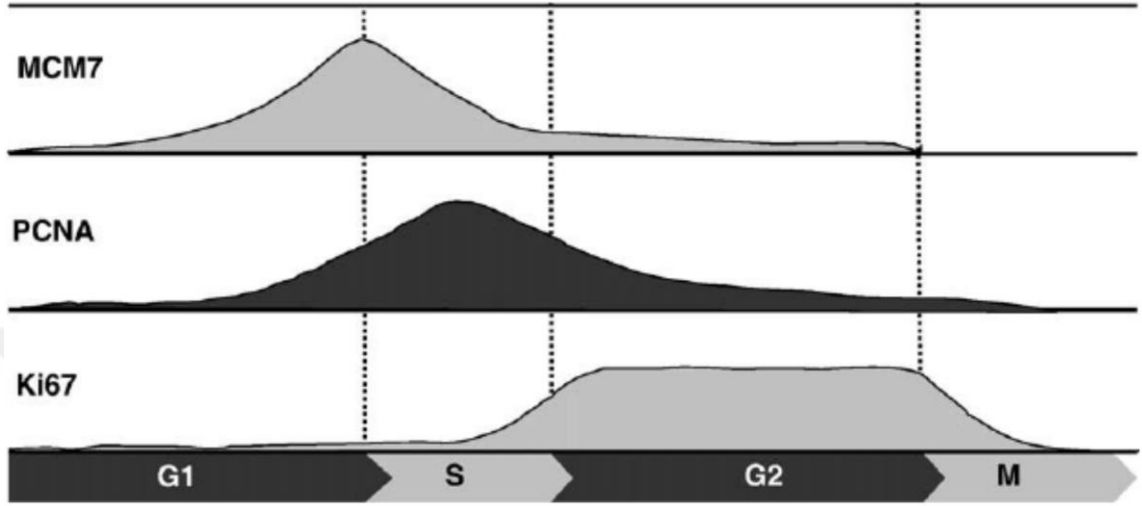
koşulların etkisiyle bu oranlarda meydana gelen değişimlerin, ilgili hücre tipleri üzerindeki etkisini de şekillendirebildiği bilinmektedir. Örneğin, TRAIL ligandı ve reseptörlerinin dokulardaki ifade oranlarındaki değişikliklerin, kanserde farklı evreler ile ilişkilendirildiği birçok çalışma mevcuttur (Koksal ve ark., 2008; Sanlioglu ve ark., 2009). Mevcut çalışmamızda, kontrol gruplarımızda ve deney gruplarımızda TRAIL ve reseptörlerinin obezite ve T2D gelişim sürecindeki ifade oranlarını belirledik. Genel olarak, TRAIL ifadesinin obezite geliştikçe baskılandığını, T2D gelişim sürecinde özellikle ekzokrin dokuda baskılandığını gözledik (Şekil 4.7). Farelerdeki tek TRAIL ölüm reseptörü olan DR5'in ifadesinin, hastalık gelişim sürecinde ekzokrin dokuda baskılanırken Langerhans adacıklarında arttığını gözledik (Şekil 4.8). Dokularda farklı anomalilerde DR5 ekspresyonunda artış olabildiği bilinmektedir. DcR1 yalancı reseptörünün ekspresyonunda, obez hayvan grubunda azalma gözlenirken, T2D hayvanlarda kontrol hayvanlarla kıyaslandığında değişiklik gözlenmedi (Şekil 4.9). DcR2 yalancı reseptörünün ekspresyon oranının da, obezite ve T2D sürecinde endokrin dokuda sabit kalırken ekzokrin dokuda arttığını gözledik (Şekil 4.10). TRAIL'ın 4 transmembran reseptörünün her birinin hücrelerde sağkalımı ve proliferasyonu tetikleyebildiği bilinmektedir.

Çalışmamızda, TRAIL'ın yüksek yağlı yemle beslenen, obez ve diyabetik hayvanlarda olası antiapoptotik, antiinflamatuvar, proliferatif ve rejeneratif etkilerini araştırmak için lenitiviral vektör aracılı TRAIL uygulaması (LV-TRAIL) ve bazı gruplarda beraberinde çözülebilir TRAIL uygulaması (sTRAIL) gerçekleştirdik. Lentiviral vektörler, etkinliği ve güvenliliği yüksek gen transfer araçları olarak son dönemde *in vitro* ve *in vivo* gen aktarımlarında, temel ve klinik araştırmalarda ve uygulamalarda sıklıkla kullanılmaktadır (Milone and O'Doherty 2018). Transgen kapasiteleri 8 kb'ye kadar çıkabilen vektörlerdir ve genellikle immunojeniteleri adenoviral vektörler gibi diğer bazı vektör sistemlerine göre düşüktür. Ancak diğer virüslerde olduğu gibi, yüksek viral dozların konakçının sistemik özelliklerine de bağlı olarak yaratacağı viral toksisite ve inaktivasyon, bu vektörün dahil edildiği uygulamalarda da göz önünde bulundurulması gereken bir faktördür (Carbonaro-Sarracino, Tarantal et al. 2020). TRAIL'ın sistemik uygulamasının, TNF süper ailesinin diğer üyelerine benzer toksik etkilere yol açmadığı bilinmektedir (Merino, Lalaoui et al. 2007). Rekombinant TRAIL'ın önceleri kullanılan formlarının, protein pürifikasyon süreçlerini kolaylaştıran poli-histidin veya FLAG epitop etiketi bulundurduğu, bu nedenle

primer hepatositlerde *in vitro* toksisiteye neden olduğu bildirilmiştir. Ancak etiket bulundurmeyen rekombinant TRAIL versiyonlarında aynı etki gözlenmemiştir (Ralff and El-Deiry 2018). Çalışmamızda LV-TRAIL tek başına etkinlik göstermekle birlikte, sistemik sTRAIL uygulaması ile birlikte daha yüksek etkinlik sergiledi. LVlerin yüksek dozlarının hayvanlarda ölüme sebep olabileceğini daha önceki çalışmalarımızda gözledik; bu kapsamda sTRAIL uygulaması, viral vektör faktörü olmadan doz artırımı yapabilmemizi sağladı. LVlerin bazen dezavantaj da olabilen önemli bir avantajı, genomlarını hedef hücre genomuna entegre etmeleri sayesinde tek dozla sürekli ekspresyon sağlayabilmeleridir. sTRAIL uygulamasının ise belirli sürelerle tekrarı gerekir. Uyguladığımız kombine sistemin, bu kapsamda her iki uygulamanın eksikliklerini gidermiş olması muhtemeldir.

TRAIL'ın pankreatik beta hücreleri üzerinde koruyucu etki gösterdiği düşünülse de, bu etkinin niteliği henüz tam olarak anlaşılamamıştır. TRAIL'ın farklı hücre tipleri üzerinde koruyucu ve proliferatif etkileri bilinmektedir (Secchiero ve ark., 2004). Farklı primer pankreatik adacık kültürlerinde yapılan çalışmalar, bu hücrelerin TRAIL'ın apoptotik etkisine dirençli olduğuna işaret etmiştir (Ou ve ark., 2002). Mi ve ark., obez olmayan diyabetik (NOD; Non-Obese Diabetic) farelerin pankreatik adacıklarını farklı TRAIL dozları ile (25, 50, 100 ng/ml) muamele etmiş, ancak apoptotik etki gözlememiştir (Mi ve ark., 2003). Önceki çalışmalarımızda, TRAIL'ın rat pankreatik beta hücrelerinde proliferasyon oranını 1,5 kat kadar artırdığını gözledik (Kahraman, Yılmaz et al. 2021). Mevcut çalışmamızda, *in vivo* TRAIL uygulamasını takiben pankreasta ağırlıklı olarak adacıklarda Ki67 proliferasyon belirtecini ve genel olarak pankreas dokusunda MCM2 proliferasyon belirtecini ifadelerinde yine 1,5 kat kadar bir artış gözledik. Adı geçen belirteçler, pankreasta kabul gören proliferasyon belirteçleri olmasına rağmen, her bir proteinin hücreden hücreye ekspresyonunun değişebileceği, proliferasyon belirteçlerinin aslında hiçbirinin hücre bölünmesi geçiren beta hücrelerinin hepsini belirleyemeyeceği bildirilmektedir (Kohler, Kreuter et al. 2010). Öyle ki, ökaryotik hücrelerde hücre bölünmesi bilindiği gibi çok kompleks bir süreçtir ve siklin proteinlerini, siklin bağımlı kinazları ve diğer birçok regülatörün fonksiyonunu gerektirir. Proliferatif belirteçler, hücre döngüsü evreleri süresince bazen çok az ifade edilirken, bazen ifadeleri en üst düzeye çıkmaktadır (Şekil 5.1). Ancak Ki67 ve MCM2'nin pankreatik dokuda beta hücre proliferasyonunun belirlenmesinde en etkili belirteçlerden olduğu da ifade edilmektedir.

