T.C
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

TRAIL'IN PANKREATİK BETA HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ PROLİFERATİF ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Sevim KAHRAMAN DİRİCE

Doktora Tezi

Antalya, 2014

T.C
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

TRAIL'IN PANKREATİK BETA HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ PROLİFERATİF ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Sevim KAHRAMAN DİRİCE

Doktora Tezi

Tez Danışmanı
Doç.Dr. Ahter Dilşad ŞANLIOĞLU

Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi (Proje No: 2012.03.0122.003) ve TUBİTAK (112S450) Tarafından desteklenmiştir.

"Kaynakça Gösterilerek Tezimden Yararlanılabilir"

Antalya, 2014

Sağlık Bilimleri Ensitüsü Kurulu ve Akdeniz Üniversitesi Senato Kararı

Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün 22/06/2000 tarih ve 02/09 sayılı Enstitü Kurul kararı ve 23/05/2003 tarih ve 04/44 sayılı Senato kararı gereğince "*Sağlık Bilimleri Enstitülerinde lisansüstü eğitim gören doktora öğrencilerinin tez savunma sınavına girebilmeleri için, doktora bilim dalında SCI tarafından taranan dergilerde en az bir yurtdışı yayın yapması gerektiği*" ilkesi gereğince yapılan yayınların listesi aşağıdadır.

1. Dirice E, **Kahraman S**, Jiang W, El Ouaamari A, De Jesus DF, Teo AK, Hu J, Kawamori D, Gaglia JL, Mathis D, Kulkarni RN. Soluble factors secreted by T cells promote β-cell proliferation. *Diabetes*. 2014 Jan;63(1):188-202.

2. Dirice E, **Kahraman S**, Elpek GO, Aydin C, Balci MK, Omer A, Sanlioglu S, Sanlioglu AD.TRAIL and DcR1 Expressions Are Differentially Regulated in the Pancreatic Islets of STZ- versus CY-Applied NOD Mice. *Experimental Diabetes Research.* 2011;2011:625813.

3. Kahraman S, Dirice E, Hapil FZ, Ertosun MG, Ozturk S, Griffith TS, Sanlioglu S and Sanlioglu AD. Tracing of xenogeneic islet graft survival by way of in vivo fluorescence imaging. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews.* 2011 Sep;27(6):575-83.

4. Kahraman S, Dirice E, Sanlioglu AD, Yoldas B, Bagci H, Erkilic M, Griffith TS, Sanlioglu S. In vivo fluorescence imaging is well-suited for the monitoring of adenovirus directed transgene expression in living organisms. *Molecular Imaging and Biology.* 2010 Jun;12(3):278-85.

5. Dirice E, Sanlioglu AD, **Kahraman S**, Ozturk S, Balci MK, Omer A, Griffith TS, and Sanlioglu S. Adenovirus mediated TRAIL gene (Ad5hTRAIL) delivery into pancreatic islets prolongs normoglycemia in STZ-induced diabetic rats. *Human Gene Therapy.* 2009 Oct;20(10):1177-89.

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu çalışma, jürimiz tarafından Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Tıbbi Genetik Programı'nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir. 27/05/2014

Tez Danışmanı: **Doç. Dr. Ahter Dilşad ŞANLIOĞLU**
Akdeniz Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Üye : **Prof.Dr. Osman Nidai ÖZEŞ**
Akdeniz Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Üye : **Prof.Dr. Hasan Ali ALTUNBAŞ**
Akdeniz Üniversitesi
Tıp Fakültesi
İç Hastalıkları Anabilim Dalı

Üye : **Prof. Dr. Özgül ALPER**
Akdeniz Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Üye : **Doç.Dr. Vildan CANER**
Pamukkale Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

ONAY:

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun ..... / ..... / 2014 tarih ve ..... / ..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof.Dr. İsmail ÜSTÜNEL
Enstitü Müdürü

ÖZET

Hem Tip 1 hem de Tip 2 Diyabet'te, insülin üreten pankreatik beta hücre kitlesinin giderek azaldığı görülür. Bu nedenle, fonksiyonel beta hücre kitlesini artırmaya yönelik yeni tedavi yaklaşımlarının her iki tip diyabet için de fayda sağlayacağı düşünülmektedir. Birçok kanser hücresinde apoptotik etkisi olduğu gösterilmiş olan TRAIL'ın (TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand), sağlıklı bazı hücrelerde, örneğin vasküler düz kas hücrelerinde ve vasküler endotel hücrelerde proliferasyonu tetiklediği gözlenmiştir; pankreatik beta hücrelerinde ise sitokin aracılı hücre hasarına karşı koruma sağladığı düşünülmektedir.

Bu bulgulardan yola çıkarak, TRAIL'ın pankreatik beta hücreleri üzerindeki biyolojik etkisini tanımlamayı ve olası proliferatif etkisini göstermeyi hedefledik. Çalışmamızda sıçan pankreatik adacıkları ve fare insulinoma hücre hattı (Min6) kullanıldı. Pankreatik adacıklar, Wistar türü sıçanlardan izole edildi ve enzimatik yolla parçalanarak primer hücre kültürü kuruldu. Adacık hücre kültürünün büyük çoğunluğunu beta hücreleri oluştururken, diğer kısmını alfa hücreleri, fibroblastlar ve diğer hücre tipleri oluşturmaktaydı. Kültürdeki hücrelere artan dozlarda (0, 1, 10 ng/ml) çözülebilir TRAIL (sTRAIL) uygulanmasının, hücre canlılığında azalmaya neden olmadığı gözlendi. Aksine, sTRAIL uygulaması primer pankreatik beta hücrelerinde proliferasyonu indükledi. Min6 beta hücre hattı kullanılarak yapılan sTRAIL uygulamaları yine hücrelerde proliferasyonu artırıcı etki ile sonuçlanırken, kontrol olarak kullanılan A549 akciğer kanser hücre hattında güçlü apoptotik etki gözlendi. Min6 hücrelerinde adenoviral vektörler aracılığıyla TRAIL gen aktarımı sonrasında, hücre yüzeyinde TRAIL sentezinin artışını takiben proliferasyon gözlenirken, A549 hücreleri aynı uygulama sonrasında apoptoza uğradı. Western Blot sonuçları, TRAIL'ın beta hücrelerindeki proliferasyon tetikleyici etkisini, ERK1/2, p38 ve Akt yolakları üzerinden gerçekleştirdiğini düşündürmektedir.

Elde edilen bu sonuçlar, TRAIL'in, hem sıçan primer adacık hücrelerinde hem de fare pankreatik beta hücre hattında apoptoza neden olmadığını göstermekte, bunun yanında TRAIL'ın beta hücreleri üzerindeki proliferatif etkisine işaret etmektedir. Sonuç olarak bulgularımızın TRAIL molekülünün beta hücreleri üzerindeki biyolojik etkisinin anlaşılması yönünde literatüre katkı sağlayacağını, bunun yanında yapılacak ileri çalışmalarla TRAIL'ın beta hücre kaybının önlenmesi veya telafi edilmesinde kullanılabilecek bir aday molekül olabileceğini düşünüyoruz.

Anahtar Kelimeler: TRAIL, Beta Hücre Proliferasyonu, Diyabet

ABSTRACT

Therapeutic approaches to increase functional beta cell mass in diabetic patients are of great interest since loss of pancreatic beta cell mass and function contribute to development of both type-1 and type-2 diabetes. TRAIL (TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand), which is an apoptosis inducer in a wide variety of tumor cells, has also proven to promote survival and proliferation in various cell types, such as vascular smooth muscle cells and vascular endothelial cells. Furthermore, TRAIL is claimed to protect pancreatic beta cells against cytokine-related harm.

We aimed to describe the biological effect of TRAIL on pancreatic beta cells and to investigate whether TRAIL could induce proliferation in these cells. Rat pancreatic islets and mouse insulinoma cell line (Min6) were used. Pancreatic islets were isolated from Wistar rats and enzymatically dispersed into single cells, then cultured. Cultures of dispersed rat islets contained mostly of beta cells, and remaining were alpha cells, fibroblast cells, and the other cell types. Cultures treated with increasing doses of recombinant sTRAIL (0, 1, 10 ng/ml) displayed no reduction in viable cell numbers. On the contrary, sTRAIL treatment induced proliferation of primary pancreatic beta cells compared to the untreated group. sTRAIL treatment also induced proliferation in Min6 beta cell line, while inducing apoptosis in A549 lung cancer cell line which was used as a control cell type. TRAIL expression was also increased in the pancreatic beta cell line and in A549 cells, by adenoviral gene delivery. Increased expression of TRAIL induced proliferation in Min6, while inducing apoptosis in A459 cells. Western Blot results suggest that TRAIL may promote beta cell proliferation through ERK1/2, p38 and Akt pathways.

These results demonstrate that TRAIL does not induce apoptosis in primary rat beta cells or mouse beta cell line Min6, while increasing viability and proliferation. In conclusion, we believe that our results will contribute to the understanding of the biological role of TRAIL on beta cells, and suggest that TRAIL may be a candidate molecule to prevent beta cell loss and/or replenish beta cell mass, through further investigations.

Keywords: TRAIL, Beta Cell Proliferation, Diabetes

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim ve tez çalışmam boyunca emek veren, yol gösteren ve her zaman destek olarak verimli bir doktora eğitimi tamamlamamı sağlayan ve ayrıca tez çalışmamda müdürlüğünü yürüttüğü Gen ve Hücre Tedavisi Araştırma ve Geliştirme Merkezi'nin imkanlarından yararlanmamı sağlayan danışman hocam Doç.Dr. Ahter Dilşad ŞANLIOĞLU'na,

Tez çalışmam boyunca Tez İzleme Kurulu'nda yer alarak görüş ve öneriyle destek olan Prof.Dr. Hasan Ali ALTUNBAŞ'a,

Tez çalışmam boyunca Tez İzleme Kurulu'nda yer alarak görüş ve öneriyle destek olan ve müdürlüğünü yürüttüğü Sağlık Bilimleri Araştırma ve Uygulama Merkezi'nin imkanlarından yararlanmamı sağlayan Prof.Dr. Nidai ÖZEŞ'e,

Yüksek lisans ve doktora eğitimimde emeği geçen ve tecrübelerinden faydalanmamı sağlayan ve ayrıca doktora tez çalışmamda hücre, virüs ve malzeme desteği sunan Prof.Dr. Salih ŞANLIOĞLU'na,

Yüksek lisans ve doktora eğitimimde her zaman bilgi ve birikimlerinden yararlanmamı sağlayan ve bilimsel araştırmaya teşvik eden Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı öğretim üyeleri, Prof.Dr. Nidai ÖZEŞ, Prof.Dr. Sibel BERKER KARAÜZÜM, Prof.Dr. Salih ŞANLIOĞLU, Prof.Dr. İbrahim KESER, Prof.Dr. Özgül ALPER, Prof.Dr. Fahri UÇAR, Prof.Dr. Hüseyin BAĞCI, Doç.Dr. Ahter Dilşad ŞANLIOĞLU, Doç.Dr. Ş. Burçak YOLDAŞ ÇELİKTEN, Yard.Doç.Dr. Esra MANGUOĞLU, Yard.Doç.Dr. Mahmut AKYOL, ve Yard.Doç.Dr. Sezin YAKUT'a,

Doktora tez çalışmamda önerileri ile katkıda bulunan ve ilgisini esirgemeyen Dr. Ercüment DİRİCE'ye,

Çalışmam süresince destekleri ve yardımları için Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı araştırma görevlilerine ve sekreterliğine,

Tez savunma sınavımda juri üyeliği yapan Doç.Dr. Vildan CANER'e ve yedek jüri üyeliği yapan Prof.Dr. Lale ŞATIROĞLU TUFAN ve Doç.Dr. Ş. Burçak YOLDAŞ ÇELİKTEN'e,

Doktora eğitimim boyunca ilgili resmi işlemleri yürüten Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü çalışanlarına,

Doktora tez sürecinde inançları ve göstermiş oldukları sabır ve destek için sevgili eşime ve aileme içten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

		Sayfa
ÖZET		**v**
ABSTRACT		**vi**
TEŞEKKÜR		**vii**
İÇİNDEKİLER DİZİNİ		**viii**
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ		**xi**
ŞEKİLLER DİZİNİ		**xv**
ÇİZELGELER DİZİNİ		**xvi**
GİRİŞ ve AMAÇ		**1**
GENEL BİLGİLER		**2**
2.1.	Diabetes Mellitus	**2**
2.1.1.	Beta Hücre Kitlesi	**3**
2.1.2.	Beta Hücre Kitlesinin Telafisi Mümkün Müdür?	**4**
2.1.3.	Beta Hücre Rejenerasyonu	**5**
2.1.4.	Beta Hücre Proliferasyonunun Genetik Kontrolü	**6**
2.1.5.	Beta Hücre Proliferasyonunu Tetikleyen Faktörler	**6**
2.2.	TRAIL ve TRAIL Reseptörleri	**8**
2.2.1.	TRAIL Sinyal Yolağı	**9**
2.2.1.1.	TRAIL'ın Apoptotik Rolü	**9**
2.2.1.2.	TRAIL'ın Apoptoz Dışı Rolü	**10**
2.2.2.	TRAIL'ın Sağlıklı Hücreler Üzerindeki Etkisi	**12**
2.2.3.	TRAIL'ın Diyabetteki Rolü	**14**
2.2.4.	TRAIL ve Reseptör İlişkisinin Önemi	**16**
MATERYAL ve YÖNTEMLER		**17**
3.1.	Sıçan Pankreatik Adacıklarının Elde Edilmesi	**17**
3.1.1.	Pankreasın Cerrahi Olarak Çıkartılması	**18**
3.1.2.	Pankreasın Sindirimi	**18**
3.1.3.	Pankreatik Adacıkların Saflaştırılması	**18**
3.1.4.	Pankreatik Adacıkların Kültüre Alınması	**18**
3.2.	Pankreatik Adacıkların Canlılık Oranlarının Belirlenmesi	**19**
3.3.	Pankreatik Adacıkların Parçalanarak Tek Hücre Kültürünün Kurulması	**19**
3.3.1.	Adacık Hücrelerinin 96 Kuyulu Kaplara Ekimi	**19**
3.3.2.	Adacık Hücrelerinin pLL Kaplı Kuyulara Ekimi	**20**

3.4. Min6 Hücre Kültürü **20**
3.5. A549 Hücre Kültürü **20**
3.6. Hücrelerin sTRAIL ile Muamele Edilmesi **21**
3.7. İmmünositokimya **22**
3.8. Annexin V Testi **23**
3.9. WST-1 Canlılık/Proliferasyon Testi **23**
3.10. MTT Canlılık/Proliferasyon Testi **23**
3.11. Western Blot **24**
3.11.1. Hücre Lizatı Toplanması **24**
3.11.2. Jel Hazırlanması ve Elektroforez **25**
3.11.3. Örneklerin Membrana Transfer Edilmesi **25**
3.11.4. Bloklama ve Antikor ile İşaretleme **25**
3.11.5. Strip-off **25**
3.11.6. Western Band Analizi **25**
3.12. Hücrelerinin Adenoviral Vektörlerle Transdüksiyonu **26**
3.13. İstatistiksel Analiz **26**

BULGULAR **27**

4.1. Sıçan Pankreatik Adacıkları Yüksek Oranda Canlı ve Saf Olarak İzole Edildi **27**
4.2. İzole Edilen Pankreatik Adacıkları Oluşturan Hücreler, Enzimatik Olarak Ayrılarak Farklı Koşullarda Kültüre Edildi **28**
4.3. Tek Hücrelere Ayrılan Pankreatik Adacık Kültüründeki Farklı Hücre Popülasyonları Belirlendi **29**
4.4. sTRAIL Muamelesi Primer Adacık Hücre Kültüründe Apoptotik Etki Göstermedi **30**
4.5. sTRAIL Muamelesi Primer Adacık Hücre Kültüründe Hücre Canlılığını ve Proliferasyonunu Artıcı Etki Gösterdi **32**
4.6. Adacık Hücre Kültüründeki Hücrelerde TRAIL Sentezinin Olduğu Gösterildi **34**
4.7. sTRAIL Uygulaması, Min6 Hücre Hattında Hücre Canlılığını Artıcı Etki Gösterdi **35**
4.8. sTRAIL Uygulaması, Kontrol Olarak Kullanılan A549 Hücre Hattında Toksik Etki Gösterdi **38**
4.9. TRAIL Geni Adenoviral Vektörler Aracılığıyla Hücrelere Aktarılarak Hücre İçindeki TRAIL Sentezi Artırıldı **39**
4.10. TRAIL Geni Kodlayan Adenoviral Vektörler Aracılığıyla TRAIL Sentezi Artırılan Min6 Hücrelerinde Hücre Canlılığı/Proliferasyonunda Artış Gözlendi **40**
4.11. Adenoviral Vektörler Aracılığıyla TRAIL Sentezi Artırılan A549 Hücrelerinde Hücre Canlılığı/Proliferasyonu Azaldı **41**
4.12. sTRAIL ile Muamele Edilen Min6 Hücrelerindeki TRAIL ve Reseptör Sentezleri Belirlendi **42**
4.13. sTRAIL, ERK, p38 ve Akt Üzerinden Min6 Hücrelerinde Proliferasyon Sağlıyor Olabilir **43**

TARTIŞMA **46**

SONUÇ **51**

KAYNAKLAR **52**

ÖZGEÇMİŞ **57**

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Ad : Adenovirüs
Ad5hTRAIL : İnsan TRAIL Geni Taşıyan Serotip 5 Adenovirüs
aFGF : Acidic Fibroblast Growth Factor
Apo2L : Apoptosis Ligand 2
BID : BH3 Interacting Domain
B-KLL : B Hücreli Kronik Lenfositik Lösemi
BSA : Bovine Serum Albumin
CCK : Cholecystokinin
CD253 : Cluster of Differentiation 253
CDK : Cyclin Dependent Kinase
cIAP : Cellular Inhibitors of Apoptosis Proteins
CO_2 : Karbondioksit
Cx : Connexin
DcR : Decoy Receptor
DISC : Death Inducing Signaling Complex
DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium
DR4 : Death Receptor
EDTA : Etilen Diamin Tetraasetik Asit
EGF : Epidermal Growth Factor
ERK : Extracellular Signal Regulated Kinase
FADD : Fas Associated Death Domain
FBS : Fetal Bovine Serum
FDA : Fluorescein Diacetate
FFA : Free Fatty Acids
GH : Growth Hormone
GIP : Gastrointestinal Peptide
GLP : Glucagon Like Peptide
GLUT : Glucose Transporter
HB-EGF : Heparin-Binding EGF-Like Protein
HCl : Hidroklorik Asit

HGF : Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor

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 IkB Kinase

IL : Interleukin

INGAP : Islet Neogenesis Associated Peptide

iPSC : Induced Pluripotent Stem Cells

Irs : Insulin Receptor Substrate

JNK : c-Jun N-terminal Kinase

KCl : Potasyum Klorid

KH_2PO_4 : 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 : Metalloproteinaz

MOI : Multiplicity of infection

NaCl : Sodyum Klorid

NaH_2PO_4 : Sodyum Dihidrojen Fosfat

$NaHCO_3$: Sodyum Bikarbonat

NaOH : Sodyum Hidroksid

NCS : Newborn Calf Serum

NFAT : Nuclear Factor of Activated T Cells

NFκB : Nuclear Factor Kappa B

NGF : Nerve Growth Factor

NOD : Non-Obese Diabetic

NT-3 : Neurotrophin-3

OPG : Osteoprotegerin

PBS : Phosphate Buffered Saline

PDGF : Platelet-Derived Growth Factor

PE : Polyethylene

PI : Propidium Iodide

PI3K : Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-Kinase

PL : Placental Lactogen

pLL : Poly-L-Lysine

PRL : Prolactin

PSP : Pancreatic Stone Protein

PTP : Pancreatic Thread Protein

RANKL : Receptor Activator of Nuclear Factor-kB (NF-kB) Ligand

Rb : Retinoblastoma

RIP1 : Receptor Interacting Protein-1

Rpm : Revolutions Per Minute

RPMI 1640 : Roswell Park Memorial Institute Medium

SEM : Standard Error of Mean

siRNA : Small Interfering Ribosomal Nucleotide Acids

sTRAIL : Soluble TRAIL

STZ : Streptozotocine

SU : Sulfonylurea

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 (Ligand) 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

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil		Sayfa
2.1.	Pankreas kesiti	**3**
2.2.	Beta hücre kitlesinin dinamik yapısını gösteren şema	**5**
2.3.	TRAIL reseptörleri	**9**
2.4.	TRAIL'ın apoptotik sinyal yolağı	**10**
2.5.	TRAIL'ın NF-kB aracılı sinyal yolağı	**11**
2.6.	TRAIL'ın apoptoz dışı sinyal yolağı	**12**
2.7.	TRAIL tedavisi ve TRAIL yoksunluğunun diyabet üzerindeki sistemik etkileri	**15**
4.1.	Sıçan pankreatik adacıkları	**27**
4.2.	Primer adacık hücre kültürü	**28**
4.3.	pLL kaplı kültür kaplarının kullanılması	**29**
4.4.	Adacık hücre kültüründeki hücre popülasyonları	**30**
4.5.	Primer adacık hücrelerinin apoptoz oranları	**31**
4.6.	Primer adacık hücrelerinde ölü hücre oranları	**32**
4.7.	Primer adacık hücrelerinin canlılık/proliferasyon grafiği	**33**
4.8.	Primer adacık beta hücrelerinin proliferasyon oranı	**34**
4.9.	Primer adacık hücrelerindeki TRAIL sentezi	**35**
4.10.	sTRAIL'ın Min6 beta hücreleri üzerindeki etkisi	**36**
4.11.	Min6 beta hücrelerinin canlılık/proliferasyon oranı	**37**
4.12.	sTRAIL'ın Min6 hücre proliferasyonu üzerine etkisi	**38**
4.13.	A549 hücrelerinin sTRAIL ile muamele edilmesi	**39**
4.14.	Hücrelerdeki TRAIL sentezi	**40**
4.15.	TRAIL gen aktarımı sonrasında Min6 hücrelerindeki TRAIL sentezi	**41**
4.16.	TRAIL gen aktarımının Min6 hücreleri üzerindeki etkisi	**41**
4.17.	AdTRAIL transdüksiyonunun A549 hücreleri üzerindeki etkileri	**42**
4.18.	Min6 hücrelerindeki TRAIL ve reseptör sentezi	**43**
4.19.	sTRAIL muamelesinin ERK fosforilasyonu üzerine etkisi	**44**
4.20.	sTRAIL muamelesinin p38 ve Akt fosforilasyonu üzerine etkisi	**45**

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge		Sayfa
2.1.	Beta hücre kitlesini etkileyen hormonlar, büyüme faktörleri ve diğer faktörler.	**7**

GİRİŞ ve AMAÇ

Diyabet dünya çapında görülen en yaygın kronik hastalıklardan biridir. Diyabetli hasta sayısı, günümüzün yaşam koşulları, fiziksel aktivitenin günlük yaşamda yeterince yer almaması ve son yıllarda obezitede gözlenen artış ile birlikte gittikçe artmaktadır. Hem Tip 1 hem de Tip 2 diyabet'te, insülin üreten pankreatik beta hücre kitlesinin hastalık sürecinde giderek azaldığı görülmektedir. Bu nedenle, fonksiyonel beta hücre kitlesini artırmaya yönelik yeni/destekleyici tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesi her iki tip diyabet için de fayda sağlayacaktır. Azalan beta hücre kitlesinin telafi edilmesine yönelik geliştirilen deneysel yöntemler, *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda genellikle beklenen etkinliği gösterememiştir.