TRAIL'ın bu etkileri, in vitro sonuçlarımızla da uyumludur ve farklı şartlara göre değişip değişmediği, araştırılması gereken noktalardandır.



Şekil 5.1. Farklı proliferasyon belirteçlerinin hücre döngüsü sırasındaki dinamik ifade paternleri (Kohler, Kreuter et al. 2010).

PDX-1 ve CK20, pankreatik dokuda rejeneratif belirteçler olarak tanımlanır. PDX-1, hem beta hücrelerinin gelişim aşamalarında, hem de yetişkin beta hücrelerinde önemli iken, CK20'nin özellikle duktal-beta hücre arası translasyonel hücrelerde ekspresyonu ve fetal dönemdeki aktivitesi dikkat çekmektedir. Pankreasta beta hücrelerine farklılaşabilme potansiyeli olan duktal hücreler, “öncü hücreler” olarak tanımlanmaktadır. İkinci bir mekanizmaya göre, beta hücre kaynağı, sitokeratin (CK) ifade eden çoğalan bir hücre havuzundan gelmektedir, ancak ilk mekanizmanın daha olası olduğu da ifade edilmektedir (Paris, Tourrel-Cuzin et al. 2004). Duktal hücrelerden beta hücre neogenezinde PDX-1'in özellikle önemli olduğu ifade edilmektedir (Noguchi, Kaneto et al. 2003). Ancak, fetal dönemde bu süreç biraz daha olası olsa da, yetişkin öncü hücrelerinin ve özellikle duktal hücre öncülerinin tanımlamasının, farklı belirteçlerin beta hücre farklılaşmasının farklı evrelerinde ifade ediliyor olmasından dolayı çok zor olduğu da ifade edilmektedir. Ancak bu alanda yapılan her çalışmanın, bu sürecin aydınlatılmasına katkıda bulunma potansiyeli bulunmaktadır. Endokrin ve ekzokrin dokularda yapılacak olan, proliferasyon ve rejenerasyon belirteçleri ile birarada insülin boyaması da, bu süreçte daha ileri bilgi sağlayacaktır. Bununla birlikte, burada PDX-1'e atfedilecek özel bir önem, pankreatik beta

hücre fonksiyonunda ve sağ kalımında esansiyel rolünün olduğudur. PDX-1'in hiç ifade edilmemesi, pankreatik agenezle ilişkilendirilirken, kısmi yetersizliğinin ise ciddi beta hücre disfonksiyonuna yol açtığı ve rodentlerde ve insanlarda beta hücre ölümlerini artırarak diyabet olasılığını artırdığı bilinmektedir (Fujimoto and Polonsky 2009). T2D'nin major komplikasyonlarından olan kronik hiperglisemi ve dislipideminin, PDX-1 ekspresyonunun azalması nedeniyle beta hücre disfonksiyonuna ve apoptozuna neden olduğu bildirilmektedir. Dolayısıyla, TRAIL'ın PDX-1 ifadesinde artışı indüklediğine yönelik bulgumuz, bu önemli molekülün diyabette oynadığı düşünülen koruyucu rolüne yönelik önemli bir mekanizma olabilir (Şekil 4.28).

Çalışmamızda gözlediğimiz, *in vivo* TRAIL uygulamasının pankreatik adacıklarda insülin salınımını artırıcı etkisinin de önemli bir bulgu olduğunu düşünüyoruz. Bu etkiyi, LV-TRAIL uygulamasında, ve daha yüksek bir oranda LV-TRAIL ve sTRAIL'ın birlikte kullanıldığı uygulamada gözledik (Şekil 4.21). Yine bu bulgu ile uyumlu olarak, NIT-1 fare beta hücre hattında TRAIL uygulamasının glukoz-indüklü insülin salınımını artırdığını gördük. Öyle ki, bu hücre hattının başta TRAIL uygulaması olmaksızın artan glukoz konsantrasyonlarına cevap vermediği, ancak artan TRAIL dozları uygulandığında hücreleri yüksek glukoz konsantrasyonlarında glukoz indüklü insülin salınımına duyarlı hale getirdiği görüldü. Bu önemli etkinin farklı beta hücre hatlarında ve primer beta hücrelerinde de araştırılması, mevcut verilere katkı sağlayacaktır.

TRAIL'ın diyabette oynadığı varsayılan koruyucu rolle uyumlu olarak, TRAIL'ın sistemik inflamasyonu azalttığını, obezite ve T2D gelişim sürecinde dokulardaki ifadesinin azaldığını, ve beta hücreleri üzerinde proliferatif etkisi olduğunu gözledik. Bunun yanında, *in vivo* TRAIL uygulamasının hayvanlarda glukoz toleransını etkileme potansiyelini ve insülin direnci üzerindeki etkisini LV-TRAIL ve sTRAIL aracılı TRAIL uygulamaları ile araştırdık. Yüksek yağlı yem ile beslenme süresince sTRAIL uygulaması ve ardından tek seferlik LV-TRAIL uygulaması gerçekleştirdiğimiz hayvanlarda, glukoz tolerans bozukluğunun azaldığını ve insülin duyarlılığının arttığını gösterdik (Şekil 4.24, Şekil 4.25). Bernardi ve ark., rekombinant insan TRAIL molekülünü kullandıkları çalışmalarında, TRAIL'ın adiposit hipertrofisini, serbest yağ asidi seviyelerini ve inflamasyonu önemli oranda azalttığını, glukoz toleransını artırdığını ve non-alkolik yağlı

karaciğer hastalığını hafiflettiğini gözledi. Çalışmamızın önemli bir farkı, TRAIL'ın lentiviral vektörler yoluyla da aktarmış olmamız ve TRAIL uygulaması ile ilgili olarak gözlediğimiz diğer etkilerdir.

Deney hayvan gruplarımızda özellikle LV-TRAIL aracılı TRAIL aktarımının önemli olduğunu düşünüyoruz. Bu vektör sistemleri, organizmanın yaşamı boyunca ekspresyon gerçekleştirebilme potansiyeline sahiptir. sTRAIL uygulamasının ise LV-TRAIL'ın etkisini çoğu zaman artırıcı etki sergilediğini gözledik. TRAIL'ın bu etkisinin farklı model sistemlerde çalışılmasının önemli olacağını düşünüyoruz. Diyabet hastalarının serum örneklerinde yapılan çalışmalarda, ayak ülseri bulunan diyabetik nefropati hastalarında sağlıklı kontrollere oranla sTRAIL seviyelerinin önemli oranda düşük olduğu bilinmektedir (Arik, Yalcin et al. 2013). Yine diyabetik nefropati hastalarında periferik kan mononükleer hücrelerinde TRAIL mRNA'sının ve serumda sTRAIL miktarlarının kontrollere göre önemli oranda düşük olduğu bildirilmiştir (Chang, Liang et al. 2018). Öyle ki, TRAIL uygulaması, renal morfolojik değişiklikleri ve TGF-beta tarafından indüklenen, diyabetik nefropati ile ilişkilendirilen mezenkimal geçişi de önlemiştir (Toffoli, Tonon et al. 2020). Çalışmamızda, TRAIL uygulaması sonrası, karaciğer yağlanmasında miktarının yükseldiği bilinen alkalik fosfat (ALP) değerlerinin yanı sıra total kolesterol ve serumdaki glukoz oranlarında da düşme gözledik (Şekil 4.23).

Sonuç olarak bulgularımız, TRAIL'ın obezite ve diyabette koruyucu rolünü destekler niteliktedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Diyabet sürecinde, beta hücre kitlesinde progresif azalma ve beta hücre fonksiyonunda düşüş gözlenmektedir. Bu süreçlerden sorumlu mekanizmaların daha iyi anlaşılması, diyabetin patogenezinin de daha iyi anlaşılmasını, dolayısıyla daha güçlü önleyici ve tedavi edici yaklaşımlar geliştirilebilmesini sağlayacaktır (Fujimoto and Polonsky 2009). Çalışmamızda, TRAIL genini kodlayan lentiviral vektörlerle (LV-TRAIL) ve çözülebilir TRAIL (sTRAIL) uygulaması ile, diyet indüklü olarak oluşturduğumuz obez hayvanlarda ve diyet indüklü ve STZ-aracılı oluşturduğumuz diyabetik hayvanlarda, TRAIL'ın antidiyabetik, antiinflamatuvar ve pankreasta proliferatif ve rejeneratif etkilerini araştırdık. Çalışmamızda kullandığımız üçüncü jenerasyon LVler, köken aldığı HIV-1 virüsünden farklı bir zarf proteini kodlaması, üretiminde vektör ve paketleme fonksiyonlarını ayıran en az 4 farklı plazmid kullanılması, bazı yapısal genlerinin çıkarılmış olması (ör: HIV-1'in replikasyonu için esansiyel olan *tat* geni), ve kendi kendilerini inaktive eden (SIN; self-inactivating) vektörler olarak üretilmeleri dolayısıyla, bugün gen transfer çalışmalarında en çok önerilen ve en fazla tercih edilen LV tipleridir. Tek uygulama ile uzun süreli ekspresyon sağlama potansiyeli de özellikle önemlidir.

LV-TRAIL aracılı TRAIL gen naklinin ve sTRAIL uygulamasının, diyabetli hayvanlarda kan şekeri düşürücü, insülin direncini azaltıcı, sistemik inflamasyonu azaltıcı ve pankreasta insülin sentezini artırıcı etkisini gözledik. Bunun yanında, TRAIL'ın pankreatik adacıklarda proliferatif Ki-67 belirtecinin ve rejeneratif PDX-1 belirtecinin ifadelerini artırdığını gözledik. TRAIL'ın beta hücrelerinin fonksiyonu ve sağ kalımı için özellikle önemli olan ve diyabette azaldığı bilinen PDX-1 ifadesini artırdığını gözlememiz ise önemli bir bulgu olarak, ileri araştırmalarımızda da yer alacak bir araştırma konusu olacaktır. Bu bulguların daha büyük diyabetik hayvan modellerinde (köpekler, domuzlar, primatlar ve kediler gibi) test edilmesinin de önemli ek bulgular sağlama potansiyeli mevcuttur.

Özlem YILMAZ'ın yüksek lisans tez çalışmasında, TRAIL'ın pankreatik beta hücrelerinde proinflamatuvar sitokinlere karşı koruyucu ve hücre canlılığını artırıcı etkilerini gözledik (YÖK Tez Merkezi tez no: 396220). Bir diğer çalışmamızda, TRAIL'ın pankreatik beta

hücreleri üzerinde proliferatif etkisini gösterdik (Kahraman, Yılmaz et al. 2021). Bu çalışmada gözlediğimiz *in vivo* etkiler de, TRAIL'ın obezite ve diyabetteki koruyucu rolünü destekler niteliktedir, ve ileri araştırmalara açık yeni bulgular içermektedir. TRAIL'ın gözlediğimiz etkilerinin, hastalık gelişim sürecinde farklı aşamalarda değişebileceği de göz önüne alınması gereken bir faktördür, ancak genel bulgular ağırlıklı olarak koruyucu rolü desteklemektedir. Bu özellikleri, TRAIL'ın diyabete karşı koruyucu ve/veya terapötik bir molekül olarak kullanılma potansiyelinin tam olarak açığa çıkarılabilesine katkı sağlayabileceğine inanıyoruz.



KAYNAKLAR

- Aktas, O., U. Schulze-Topphoff and F. Zipp (2007). "The role of TRAIL/TRAIL receptors in central nervous system pathology." Front Biosci **12**: 2912-2921.
- Amrani, A., J. Verdaguer, B. Anderson, T. Utsugi, S. Bou and P. Santamaria (1999). "Perforin-independent beta-cell destruction by diabetogenic CD8(+) T lymphocytes in transgenic nonobese diabetic mice." J Clin Invest **103**(8): 1201-1209.
- Arik, H. O., A. D. Yalcin, S. Gumuslu, G. E. Genc, A. Turan and A. D. Sanlioglu (2013). "Association of circulating sTRAIL and high-sensitivity CRP with type 2 diabetic nephropathy and foot ulcers." Med Sci Monit **19**: 712-715.
- Audo, R., C. Daïen, L. Papon, C. Lukas, O. Vittecoq, M. Hahne, B. Combe and J. Morel (2015). "Osteoprotegerin and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand as prognostic factors in rheumatoid arthritis: results from the ESPOIR cohort." Arthritis Res Ther **17**: 193.
- Aydin, C., A. D. Sanlioglu, B. Karacay, G. Ozbilim, L. Dertsiz, O. Ozbudak, C. A. Akdis and S. Sanlioglu (2007). "Decoy Receptor-2 Small Interfering RNA (siRNA) Strategy Employing Three Different siRNA Constructs in Combination Defeats Adenovirus-Transferred Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand Resistance in Lung Cancer Cells." Hum Gene Ther **18**: 39-50.
- Azijli, K., B. Weyhenmeyer, G. J. Peters, S. de Jong and F. A. Kruyt (2013). "Non-canonical kinase signaling by the death ligand TRAIL in cancer cells: discord in the death receptor family." Cell Death Differ **20**(7): 858-868.
- Bonner-Weir, S., D. F. Trent and G. C. Weir (1983). "Partial pancreatectomy in the rat and subsequent defect in glucose-induced insulin release." J Clin Invest **71**(6): 1544-1553.
- Bouwens, L., R. N. Wang, E. De Blay, D. G. Pipeleers and G. Kloppel (1994). "Cytokeratins as markers of ductal cell differentiation and islet neogenesis in the neonatal rat pancreas." Diabetes **43**(11): 1279-1283.
- Carbonaro-Sarracino, D. A., A. F. Tarantal, C. C. I. Lee, M. L. Kaufman, S. Wandro, X. Jin, M. Martinez, D. N. Clark, K. Chun, C. Koziol, C. L. Hardee, X. Wang and D. B. Kohn

(2020). "Dosing and Re-Administration of Lentiviral Vector for In Vivo Gene Therapy in Rhesus Monkeys and ADA-Deficient Mice." Mol Ther Methods Clin Dev **16**: 78-93.

Chang, W. W., W. Liang, X. M. Yao, L. Zhang, L. J. Zhu, C. Yan, Y. L. Jin and Y. S. Yao (2018). "Tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand expression in patients with diabetic nephropathy." J Renin Angiotensin Aldosterone Syst **19**(3): 1470320318785744.

Chellappan, D. K., N. S. Sivam, K. X. Teoh, W. P. Leong, T. Z. Fui, K. Chooi, N. Khoo, F. J. Yi, J. Chellian, L. L. Cheng, R. Dahiya, G. Gupta, G. Singhvi, S. Nammi, P. M. Hansbro and K. Dua (2018). "Gene therapy and type 1 diabetes mellitus." Biomed Pharmacother **108**: 1188-1200.