Diyabet sürecinde azalan beta hücre kitlesinin yerine konulması için düşünülen stratejilerden biri, endojen beta hücrelerinde proliferasyonun indüklenmesi ve böylece beta hücre kitlesinin artırılmasıdır. Yetişkin bireylerde pankreatik beta hücrelerinin çok yavaş da olsa kendilerini yenilediklerine dair bulgular mevcuttur. Beta hücrelerinin çoğalmasını sağlayacak moleküllerin bulunması ve bu moleküllerin etkinlik derecelerinin ve mekanizmalarının açığa çıkarılması, diyabete yönelik yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilebilmesi açısından önemlidir.

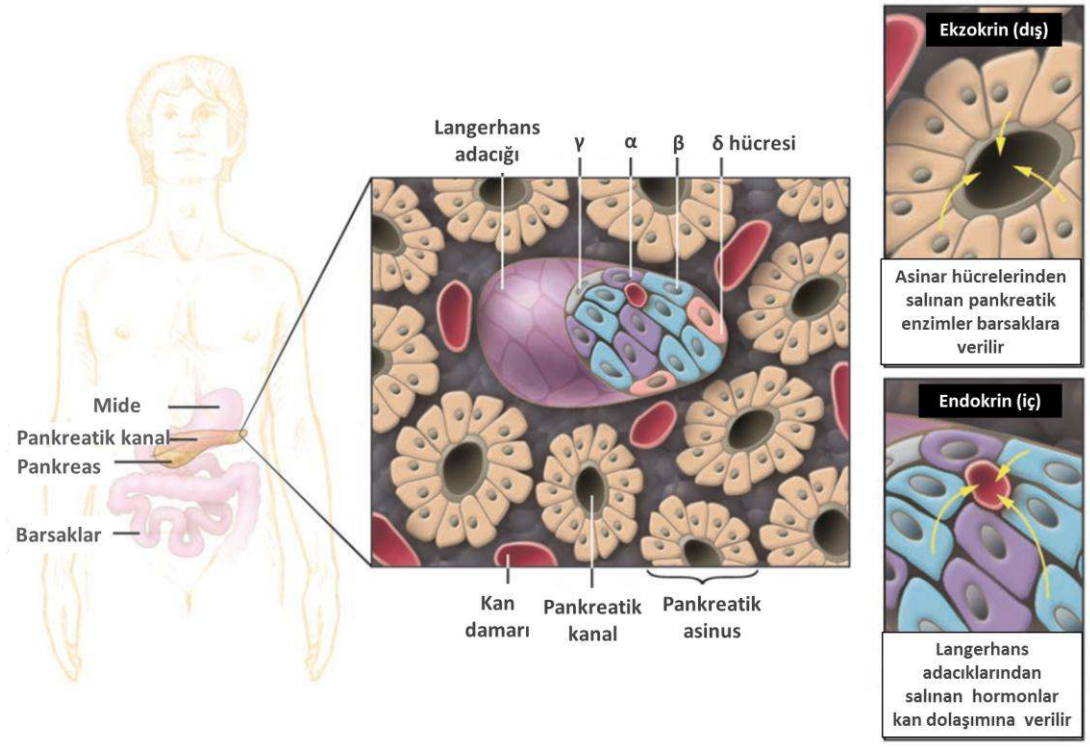
Çalışmamızda, TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL) molekülünün pankreatik beta hücreleri üzerinde muhtemel proliferatif etkisi olabileceğini hipotez ettik. TRAIL ilk tanımlandığında kanser hücrelerinde ölümü tetikleyen bir protein olarak önem kazanmış ve kanser hücre biyolojisi alanında TRAIL ile ilgili pek çok araştırma yapılmıştır. Fakat TRAIL'ın kanser hücrelerindeki apoptotik etkisi yanında, örneğin vasküler endotel hücrelerde ve vasküler düz kas hücrelerinde proliferatif etkisi olduğu daha sonra yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Ayrıca TRAIL'ın kanser dışında, ateroskleroz, diyabet, obezite gibi başka hastalıklarda da önemli roller üstlendiği düşünülmektedir. Bu bulgular ışığında bu çalışmadaki amacımız, TRAIL molekülünün pankreatik beta hücreleri üzerindeki biyolojik etkisini tanımlamak ve muhtemel proliferatif etkisini test etmekti.

GENEL BİLGİLER

2.1. Diabetes Mellitus

Diyabet dünya çapında en yaygın görülen kronik hastalıklardan biridir. Değişen yaşam koşulları, fiziksel aktivitenin azalması ve obezitenin artmasıyla birlikte diyabetli hasta sayısı da giderek çoğalmaktadır. 2010 yılı tahminlerine göre tüm dünyada yaklaşık 285 milyon diyabet hastası olduğu ve 2030 yılında bu sayının 439 milyona ulaşacağı düşünülmekteydi [1]. Ancak son verilere göz önüne alındığında, 2030 yılında diyabetli hasta sayısının 550 milyondan fazla olacağı tahmin edilmektedir [2]. Türkiye'deki diyabet hastası sayısının ise yaklaşık 3,7 milyon olduğu ve bu sayının 20 yıl sonra 6,3 milyona ulaşacağı tahmin edilmektedir. Türkiye'deki diyabet prevalansı yaklaşık %7,4 olarak bildirilmektedir [1, 3].

Diyabet pankreasın görevini yerine getirememesi sonucu gelişen bir hastalıktır. Pankreas, besinlerin sindirimi ve glukoz homeostazının kontrol edilmesinde önemli bir organdır. Ekzokrin ve endokrin dokular olmak üzere iki farklı yapı içerir. Pankreasın büyük bir kısmını ekzokrin doku oluşturur (Şekil 2.1). Ekzokrin dokunun içinde pankreatik kanal hücreleri ve kanalın etrafını çevreleyerek salgıladığı pankreatik enzimlerle barsaklarda sindirimin gerçekleşmesini sağlayan asinar hücreler yer alır. Endokrin doku ise, ekzokrin dokunun içine dağılmış şekilde "Langerhans adacıkları" olarak bilinen hücre kümelerinden oluşur. Bu endokrin kısım pankreasın ancak %2'lik kısmını oluşturur. Her bir Langerhans adacığı beş farklı hücre tipi içerir. Bu hücreler insülin sentezleyen β hücreleri (yaklaşık %70-80), glukagon sentezleyen α hücreleri (yaklaşık %15-20), somatostatin sentezleyen δ hücreleri (yaklaşık %5), pankreatik polipeptid içeren γ hücreleri (yaklaşık %1), ve ghrelin içeren ε hücreleridir (genelde <%1) [4]. Bu hücrelerden sentezlenen hormonlar kan damarları aracılığıyla dolaşıma verilir ve dolaşımdaki glukoz seviyesinin belirli bir aralıkta tutulmasını sağlar [5, 6].



Şekil 2.1. Pankreas kesiti. Pankreasın büyük bir kısmı ekzokrin dokudan oluşur. Ekzokrin dokunun içinde pankreatik kanal hücreleri ve kanalın etrafını saran asinar hücrelerin oluşturduğu "pankreatik asinuslar" yer alır. Asinar hücreler pankreatik kanallara enzim salgılayarak sindirime yardımcı olurlar. Ekzokrin dokunun içine dağılmış şekilde "Langerhans adacıkları" olarak bilinen endokrin hücre kümeleri yer alır. Langerhans adacıklarından sentezlenen hormonlar kan damarları aracılığıyla dolaşıma verilir [5].

Diyabetin tip 1 ve tip 2 olmak üzere başlıca iki ana tipi vardır. Tip 1 diyabet (T1D) pankreatik beta hücrelerine karşı gelişen otoimmün saldırı sonucu beta hücrelerinde apoptoz gözlenir ve insülin yetersizliğine bağlı olarak diyabet gelişir. T1D, diyabetin immün aracılı formudur. Adacık otoantikorlarının varlığı en iyi şekilde, insülitis (adacıkların immün sistem hücreleri tarafından kuşatılması ve işgal edilmesi) ve spesifik olarak adacık beta hücrelerinin yıkımı ile karakterize edilir. Bunun yanı sıra, spesifik HLA (insan lökosit antijeni) alelleri ile ilişkilidir ve hastalık ilerledikçe insülin yetersizliği gittikçe şiddetlenir. Tip 2 diyabet (T2D) ise glukoz intoleransına genetik yatkınlığın yanısıra, sağlıksız yaşam tarzı ve çevresel faktörlerin etkisiyle ortaya çıkmaktadır. T2D'te hastalarda başlangıçta insülin direnci (obezite, yüksek yağlı beslenme, hareketsizlik, yaşlanma ya da genetik temelden kaynaklanan) gelişir ve arkasından beta hücrelerinde fonksiyon kaybı ve hiperglisemi gözlenir. Beta hücrelerinde görülen fonksiyon bozukluğunu beta hücre kaybı izleyebildiğinden T2D hastalarında da beta hücre ölümü gözlenir [4]. Her iki tip diyabet de, sonuçta progresif beta hücre yıkımı ile karakterizedir [7].

2.1.1. Beta Hücre Kitlesi

Pankreasta yer alan beta hücrelerinin tamamı "beta hücre kitlesi" olarak adlandırılır. Yeterli miktarda beta hücre kitlesinin varlığı normal glukoz

homestazının sağlanması açısından oldukça önemlidir. Cerrahi müdahale ile pankreası alınan [8] ya da beta hücre toksini verilerek beta hücre kitlesi azaltılan [9, 10] deney hayvanlarında diyabet gelişiminin gözlenmesi, beta hücre kitlesinin önemini göstermiştir. T1D ve T2D'te görülen beta hücre kitlesindeki azalma, hastalık gelişimine katkıda bulunur. İnsanlarda beta hücre kitlesini *in vivo* olarak ölçebilen hassas ve spesifik bir yöntem olmadığı için, bu konudaki bilgiler kısıtlıdır. Ancak otopsi ile elde edilen pankreaslarda yapılan çalışmalar sonucunda, T1D hastalarının beta hücre kitlesindeki kayıp oranının yaklaşık %70-100 olduğu gözlenmiş, T2D hastalarında ise bu oranın %0-65 arasında olduğu görülmüştür [11].

2.1.2. Beta Hücre Kitlesinin Telafisi Mümkün Müdür?

Hem T1D hem de T2D'te azalan beta hücre kitlesinin kaybından doğan komplikasyonların telafi edilmesine yönelik farklı tedavi yöntemleri geliştirilmiştir [12]. Fakat bu tedavi yöntemlerinin çoğu zaman yetersiz kaldığı bilinmektedir. Örneğin, beta hücre kaybı nedeniyle ortaya çıkan insülin ihtiyacı, dışarıdan insülin enjeksiyonu ile karşılanmaktadır. Fakat bu tedavi yönteminin, kan glukozunun hayat boyu sıkı takibini ve sürekli insülin enjeksiyonunu gerektirdiği bilinmektedir. Kan glukoz seviyesinin gerektiği gibi kontrol edilemediği durumlarda nöropati, nefropati, retinopati, kalp hastalıkları ve ateroskleroz gibi ciddi komplikasyonlar görülebilmektedir [13]. Diyabet tedavisinde uygulanan diğer yöntemler arasında, uygun hastalarda pankreas nakli ve pankreatik adacık nakli yer alır. Tüm pankreas nakline oranla pankreatik adacık nakli, daha az invaziv cerrahi gerektirmesi ve kan glukoz seviyesinin normal seviyelerde tutulmasını sağlayarak komplikasyonları azaltabilmesi açısından ümit verici olsa da, nakil sonrası graftlarda fonksiyonel bozukluk ve graft reddi bu yöntemin başarısını gölgelemektedir [14]. Bunların yanında, her iki nakil için de organ bağışının yetersiz olduğu bilinmekte ve nakil sonrasında hayat boyu immün baskılayıcı ilaç kullanımı gerekmektedir [15].

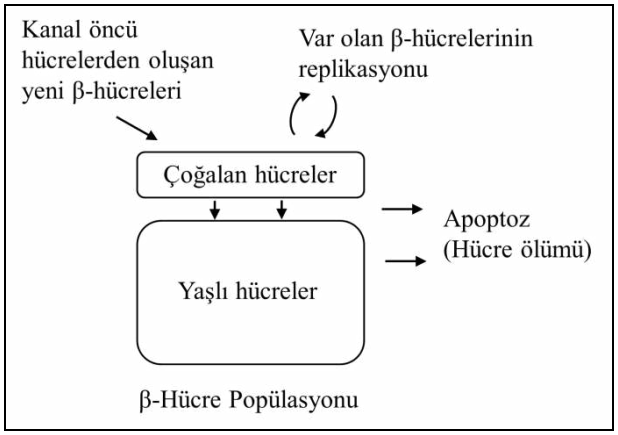
Verici bulma sıkıntısının ortadan kaldırması amacıyla embriyonik kök hücrelerin pankreatik beta hücrelerine dönüştürülmesi planlanmış ve bu şekilde elde edilen beta hücrelerinin hastalara naklini içeren yeni bir tedavi yaklaşımı tasarlanmıştır [16]. Fakat bu tedavi yaklaşımının da yine immun baskılayıcı ilaç kullanımını gerektireceği açıktır. Hem immün baskılayıcı ilaç kullanımı gerektirmeyecek hem de verici sıkıntısı yaşanmayacak alternatif bir tedavi yöntemi olarak indüklenmiş pluripotent kök hücrelerin (iPS) kullanılma fikri, son yıllarda oldukça ilgi görmüştür [17]. Bu yöntem kısaca, hastalardan alınan fibroblast hücrelerine *in vitro* ortamda pluripotent özellik kazandırılması ve istenilen hücre tipine farklılaşmaları sağlandıktan sonra hastaya geri nakledilmesini amaçlar [18]. Diyabet hastalarından alınan fibroblast hücrelerinden iPS hücreleri başarılı bir şekilde elde edilmiş [19, 20] ve farklılaşmaları indüklenerek insülin üreten hücrelere dönüştürülmüştür [21]. Fakat bu çalışmalar halen araştırma aşamasındadır.

Diyabet hastalarında azalan beta hücre kitlesinin yerine konulabilmesi için düşünülen alternatif stratejilerden birisi de, endojen beta hücre kaynaklarının rejenerasyonunun tetiklenmesidir. Barsak epiteli gibi yenilenme kapasitesi yüksek olan dokularda ya da karaciğer gibi hücre kaybını takiben yeniden hücre oluşumunun

tetiklenebildiği dokularda hücresel rejenerasyon zaten gerçekleşmektedir. Pankreasta ise beta hücrelerinin çok yavaş da olsa kendilerini yenileyebildiklerine dair bulgulara rastlanmıştır [22]. Pankreasta beta hücrelerinin çoğalmasını tetikleyebilecek moleküllerin bulunması ve ilgili mekanizmaların aydınlatılması, diyabette yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilebilmesi açısından oldukça önem taşımaktadır.

2.1.3. Beta Hücre Rejenerasyonu

Endokrin pankreasın gelişimi ve büyümesi üzerine pek çok araştırma yapılmıştır. Yine de beta hücre kitlesinin normal koşullarda ya da diyabet gelişimi sırasında nasıl değiştiği hakkında bilinmeyen birçok nokta vardır. Embriyonik gelişim sırasında beta hücreleri, neurogenin 3 pozitif öncül hücrelerinden köken alırlar [23, 24] ve hızla çoğalarak fetal dönemin sonlarına doğru beta hücre kitlesini oluştururlar [25]. Bu aşamada beta hücreleri "neogenez" yoluyla, yani kanal öncü hücrelerinin insülin salgılayan beta hücrelerine farklılaşması yoluyla oluşurlar. Doğumdan sonraki neonatal dönemde ise hem neogenez hem de farklılaşmış beta hücrelerinin replikasyonu yoluyla beta hücreleri oluşur ve beta hücre kitlesi artmaya devam eder [26]. Embriyonik ve neonatal dönemdeki hızlı artıştan sonra, beta hücre proliferasyonu postnatal dönemde son derece yavaşlar [27, 28]. Bu bulgular, yetişkin pankreatik beta hücrelerinin kendilerini pek yenilemediğini düşündürmekteydi. Fakat rodent [29, 30] ve insan [28] pankreas kesitlerinden elde edilen bilgiler, postnatal dönemdeki beta hücre kitlesinin vücut ağırlığı ile doğru orantılı olarak yaş ilerledikçe arttığını göstermiştir. Beta hücre kitlesinde gözlenen bu artışın, adacık sayısının artmasından ziyade adacıklardaki beta hücre sayısındaki artışı yansıttığı gösterilmiştir. Yani postnatal dönemde beta hücre sayısını artıran asıl mekanizmanın var olan beta hücrelerinin replikasyonu olduğu sonucuna varılmıştır [28, 31, 32]. Yetişkin dönemde neogenez, proliferasyon ya da hücre hipertrofisi (hücre çapının büyümesi) yoluyla yeni beta hücreleri oluşurken, diğer taraftan apoptoz ya da beta hücre atrofisi (hücre çapının küçülmesi) yoluyla eski beta hücreleri ölür ve bu şekilde beta hücre kitlesi çok yavaş da olsa yenilenerek dengede tutulur (Şekil 2.2) [30].



Şekil 2.2. Beta hücre kitlesinin dinamik yapısını gösteren şema. Beta hücrelerinin replikasyonu ve kanal öncü hücrelerinin farklılaşması sonucu yeni beta hücreleri oluşurken, apoptoz ile bazı beta hücreleri ölür ve bu şekilde beta hücre popülasyonu yavaşça kendini yeniler [30].