Cnop, M., N. Welsh, J. C. Jonas, A. Jorns, S. Lenzen and D. L. Eizirik (2005). "Mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 and type 2 diabetes: many differences, few similarities." Diabetes **54 Suppl 2**: S97-107.

Crabtree, J. S., P. C. Scacheri, J. M. Ward, S. R. McNally, G. P. Swain, C. Montagna, J. H. Hager, D. Hanahan, H. Edlund, M. A. Magnuson, L. Garrett-Beal, A. L. Burns, T. Ried, S. C. Chandrasekharappa, S. J. Marx, A. M. Spiegel and F. S. Collins (2003). "Of mice and MEN1: Insulinomas in a conditional mouse knockout." Mol Cell Biol **23**(17): 6075-6085.

de Miguel, D., J. Lemke, A. Anel, H. Walczak and L. Martinez-Lostao (2016). "Onto better TRAILs for cancer treatment." Cell Death Differ **23**(5): 733-747.

Degli-Esposti, M. A., W. C. Dougall, P. J. Smolak, J. Y. Waugh, C. A. Smith and R. G. Goodwin (1997). "The novel receptor TRAIL-R4 induces NF-kappaB and protects against TRAIL-mediated apoptosis, yet retains an incomplete death domain." Immunity **7**(6): 813-820.

Degli-Esposti, M. A., P. J. Smolak, H. Walczak, J. Waugh, C. P. Huang, R. F. DuBose, R. G. Goodwin and C. A. Smith (1997). "Cloning and characterization of TRAIL-R3, a novel member of the emerging TRAIL receptor family." J Exp Med **186**(7): 1165-1170.

Deshpande, A. D., M. Harris-Hayes and M. Schootman (2008). "Epidemiology of diabetes and diabetes-related complications." Phys Ther **88**(11): 1254-1264.

Di Bartolo, B. A., J. Chan, M. R. Bennett, S. Cartland, S. Bao, B. E. Tuch and M. M. Kavurma (2011). "TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) protects against diabetes and atherosclerosis in Apoe / mice." Diabetologia **54**(12): 3157-3167.

Dickens, L. S., R. S. Boyd, R. Jukes-Jones, M. A. Hughes, G. L. Robinson, L. Fairall, J. W. Schwabe, K. Cain and M. Macfarlane (2012). "A death effector domain chain DISC model reveals a crucial role for caspase-8 chain assembly in mediating apoptotic cell death." Mol Cell **47**(2): 291-305.

Dirice, E., S. Kahraman, G. O. Elpek, C. Aydin, M. K. Balci, A. Omer, S. Sanlioglu and A. D. Sanlioglu (2011). "TRAIL and DcR1 expressions are differentially regulated in the pancreatic islets of STZ- versus CY-applied NOD mice." Exp Diabetes Res **2011**: 625813.

Dirice, E., A. D. Sanlioglu, S. Kahraman, S. Ozturk, M. K. Balci, A. Omer, T. S. Griffith and S. Sanlioglu (2009). "Adenovirus-mediated TRAIL gene (Ad5hTRAIL) delivery into pancreatic islets prolongs normoglycemia in streptozotocin-induced diabetic rats." Hum Gene Ther **20**(10): 1177-1189.

Dor, Y., J. Brown, O. I. Martinez and D. A. Melton (2004). "Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation." Nature **429**(6987): 41-46.

Dor, Y. and D. A. Melton (2004). "How important are adult stem cells for tissue maintenance?" Cell Cycle **3**(9): 1104-1106.

Emery, J. G., P. McDonnell, M. B. Burke, K. C. Deen, S. Lyn, C. Silverman, E. Dul, E. R. Appelbaum, C. Eichman, R. DiPrinzio, R. A. Dodds, I. E. James, M. Rosenberg, J. C. Lee and P. R. Young (1998). "Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL." J Biol Chem **273**(23): 14363-14367.

Englbrecht, C. C. and A. Facius (2005). "Bioinformatics challenges in proteomics." Comb Chem High Throughput Screen **8**(8): 705-715.

Escors, D. and K. Breckpot (2010). "Lentiviral vectors in gene therapy: their current status and future potential." Arch Immunol Ther Exp (Warsz) **58**(2): 107-119.

Fajas, L., J. S. Annicotte, S. Miard, D. Sarruf, M. Watanabe and J. Auwerx (2004). "Impaired pancreatic growth, beta cell mass, and beta cell function in E2F1 (-/-)mice." J Clin Invest **113**(9): 1288-1295.

Falschlehner, C., C. H. Emmerich, B. Gerlach and H. Walczak (2007). "TRAIL signalling: decisions between life and death." Int J Biochem Cell Biol **39**(7-8): 1462-1475.

Flier, S. N., R. N. Kulkarni and C. R. Kahn (2001). "Evidence for a circulating islet cell growth factor in insulin-resistant states." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(13): 7475-7480.

Fujimoto, K. and K. S. Polonsky (2009). "Pdx1 and other factors that regulate pancreatic beta-cell survival." Diabetes Obes Metab **11 Suppl 4**(Suppl 4): 30-37.

Funcke, J. B., V. Zoller, M. A. El Hay, K. M. Debatin, M. Wabitsch and P. Fischer-Posovszky (2015). "TNF-related apoptosis-inducing ligand promotes human preadipocyte proliferation via ERK1/2 activation." FASEB J **29**(7): 3065-3075.

Georgia, S. and A. Bhushan (2004). "Beta cell replication is the primary mechanism for maintaining postnatal beta cell mass." J Clin Invest **114**(7): 963-968.

Giuliani, M., W. Moritz, E. Bodmer, D. Dindo, P. Kugelmeier, R. Lehmann, M. Gassmann, P. Groscurth and M. Weber (2005). "Central necrosis in isolated hypoxic human pancreatic islets: evidence for postisolation ischemia." Cell Transplant **14**(1): 67-76.

Gong, B. and A. Almasan (2000). "Genomic organization and transcriptional regulation of human Apo2/TRAIL gene." Biochem Biophys Res Commun **278**(3): 747-752.

Gradwohl, G., A. Dierich, M. LeMeur and F. Guillemot (2000). "neurogenin3 is required for the development of the four endocrine cell lineages of the pancreas." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(4): 1607-1611.

Gu, G., J. Dubauskaite and D. A. Melton (2002). "Direct evidence for the pancreatic lineage: NGN3+ cells are islet progenitors and are distinct from duct progenitors." Development **129**(10): 2447-2457.

Guicciardi, M. E. and G. J. Gores (2009). "Life and death by death receptors." FASEB J **23**(6): 1625-1637.

Hariri, N. and L. Thibault (2010). "High-fat diet-induced obesity in animal models." Nutrition research reviews **23**(2): 270-299.

Harith, H. H., M. J. Morris and M. M. Kavurma (2013). "On the TRAIL of obesity and diabetes." Trends Endocrinol Metab **24**(11): 578-587.

Harvey, M., H. Vogel, E. Y. Lee, A. Bradley and L. A. Donehower (1995). "Mice deficient in both p53 and Rb develop tumors primarily of endocrine origin." Cancer Res **55**(5): 1146-1151.

Hayashi, K., R. Kojima and M. Ito (2006). "Strain differences in the diabetogenic activity of streptozotocin in mice." Biol Pharm Bull **29**(6): 1110-1119.

Hilliard, B., A. Wilmen, C. Seidel, T. S. Liu, R. Goke and Y. Chen (2001). "Roles of TNF-related apoptosis-inducing ligand in experimental autoimmune encephalomyelitis." J Immunol **166**(2): 1314-1319.

Huang, K., J. Zhang, K. L. O'Neill, C. B. Gurumurthy, R. M. Quadros and X. Luo (2016). "Cleavage by Caspase 8 and Mitochondrial Membrane Association Activate Bid during TRAIL-induced Apoptosis." J Biol Chem.

Huang, Y., N. Erdmann, H. Peng, Y. Zhao and J. Zheng (2005). "The role of TNF related apoptosis-inducing ligand in neurodegenerative diseases." Cell Mol Immunol **2**(2): 113-122.

Hymowitz, S. G., M. P. O'Connell, M. H. Ultsch, A. Hurst, K. Totpal, A. Ashkenazi, A. M. de Vos and R. F. Kelley (2000). "A unique zinc-binding site revealed by a high-resolution X-ray structure of homotrimeric Apo2L/TRAIL." Biochemistry **39**(4): 633-640.

Iglesias, A., M. Murga, U. Laresgoiti, A. Skoudy, I. Bernales, A. Fullaondo, B. Moreno, J. Lloreta, S. J. Field, F. X. Real and A. M. Zubiaga (2004). "Diabetes and exocrine pancreatic insufficiency in E2F1/E2F2 double-mutant mice." J Clin Invest **113**(10): 1398-1407.

Kahn, C. R., Gordon, C.W., King, G.L. (2005). Joslin's Diabetes Mellitus, Lippincott Williams & Wilkins.

Kahraman Dirice, S. (2014). TRAIL'in Pankreatik Beta Hücreleri Üzerindeki Proliferatif Etkisinin Araştırılması. PhD, Akdeniz Üniversitesi.

Kahraman, S. (2014). TRAIL'in Pankreatik Beta Hücreleri Üzerindeki Proliferatif Etkisinin Arastirilmesi. PhD, Akdeniz Üniversitesi, Tıp Fakultesi, .

Kahraman, S., O. Yilmaz, H. A. Altunbas, E. Dirice and A. D. Sanlioglu (2021). "TRAIL induces proliferation in rodent pancreatic beta cells via AKT activation." J Mol Endocrinol **66**(4): 325-338.

Kamiya, T., M. Sameshima-Kamiya, R. Nagamine, M. Tsubata, M. Ikeguchi, K. Takagaki, T. Shimada and M. Aburada (2012). "The crude extract from puerariae flower exerts antiobesity and antifatty liver effects in high-fat diet-induced obese mice." Evid Based Complement Alternat Med **2012**: 272710.

Kang, S., E. J. Park, Y. Joe, E. Seo, M. K. Park, S. Y. Seo, H. Y. Chung, Y. H. Yoo, D. K. Kim and H. J. Lee (2010). "Systemic delivery of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) elevates levels of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) and prevents type 1 diabetes in nonobese diabetic mice." Endocrinology **151**(12): 5638-5646.

Karadimos, M. J., A. Kapoor, I. El Khattabi and A. Sharma (2012). "beta-cell preservation and regeneration for diabetes treatment: where are we now?" Diabetes Manag (Lond) **2**(3): 213-222.

Kavurma, M. M., M. Schoppet, Y. V. Bobryshev, L. M. Khachigian and M. R. Bennett (2008). "TRAIL stimulates proliferation of vascular smooth muscle cells via activation of NF-kappaB and induction of insulin-like growth factor-1 receptor." J Biol Chem **283**(12): 7754-7762.

Kohler, C. U., A. Kreuter, M. C. Rozynkowski, T. Rahmel, W. Uhl, A. Tannapfel, W. E. Schmidt and J. J. Meier (2010). "Validation of different replication markers for the detection of beta-cell proliferation in human pancreatic tissue." Regul Pept **162**(1-3): 115-121.

Koksai, I. T., A. D. Sanlioglu, B. Karacay, T. S. Griffith and S. Sanlioglu (2008). "Tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand-R4 decoy receptor expression is correlated with high Gleason scores, prostate-specific antigen recurrence, and decreased survival in patients with prostate carcinoma." Urol Oncol **26**(2): 158-165.

Koliaki, C. and N. Katsilambros (2022). "Repositioning the Role of Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL) on the TRAIL to the Development of Diabetes Mellitus: An Update of Experimental and Clinical Evidence." Int J Mol Sci **23**(6).

Kondo, Y., T. Toyoda, N. Inagaki and K. Osafune (2018). "iPSC technology-based regenerative therapy for diabetes." J Diabetes Investig **9**(2): 234-243.

Kubota, N., K. Tobe, Y. Terauchi, K. Eto, T. Yamauchi, R. Suzuki, Y. Tsubamoto, K. Komeda, R. Nakano, H. Miki, S. Satoh, H. Sekihara, S. Sciacchitano, M. Lesniak, S.

Aizawa, R. Nagai, S. Kimura, Y. Akanuma, S. I. Taylor and T. Kadowaki (2000). "Disruption of insulin receptor substrate 2 causes type 2 diabetes because of liver insulin resistance and lack of compensatory beta-cell hyperplasia." Diabetes **49**(11): 1880-1889.

Kushner, J. A., M. A. Ciemerych, E. Sicinska, L. M. Wartschow, M. Teta, S. Y. Long, P. Sicinski and M. F. White (2005). "Cyclins D2 and D1 are essential for postnatal pancreatic beta-cell growth." Mol Cell Biol **25**(9): 3752-3762.

Lamhamedi-Cherradi, S. E., S. Zheng, R. M. Tisch and Y. H. Chen (2003). "Critical roles of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in type 1 diabetes." Diabetes **52**(9): 2274-2278.

Latres, E., M. Malumbres, R. Sotillo, J. Martin, S. Ortega, J. Martin-Caballero, J. M. Flores, C. Cordon-Cardo and M. Barbacid (2000). "Limited overlapping roles of P15(INK4b) and P18(INK4c) cell cycle inhibitors in proliferation and tumorigenesis." EMBO J **19**(13): 3496-3506.

Longnecker, D. S. (2021). Anatomy and Histology of the Pancreas. The Pancreas Biology and Physiology. J. A. W. Fred S. Gorelick. United States of America, Michigan Publishing.

Luo, J., J. Quan, J. Tsai, C. K. Hobensack, C. Sullivan, R. Hector and G. M. Reaven (1998). "Nongenetic mouse models of non-insulin-dependent diabetes mellitus." Metabolism **47**(6): 663-668.

Lutz, T. A. and S. C. Woods (2012). "Overview of animal models of obesity." Curr Protoc Pharmacol **Chapter 5**: Unit5 61.

Meier, J. J., A. E. Butler, Y. Saisho, T. Monchamp, R. Galasso, A. Bhushan, R. A. Rizza and P. C. Butler (2008). "Beta-cell replication is the primary mechanism subserving the postnatal expansion of beta-cell mass in humans." Diabetes **57**(6): 1584-1594.

Merino, D., N. Lalaoui, A. Morizot, E. Solary and O. Micheau (2007). "TRAIL in cancer therapy: present and future challenges." Expert Opin Ther Targets **11**(10): 1299-1314.

Mert, U. and A. D. Sanlioglu (2017). "Intracellular localization of DR5 and related regulatory pathways as a mechanism of resistance to TRAIL in cancer." Cell Mol Life Sci **74**(2): 245-255.

Meurette, O., L. Huc, A. Rebillard, G. Le Moigne, D. Lagadic-Gossmann and M. T. Dimanche-Boitrel (2005). "TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) induces

necrosis-like cell death in tumor cells at acidic extracellular pH." Ann N Y Acad Sci **1056**: 379-387.

Mi, Q. S., D. Ly, S. E. Lamhamedi-Cherradi, K. V. Salojin, L. Zhou, M. Grattan, C. Meagher, P. Zucker, Y. H. Chen, J. Nagle, D. Taub and T. L. Delovitch (2003). "Blockade of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand exacerbates type 1 diabetes in NOD mice." Diabetes **52**(8): 1967-1975.

Milone, M. C. and U. O'Doherty (2018). "Clinical use of lentiviral vectors." Leukemia **32**(7): 1529-1541.