Yapılan çalışmalar, yetişkin beta hücresinin vücudun ihtiyaçlarını karşılayabilmek ve glukoz homeostazını sağlayabilmek için kitlesini artırdığını göstermiştir. Örneğin gebelik [33], obezite [34, 35], insülin direnci [36-38], pankreas hasarı [10, 39] ya da kısmi pankreatektomi [8] gibi insüline duyulan ihtiyacın arttığı fizyolojik ya da patolojik durumlarda beta hücre sayısının arttığı gösterilmiştir. Beta hücre kitlesinin ihtiyaca göre değişmesi, aslında beta hücre kitlesinin dinamik bir yapı olduğunu göstermektedir. Örneğin gebelik döneminde, büyüyen fetusun ihtiyacını karşılayabilmek için vücudun insüline olan ihtiyacı artmaktadır. Bu nedenle pankreatik beta hücre kitlesi gebelik döneminde artar ve doğum sonrası tekrar eski haline döner [33, 40]. Vücut ağırlığının aşırı arttığı obezite gibi durumlarda, gebelikte olduğu gibi vücudun insüline duyduğu ihtiyaç artar ve bu ihtiyacı karşılayabilmek için beta hücre kitlesinde de artış görülür. Diyabetik olmayan obez hayvan modellerinden, Zucker *fa/fa* sıçanlarda beta hücre kitlesinin kontrol sıçanlara göre dört kat arttığı gözlenmiştir [35]. İnsanlarda da ortalama 0,8 gr olan beta hücre kitlesinin obez insanlarda 1,2 gr olduğu, dolayısıyla obezitenin beta hücre kitlesini %50 oranında artırdığı gösterilmiştir [41]. Beta hücre kitlesinin ihtiyaç halinde artması "beta hücre telafisi" olarak tanımlanmıştır. Hem gebelik hem de obezitede eğer beta hücre telafisi yapılamazsa glukoz hemostazı sağlanamadığından diyabet gelişmektedir. Bu nedenle glukoz homeostazının sağlanması aslında beta hücre kitlesine bağlı bir durumdur. Örneğin dört gün boyunca glukoz infüzyonu yapılarak kan glukoz seviyesi artırılan (hiperglisemi) sıçanların pankreasları incelendiğinde, beta hücre proliferasyonunun arttığı ve beta hücrelerinin genişlediği (hipertrofi), sonuç olarak da beta hücre kitlesinde artış meydana geldiği bulunmuştur [42]. Yine farelerde de glukoz infüzyonunun beta hücre replikasyonunu artırdığı gösterilmiştir [43].

2.1.4. Beta Hücre Proliferasyonunun Genetik Kontrolü

Yetişkin beta hücre kitlesinin dinamik olmasında beta hücre proliferasyonunun rolü oldukça büyüktür. Fakat şimdiye dek beta hücre proliferasyonunu kontrol eden genetik mekanizmalar tam olarak aydınlatılamamıştır. Beta hücrelerinde proliferasyona neden olan faktörler, hücre döngüsünün düzenlenmesini sağlayan sinyal yolaklarını kullanmak durumundadır. Bu noktadan yola çıkılarak yapılan çalışmalarda hücre döngüsü düzenleyicileri olan siklin D1/D2 ve CDK4'ün beta hücre proliferasyonunu tetiklediği [44-46] ve E2F1/2 gibi hücre döngüsüyle ilişkili transkripsiyon faktörlerinin beta hücre proliferasyonu için zorunlu olduğu gösterilmiştir [47, 48]. Diğer taraftan p15Ink4b, p18Ink4c ve p27Kip1 gibi bazı hücre döngüsü inhibitörlerinin de beta hücre replikasyonunu baskıladığı gösterilmiştir [49-51]. Bunların yanı sıra, NFAT [52], Menin [53], Irs2 [54], p53 ve Rb [55] gibi diğer genlerin de beta hücre proliferasyonunun düzenlenmesinde rol oynadığı gösterilmiştir.

2.1.5. Beta Hücre Proliferasyonunu Tetikleyen Faktörler

Pankreatik beta hücrelerinden sentezlenen ve proliferasyonu tetikleyen otonom faktörlerin yanı sıra dolaşımda bulunan sistemik faktörlerin de beta hücre replikasyonu üzerinde etkisi olduğunu düşünülmektedir [56]. Örneğin glukoz bir beta hücre mitojeni olarak tanımlanmaktadır. Dolaşımdaki glukoz, glukoz taşıyıcısı kanal

proteinleri (GLUT) tarafından hücre içine alındıktan sonra, glukokinaz enzimi tarafından glukoz-6-fosfata dönüştürülür ve glikolizde kullanılır. Glukokinaz enziminin genetik olarak baskılandığı beta hücrelerinde, glukozun beta hücrelerinde proliferasyonu uyaramadığı gösterilmiştir [40]. Glukokinaz aktivitesinin farmakolojik ajanlar kullanılarak artırılması ise beta hücre replikasyonunu iki kat artırmıştır [57]. Bu durum, glukozun glikolizde kullanılması sonucunda beta hücrelerinde proliferasyonu sağladığını kanıtlamaktadır. Bunun yanı sıra, insülin, plasental laktojen, prolaktin gibi birçok hormon beta hücre kitlesini değiştirme etkisine sahiptir [33, 58]. GLP-1 ve GIP gibi inkretin hormonlar da insülin salınımını artırarak beta hücre replikasyonunu tetikler [59]. Beta hücre replikasyonu üzerinde etkisi olan birçok faktör belirlenmiştir (Çizelge 2.1) [60].

Çizelge 2.1. Beta hücre kitlesini etkileyen hormonlar, büyüme faktörleri ve diğer faktörler. Tarabra ve arkadaşlarından alıntı yapılmıştır [60]. FGF, acidic fibroblast growth factor; CCK, cholecystokinin; Cx, connexin; HB-EGF, heparin-binding EGF-like protein; HGF, hepatocyte growth factor/scatter factor; IAPP, islet amyloid polypeptide; IFN, interferon; IL, interleukin; INGAP, islet neogenesis-associated peptide; NGF, nerve growth factor; NT-3, neurotrophin-3; PDGF, platelet-derived growth factor; PSP, pancreatic stone protein; PTP, pancreatic thread protein; SU, sulfonylurea; TGF, transforming growth factor; TNF, tumor necrosis factor; VEGF, vascular endothelial growth factor.

	Stimülatörler	**İnhibitörler**
Metabolitler	Glukoz, FFA, amino asitler	Glukoz, FFA
Sitokinler	GH, PRL, PL	IL-1, IFNγ, TNF-α, leptin
Büyüme faktörleri	IGF-I, IGF-II, insülin, TGF-α, betaselülin, HB-EGF, aFGF, VEGF, PDGF, HGF	HGF
Plasental hormonlar	Plasental laktojen, Prolaktin	
Glukagon ailesi	GLP-1, GIP, glukagon	
Somatostatin ailesi		Somatostatin
CGRP ailesi		IAPP/amilin
Gastrin ailesi	Gastrin, CCK	
TGF-β ailesi	Aktivin A	TGF-β, follistatin
Nörotrofinler	NGF, NT-3	
Nörotransmiterler	Asetilkolin	(Nor)epinefrin
Lektinler	Reg/INGAP/PSP/PTP	
Adhezyon molekülleri	İntegrin α6β1, Cx43, Cx36	
İlaçlar	Nikotinamid, SU	Diazoxide
Toksinler		Streptozotosin, alloxan

Beta hücre proliferasyonunu tetikleyen moleküllerin diyabet tedavisinde kullanılma potansiyelleri incelendiğinde, pek çoğunun ya beta hücresine özgü olmadığı ya da güçlü bir proliferasyon tetikleyicisi olmadığı görülmüştür. Ancak Dr. Melton ve arkadaşları tarafından, 2013 yılı içinde yayınlanmış bir çalışmada, "betatrofin" isimli molekülün beta hücrelerine özgü ve güçlü proliferasyon

yapabilme özelliği tanımlanmıştır [61]. Farelere "betatrofin" verildiğinde beta hücre proliferasyonunun kontrol grubuna kıyasla ortalama 17 kat arttığı, hatta bazı farelerde bu artışın 33 kat olduğu gösterilmiştir. Bu kadar güçlü proliferasyon yapabilen bu molekül, insanda karaciğer tarafından sentezlenmektedir. Fakat insanlarda betatrofinin beta hücre proliferasyonu üzerindeki etkisi gösterilememiştir.

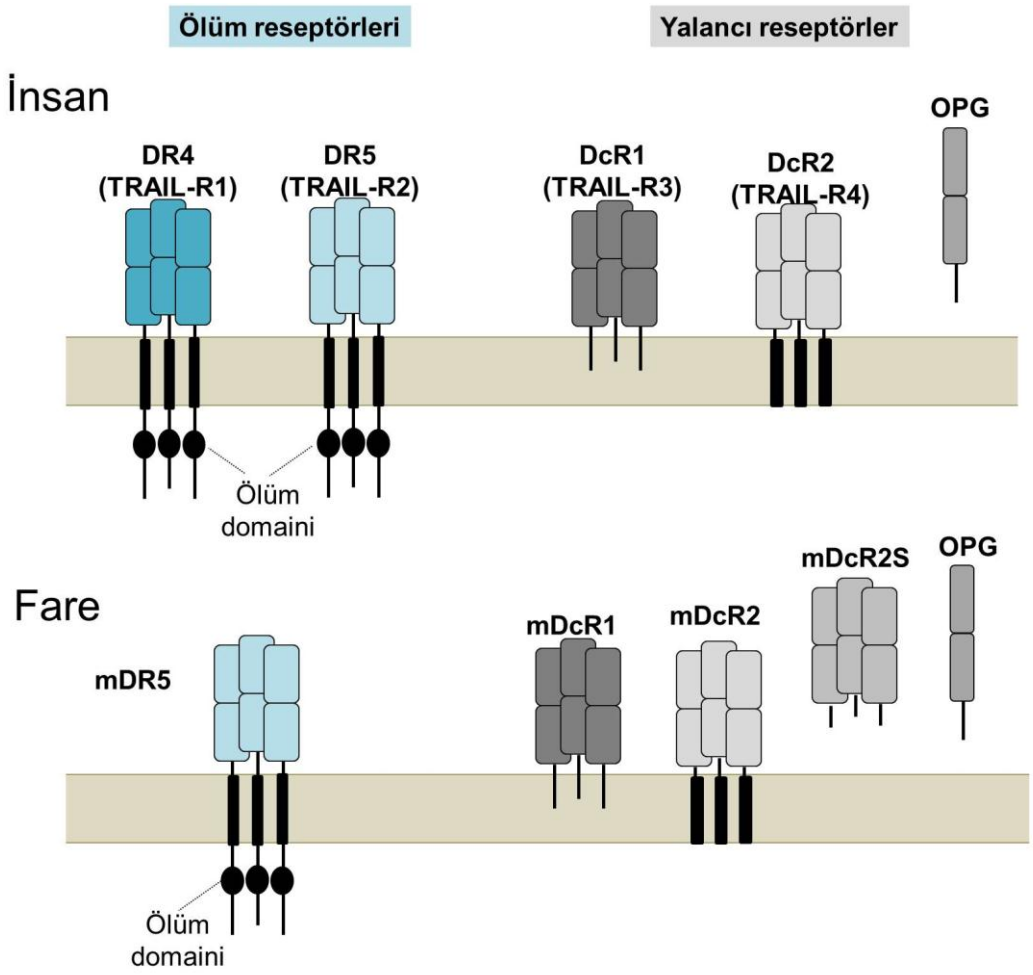
Çalışmamızda, TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand'ın (TRAIL) pankreatik beta hücreleri üzerinde muhtemel proliferatif etkisi olabileceğini hipotez ettik. TRAIL ilk keşfedildiğinde kanser hücrelerini öldüren bir protein olarak tanımlanmış [62] ve kanser hücre biyolojisi alanında TRAIL ile ilgili pek çok araştırma yapılmıştır. Fakat TRAIL'ın kanser hücreleri dışındaki normal hücrelerde, örneğin vasküler düz kas hücreleri [63], vasküler endotel hücreler [64] ve romatoid artrit sinoviyal fibroblastlarda [65] proliferatif etkisi olduğu daha sonra yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Ayrıca TRAIL'ın kanser dışında, ateroskleroz [66], diyabet [67], obezite [68] gibi başka hastalıklarda da önemli roller üstlendiği düşünülmektedir [69].

2.2. TRAIL ve TRAIL Reseptörleri

TNF-ligand ailesinin bir üyesi olarak tanımlanan TRAIL (Apo2L, TNFSF10, ya da CD253 olarak da bilinmektedir), hücre membranında yer alan bir tip II membran proteinidir. TRAIL, sistein proteazlar ve matriks metalloproteinaz-2 (MMP-2) tarafından kesildiğinde, hücre membranından ayrılır ve çözülebilir TRAIL (sTRAIL) olarak dolaşıma geçer. TRAIL, membrana bağlı ya da çözülebilir formda, birçok tümör ve kanser hücre tipinde apoptozu başlatma yeteneğine sahiptir [62].

TRAIL'ın hücre içine sinyal iletimini sağlayan dört farklı transmembran reseptörü, bir de çözülebilir reseptörü vardır. Transmembran reseptörlerden ikisi ölüm domaini içeren DR4 (TRAIL-R1) ve DR5 (TRAIL-R2), diğer ikisi ise yalancı reseptörler olan DcR1 (TRAIL-R3) ve DcR2'dir (TRAIL-R4). TRAIL'ın bağlanabildiği çözülebilir reseptör ise osteoprotegerindir (OPG). Ölüm reseptörleri sitoplazmik kısımlarında ölüm domaini taşırlar ve apoptoz sinyalinin gönderilmesi için bu domainlerini kullanırlar. Yalancı reseptörlerde ise ölüm domaini ya yoktur ya da kesilmiş halde bulunur. Bu nedenle, TRAIL yalancı reseptörlerine bağlandığında hücre içine apoptoz sinyali iletilmez. OPG de bir yalancı reseptördür ve TRAIL'ın çözülebilir formda bulunan tek reseptörüdür. TRAIL diğer reseptörlerine oranla OPG'ye daha az bağlanır. OPG aynı zamanda osteoklast gelişiminde görevli olan RANKL'ın [Activator of Nuclear Factor-kB (NF-kB) Ligand] da reseptörü olarak görev yapar [70].

Farelerde de beş TRAIL reseptörü tanımlanmıştır. Bunlar; mDR5, mDcR1, mDcR2, mDcR2S ve OPG'dir. Bu reseptörlerden sadece mDR5 ölüm domaini içerir ve insanlardaki DR4 ve DR5 ile yaklaşık %60 dizi benzerliğine sahiptir. Bunun dışında, insanlardaki DcR1 ve DcR2 ile benzerlik gösteren iki tane de yalancı reseptör tanımlanmıştır. Bu yalancı reseptörlerden birinin çözülebilir formu da bulunmaktadır. Dolayısıyla fareler, OPG ile beraber toplamda iki adet çözülebilir TRAIL reseptörüne sahiptir (Şekil 2.3.) [71].

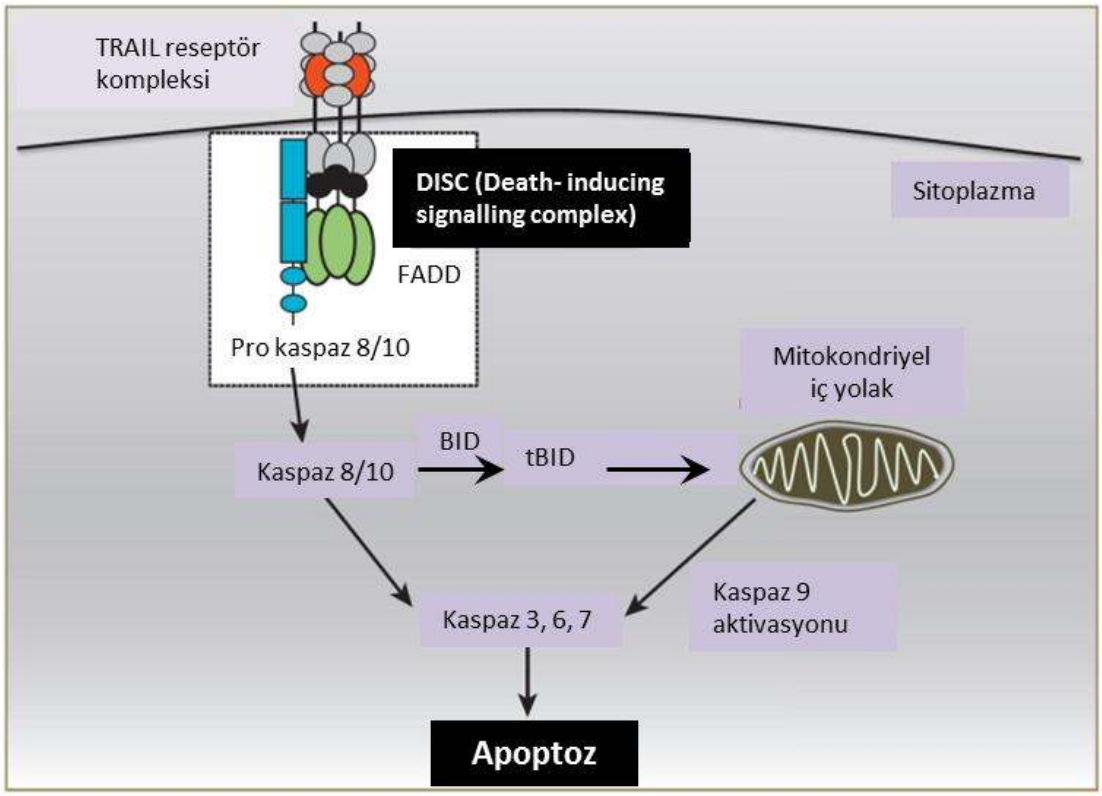


Şekil 2.3. TRAIL reseptörleri. İnsanda ve farede bulunan TRAIL reseptörleri [71].

2.2.1. TRAIL Sinyal Yolağı

2.2.1.1. TRAIL'ın Apoptotik Rolü

TRAIL, ölüm reseptörlerine bağlandığında hücre içine apoptoz sinyali iletilir. Şekil 2.4'te TRAIL aracılığıyla tetiklenen apoptoz yolağı resmedilmiştir [69]. TRAIL molekülünün DR4 ya da DR5 ile bağlanmasının ardından trimerizasyon gerçekleşir ve reseptörün hücre içinde kalan kısmında DISC (death-inducing signaling complex) adı verilen protein kompleksi oluşur [72]. Bu protein kompleksinin içinde FADD (Fas-associated death domain) ve apoptoz başlatıcısı olan kaspaz 8 bulunur. Kaspaz 8'in olmadığı durumlarda kaspaz 10 bu kompleksin içinde yer alabilir ve apoptoz sinyalini başlatabilir [73]. Kaspazların DISC yapısına katılması ve aktifleşmesi sonucunda, diğer kaspazların aktivasyonu ile dış apoptotik yolak başlar. Aynı zamanda proapototik protein olan BID'in (BH3 interacting-domain) kesilmesiyle mitokondri üzerinden de iç apoptotik yolak başlatılarak apoptoz sinyali daha da güçlendirilir [69].



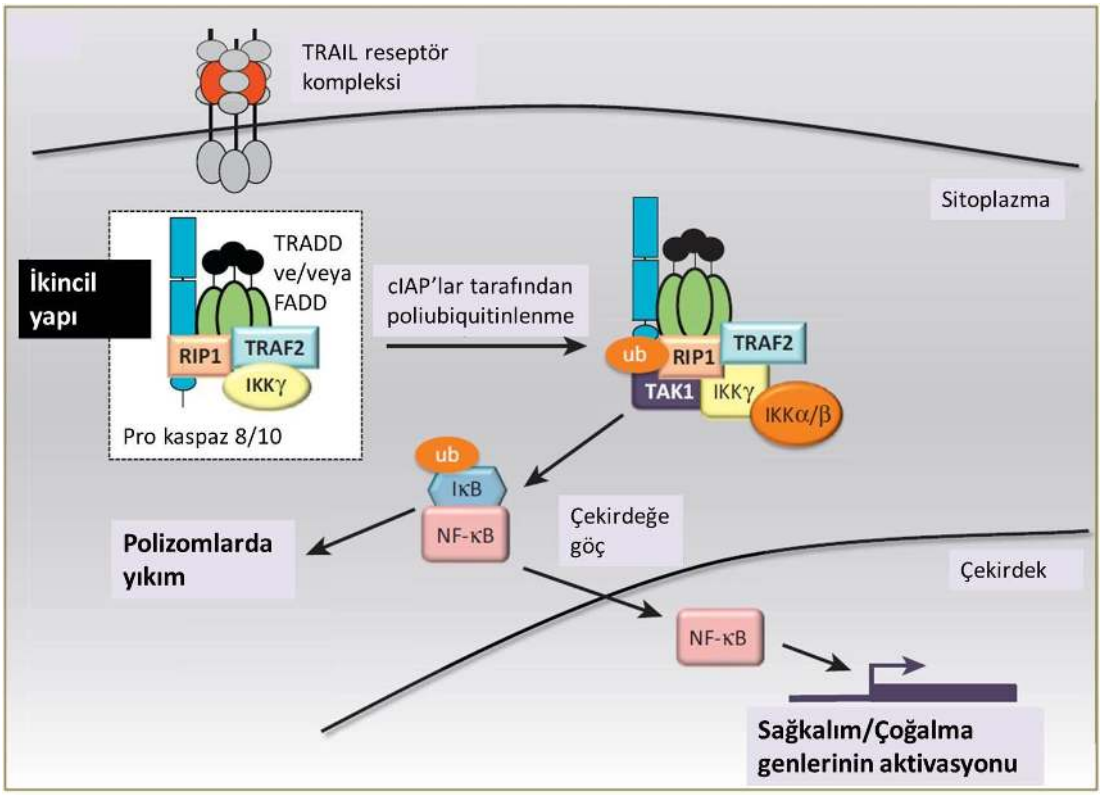
Şekil 2.4. TRAIL'ın apoptotik sinyal yolağı. TRAIL'ın başlattığı ve hücreyi ölüme götüren sinyal yolağı. TRAIL, hücre yüzeyindeki ölüm reseptörlerine bağlandıktan sonra, reseptörün hücre içinde kalan kısmındaki FADD, prokaspaz-8 ve prokaspaz-10 ile bir araya gelerek DISC yapısını oluşturur. Kaspaz 8 ve kaspaz 10'un kesilmesi ile kaspaz aktivasyonu gerçekleşince hücre ölüm işlemi başlatılır. Kaspaz 8 diğer taraftan BID'i keser ve kesilen BID mitokondriye geçerek, mitokondriyel iç yolağın aktivasyonunu ve apoptozu tetikler [69].

2.2.1.2. TRAIL'ın Apoptoz Dışı Rolü

TRAIL'ın farklı fonksiyonlarının araştırıldığı çalışmalarda, TRAIL'ın anti-apoptotik fonksiyonunun da olduğu, hatta bazı tümörlerde anti-apoptotik etki gösterip tümör hücrelerinin sağkalımını/proliferasyonunu dahi tetikleyebileceği gösterilmiştir [74]. Örneğin B hücreli kronik lenfositik lösemide (B-KLL), lösemi hücreleri üzerinde normal lenfositlere oranla daha fazla TRAIL sentezlendiği gözlenmiş, bunun sonucunda B-KLL hücrelerinin bir kısmının yaşam süresinin uzadığı ileri sürülmüştür [75, 76].

TRAIL reseptörlerinin yarattığı sinyal iletim sistemi, FADD ile bağlanan diğer ölüm reseptörleri gibi karmaşıktır. TRAIL, reseptörüne bağlandıktan sonra hücrelere apoptoz sinyalinin yanı sıra, sağkalım ve çoğalma sinyalleri de iletilebilir. Bu sinyaller, ölüm reseptörleri üzerinden NF-kB, MAP kinaz (MAPK) ve Akt aktivasyonu ile gerçekleşir. TRAIL molekülü hücre yüzeyindeki reseptörüne bağlandığında, hücre içinde DISC oluşumunu takiben "ikincil yapı" adı verilen yapı

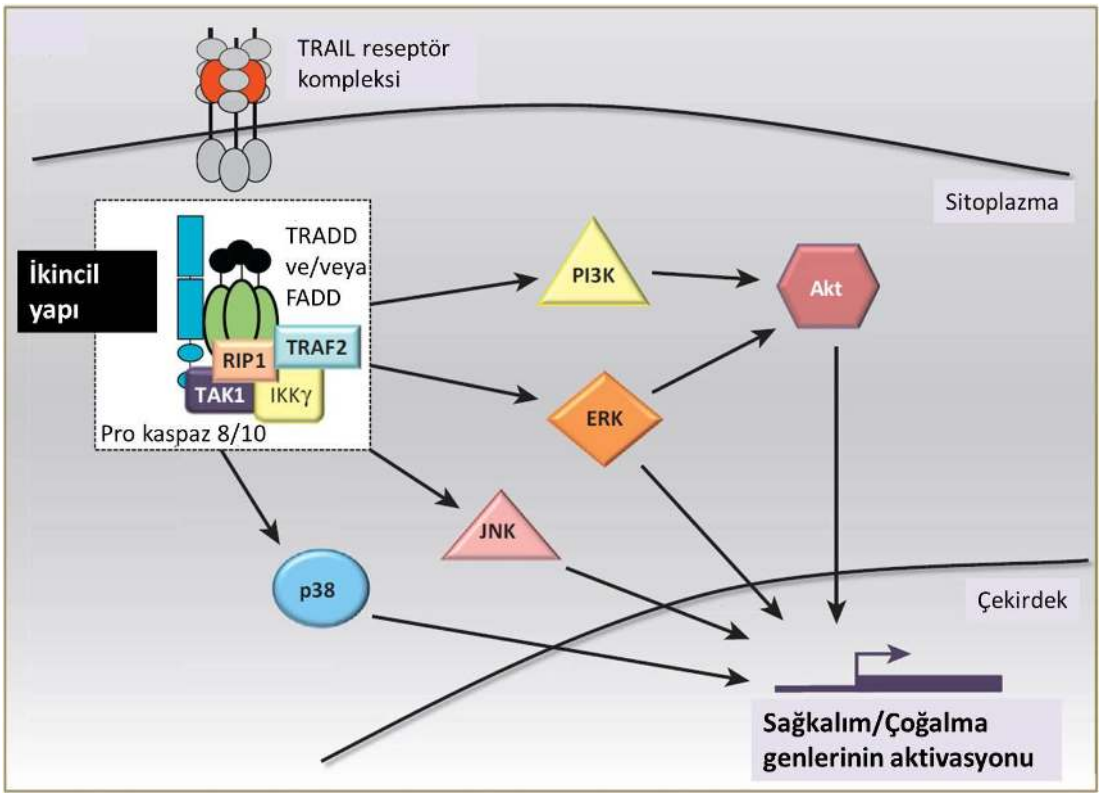
oluşur. İkincil yapıyı oluşturan moleküller, FADD ve kaspaz 8/10 içeren DISC yapısı, TRADD (TNF receptor associated DD), TRAF2 (TNF receptor-associated factor-2) ve RIP1 (receptor interacting protein-1) adlı proteindir. İkincil yapıda yer alan RIP1 proteinine, cIAP'ler (cellular inhibitors of apoptosis proteins) tarafından çoklu ubiquitin zinciri takılır ve bu proteinler çoklu ubiquitin zincirine sahip olduktan sonra TAK1 [transforming growth factor (TGF) b-activated kinase-1] ile bağlanabilir. RIP1'in TAK1 ile bağlanması sonucunda, TAK1 IKK'lerin (inhibitor of IkB kinase) aktivasyonunu sağlar. Aktif konuma geçen IKK, NF-kB molekülünün sitoplazmada tutulmasını sağlayan IkB molekülünün 48. lizin amino asidine çoklu ubiquitin zinciri bağlamak suretiyle proteozomal yıkımına neden olur. IkB molekülünün yıkımı sonucu NF-kB sitoplazmada serbest kalır ve serbest kalan NF-kB molekülü çekirdeğe göç eder (Şekil 2.5) [69].



Şekil 2.5. TRAIL'ın NF-kB aracılı sinyal yolağı. TRAIL, reseptörü ile bağlandıktan sonra ikincil yapının oluşumuna neden olur. İkincil yapı; DISC ile beraber TRADD, prokaspaz 8/10, TRAF2, RIP1, IKKα, IKKβ ve IKKγ moleküllerini içerir. RIP1 molekülünün çoklu ubiquitin ile bağlanmasının ardından TAK1 molekülü aktif hale gelir ve IKK moleküllerini fosforilleyerek NF-kB aktivasyonu sağlar. Aktifleşen NF-kB ise çekirdekte hücre sağkalımını sağlayan genlerinin sentezlenmesine öncülük eder [69].

TRAIL'ın reseptörüne bağlanmasını takiben ERK (extracellular signal-regulated kinase), JNK (c-Jun N-terminal kinase), ve p38 kinazın da içinde bulunduğu MAP kinazlar aktive olabilirler (Şekil 2.6) [69]. Bunun yanı sıra TRAIL, PI3K aktivasyonu yoluyla Akt fosforilasyonunu tetikleyebilir. Bu kinazların aktivasyonu için ikincil sinyal kompleksinin tüm elemanlarına ihtiyaç olup olmadığı bilinmemektedir. Ancak bu yolaklar arasında etkileşim olduğu kesindir. Örneğin,

TRAIL sayesinde fosforillenen ve aktifleşen Akt aslında ERK bağımlıdır [64]. Aktif hale geçen Akt, NF-kB aktivasyonu yapabilir ve bu aktivasyon sağkalım ve çoğalmanın yanı sıra hücre ölümünü de başlatabilir. Bu nedenle TRAIL sinyal yolağının ikincil yapı aracılı aktivasyonu sadece hücre sağkalımı ile sınırlı değildir. Aynı zamanda apoptoz gibi diğer hücresel olayları da yönetebilir [77, 78]. Fakat sinyal yolağındaki moleküllerin birbirleriyle etkileşimleri hala tam olarak belirlenememiştir.



Şekil 2.6. TRAIL'ın apoptoz dışı sinyal yolağı. TRAIL tarafından başlatılan ikincil yapı, PI3K ve MAPK sinyal yolaklarını tetikleyebilir, bu da hücre sağkalımı ve çoğalması ile ilgili genlerin sentezini sağlayabilir [29].

2.2.2. TRAIL'ın Sağlıklı Hücreler Üzerindeki Etkisi

TRAIL'ın fonksiyonu üzerine yapılan çalışmalar, TNF ailesi üyesi olan diğer ölüm ligandlarından farklı olarak iki önemli özelliğini ortaya koymuştur: Birincisi, malignansilere karşı doğal immun sistemin kullandığı silahlardan biri olarak kabul edilen bu molekülün, kanser hücrelerinde seçici olarak apoptozu indüklerken normal hücrelerde genel olarak apoptotik etki göstermemesidir. TRAIL'ın bu özelliği, kansere karşı geliştirilebilecek yeni terapötik stratejiler açısından büyük bir umut kaynağı olmuştur ve bu alanda birçok araştırma yürütülmektedir.

TRAIL'ın TNF süper ailesinin diğer üyelerinden farklı olan ikinci bir özelliği ise, diğer apoptotik moleküllerin ekspresyonları sıkı regülasyon altında tutulup sadece geçici olarak ifade edilirken, TRAIL ligand ve reseptörlerinin normal

dokuların büyük çoğunluğunda eksprese ediliyor olmasıdır. Bu durum, bu molekülün henüz tanımlanmamış farklı rolleri olabileceğini akla getirmektedir [79].

Nitekim, TRAIL'ın, primer insan vasküler endotel hücrelerinde (HUVEC) proanjiyogenik etki gösterdiği belirlenmiştir. Şimdiye kadar en iyi tanımlanmış anjiyogenik faktörlerden biri olan VEGF ile karşılaştırıldığında, TRAIL'ın endotelyal hücre göçünde ve yeni damar oluşumda VEGF kadar olmasa da belirgin bir etkisinin olduğu gösterilmiştir. TRAIL'ın HUVEC hücreleri üzerindeki bu proanjiyogenik etkisini ise ERK1/2 üzerinden gerçekleştirdiği belirlenmiştir [80]. Önceleri TRAIL, çeşitli kanser hücrelerinde apoptozu tetikleyebildiği için anti-kanser ilacı olarak düşünülse de, bu çalışma ile TRAIL'ın beklenmedik anjiyogenik etkisinin gösterilmesi dikkatleri farklı bir yöne çekmiştir. Aynı çalışma ekibinin yaptığı diğer bir çalışmada, yine TRAIL'ın primer vasküler endotel hücrelerde proliferasyonu tetiklediği gösterilmiştir. TRAIL'ın hücrelerde proliferasyonu tetiklerken kullandığı sinyal yolaklarının belirlenmesi için aktive olması muhtemel olan kinazların fosforilasyon ve aktivasyon düzeylerine bakıldığında, TRAIL'ın p38, JNK ve NFkB üzerinden değil de ERK1/2 ve Akt üzerinden bu etkiyi yarattığı belirlenmiştir. İnhibitör kullanılarak ERK1/2 aktivasyonu engellendiğinde TRAIL'ın aynı hücrelerde proliferasyonu sağlayamadığı belirtilmiştir. Benzer şekilde Akt aktivasyonu engellendiğinde ise hücrelerde apoptozun tetiklendiği gösterilmiştir [64]. Sonuç olarak TRAIL'ın, primer vasküler endotel hücrelerde ERK yolağı üzerinden proliferasyonu sağlarken, Akt yolağı üzerinden de bu hücreleri apoptozdan koruduğu düşünülmektedir. Diğer taraftan, endotel hücrelerin normalde TRAIL aracılı apoptoza dirençli olduğu bilinmektedir. Endotel hücre yüzeyinde eksprese edilen DcR1 ve DcR2 yalancı reseptörlerinin de endotel hücreleri TRAIL aracılı apoptozdan koruyan etmenlerden olduğu düşünülmektedir [81].

TRAIL'ın endotel hücre fizyolojisinde önemli rol oynayabileceğinin gösterilmesinin ardından, bu molekülün aynı zamanda vasküler düz kas hücrelerinde de olumlu etkileri olduğu gözlenmiştir. Örneğin, TNFα (tumor necrosis factor-α), interlökin-1β ve interferon-γ gibi pro-inflamatuar sitokinlerin neden olduğu ya da uzun süreli serumsuz ortamın tetiklediği apoptotik etkiye karşı, TRAIL vasküler düz kas hücrelerinde sağkalımı indüklemiştir. TRAIL'ın vasküler düz kas hücrelerinde aynı zamanda hücre göçünü de sağladığı gösterilmiştir. TRAIL'ın bu etkilerini ERK ve Akt fosforilasyonu yaparak gerçekleştirdiği gözlenmiştir. ERK yolunun farmakolojik inhibitörler kullanılarak baskılanması durumunda, TRAIL'ın yarattığı etkilerin de baskılandığı görülmüştür [82]. Bunun yanında, düşük dozlarda kullanıldığında (1 ng/ml) çözülebilir TRAIL molekülünün primer insan vasküler düz kas hücrelerinde NF-kB aktivasyonunu, IGF1R ekspresyonunu ve yine proliferasyonu indüklediği bildirilmiştir [83].

TRAIL'ın primer vasküler endotel hücrelerde ve vasküler düz kas hücrelerinde çoğalmayı teşvik edici etkisinin gösterilmesi üzerine diğer sağlıklı hücreler üzerindeki etkileri de merak konusu olmuştur. Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda TRAIL'ın pankreatik beta hücreleri üzerindeki etkisi tam olarak açıklığa kavuşturulamamıştır. TRAIL'ın pankreatik beta hücrelerinde apoptoza neden olmadığı yönünde bilgiler bulunmakla birlikte [84, 85], aksinin gösterildiği

çalışmalar da vardır [86]. Genel olarak, TRAIL'ın diyabet gelişiminde de önemli rolü olabileceğini gösteren çalışmalar mevcuttur.

2.2.3. TRAIL'ın Diyabetteki Rolü

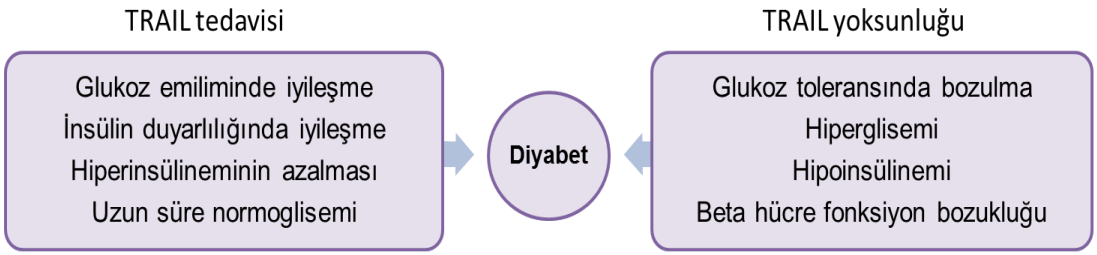
TRAIL'ın diyabet gelişimindeki etkisi ilk olarak Tip 1 Diyabet (T1D) hayvan modellerinde tanımlanmıştır. T1D'te gelişen otoimmün saldırılar sonucunda pankreatik beta hücreleri apoptoz ile yıkılır. Bu yıkımdan başlıca sorumlu hücrelerden biri de sitotoksik T hücreleridir. Bu hücreler, Fas ve TNF reseptörleri üzerinden beta hücrelerine apoptoz sinyali gönderirler. Pankreasa nüfuz eden T hücreleri ve makrofajlar, bulundukları ortama TNFα ve interferon-γ gibi proinfamatuar sitokinler salgılayarak beta hücre yıkımının şiddetlenmesi sağlarlar [87]. T1D hastalarının pankreasları incelendiğinde pankreatik adacıklarda TRAIL sentezinin olduğu, fakat sağlıklı insanların pankreatik adacıklarında TRAIL sentezinin olmadığı gösterilmiştir [88]. T1D hastalarından alınan T hücrelerindeki TRAIL sentezinin de beta hücre antijeni ile uyarıldığı zaman arttığı gösterilmiştir. Bu sonuçlar, pankreastaki TRAIL sentezinin ana kaynağının T hücreleri olduğunu düşündürse de, aslında pankreatik adacıklar ve beta hücre hatlarında da TRAIL sentezi vardır [86]. Sonuç olarak, TRAIL'ın hem pankreatik adacıklarda hem de T lenfositlerde sentezinin olduğunun gösterilmesi, TRAIL'ın T1D gelişiminde görülen beta hücre yıkım sürecinde görev aldığına işaret etse de, TRAIL'ın yıkımı hızlandırıcı yönde mi yoksa beta hücrelerini yıkımdan koruyucu yönde mi etki ettiği henüz tam olarak bilinmemektedir. Bu nedenle TRAIL'ın tip 1 diyabetteki rolü tartışmalıdır.

Son zamanlarda TRAIL'ın Tip 2 Diyabet gelişiminde de önemli rolü olabileceğine dair veriler elde edilmiştir. T2D'in giderek yaygınlaştığı da düşünüldüğünde, hastalığın mekanizmasının aydınlatılmasına yönelik her yeni bulgu önem kazanmaktadır. Dolaşımdaki TRAIL seviyesinin yeni tanı alan T2D hastalarında azaldığı, 6 aylık diyabet tedavisi sonrası önemli oranda yükseldiği gözlenmiş, dolaşımdaki TRAIL seviyesinin T2D'te endotel fonksiyon açısından koruyucu olabileceği ileri sürülmüştür [89, 90]. Her iki diyabet türünde de beta hücre kitlesinde farklı mekanizmalar aracılığıyla da olsa azalma görülebildiğinden, TRAIL'ın beta hücreleri üzerindeki rolünün tam olarak aydınlatılabilmesi, hastalığın mekanizmasının daha iyi anlaşılabilmesi yönünde önemli bilgiler sağlayabilecektir.

TRAIL'ın beta hücreleri üzerinde yıkıcı rol oynayabileceğine yönelik bulguların olmasının yanı sıra beta hücrelerini koruyucu bir rol üstlenmiş olabileceğine işaret eden bulgular da vardır. Örneğin gurubumuzun yaptığı bir çalışmada, insan pankreasında yüksek seviyede TRAIL sentezinin olması, beta hücre ölümü ile ilişkili bulunmuştur [91]. Yine grubumuzun bir çalışmasında NOD farelerde Streptozotosin (STZ) ile hızlandırılan diyabette, yıkıcı insülitis gelişimine paralel olarak pankreatik beta hücrelerinde TRAIL sentezinde önemli artış gözlenmiştir [92]. Mi ve ekibinin yaptığı bir çalışmada da, NOD farelerin pankreatik adacıklarında TRAIL sentezinin diyabet geliştikten sonra arttığı gösterilmiştir [84]. Bahsedilen tüm bu çalışmalardaki bulgular, ilk bakışta TRAIL'ın beta hücrelerindeki apoptotik ölümlere aracılık ediyor olabileceği şeklinde yorumlanabilecekken, aslında

TRAIL miktarının özellikle yıkıcı insülitis sürecinde, istilacı sitotoksik T lenfositlere karşı aktive edilen bir savunma mekanizmasının bir parçası olabileceğine de işaret etmektedir.

TRAIL'ın T1D gelişiminde olumlu etkilerinin olduğu, T1D hayvan modellerinde yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Örneğin, TRAIL-yoksun farelere, beta hücre toksini olarak bilinen ve hayvanları diyabet yapmak için sıklıkla kullanılan STZ enjekte edildiğinde, diyabet gelişiminin yabanıl tip farelere göre daha kısa sürede olduğu gözlenmiştir [67]. TRAIL-yoksun farelerin pankreatik adacıklarına daha fazla lökositin nüfuz ettiği ve daha şiddetli adacık yıkımının gerçekleştiği gösterilmiştir. Yine aynı çalışmada kendiliğinden diyabet geliştiren NOD farelere TRAIL'ın fonksiyonunu bloke etmek amacıyla soluble DR5 enjeksiyonu yapıldığında, NOD farelerin daha erken dönemde ve daha yüksek oranda diyabet geliştirdiği gösterilmiştir [67]. Sonuç olarak TRAIL yokluğunun ya da TRAIL fonksiyonunun baskılanmasının diyabet gelişimini hızlandırdığı gösterilmiştir. Bu çalışmayı destekler nitelikteki başka bir çalışmada, STZ enjeksiyonu ile diyabet yapılan hayvanlara TRAIL enjeksiyonu (5 gün boyunca, 20 µg/gün) yapıldığında, hipergliseminin azaldığı, pankreatik adacıkların kısmen korunduğu ve sistemik ve pankreatik yangı moleküllerinin daha az sentezlendiği gösterilmiştir [93]. Yine benzer bir çalışmada, kendiliğinden diyabet geliştiren NOD farelere adenoviral vektörlerle TRAIL geni aktarıldığında, diyabet insidansında azalma olduğu rapor edilmiştir [94]. Bu bulgular TRAIL varlığının diyabet gelişiminde koruyucu yönde etkisi olduğuna işaret etmektedir.