Mirandola, P., C. Ponti, G. Gobbi, I. Sponzilli, M. Vaccarezza, L. Cocco, G. Zauli, P. Secchiero, F. A. Manzoli and M. Vitale (2004). "Activated human NK and CD8⁺ T cells express both TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and TRAIL receptors but are resistant to TRAIL-mediated cytotoxicity." Blood **104**(8): 2418-2424.

Murase, T., M. Aoki, T. Wakisaka, T. Hase and I. Tokimitsu (2002). "Anti-obesity effect of dietary diacylglycerol in C57BL/6J mice: dietary diacylglycerol stimulates intestinal lipid metabolism." J Lipid Res **43**(8): 1312-1319.

Nagane, M., H. J. Huang and W. K. Cavenee (2001). "The potential of TRAIL for cancer chemotherapy." Apoptosis **6**(3): 191-197.

Nir, T., D. A. Melton and Y. Dor (2007). "Recovery from diabetes in mice by beta cell regeneration." J Clin Invest **117**(9): 2553-2561.

Noguchi, H., H. Kaneto, G. C. Weir and S. Bonner-Weir (2003). "PDX-1 protein containing its own antenapedia-like protein transduction domain can transduce pancreatic duct and islet cells." Diabetes **52**(7): 1732-1737.

Olgun, H. B., H. M. Tasyurek, A. D. Sanlioglu and S. Sanlioglu (2018). "High-Titer Production of HIV-Based Lentiviral Vectors in Roller Bottles for Gene and Cell Therapy." Methods Mol Biol.

Olgun, H. B., H. M. Tasyurek, A. D. Sanlioglu and S. Sanlioglu (2019). "High-Titer Production of HIV-Based Lentiviral Vectors in Roller Bottles for Gene and Cell Therapy." Methods Mol Biol **1879**: 323-345.

Pan, G., K. O'Rourke, A. M. Chinnaiyan, R. Gentz, R. Ebner, J. Ni and V. M. Dixit (1997). "The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL." Science **276**(5309): 111-113.

Paris, M., C. Tourrel-Cuzin, C. Plachot and A. Ktorza (2004). "Review: pancreatic beta-cell neogenesis revisited." Exp Diabetes Res **5**(2): 111-121.

Parsons, J. A., T. C. Brelje and R. L. Sorenson (1992). "Adaptation of islets of Langerhans to pregnancy: increased islet cell proliferation and insulin secretion correlates with the onset of placental lactogen secretion." Endocrinology **130**(3): 1459-1466.

Pei, X. H., F. Bai, T. Tsutsui, H. Kiyokawa and Y. Xiong (2004). "Genetic evidence for functional dependency of p18Ink4c on Cdk4." Mol Cell Biol **24**(15): 6653-6664.

Pimentel, J. M., J. Y. Zhou and G. S. Wu (2023). "The Role of TRAIL in Apoptosis and Immunosurveillance in Cancer." Cancers (Basel) **15**(10).

Pitti, R. M., S. A. Marsters, S. Ruppert, C. J. Donahue, A. Moore and A. Ashkenazi (1996). "Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family." J Biol Chem **271**(22): 12687-12690.

Ralff, M. D. and W. S. El-Deiry (2018). "TRAIL pathway targeting therapeutics." Expert Rev Precis Med Drug Dev **3**(3): 197-204.

Robertson, R. P. (2004). "Islet transplantation as a treatment for diabetes - a work in progress." N Engl J Med **350**(7): 694-705.

Sakuma, T., M. A. Barry and Y. Ikeda (2012). "Lentiviral vectors: basic to translational." Biochem J **443**(3): 603-618.

Sanlioglu, A. D., E. Dirice, O. Elpek, A. F. Korcum, M. K. Balci, A. Omer, T. S. Griffith and S. Sanlioglu (2008). "High levels of endogenous tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand expression correlate with increased cell death in human pancreas." Pancreas **36**(4): 385-393.

Sanlioglu, A. D., B. Karacay, I. T. Koksak, T. S. Griffith and S. Sanlioglu (2007). "DcR2 (TRAIL-R4) siRNA and adenovirus delivery of TRAIL (Ad5hTRAIL) break down in vitro tumorigenic potential of prostate carcinoma cells." Submitted.

Secchiero, P., C. Zerbinati, E. Rimondi, F. Corallini, D. Milani, V. Grill, G. Forti, S. Capitani and G. Zauli (2004). "TRAIL promotes the survival, migration and proliferation of vascular smooth muscle cells." Cell Mol Life Sci **61**(15): 1965-1974.

Shaer, A., N. Azarpira and M. H. Karimi (2014). "Differentiation of human induced pluripotent stem cells into insulin-like cell clusters with miR-186 and miR-375 by using chemical transfection." Appl Biochem Biotechnol **174**(1): 242-258.

Shapiro, A. M., J. R. Lakey, E. A. Ryan, G. S. Korbutt, E. Toth, G. L. Warnock, N. M. Kneteman and R. V. Rajotte (2000). "Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen." N Engl J Med **343**(4): 230-238.

Snajdauf, M., K. Havlova, J. Vachtenheim, Jr., A. Ozaniak, R. Lischke, J. Bartunkova, D. Smrz and Z. Strizova (2021). "The TRAIL in the Treatment of Human Cancer: An Update on Clinical Trials." Front Mol Biosci **8**: 628332.

Song, J. H., M. C. Tse, A. Bellail, S. Phuphanich, F. Khuri, N. M. Kneteman and C. Hao (2007). "Lipid rafts and nonrafts mediate tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand induced apoptotic and nonapoptotic signals in non small cell lung carcinoma cells." Cancer Res **67**(14): 6946-6955.

Song, K., Y. Chen, R. Goke, A. Wilmen, C. Seidel, A. Goke and B. Hilliard (2000). "Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) is an inhibitor of autoimmune inflammation and cell cycle progression." J Exp Med **191**(7): 1095-1104.

Srinivasan, K. and P. Ramarao (2007). "Animal models in type 2 diabetes research: an overview." Indian J Med Res **125**(3): 451-472.

Surwit, R. S., C. M. Kuhn, C. Cochrane, J. A. McCubbin and M. N. Feinglos (1988). "Diet-induced type II diabetes in C57BL/6J mice." Diabetes **37**(9): 1163-1167.

Takahashi, K. and S. Yamanaka (2006). "Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors." Cell **126**(4): 663-676.

Teta, M., M. M. Rankin, S. Y. Long, G. M. Stein and J. A. Kushner (2007). "Growth and regeneration of adult beta cells does not involve specialized progenitors." Dev Cell **12**(5): 817-826.

Toffoli, B., F. Tonon, V. Tisato, A. Michelli, G. Zauli, P. Secchiero, B. Fabris and S. Bernardi (2020). "TRAIL treatment prevents renal morphological changes and TGF-beta-induced mesenchymal transition associated with diabetic nephropathy." Clin Sci (Lond) **134**(17): 2337-2352.

Trucco, M. (2005). "Regeneration of the pancreatic beta cell." J Clin Invest **115**(1): 5-12.

Turk, J., J. A. Corbett, S. Ramanadham, A. Bohrer and M. L. McDaniel (1993). "Biochemical evidence for nitric oxide formation from streptozotocin in isolated pancreatic islets." Biochem Biophys Res Commun **197**(3): 1458-1464.

Varfolomeev, E., H. Maecker, D. Sharp, D. Lawrence, M. Renz, D. Vucic and A. Ashkenazi (2005). "Molecular determinants of kinase pathway activation by Apo2 ligand/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand." J Biol Chem **280**(49): 40599-40608.

Walczak, H., M. A. Degli-Esposti, R. S. Johnson, P. J. Smolak, J. Y. Waugh, N. Boiani, M. S. Timour, M. J. Gerhart, K. A. Schooley, C. A. Smith, R. G. Goodwin and C. T. Rauch (1997). "TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL." EMBO J **16**(17): 5386-5397.