Şekil 2.7. TRAIL tedavisi ve TRAIL yoksunluğunun diyabet üzerindeki sistemik etkileri [69].

Grubumuz tarafından yapılan bir çalışmada, adenoviral vektörlerle TRAIL geni aktarılan pankreatik adacıklar diyabetik sıçanlara nakledilmiş ve nakil sonrası graftların sağkalım süresinin kontrol graftlara göre daha uzun olduğu gözlenmiştir [95]. TRAIL'ın T1D'teki rolüne yönelik olarak grubumuzun bir başka bulgusu, NOD farelerde diyabeti hızlandırıcı ajan olarak kullandığımız Siklofosfamid'in, hastalığa yol açma sürecinde TRAIL ligandını da çok güçlü oranda baskıladığının görülmesidir [92]. Siklofosfamid, normalde immun reaksiyonu baskılayıcı etki gösteren Treg hücrelerini baskılayarak T1D gelişimine yol açar. Siklosfamid'in bugüne kadar bilinmeyen bu etkisi ve tüm diğer bulgular, TRAIL'ın pankreatik beta hücreleri üzerindeki, dolayısıyla T1D'teki koruyucu rolüne işaret etmektedir.

2.2.4. TRAIL ve Reseptör İlişkisinin Önemi

TRAIL'ın normal ve kanser hücrelerindeki farklı biyolojik etkilerini (apoptoz, sağkalım, proliferasyon) gerçekleştirebilmesinde, hücre yüzey reseptörlerinin ekspresyon profilinin önemi birçok araştırmacı tarafından gösterilmiştir. Biz de çalışmalarımızda özellikle hücre yüzeyindeki yalancı reseptörlerin ekspresyon oranlarının kanser hücrelerinde TRAIL dirençliliğine neden olabileceğini gösterdik. Yalancı reseptörlerden biri olan DcR2, siRNA kullanılarak bloke edildiğinde TRAIL'ın hücrelerde apoptozu tetikleyebildiğini gözledik [96, 97].

TRAIL ve reseptör ilişkisinin diyabetteki önemi henüz bilinmemektedir. Fakat TRAIL ve reseptör sentezinin diyabette nasıl değiştiğinin bilinmesi, TRAIL'ın diyabetteki fonksiyonunun anlaşılabilmesi açısından oldukça önemlidir. Bu amaçla grubumuzun insan pankreasında yaptığı çalışmada, adacıklardaki TRAIL reseptör sentez profilleri belirlenmiş ve DcR1 ve DcR2 yalancı reseptörlerinin, DR4 ve DR5 ölüm reseptörlerine göre oldukça yüksek miktarda sentezlendiği gösterilmiştir. Reseptör sentez düzeylerindeki bu farklılığın, beta hücrelerinde TRAIL aracılı apoptoza karşı bir savunma mekanizması olabileceği akla gelmektedir. [91]. Grubumuzun NOD farelerde yaptığı bir çalışmada yine, pankreatik adacıklarda diyabet gelişimi öncesinde (10 haftalık) DR5 ölüm reseptörünün yanı sıra, DcR1 ve DcR2 yalancı reseptörlerinin de önemli miktarda sentezlendiği gözlenmiştir [92].

TRAIL'ın beta hücrelerinde apoptoza neden olmaması, bu hücrelerde FasL ve TNF-alfa gibi sitokinlerin apoptotik etkilerine karşı koruyucu rol alabileceğinin düşünülmesi, bunun yanında DcR1 ve DcR2 yalancı reseptörlerinin beta hücrelerinin yüzeyinde önemli oranda sentezlendiğinin gösterilmesi, TRAIL'ın vasküler düz kas hücreleri ve insan vasküler endotel hücreleri gibi sağlıklı hücrelerde çoğalmayı teşvik etmesi gibi bulgular göz önüne alındığında, TRAIL'ın beta hücreleri üzerinde sağkalımı ve çoğalmayı teşvik edici etkisinin olabileceği düşünülmektedir. Bu tez çalışmasında hipotezimizi bu çerçevede kurduk ve sıçanlardan elde ettiğimiz primer pankreatik beta hücrelerinde ve fare beta hücre hattında çözülebilir TRAIL molekülünün (sTRAIL) ve adenoviral vektörlerle sağlanacak olan (Ad5hTRAIL) TRAIL ekspresyonunun beta hücre canlılığı üzerine etkilerini, muhtemel proliferatif etkisini ve bu etkinin mekanizmasını araştırdık.

MATERYAL ve YÖNTEMLER

3.1. Sıçan Pankreatik Adacıklarının Elde Edilmesi

Kullanılan Solüsyonlar:

DMEM Besiyeri:

Bir şişe toz besiyeri (Sigma D5648; 4,5 g/l glukoz ve L-glutamin) ve 3,6 g sodyum bikarbonat 900 ml distile su içerisinde çözüldü ve 1 litreye tamamlandı. Steril kabinde 0,22 μm filtreden geçirildikten sonra, 5 ml penisilin-streptomisin-amfoterisin solüsyonu (Biological Industries) eklendi. Serumlu DMEM için %10 oranında inaktif NCS (Newborn Calf Serum, Biochrom AG) ilavesi yapıldı.

RPMI 1640 Besiyeri:

Bir şişe toz besiyeri (Sigma, R7755) 900 ml distile su içinde çözüldü. İçerisine %7,5 sodyum bikarbonat solüsyonu eklenerek pH 7.2'ye ayarlandı ve 1 litreye tamamlandı. Besiyeri steril kabinde 0,22 μm vakumlu filtreden geçirildi. Daha sonra 10,25 ml L-Glutamin (Biochrom AG) solüsyonu, 110 ml inaktif FBS (fetal bovine serum, Biochrom AG) ve 5 ml penisilin-streptomisin (Biochrom AG) solüsyonu ilave edildi.

Phosphate Buffer Saline (PBS) Solüsyonu:

8 g NaCl (Sigma), 0,2 g KCl (Sigma), 1,44 g NaH_2PO_4 (Sigma), ve 0,24 g KH_2PO_4 (Sigma) tartılarak, 800 ml distile su içinde çözüldü. NaOH ile pH 7.4'e ayarlandı ve toplam hacim distile su ile 1 litreye tamamlandı. Solüsyon steril kabinde 0,22 μm vakumlu filtreden geçirildi.

Enzim Stok Solüsyonu (2,5 mg/ml):

100 mg liyofilize enzim Liberaz RI (Roche), 4 ml soğuk enjeksiyon kalitesindeki su ile çözüldü ve buz üzerinde 30 dakika bekletildi. Bekleme süresinde arada bir alt üst edilerek karıştırıldı. Hazırlanan enzim solüsyonu, enjeksiyon kalitesindeki su ile 10 kat seyreltilerek -20°C'de saklandı.

Enzim Solüsyonu (0,25 mg/ml):

1 ml enzim stok solüsyonu, 9 ml serumsuz DMEM ile karıştırılarak hazırlandı.

Deney Hayvanları:

10-12 haftalık Wistar türü dişi sıçanlar Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Bakım ve Üretim Ünitesi'nden temin edildi. Deney hayvanlarına uygulanacak işlemler için Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Onayı alındı ve tüm

işlemler kurallara uygun biçimde gerçekleştirildi. Deneylerin tamamlanması için toplam 30 sıçan kullanıldı.

3.1.1. Pankreasın Cerrahi Olarak Çıkartılması

Anestezi işlemi ksilazin (40-80 mg/kg) ve ketamin (5-10 mg/kg) karışımının intra-peritonel enjeksiyonu ile gerçekleştirildi. Sıçan, çalışma tablasına sırt üstü yatırıldı ve abdomen %70'lik alkol ile temizlendi. V-insizyon ile karın boşluğuna ulaşıldı. Karaciğer kraniyele çekildi ve üzerine gazlı bez yerleştirildi. Barsaklar, hayvanın soluna alınarak pankreas ortaya çıkarıldı. Ortak safra kanalının karaciğer ucu ve duodenumla birleştiği ucu hemostat klempler ile kapatıldı. PE50 tüpü (Biopac) ile ortak safra kanalından 10 ml soğuk enzim solüsyonu enjekte edilerek pankreas şişirildi. Pensetler yardımıyla, pankreas çevre organlardan ayrıldı ve temiz bir tüp içine alındı.

3.1.2. Pankreasın Sindirimi

Pankreas 37°C su banyosunda 17-19 dakika tutuldu. Süre sonunda üzerine 40 ml serumlu DMEM eklenerek çalkalandı ve 1600 rpm'de 75 saniye süreyle 4°C'de santrifüj edildi. Çökelti üzerine 40 ml serumlu DMEM eklenerek süspanse edildi ve 400 μm'lik çelik filtreden (Thomas Scientific) geçirildi. Süspansiyon, 1600 rpm'de 75 saniye süreyle 4°C'de santrifüj edildi ve süpernatant atıldı.

3.1.3. Pankreatik Adacıkların Saflaştırılması

Çökelti, 20 ml soğuk Histopak 1077 (Sigma) ile karıştırıldı ve üzerine 10 ml serumsuz DMEM eklendi. Daha sonra 2500 rpm'de 17 dakika süreyle 4°C'de santrifüj edildi ve orta hatta toplanan adacıklar temiz bir tüpe aktarıldı. Üzerine serumlu DMEM ilave edildi ve 1600 rpm'de 2 dakika süreyle 4°C'de santrifüj edildi. Çökelti üzerine, 25 ml serumlu DMEM eklendi ve 4 dakika buz üzerinde bekletildi. Süre sonunda tüpün üzerinden 10 ml çekilerek atıldı, tekrar 10 ml serumlu DMEM eklendi. Karıştırılarak tekrar 4 dakika buz üzerinde bekletildi. Sedimentasyon adı verilen bu işlem 3-4 kez tekrarlandı. Sedimentasyonun amacı, ağır olan pankreatik adacıkların tüpün dibine çökmesi beklendikten sonra tüpün üzerinde kalan daha hafif asiner hücrelerin çekilerek uzaklaştırılması ve bu işlemlerin arka arkaya tekrarlanarak adacıkların yüksek saflıkta elde edilmesidir.

3.1.4. Pankreatik Adacıkların Kültüre Alınması

Sedimentasyon sonrasında elde edilen adacık hücre süspansiyonu kültür kabına aktarıldı ve mikroskop altında görülen adacıklar mikropipetle tek tek toplanarak mikrosantrifüj tüpüne konuldu. Bu aşamada sadece pankreatik adacıklar seçilerek toplandığı için asiner hücreler ortamdan uzaklaştırılmış oldu. Tüpe alınan pankreatik adacıklar bir kere PBS ile yıkandıktan sonra 10 ml serumlu RPMI 1640 besiyeri içerisinde kültür kabına alındı ve 37°C sıcaklık ve %5 CO_2'li nemli ortamda gece boyu tutuldu.

3.2. Pankreatik Adacıkların Canlılık Oranlarının Belirlenmesi

Kullanılan Solüsyonlar:

Floresein Diasetat Solüsyonu (FDA):

5 mg toz floresein diasetat (Sigma) tartıldı ve 1 ml aseton içinde çözülerek 4°C'de karanlıkta saklandı.

Propidyum Iodid Solüsyonu (PI):

1 mg toz propidyum iodid (Sigma) tartıldı ve 1 ml distile su içinde çözülerek 4°C'de karanlıkta saklandı.

Pankreatik adacıklar izole edildikten hemen sonra, canlılık tayini için temsili olarak yaklaşık 50 tane adacık alındı ve 1 ml PBS içine 2 µl FDA, 2 µl PI solüsyonu eklenerek adacıklarla birlikte 20 dakika 37°C'de tutuldu. Süre sonunda floresan mikroskop altında adacıkların canlılık oranları analiz edildi.

3.3. Pankreatik Adacıkların Parçalanarak Tek Hücre Kültürünün Kurulması

Kullanılan Solüsyonlar:

RPMI 1640 Besiyeri:

Bölüm 3.1.'de açıklandığı gibi hazırlandı.

PBS:

Bölüm 3.1.'de açıklandığı gibi hazırlandı.

Akutaz:

Kullanıma hazır solüsyon (Millipore).

3.3.1. Adacık Hücrelerinin 96 Kuyulu Kaplara Ekimi

İzolasyon işleminden sonra gece boyu kültürde tutulan pankreatik adacıklar mikroskop altında incelendi ve sağlıklı görünenler mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Bir kere PBS ile yıkandıktan sonra, adacıkların üzerine 1 ml akutaz enzim solüsyonu eklenerek doku kültür kabına aktarıldı. Enzimin aktivite gösterebilmesi için 37°C'de 15-20 dakika tutuldu ve her 5 dakikada bir pipetaj yapılarak adacıkların parçalanması sağlandı. Mikroskop altında adacıkların tek tek hücrelere ayrıldığı görüldükten sonra, üzerine 9 ml serumlu RPMI besiyeri eklendi ve parçalanamayan adacıkların elenmesi için 40 µm filtreden geçirildi. Thoma lamı kullanılarak hücre sayımı yapıldı ve adacıkların dağıtılmasıyla elde edilen tek hücre süspansiyonundan 100'er µl alınarak hücreler 96 kuyulu doku kültür kabının kuyularına ekildi (85000 hücre/kuyu/100 µl besiyeri). Hücreler daha sonra 37°C sıcaklık ve %5 CO_2'li %95 nemli kültür ortamına alındı.

3.3.2. Adacık Hücrelerinin pLL Kaplı Kuyulara Ekimi

Kullanılan Solüsyonlar:

Poli-L-Lizin (pLL):
Kullanıma hazır solüsyon (Sigma, 0,1 mg/ml).

96 kuyulu kültür kabının kuyularına 50'şer µl pLL eklenerek 37°C'de bir gece tutuldu. Ertesi gün kuyulardaki pLL uzaklaştırıldı ve steril distile su ile 3'er kez yıkandı. Kapak açık olarak 30 dakika kurumaya bırakıldı. Akutaz ile parçalanan adacık hücreleri kuyulara ekildi (85000 hücre/kuyu/100 µl besiyeri). Hücreler 37°C sıcaklık ve %5 CO_2'li %95 nemli kültür ortamına alındı.

3.4. Min6 Hücre Kültürü

Kullanılan Solüsyonlar:

DMEM Besiyeri:
Bölüm 3.1.'de açıklandığı gibi hazırlandı. Ek olarak 1 litre besiyerine 5 µl β-merkaptoetanol eklendi.

PBS:
Bölüm 3.1.'de açıklandığı gibi hazırlandı.

Tripsin-EDTA:
10X Tripsin-EDTA solüsyonu (Biochrom AG) PBS ile 10 kat seyreltilerek kullanıldı.

Min6 hücreleri Dr. Jun-ichi Miyazaki'nin (Osaka Üniversitesi, Japonya) izniyle Prof.Dr. Salih ŞANLIOĞLU'ndan (Akdeniz Üniversitesi) temin edildi. Min6 hücreleri %5 CO_2, %95 nem ve 37°C sıcaklıkta T25 flasklarda büyütüldü [98]. Kültür kabının %80'i hücrelerle kaplandığı zaman besiyeri çekilerek atıldı ve 5 ml PBS ile yıkandı, 0,5 ml tripsin-EDTA solüsyonu eklenerek 3-5 dakika oda sıcaklığında beklendi. Hücreler yüzeyden ayrılmaya başlayınca 5-10 ml serumlu besiyeri ile süspanse edilerek santrifüj tüpüne alındı. Tüp, 900 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve çökelti 20 ml serumlu besiyerinde homojenize edilerek 4 adet T25 flaska dağıtıldı. Besiyeri her 3 günde bir tazelendi. Deneyler pasaj sayısı 22-30 arasında olan Min6 hücreleri ile yapıldı.

3.5. A549 Hücre Kültürü

Kullanılan Solüsyonlar:

RPMI 1640 Besiyeri:
Bölüm 3.1.'de açıklandığı gibi hazırlandı.

PBS:

Bölüm 3.1.'de açıklandığı gibi hazırlandı.

Tripsin-EDTA:

Bölüm 3.4.'de açıklandığı gibi hazırlandı.

ATCC'den temin edilen insan adenokarsinoma akciğer kanser hücre hattı (A549) kullanıldı. A549 hücreleri %5 CO_2, %95 nem ve 37°C sıcaklıkta T25 flasklarda büyütüldü. Kültür kabının %80'i hücrelerle kaplandığı zaman besiyeri çekilerek atıldı ve 5 ml PBS ile yıkandı, 0,5 ml tripsin-EDTA solüsyonu eklenerek 3-5 dakika oda sıcaklığında beklendi. Hücreler yüzeyden ayrılmaya başlayınca 5-10 ml serumlu besiyeri ile süspanse edilerek santrifüj tüpüne alındı. Tüp, 900 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve çökelti 20 ml serumlu besiyerinde homojenize edilerek 4 adet T25 flaska dağıtıldı. Besiyeri her 3 günde bir tazelendi. Deneyler pasaj sayısı 55-62 arasında olan A549 hücreleri ile yapıldı.

3.6. Hücrelerin sTRAIL ile Muamele Edilmesi

Kullanılan Solüsyonlar:

sTRAIL (20 µg/ml):

Liyofilize rekombinant insan çözülebilir sTRAIL proteini (R&D, Katalog no:375-TL) 500 µl %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 µm filtreden geçirildi.

Primer Adacık Hücre Kültürü Muamele Besiyeri:

Bir şişe toz besiyeri (Sigma, R1383, L-glutaminli, glukozsuz ve sodyum bikarbonatsız) 900 ml distile su içinde çözüldü. İçerisine %7,5 sodyum bikarbonat solüsyonu eklenerek pH 7.2'ye ayarlandı ve 1 litreye tamamlandı. Besiyeri steril kabinde 0,22 µm vakumlu filtreden geçirildikten sonra 5 ml penisilin-streptomisin solüsyonu ilave edildi. Serum konsantrasyonu inaktif FBS ilavesi ile %2 yapıldı. Glukoz konsantrasyonu %45 D-glukoz ilavesi ile 5 mM yapıldı.

D-Glukoz (%45):

45 g D-glukoz (Sigma) tartılarak 80 ml distile su içerisinde çözüldü. Isıtıcı ve karıştırıcı yardımıyla çözünen solüsyon 100 ml'ye tamamlandı. 0,22 µm filtreden geçirildi.

Min6 Hücre Kültürü Muamele Besiyeri:

Bölüm 3.1'de açıklandığı gibi hazırlanan serumsuz DMEM besiyerine %0,5 oranında BSA eklendi ve filtreden geçirildi.

A549 Hücre Kültürü Muamele Besiyeri:

Bölüm 3.1'de açıklandığı gibi hazırlanan serumsuz RPMI besiyerine %0,5 oranında BSA eklendi ve filtreden geçirildi.

sTRAIL ile muamele edilecek hücreler, bir gece boyunca uygulamanın gerçekleştirileceği besiyerlerinde tutularak senkronize edildi. Ertesi gün hücrelerin üzerindeki besiyeri uzaklaştırıldı ve bir kere PBS ile yıkandıktan sonra farklı dozlarda (0, 0.1, 1, 10, 100 ng/ml) sTRAIL içeren muamele besiyeri eklenerek 37°C sıcaklık ve %5 CO_2'li %95 nemli kültür ortamına bırakıldı. Pozitif kontrol olarak %10 ya da %15 serumlu besiyeri kullanıldı.

3.7. İmmünositokimya

Kullanılan Solüsyonlar:

Bloklama Solüsyonu:

Liyofilize normal eşek serumu (Jackson ImmunoResearch) distile su içinde çözdürüldü (60mg/ml). Bloklama için %5 oranında PBS içinde sulandırılarak kullanıldı.

96 kuyulu kültür kaplarında büyütülen hücrelerin üzerindeki besiyeri çekilerek uzaklaştırıldı ve üzerine 100 µl soğuk metanol (Merck) eklenerek -20°C'de 20 dakika fiksasyon yapıldı. Süre sonunda metanol çekilerek uzaklaştırıldı ve 3 kere 5'er dakika PBS ile yıkandı. Bloklama için hücrelerin üzerine 50'şer µl bloklama solüsyonu eklendi ve oda sıcaklığında 1 saat tutuldu. Süre sonunda bloklama solüsyonu uzaklaştırıldı ve 50'şer µl primer antikor solüsyonu eklenerek gece boyu +4°C'de tutuldu. Primer antikor solüsyonu, guinea pig anti-insulin (Abcam, ab7842), rabbit anti-glukagon (Abcam, ab18461), mouse anti-vimentin (Santa Cruz), mouse anti-Ki67 (BD, 556003), goat anti-TRAIL (R&D, AF375) antikorlarının, antikor sulandırma solüsyonu (Abcam) içerisinde 1:100 oranında sulandırılması ile hazırlandı. Ertesi gün primer antikor solüsyonu uzaklaştırıldı ve 3 kere 5'er dakika PBS ile yıkama yapıldı. Daha sonra 50'şer µl sekonder antikor solüsyonu eklenerek oda sıcaklığında 1 saat tutuldu. Sekonder antikor solüsyonu, anti-guinea pig CY2 (Jackson ImmunoResearch), anti-rabbit Texas Red (Santa Cruz), anti-rabbit FITC (Jackson ImmunoResearch) ve anti-mouse Alexa Fluor 594 (Jackson ImmunoResearch), anti-goat HRP (Santa Cruz) antikorlarının 1:200 oranında PBS içinde sulandırılması ile hazırlandı. Süre sonunda sekonder antikor solüsyonu uzaklaştırıldı ve hücreler 3 kere 5'er dakika PBS ile yıkandı. Floresan boyamalar için hücrelerin üzerine DAPI çekirdek boyası içeren yapıştırma solüsyonu (Life Science Division) eklendi ve floresan mikroskopta incelendi. HRP işaretli sekonderlerle yapılan boyamalarda ise hücre çekirdekleri 30 saniye hematoksilen ile boyandıktan sonra yıkandı ve hücrelerin üzerine Kaiser's gelatin eklenerek ışık mikroskobunda incelendi.

3.8. Annexin V Testi

Kullanılan Solüsyonlar:

Annexin V-FITC Kit (Trevigen, 4830-01-K):

Hücrelerin üzerinden besiyeri uzaklaştırıldı ve soğuk PBS ile yıkandı. 10 µl 10X binding buffer, 10 µl propidium iyodid, 1 µl Annexin V conjugate, 79 µl bidistile su ile karıştırılarak Annexin V inkübasyon solüsyonu hazırlandı. Hücrelerin üzerine 100 µl Annexin V inkübasyon solüsyonu eklenerek 15 dakika karanlıkta tutuldu. Hücreler 2 kez 1X binding buffer ile yıkandı ve floresan mikroskopta görüntülendi.

3.9. WST-1 Canlılık/Proliferasyon Testi

Kullanılan Solüsyonlar:

WST-1:

Kullanıma hazır solüsyon (Roche, 11 644 807 001).

96 kuyulu kültür kabındaki hücrelere, 100 µl besiyeri varlığında 10 µl WST-1 solüsyonu eklendi ve 4 saat 37°C'de tutuldu. Süre sonunda 5-10 dakika çalkalandıktan sonra spektrofotometrede ölçüm yapıldı (test dalga boyu 440 nm, referans dalga boyu 600 nm).

3.10. MTT Canlılık/Proliferasyon Testi

Kullanılan Solüsyonlar:

MTT (5 mg/ml):

(Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT, AppliChem, A2231) 10 mg tartıldı ve 10 ml PBS içinde çözüldü. Steril kabinde 0,22 µm filtreden geçirilerek karanlıkta muhafaza edildi.

96 kuyulu kültür kabındaki hücrelere, 100 µl besiyeri varlığında 25 µl MTT solüsyonu (5 mg/ml) eklendi ve 4 saat 37°C'de tutuldu. Süre sonunda besiyeri uzaklaştırıldı ve 100 µl DMSO (Sigma) eklendi, 5-10 dakika çalkalandıktan sonra spektrofotometrik ölçüm yapıldı (test dalga boyu 540 nm, referans dalga boyu 690 nm).

3.11. Western Blot

Kullanılan solüsyonlar:

Lizis Tamponu:

100 mM NaF, 50 mM Hepes, 150 mM NaCl, 1 mM $MgCl_2$, 1 mM EGTA,1 mM Na_3VO_4, %10 Gliserol ve %1,2 Triton, 1 litre bidistile su içinde ile hazırlandı ve pH 7.4'e ayarlandı. Kullanılmadan önce 50 ml solüsyona bir tablet proteaz inhibitör kokteyli (Roche) eklenerek çözüldü.

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-merkaptoetanol eklenerek hazırlandı.

%8 Alt Jel:

4,6 ml bidistile su, 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.

%5 Üst Jel:

1,4 ml bidistile su, 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.

1X Elektroforez Tamponu:

1,5 g Tris, 9,4 g glisin ve 5 ml %10 SDS, 1 litreye bidistile su ile tamamlandı.

1X Protein Transfer Tamponu:

5,8 g Tris, 3 g glisin ve 200 ml metanol, 1 litreye bidistile su ile tamamlandı.

1X TBST (pH 7.4):

6,05 g Tris, 8,76 g NaCl ve 1 ml Tween-20, 1 litreye bidistile su ile tamamlandı.

Strip-off Solüsyonu:

33,25 ml bidistile su, 6,25 ml 0,5M Tris-HCl, 10 ml %10 SDS karıştırılarak 55°C'ye ısıtıldıktan sonra 350 µl β-merkaptoetanol eklendi.

Bloklama Solüsyonu:

5 g yağsız süt tozu 100 ml TBST'de çözüldü. Sütün içinde bulunan kazeinin kendisi bir fosfoprotein olduğu için, fosfo-antikorlar kullanılarak (p-ERK, p-p38 ve p-Akt) işaretleme yapılacağında bloklama solüsyonu olarak %1 BSA kullanıldı.

3.11.1. Hücre Lizatı Toplanması

Hücrelerin üzerinden besiyeri uzaklaştırıldı ve iki kere soğuk PBS ile yıkandı. Daha sonra hücrelerin üzerine lizis tamponu eklendi. Hücreler scraper yardımıyla kazınarak ependorfa alındı ve 10 dakika buz üzerinde tutuldu. 12000 rpm'de 4°C'de 10 dakika santrifüj yapıldı ve süpernatant temiz bir tüpe alındı. Yükleme öncesinde,

50 µg örnek, yarı hacmi kadar 2X yükleme tamponu ile karıştırıldı ve 95°C'de 5 dakika tutuldu.

3.11.2. Jel Hazırlanması ve Elektroforez

Elektroforez camları (BioRad) temizlenerek uygulama için hazırlandı ve alt jel döküldü. Jelin düzgün donması için üzeri su ile kaplandı. Jel donduktan sonra üzerindeki su döküldü ve yerine üst jel eklendi. Tarak yerleştirilerek donması beklendi. Jel donduktan sonra elektroforez tankına yerleştirildi ve tankın içi 1X elektroforez tamponu ile doldurulduu. Hazırlanan örnekler sırayla yüklendi ve 100V akımda 10-15 dakika, sonra 150V akımda 1 saat yürütüldü.

3.11.3. Örneklerin Membrana Transfer Edilmesi

Elektroforez sonunda jel çıkartılarak blotlama sandviçi hazırlandı. PVDF membran, 0,45 µm (Millipore) metanolde aktive edildikten sonra jelin üzerine yerleştirildi. Blotlama tankı 1X protein transfer tamponu ile doldurulduu ve 100 V akımda 2 saat çalıştırıldı.

3.11.4. Bloklama ve Antikor ile İşaretleme

Transfer sonrası PVDF membran bloklama solüsyonu içine alındı ve 5-10 dakika (%5 süt için) ya da 90 dakika (%1 BSA için) çalkalandı. Daha sonra membran primer antikor solüsyonu içine alınarak 4°C'de gece boyu çalkalandı. Primer antikor olarak TRAIL (1:1000, R&D AF347), DR5 (1:1000, R&D AF721), DcR1 (1:1000, R&D AF630), DcR2 (1:1000, R&D AF633), ERK1 (1:1000, sc-94), pERK1/2 (Thr202/Tyr204)(1:1000, sc-16982), p38 (1:1000, Cell Signaling #9212), pp38 (Thr180/Tyr182)(1:1000, Cell Signaling #9211), Akt1 (1:1000, sc-5298), pAkt1/2/3 (Ser473) (1:1000, sc-33437) ve yükleme kontrolü olarak β-aktin (1:1000, sc-81178) antikoru kullanıldı. Membran üç kere 10'ar dakika TBST ile yıkandı ve sekonder antikor solüsyonu içine alınarak 1 saat oda sıcaklığında çalkalandı. Membran üç kez 10'ar dakika TBST ile yıkandı. ECL solüsyonu (Roche) kullanılarak görüntüleme yapıldı.

3.11.5. Strip-off

İşaretleme yapılan membranlar 55°C'de 30 dakika strip-off solüsyonu içinde çalkalandıktan sonra 45 dakika oda sıcaklığında TBST ile yıkandı. Bloklama solüsyonu içinde 30 dakika (%5 süt için) ya da 90 dakika (%1 BSA için) çalkalandıktan sonra gece boyu 4°C'de primer antikor ile işaretlendi.

3.11.6. Western Band Analizi

ImageQuant 5.1. programı kullanılarak bandların yoğunlukları belirlendi.

3.12. Hücrelerinin Adenoviral Vektörlerle Transdüksiyonu

Kullanılan Solüsyonlar:

Transdüksiyon Solüsyonu:

%2 serumlu besiyerine farklı yoğunluklarda AdTRAIL adenoviral vektör (0, 0.25, 0.5, 1, 2, 5 µl/ml) eklenerek hazırlandı. Kullanılan AdTRAIL adenoviral vektör stoğunun konsantrasyonu $1x10^{12}$ virüs/ml olarak belirlenmişti. Hücrelere farklı miktarlarda virüs eklendiğinde, hücre başına düşen enfeksiyöz virüs partikülü 0, 125, 250, 500, 1250, 2500 MOI olarak hesaplandı. MOI (Multiplicity of infection) hücre başına düşen enfeksiyöz virüs partikülünü gösteren bir birimdir.

Min6 ve A549 hücreleri %10 serumlu besiyerlerinde yetiştirildi. Geceboyu %2 serumlu besiyerinde tutularak hücreler senkronize edildi. Ertesi gün besiyeri çekildi ve bir kez PBS ile yıkandıktan sonra transdüksiyon solüsyonu eklendi. Transdüksiyonun 48. saatinde hücreler mikroskop ile görüntülendi ve alınan resimler kaydedildi.

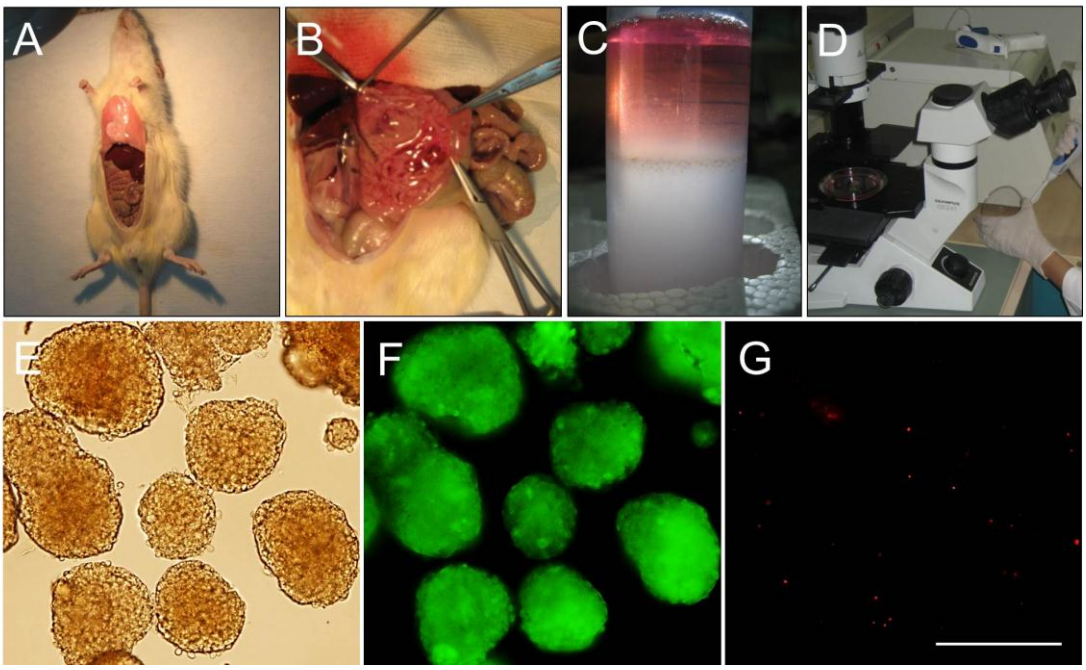
3.13. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analiz için Excel (Microsoft Office) kullanıldı ve Student's *t* test ile istatistiksel analizler yapıldı. Hata payları SEM (Standard Error of Mean) değerleri ile belirlendi ve 0.05 *p* değerinin altı anlamlı olarak kabul edildi.

BULGULAR

4.1. Sıçan Pankreatik Adacıkları Yüksek Oranda Canlı ve Saf Olarak İzole Edildi

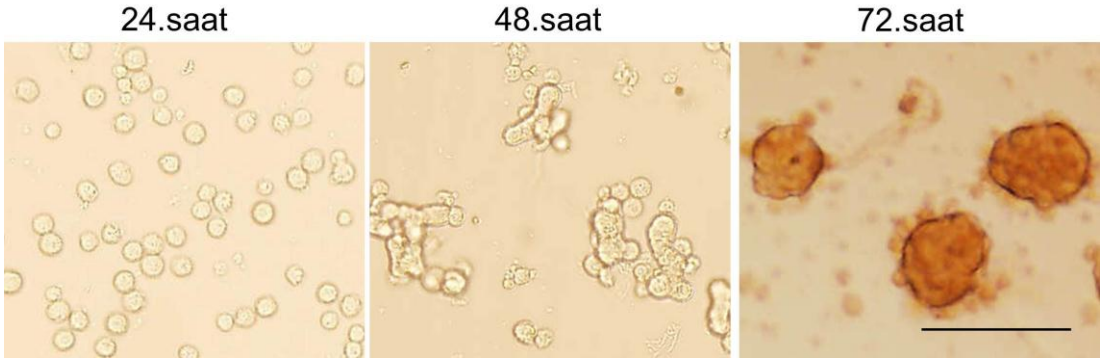
Pankreatik adacıklar 10-12 haftalık dişi Wistar türü sıçanlardan elde edildi. İzolasyon sonrasında kültüre alınan hücrelerin hepsinin pankreatik adacık olduğu mikroskop altında incelenerek belirlendi. Sıçan pankreasından izole edilen pankreatik adacıkların canlılık oranının belirlemesi amacıyla FDA/PI boyaması yapıldı. FDA (floresein diasetat), canlı hücreler tarafından hücre içine alındıktan sonra yeşil floresan renk veren floresein bileşiğine dönüştürülür. PI (propidyum iyodid) ise sadece ölü hücrelerin membranından geçebilen ve DNA'ya bağlanarak kırmızı floresan renk veren bir bileşiktir. Pankreatik adacıklar, FDA ve PI ile boyanarak floresan mikroskop altında incelendi ve adacıkların yüksek oranda canlı oldukları gözlendi (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Sıçan pankreatik adacıkları. Pankreatik adacıklar izole edildikten sonra FDA/PI boyamaları ile canlılık oranları belirlendi. (A) Pankreatik adacıklar genel anestezi altındaki 10-12 haftalık dişi Wistar türü sıçanlardan elde edildi. (B) Liberaz (Roche) enziminin pankreas kanalından enjekte edilmesi yöntemiyle şişirilen pankreas, cerrahi olarak çevre dokulardan ayrıldı. (C) Histopak yoğunluk gradienti yöntemiyle izole edilen adacıklar, (D) mikroskop altında ayırt edilerek toplandı ve kültür ortamına alındı. (E) Elde edilen adacıkların ışık mikroskobu altındaki görüntüsü. (F) FDA ile boyanan canlı hücreler ultraviyole ışık altında yeşil renkte görünmektedir. (G) PI ile boyanan ölü hücreler ultraviyole ışık altında kırmızı renkte görünmektedir (Bar uzunluğu 200 μm). Büyütme gücü 20X.

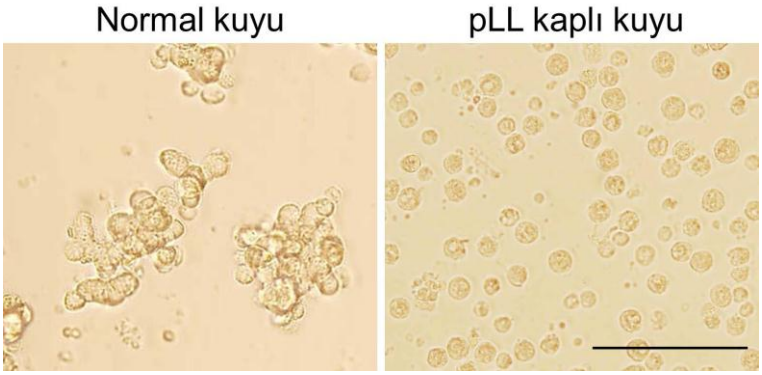
4.2. İzole Edilen Pankreatik Adacıkları Oluşturan Hücreler, Enzimatik Olarak Ayrılarak Farklı Koşullarda Kültüre Edildi

Sıçan pankreasından elde edilen adacıklar gece boyu kültürde tutulduktan sonra akutaz enzimi kullanılarak parçalandı ve tek hücre kültürü yapıldı. Adacık hücrelerinin parçalandıktan 48 saat sonra birbirlerine yaklaşarak hücre kümeleri oluşturma eğiliminde olduğu, 72 saat sonra ise tekrar bütün bir adacık görünümüne kavuştuğu gözlendi (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Primer adacık hücre kültürü. Pankreatik adacıkların enzimatik olarak dağıtılmasının ardından (24, 48, 72 saat) alınan görüntüler (Bar uzunluğu 100 μm). Büyütme gücü 40X.

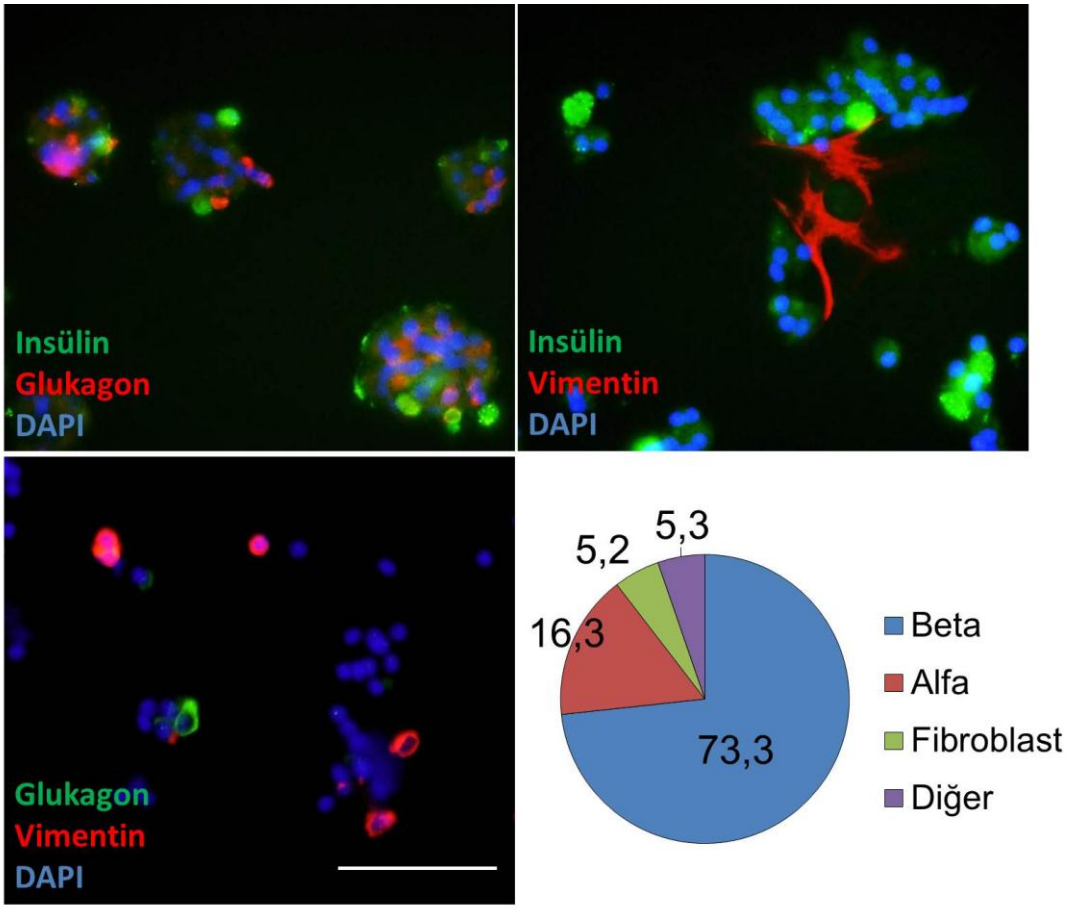
Kültür kabına çok zayıf bağlanan adacık hücrelerinin yüzeye tutunmalarını ve tek hücre halinde kalabilmelerini kolaylaştırmak amacıyla kültür kuyuları poli-L-lizin (pLL) ile kaplandı ve dağıtılan adacık hücreleri bu kuyulara ekildi. pLL, polikatyonik özelliği nedeniyle katı yüzeylere kolayca tutunur ve polianyonik hücre yüzeyiyle etkileşime girerek, hücrelerin yüzeye tutunmasına yardımcı olur. Hücre kültürü çalışmalarında hücrelerin kültür kabının yüzeyine yapışmalarını sağlamak amacıyla oldukça sık kullanılan bir ajandır. pLL kaplı kuyulara ekilen adacık hücrelerinin, ekimden 48 sonra hala tek hücre halinde kalabildikleri, bir araya gelme eğilimi göstermedikleri gözlendi (Şekil 4.3). pLL kaplı kuyularda hücrelerin yeniden bir araya gelememeleri, pLL'nin hücrelerin doğal davranışlarını engellediğini göstermektedir. Ayrıca pLL'nin hücreler ile sıkı bağlantılar kurduğu ve hücre proliferasyonu üzerine etkilerinin olabileceği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir [99]. Ayrıca pLL'nin düşük konsantrasyonda hücre proliferasyonunu indükleyebildiği, yüksek konsantrasyonda ise hücreler için toksik olabileceği göz önüne alınarak, bu aşamadan sonraki deneylerimizde pLL ile kaplama yöntemi kullanılmadı [100].