Weir, C. B. and A. Jan (2023). BMI Classification Percentile And Cut Off Points. StatPearls. Treasure Island (FL) ineligible companies. Disclosure: Arif Jan declares no relevant financial relationships with ineligible companies.

Weir, G. C., J. Gaglia and S. Bonner-Weir (2020). "Inadequate beta-cell mass is essential for the pathogenesis of type 2 diabetes." Lancet Diabetes Endocrinol **8**(3): 249-256.

Wiley, S. R., K. Schooley, P. J. Smolak, W. S. Din, C. P. Huang, J. K. Nicholl, G. R. Sutherland, T. D. Smith, C. Rauch, C. A. Smith and et al. (1995). "Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis." Immunity **3**(6): 673-682.

Zauli, G., A. Pandolfi, A. Gonelli, R. Di Pietro, S. Guarnieri, G. Ciabattini, R. Rana, M. Vitale and P. Secchiero (2003). "Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) sequentially upregulates nitric oxide and prostanoid production in primary human endothelial cells." Circ Res **92**(7): 732-740.

Zhang, X. D., T. Nguyen, W. D. Thomas, J. E. Sanders and P. Hersey (2000). "Mechanisms of resistance of normal cells to TRAIL induced apoptosis vary between different cell types." FEBS Lett **482**(3): 193-199.

Zhong, F. and Y. Jiang (2019). "Endogenous Pancreatic beta Cell Regeneration: A Potential Strategy for the Recovery of beta Cell Deficiency in Diabetes." Front Endocrinol (Lausanne) **10**: 101.

ÖZGEÇMİŞ

GENEL

ADI ve SOYADI: ÖZLEM YILMAZ
E-MAIL:

EĞİTİM

ÖĞRENİM DÖNEMİ	DERECE	KURUM	ÖĞRENİM ALANI
2015-	DOKTORA	Akdeniz Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Ve Genetik Anabilim Dalı	Tıbbi Biyoloji
2010-2014	YÜKSEK LİSANS	Akdeniz Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Ve Genetik Anabilim Dalı	Tıbbi Genetik
2010-2013	ÖN LİSANS	Anadolu Üniversitesi	Sağlık Kurumları İşletmeciliği
2005-2009	LİSANS	Niğde Üniversitesi	Biyoloji
1999-2003	LİSE	Antalya Aldemir Atilla Konuk Anadolu Lisesi	Sayısal

MAKALELER

1. Duran Canatan, Yonca Sönmez, Özlem Yılmaz, Hasan Şenol Coşkun, Sema Sezgin Göksu, Selda Uçar, Mehmet Rıfkı Aktekin. “ <i>The importance of microRNAs as a biomarker in lung cancer</i> ”. Acta Biomed, 2023, Feb:13;94(1).
2. Duran Canatan, Özlem Yılmaz , Yonca Sönmez, Abdullah Çim, Mehmet Baykara, Murat Savaş, Hasan Şenol Coşkun, Sema Sezgin Göksu, Mehmet Rıfkı Aktekin. “ <i>Use of MicroRNAs as biomarkers in the early diagnosis of prostate cancer</i> ”. Acta Biomed, 2022; Vol. 93, N. 3: e2022089.

3.	Duran Canatan, Özlem Yılmaz , Yonca Sönmez, Abdullah Çim, Hasan Şenol Coşkun, Sema Sezgin Göksu, Selda Uçar, Mehmet Rıfki Aktekin. “ <i>Circulating microRNAs as Potential Non-invasive Biomarkers for Breast Cancer Detection</i> ”. Acta Biomed, 05.2021; Vol. 92, N. 2: e2021028.
4.	Sevim Kahraman, Özlem Yılmaz , Hasan Ali Altunbaş, Ercüment Dirice, Ahter Dilşad Şanlıoğlu. “ <i>TRAIL induces proliferation in rodent pancreatic beta cells via AKT activation</i> ”. Journal of Molecular Endocrinology, 2021, May 11:66.
5.	Duran Canatan, Özlem Yılmaz , Yonca Sönmez, Abdullah Çim, Hasan Şenol Coşkun, Sema Sezgin Göksu, Selda Uçar, Mehmet Rıfki Aktekin. “ <i>MicroRNAs as biomarkers for breast cancer</i> ”. Acta Biomed 05.2021; Vol. 92(2).
6.	Ali R. Özeş, Nick Pulliam, Mustafa Gökhan Ertosun, Özlem Yılmaz , Jessica Tang, Ece Çopuroğlu, Daniela Matei, Osman Nidai Özeş, Kenneth Nephew. “ <i>Protein kinase A-mediated phosphorylation regulates STAT3 activation and oncogenic EZH2 activity</i> ”. Oncogene, 2018, Jun: 37(26).
7.	M Aslan, E Kırac, Özlem Yılmaz , B Ünal, EK Konuk, F Özcan, H Tuzcu. “ <i>Effect of tauroursodeoxycholic acid on PUFA levels and inflammation in an animal and cell model of hepatic endoplasmic reticulum stress</i> ”. Human and Experimental Toxicology, 2017, Oct 13.

KURS, SEMPOZYUM ve KONGRELER

TARİH	KONU
22-25 Kasım 2018	9. Ulusal Obezite Kongresi Multidisipliner Tanı ve Tedavi Kursu
22-25 Kasım 2018	9. Ulusal Obezite Kongresi
25 Nisan 2018	Hücreden Hasta Yatağına : DNA Sempozyumu
23-26 Kasım 2017	8. Ulusal Obezite Kongresi Multidisipliner Obezite Tedavisi Kursu
23-26 Kasım 2017	8. Ulusal Obezite Kongresi

19-23 Nisan 2017	53. Ulusal Diyabet Kongresi
26-29 Ekim 2017	XV. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi
23 Haziran 2013	Akdeniz Üniversitesi Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası
1 Kasım 2010	Kurs: Kemoterapi Manuel İlaç Hazırlama Sitotoksik İlaç uygulamaları Temiz Oda ve Aseptik Çalışma İlkeleri CytoCare™ robotu ve CytoPlan yazılımı
23 Mart 2009	Kurs: IVRS aranması Hasta monitörizasyonu İlaç hazırlanması EKG çekimi kursu

BİLDİRİLER

- Özlem Yılmaz**, Gizem Şeker, Büşra Çetin, Ersin Akıncı, Hasan Ali Altunbaş, Ahter Dilşad Şanlıoğlu. “*Yeniden Programlama Faktörlerini Kodlayan Mini İntronik Plazmitlerle İnsan Embriyonik Böbrek Hücrelerinden Uyarılmış Pluripotent Kök Hücre Eldesi*”. İstinye Üniversitesi Kök Hücre ve Doku Mühendisliği Sempozyumu, Sözlü Sunum, 27-28 Şubat 2021.
- Gökhan Görgişen, Fatma Zehra Hapil, **Özlem Yılmaz**, Zafer Çetin, Suray Pehlivanoglu, Irem Hicran Özbudak, Abdullah Erdogan, Osman Nidai Ozes. “*Identification of novel mutations of Insulin Receptor Substrate 1 (IRS1) in tumor samples of non-small cell lung cancer (NSCLC): Implications for aberrant insulin signaling in development of cancer*”. Genetics and Molecular Biology, Jan-Mar; 42(1), 15-25, 2019.
- Özlem Yılmaz**, Hasan Ali Altunbaş, Ahter Dilşad Şanlıoğlu. “*TRAIL increases glucose-stimulated insulin secretion in Min6 cells*”. European Society of Gene and Cell Therapy, (P471), 2019 Barcelona, Spain.