Şekil 4.3. pLL kaplı kültür kaplarının kullanılması. pLL ile kaplı olan ve kaplı olmayan kültür kaplarında 48 saat büyütülen adacık hücreleri (Bar uzunluğu 100 µm). Büyütme gücü 40X.

4.3. Tek Hücrelere Ayrılan Pankreatik Adacık Kültüründeki Farklı Hücre Popülasyonları Belirlendi

Pankreatik adacıklar, insülin salınımı yapan beta hücreleri, glukagon salınımı yapan alfa hücreleri, somatostatin salgılayan delta hücreleri, pankreatik polipeptit salgılayan gama (PP) hücreleri ve ghrelin üreten epsilon hücrelerinden oluşan karma bir hücreler kümesidir. Bütün olarak elde edilen adacıklar enzimatik olarak dağıtılarak kültür ortamında alındığında, kültür kabında birden fazla çeşitte hücre bulunur. Elde ettiğimiz kültürlerde bulunan hücre gruplarının oranlarının belirlenmesi amacıyla adacıklar, spesifik antikorlar ile boyandı. Beta hücrelerini belirlemek amacıyla insülin antikoru, alfa hücrelerini belirlemek için glukagon antikoru ve fibroblast hücrelerini belirlemek amacıyla vimentin antikorları kullanıldı. Hücre çekirdekleri ise DAPI ile boyanarak belirlendi. Yapılan hücre sayımları sonucunda beta (insülin+), alfa (glukagon+), fibroblast (vimentin+) ve diğer hücrelerin (sadece DAPI+) oranları belirlendi (Şekil 4.4). Negatif kontrol olarak hücreler sadece sekonder antikor ile boyandı ve boyamaların hücreye spesifik olduğu belirlendi.

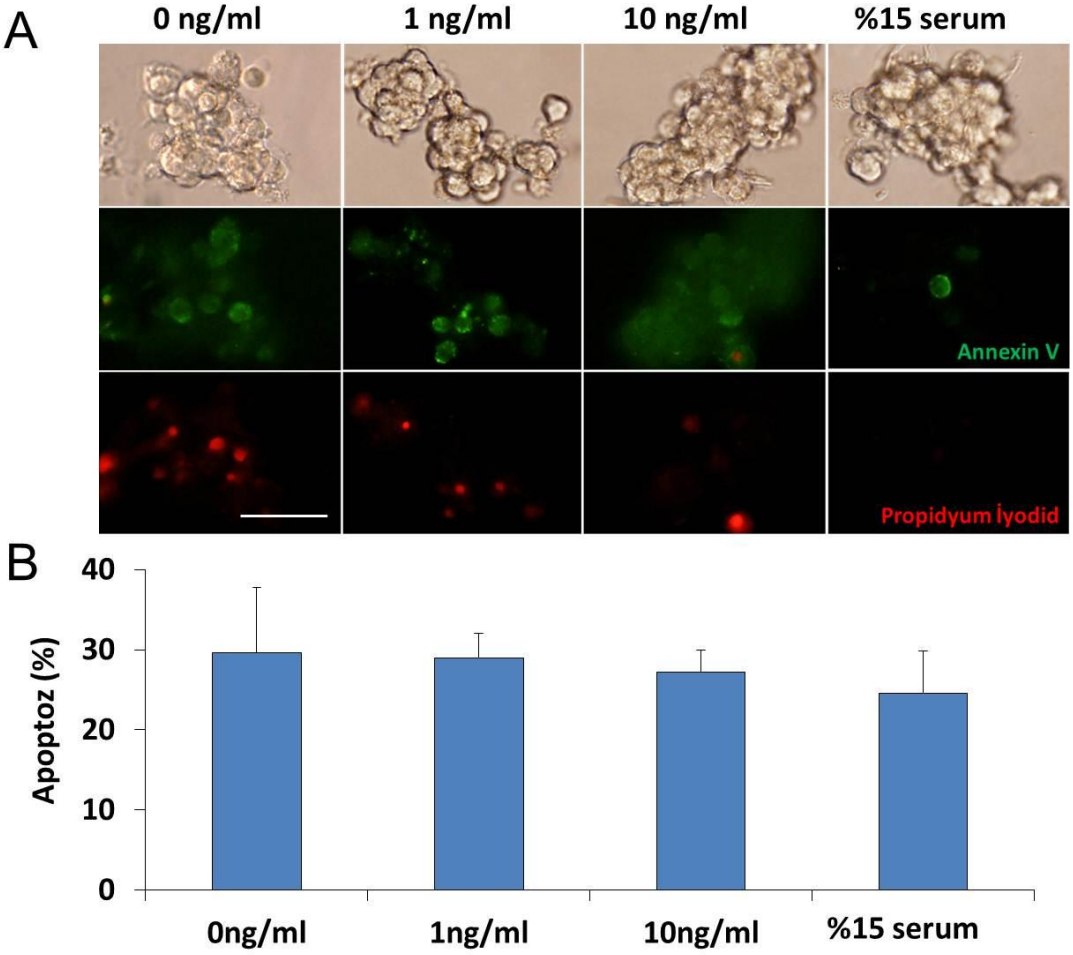


Şekil 4.4. Adacık hücre kültüründeki hücre popülasyonları. Farklı antikor kombinasyonları ile boyanan primer adacık hücrelerinin sayısal analizi ile hücre kültüründeki oranları belirlendi (Bar uzunluğu 100 µm). Her boyama için n=4 kuyu kullanıldı ve ortalama yüzde oranları belirlendi. Büyütme gücü 40X.

4.4. sTRAIL Muamelesi Primer Adacık Hücre Kültüründe Apoptotik Etki Göstermedi

TRAIL molekülünün kanser hücrelerinde apoptozu tetikleyerek hücre ölümüne neden olurken, sağlıklı hücrelerde apoptoza neden olmadığı bilinmektedir. Ayrıca TRAIL'ın hem fare [84] hem de insan [86] pankreatik adacıklarında apoptoza neden olmadığı daha önceki çalışmalarla gösterilmiştir. Çalışmamızda TRAIL'ın sıçan pankreatik hücre canlılığı üzerindeki etkilerini araştırmak üzere, primer adacık hücreleri 48 saatliğine farklı dozlarda (0, 1, 10 ng/ml) sTRAIL ile muamele edildi. Süre sonunda apoptotik hücre ölümleri Annexin V/Propidyum Iyodid ikili boyamaları ile belirlendi (Şekil 4.5A). Kullanılan bu yöntem Annexin V molekülünün hücre membranında yer alan fosfatidilserinlere bağlanabilme özelliğine dayanmaktadır. Normal hücrelerde, membran lipidlerinin bir çeşidi olan fosfatidilserin molekülleri hücre zarının sitoplazmik yüzeyinde yer alırlar. Hücrenin apoptoza gitmesi durumunda ise, fosfatidilserinler hücre zarının iç yüzeyinden dış yüzeyine geçerler ve böylece Annexin V ile kolayca bağlanırlar. Bu yer değiştirme, hücre membran bütünlüğünün bozulmadığı apoptozun erken dönemlerinde gerçekleşir. Annexin V yeşil floresan özellikteki FITC molekülü ile işaretli olduğu

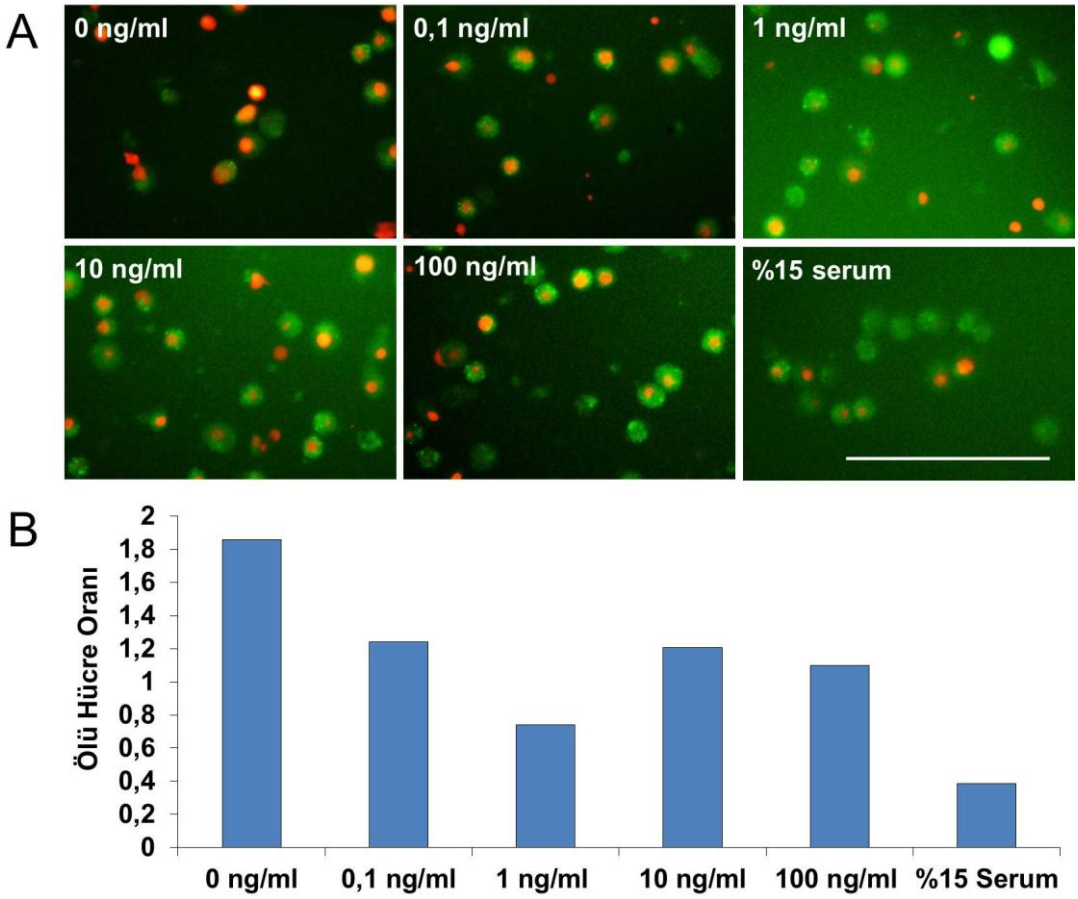
için, apoptoza giden hücreler yeşil renkte görünürler. Nekrotik hücrelerin yüzeylerinde de Annexin V bağlanması olabileceği için, yapılan propidyum iyodid boyaması ile nekrotik hücreler apoptotik hücrelerden ayrılırlar. TRAIL'ın primer beta hücreler üzerindeki apoptotik etkisini gözlemek için, sadece yeşil olan hücreler yani erken apoptotik hücreler değerlendirildi. TRAIL muamelesi yapılmayan grupta (%2 serumlu besiyeri) apoptotik hücre oranı %29,6±8,2 bulunurken, kontrol grubu olarak kullanılan %15 serumlu grupta bu oran %24,5±5,3 bulundu. TRAIL'ın düşük dozda (1 ng/ml, %28,9±3,1) ve yüksek dozda (10 ng/ml, %27,2±2,8) verildiği gruplarda ise apoptoz oranında artış olmadığı gözlendi (Şekil 4.5B).



Şekil 4.5. Primer adacık hücrelerinde apoptoz oranları. (A) Primer adacık hücreleri 48 saat süreyle farklı dozlarda (0, 1, 10 ng/ml) sTRAIL ile muamele sonrasında Annexin V (yeşil) ve propidyum iyodid (kırmızı) boyaları ile boyandı (Bar uzunluğu 50 µm). (B) Boyama sonrasında değerlendirilen grupların apoptotik hücre oranları grafikte gösterilmektedir. Her grup için n=4 kuyu kullanılmış ve deney iki kez tekrarlanmıştır. Değerler ortalama yüzde oranı ± SEM olarak ifade edilmiştir. $P > 0,05$. Büyütme gücü 40X.

TRAIL'ın primer pankreatik hücreler üzerinde apoptozu tetiklemediğini teyit etmek amacıyla hücrelere FDA/PI ile ikili boyama uygulandı ve ölü hücre sayısının (tüm kırmızı hücreler), canlı hücre sayısına (sadece yeşil hücreler) oranlanması ile ölü hücre yüzdesi belirlendi (Şekil 4.6). TRAIL ile muamele edilen gruplarda ölü

hücre oranının, TRAIL ile muamele edilmeyen kontrol grubuna (0 ng/ml) göre artmadığı, aksine azalma eğiliminde olduğu gözlendi. Özellikle 1 ng/ml sTRAIL muamelesi sonrasında ölü hücre oranının %15 serumla muamele edilen gruptaki ölü hücre oranına yaklaştığı belirlendi.

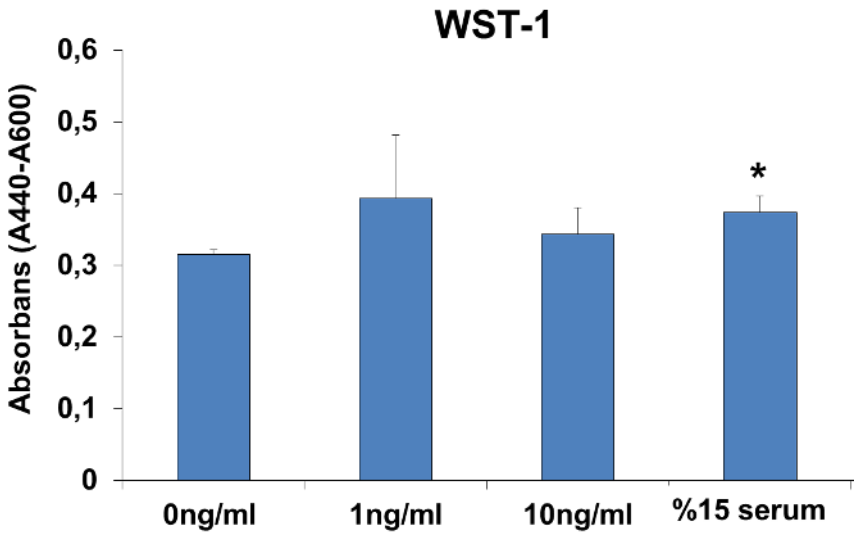


Şekil 4.6. Primer adacık hücrelerinde ölü hücre oranları. (A) Primer adacık hücreleri 48 saat süreyle farklı dozlarda (0, 0.1, 1, 10, 100 ng/ml) sTRAIL ile muamele sonrasında FDA (yeşil) ve propidyum iyodid (kırmızı) boyaları ile boyandı (Bar uzunluğu 100 µm). (B) Boyama sonrasında tüm kırmızı hücre sayısının sadece yeşil hücre sayısına bölünmesiyle elde edilen ölü hücre oranları grafikte gösterilmektedir. Her grup için toplam ortalama 2500 hücre sayıldı ve n=1 kuyu kullanıldı. Büyütme gücü 40X.

4.5. sTRAIL Muamelesi Primer Adacık Hücre Kültüründe Hücre Canlılığını ve Proliferasyonunu Artırıcı Etki Gösterdi

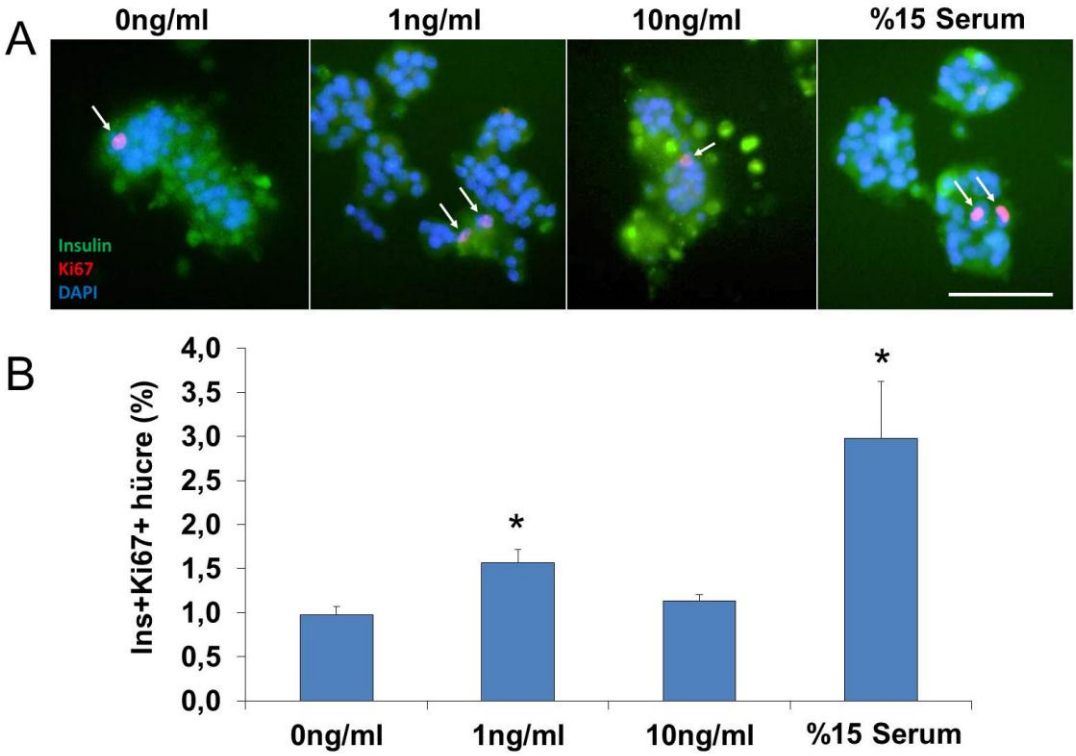
TRAIL molekülünün kanser dışındaki sağlıklı bazı hücreler üzerinde proliferasyonu tetikleyici etkisi gösterilmiştir. Örneğin TRAIL'ın vasküler endotel hücrelerde ve vasküler düz kas hücrelerinde proliferasyonu indüklediği gözlenmiştir. Pankreatik beta hücrelerinde TRAIL'ın hücre çoğalması üzerine etkisi olup olmadığını belirlemek amacıyla, 48 saat TRAIL molekülü ile muamele edilen pankreatik adacık hücrelerine canlılık ve proliferasyon testi olarak bilinen WST-1 testi uygulandı. WST-1, canlı hücrelerde bulunan mitokondriyel dehidrogenazlar tarafından renkli formazan molekülüne dönüştürülür. Oluşan ürün miktarı, hücre

sayısına ve hücrenin metabolik aktivitesine bağlı olarak artar. TRAIL ile 48 saat muamele edilen hücrelerin canlılık/proliferasyon testi sonucunda, düşük doz TRAIL muamelesinin (1 ng/ml) hücre canlılığını/proliferasyonunu artırma eğiliminde olduğu bulundu. Pozitif kontrol olarak kullanılan %15 serum ile muamele edilen grupta hücre canlılığı/proliferasyonu TRAIL ile muamele edilmeyen gruba (0 ng/ml) göre anlamlı bir artış gösterdi (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. Primer adacık hücrelerinin canlılık/proliferasyon grafiği. sTRAIL ile 48 saat muamele edilen primer adacık hücrelerinin canlılık/proliferasyon değişimi WST-1 testi ile belirlendi. Düşük doz sTRAIL (1 ng/ml) uygulanan grupta proliferasyonda artma eğilimi gözlendi. Her grup için n=4 kuyu kullanılmış ve deney üç kez tekrarlanmıştır. Değerler ortalama ± SEM olarak ifade edilmiştir. * $P < 0,05$.