4. Özlem Yılmaz , Gizem Şeker, Ahter Dilşad Şanlıoğlu, Hasan Ali Altunbaş. “ <i>Lentiviral-mediated TRAIL transfer decreased serum alkaline phosphatase, total cholesterol, and glucose levels in high-fat diet-fed obese mice</i> ”. European Society of Gene and Cell Therapy, (P467), 2019, Barcelona, Spain.
5. Özlem Yılmaz , Gizem Şeker, Ahter Dilşad Şanlıoğlu, Hasan Ali Altunbaş. “ <i>Resistance in human foreskin fibroblasts against lipofectamine-aided transfection of CoMiP plasmids</i> ”. European Society of Gene and Cell Therapy, (P398), 2019 Barcelona, Spain.
6. Sabriye Kaya, Ebru Afşar, Mutay Aslan, Özlem Yılmaz . “ <i>Thymoquinone upregulates neutral sphingomyelinase activity and ceramide levels in MCF7 cells</i> ”, Biochemistry Congress, (S-116), 2018, Muğla
7. Ebru Afşar, Özlem Yılmaz , Sabriye Kaya, Mutay Aslan. “ <i>Antiproliferative effects of thymoquinone in HEPG2 cells involve increased ceramide and Caspase 3</i> ”. Biochemistry Congress, (S-115), 2018, Muğla
8. Özlem Yılmaz , Ufuk Mert, Ahter Dilşad Şanlıoğlu, Hasan Ali Altunbaş. “ <i>TRAIL gen aktarımının tip 2 diyabet ve obez C57BL6 fare modellerinde insulin direncini ve bozulmuş glukoz toleransını hafifletici etkisi</i> ”. (SB-01), 8. Ulusal Obezite Kongresi, 2017, İstanbul
9. E.Kıraç, Özlem Yılmaz , M. Aslan “ <i>Comparative cytotoxic and cytoprotective effect of tauroursodeoxylic acid on tunicamycin treated human liver epithelial THLE-3 cells</i> ”. (P-03.04.4-007), 2016, Prag
10. Özlem Yılmaz , Ufuk Mert, Hasan Ali Altunbaş, Ahter Dilşad Şanlıoğlu. “ <i>Lentiviral vector-mediated TRAIL transfer together with sTRAIL application improved obesity and tye 2 diabetes-related abnormalities in C57BL6 mice</i> ” Stem Cells and Gene Therapy, (P353), 2016, İtalya
11. Özlem Yılmaz , Ahter Dilşad Şanlıoğlu. “ <i>TRAIL’in beta hücrelerini proinflatuar sitokinlere karşı koruyucu etkisi, DR5 ölüm reseptöründe azalma ve DcR1 yalancı reseptöründe artış ile korelasyon gösterdi</i> ”. (P-04.02.2-020), 2016, FEBS
12. Ufuk Mert, Özlem Yılmaz , Hasan Ali Altunbaş, Ahter Dilşad Şanlıoğlu. “ <i>C57BL6 farelerde Tip 2 Diyabet oluşturmak için etkin bir yöntem</i> ”. XIV. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi. (Uluslararası Katılımlı) (SS-16, Sözlü Sunum), 2015, Fethiye
13. Özlem Yılmaz , Kamil Savaş, Ahter Dilşad Şanlıoğlu, “ <i>TRAIL’in beta hücrelerini proinflatuar sitokinlere karşı koruyucu etkisi</i> ”, XIV. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi (Uluslararası Katılımlı) (SS-05, Sözlü Sunum), 2015, Fethiye

14. Gökhan Görgişen, Özlem Yılmaz , Osman Nidai Özeş. “ <i>p38 MAPK Aracılı İnsülin Reseptör Substrat 1</i> proteininin serin bölgelerinden fosforilasyonu hücre proliferasyonunda ve insülin direncinde önemli rol oynamaktadır”. XIV.Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi (Uluslararası Katılımlı), 2015, Fethiye
15. Gökhan Görgişen, Özlem Yılmaz , Osman Nidai Özeş. “ <i>p38 MAPK Aracılı IRS1 (İnsülin Reseptör Substrat 1)</i> proteini serin fosforilasyonu hücre proliferasyonunda önemli rol oynamaktadır”. 21. Ulusal Kanser Kongresi, 2015, Antalya
16. Gökhan Görgişen, Özlem Yılmaz , Osman Nidai Özeş. “ <i>p38 MAPK aracılı IRS1 (İnsülin Reseptör Substrat 1)</i> proteini serin fosforilasyonu hücre proliferasyonunda önemli rol oynamaktadır”. 21. Ulusal Kanser Kongresi, 2015, Antalya
17. Gökhan Görgişen, Özlem Yılmaz , Zafer Çetin, Suray Pehlivanoglu, Abdullah Erdoğan, Osman Nidai Özeş. “ <i>Küçük hücreli olmayan akciğer tümörlerinde meydana gelen İnsülin Reseptör Substrat 1 Geni p.S668T ve p.D674H değişimleri hücre proliferasyonunda önemli rol oynamaktadır</i> ”. 21. Ulusal Kanser Kongresi, 2015, Antalya
18. Gökhan Görgişen, Özlem Yılmaz , Zafer Çetin, Suray Pehlivanoglu, Abdullah Erdoğan, Osman Nidai Özeş. “ <i>Küçük hücreli olmayan akciğer tümör dokularında (NSCLC) İnsülin Reseptör Substrat 1 (IRS1) geni karboksi terminal bölgesinde meydana gelen değişimlerin taranması</i> ”. Tıbbi Genetik Kongresi, 2014, İstanbul

ÖDÜLLER/BURSLAR

TARİH	ÖDÜL/BURS
23-26 Kasım 2017	8. Ulusal Obezite Kongresi Sözlü Sunum Birincilik Ödülü , 2017, İstanbul. Özlem Yılmaz , Ufuk Mert, Ahter Dilşad Şanlıoğlu, Hasan Ali Altunbaş. “TRAIL gen aktarımının tip 2 diyabet ve obez C57BL6 fare modellerinde insulün direncini ve bozulmuş glukoz toleransını hafifletici etkisi”.
1-5 Ekim 2017	Uluslararası Katılımlı Kongre & Lab Expo Poster Bildiri Birincilik Ödülü , 2017, Antalya. Ebru Kırarç, Mutay Aslan, Özlem Yılmaz, Betül Ünal, Esmâ Kırmınoğlu Konuk, Filiz Özcan, Hazal Tuzcu. “Karaciğer endoplazmik retikulum stresinde Pufa düzeyleri ve inflamasyon üzerinde Tudca’nın etkisi”.
19-23 Nisan	53. Ulusal Diyabet Kongresi Sözlü Sunum İkincilik Ödülü , 2017, Kıbrıs. Özlem Yılmaz , Ufuk Mert, Hasan Ali Altunbaş, Asef Moballeghe, Ahter Dilşad Şanlıoğlu. “Lentiviral vektör aracılı TRAIL ve çözülebilir TRAIL’ın

2017	birlikte uygulanması, C57BL6 farelerde obezite ve tip 2 diyabet ile ilişkili bulguları hafifletici etki gösterdi”.
22-26 Nisan 2015	21. Ulusal Kanser Kongresi Sözlü Sunum Birincilik Ödülü , 2015, Antalya. Gökhan Görgişen, Özlem Yılmaz , Zafer Çetin, Suray Pehlivanoglu, Abdullah Erdoğan, Osman Nidai Özeş. “Küçük hücreli olmayan akciğer tümörlerinde meydana gelen İnsülin Reseptör Substrat 1 Geni p.S668T ve p.D674H değişimleri hücre proliferasyonunda önemli rol oynamaktadır”.
27-30 Ekim 2015	XIV. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi (Uluslararası Katılımlı), Prof. Dr. Altan Günalp Araştırma İkincilik Ödülü , 2015, Antalya. Gokhan Görgişen, Özlem Yılmaz , Zafer Çetin, Suray Pehlivanoglu, İrem Hicran Özbudak, Abdullah Erdoğan, Osman Nidai Özeş. “Identification of two novel mutations of IRS1 in non-small cell lung cancer tumors: implications for aberrant insulin signaling in development of cancer”.
1999-2003	Devlet Parasız ve Yatılılık Bursu