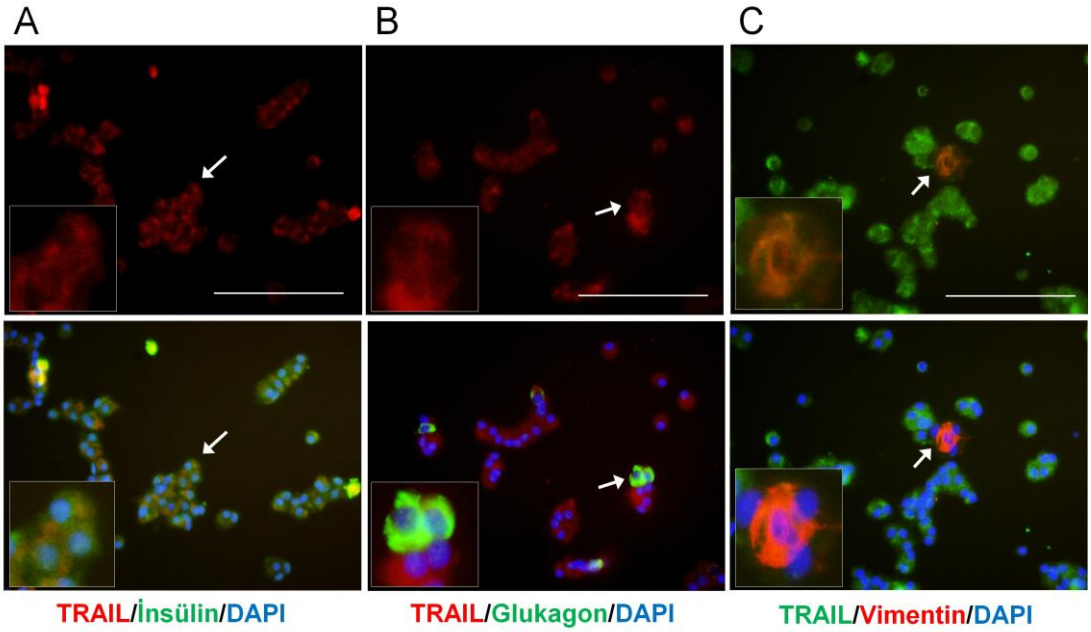
WST-1 testinden elde edilen sonuçlar, primer adacık hücre kültüründe bulunan tüm hücre grupları üzerindeki etkiyi yansıtmıştır. Oluşturduğumuz primer kültürün büyük bir kısmı beta hücrelerinden oluşmasına rağmen, kültürdeki hücre kitlesinin yaklaşık dörtte biri, adacıklardaki diğer hücre tiplerini temsil etmektedir. TRAIL'ın pankreatik beta hücrelerine özgü olarak proliferasyonu tetikleyici etkisinin olup olmadığının araştırılması için, proliferasyon belirteci olarak bilinen ve sadece çoğalan hücrelerde sentezlenen Ki67 proteini ile insülin ikili boyamasından yararlanıldı. sTRAIL molekülü ile 48 saat muamele edilen pankreatik adacık hücre kültürlerine Ki67 ve insülin boyamalarının yanısıra, hücre çekirdeklerinin boyanması için DAPI uygulandı (Şekil 4.8A). Hem insülin hem de Ki67 ile işaretlenen hücreler sayılarak, tüm insülin işaretli hücre sayısına bölündü ve beta hücre proliferasyon yüzdesi belirlendi (Şekil 4.8B). Bu sonuçlara göre; TRAIL ile muamele edilmeyen kontrol grubunda %1,06±0,18, düşük doz TRAIL (1 ng/ml) ile muamele edilen grupta %1,56±0,15, yüksek doz TRAIL (10 ng/ml) ile muamele edilen grupta %1,13±0,07, pozitif kontrol olarak %15 serum verilen grupta ise %2,98±0,65 beta hücre proliferasyonu olduğu gözlendi. İstatistiksel olarak düşük doz TRAIL uygulamasının beta hücre proliferasyonunu anlamlı derece artırdığı bulundu ($p<0,05$).



Şekil 4.8. Primer adacık beta hücrelerinin proliferasyon oranı. (A) Primer adacık hücre kültürlerine Ki67 (kırmızı) ve insülin (yeşil) antikorları ile ikili boyama yapıldı. Hücre çekirdekleri DAPI ile mavi renkte görülmektedir (Bar uzunluğu 50 µm). (B) Farklı dozlarda sTRAIL ile muamele edilen adacık hücre kültürlerindeki beta hücre proliferasyon yüzdesi grafikte gösterilmektedir. Her grup için n=4 kuyu kullanılmış ve deney iki kez tekrarlanmıştır. Değerler ortalama ± SEM olarak ifade edilmiştir. * P< 0,05. Büyütme gücü 40X.

4.6. Adacık Hücre Kültüründeki Hücrelerde TRAIL Sentezinin Olduğu Gösterildi

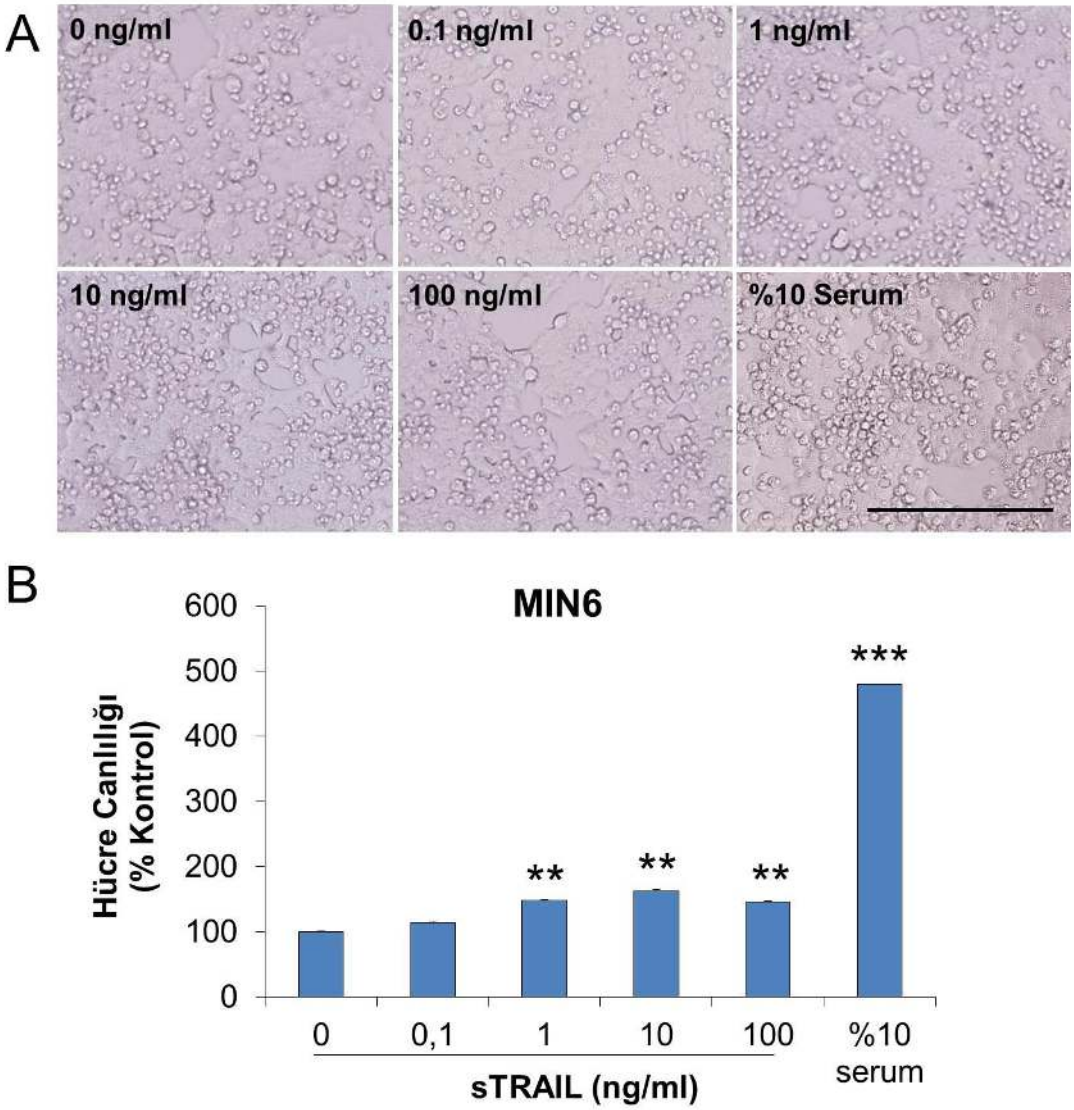
Primer sıçan adacık hücrelerinin TRAIL ile boyanması sonucunda, beta ve alfa hücrelerinin sitoplazmasında TRAIL sentezinin olduğu gözlendi (Şekil 4.9A ve 4.9B). Fibroblast hücrelerinde ise düşük oranda TRAIL sentezi olduğu, ya da hiç olmadığı belirlendi (Şekil 4.9C). TRAIL boyamasının spesifik olup olmadığını tespit etmek için beta hücreleri TRAIL geni taşıyan adenoviral vektörlerle transdükte edildikten sonra hem floresan hem de DAB yöntemiyle boyandı ve hücre sitoplazmasında güçlü TRAIL boyamasının olduğu gözlendi (Şekil 4.14). İnsülin ve glukagon boyamalarıyla üst üste gelen TRAIL boyaması, primer adacık hücre kültüründeki beta ve alfa hücrelerinin sitoplazmasında TRAIL sentezinin olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.9. Primer adacık hücrelerindeki TRAIL sentezi. (A) Primer sıçan adacık hücre kültüründe insülin(+) olan beta hücrelerinin (yeşil), aynı zamanda TRAIL(+) olduğu (kırmızı) görülmektedir. (B) Glukagon(+) olan alfa hücrelerinin de (yeşil), TRAIL(+) (kırmızı) olduğu görülmektedir. (C) Vimentin(+) hücrelerde (kırmızı) ise TRAIL boyaması görülmemektedir. Hücre çekirdekleri DAPI ile mavi renkte boyanmıştır. Her bir resmin sol alt köşesinde, okla gösterilen hücrelerin büyütülmüş resimleri yer almaktadır. (Bar uzunluğu 100 µm). Büyütme gücü 40X.

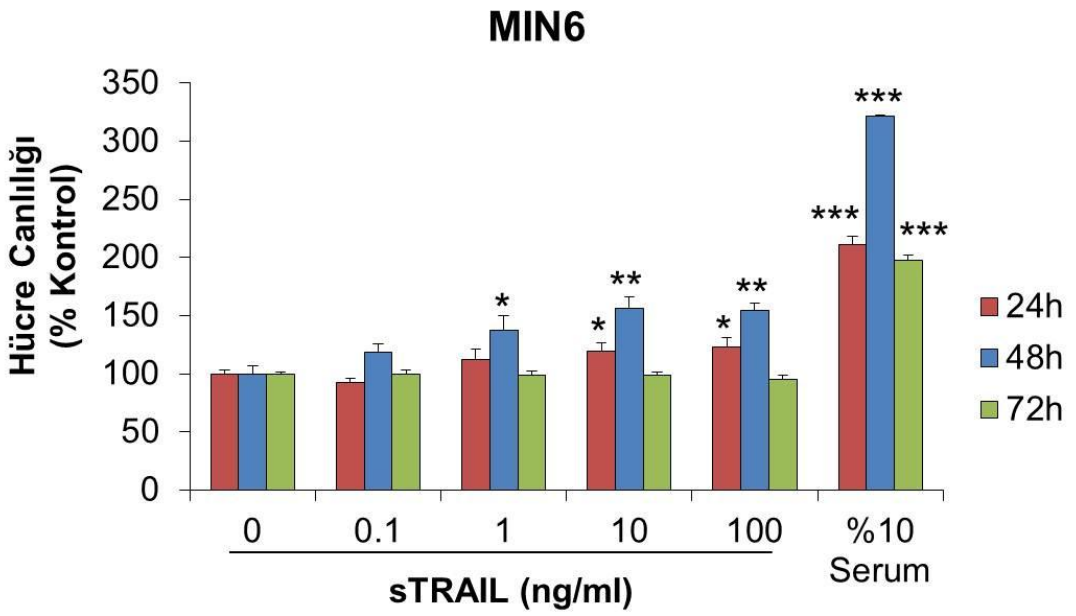
4.7. sTRAIL Uygulaması, Min6 Hücre Hattında Hücre Canlılığını Artıcı Etki Gösterdi

Sıçan primer adacık hücre kültüründe sTRAIL molekülünün proliferatif etkisinin gösterilmesi üzerine, bu etkinin sıçan primer beta hücrelerine spesifik olup olmadığını test etmek amacıyla fare beta hücreleri kullanıldı. Bu amaçla TRAIL'ın proliferatif etkisi fare beta hücre hattı olan Min6 hücrelerinde test edildi. Min6 hücreleri beş farklı dozda sTRAIL ile (0, 0.1, 1, 10, 100 ng/ml) 48 saat muamele edildi. Mikroskop altında resimleri çekilen Min6 hücrelerinin morfolojik açıdan değişmediği belirlendi. Hücre canlılığını ve proliferasyonu belirlemek amacıyla MTT testi uygulandı. MTT, primer hücre kültüründe kullanılan WST-1 testi ile aynı temele sahip olan ve hücrelerin canlılığı/proliferasyonu hakkında bilgi veren bir testtir. Uygulanan MTT testinin sonucunda, 1, 10 ve 100 ng/ml sTRAIL uygulanan grupların hücre canlılığında anlamlı bir artış gözlendi (Şekil 4.10).



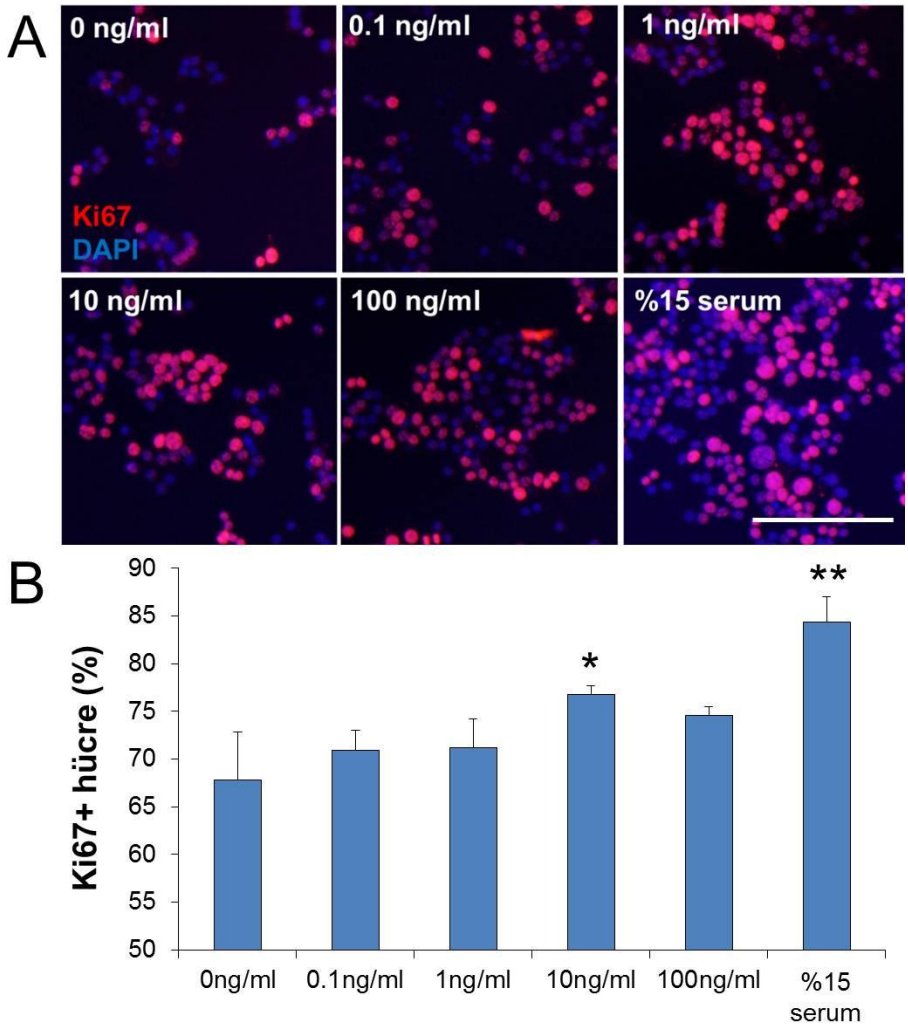
Şekil 4.10. sTRAIL'ın Min6 beta hücreleri üzerindeki etkisi. (A) Farklı dozlarda sTRAIL molekülü eklenen Min6 beta hücrelerinin morfolojilerinde bir değişim gözlenmedi. (B) sTRAIL muamelesi (1, 10 ve 100 ng/ml) Min6 hücrelerinde hücre canlılığını anlamlı derece artırdı. Her grup için n=6 kuyu kullanılmış ve deney üç kez tekrarlanmıştır. Değerler ortalama ± SEM olarak ifade edilmiştir. ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$. Bar uzunluğu 100 µm. Büyütme gücü 40X.

sTRAIL muamelesi ile hücre canlılığının artması üzerine, Min6 hücrelerinde iki farklı süre daha test edildi. Bu amaçla yine beş farklı sTRAIL dozu (0, 0.1, 1, 10, 100 ng/ml) ile 24, 48 ve 72 saat sTRAIL muamelesi yapıldı. Her bir sürenin sonunda MTT testi uygulandı ve en yüksek canlılık oranının 48. saatte olduğu görüldü. Muhtemelen hücrelerin aşırı çoğalması ve besiyerinin değişmemesi gibi faktörlerin etkisi ile 72. saatte hücre canlılığı bir önceki zaman dilimine göre azalmıştır (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. Min6 beta hücrelerinin canlılık/proliferasyon oranı. Min6 beta hücre kültürü farklı dozlarda (0, 0.1, 1, 10, 100 ng/ml) ve farklı sürelerle (24, 48 ve 72 saat) sTRAIL molekülü ile muamele edildi. MTT testi sonunda elde edilen hücre canlılık grafiği gösterilmektedir. Her grup için n=6 kuyu kullanılmış ve deney üç kez tekrarlanmıştır. Değerler ortalama ± SEM olarak ifade edilmiştir. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

TRAIL'ın Min6 beta hücre hattı üzerindeki proliferasyonu artırıcı etkisi Ki67 ve DAPI boyaması yapılarak teyit edildi (Şekil 4.12A). Ki67 ile işaretlenen hücreler sayılarak, tüm DAPI işaretli hücrelerin sayısına bölündü ve Min6 beta hücre proliferasyon yüzdesi belirlendi (Şekil 4.12B) . Bu sonuçlar MTT testinde gözlenen sonuçlar ile benzerlik gösterdi. sTRAIL ile 48 saat muamele edilen Min6 hücrelerinde, özellikle 10 ng/ml sTRAIL dozunun hücre proliferasyonunu artırdığı gözlendi.

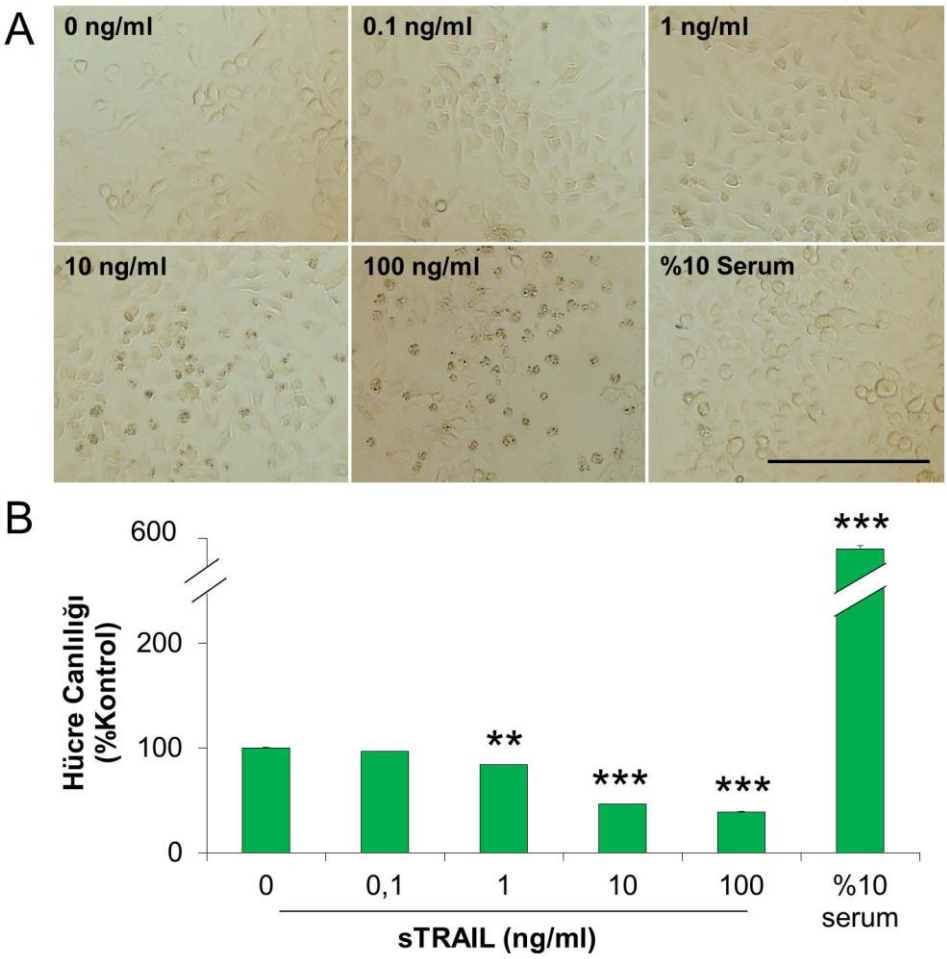


Şekil 4.12. sTRAIL'ın Min6 hücre proliferasyonu üzerine etkisi. (A) Min6 beta hücreleri 48 saat süreyle farklı dozlarda sTRAIL molekülü ile muamele edildikten sonra Ki67 antikoru (kırmızı) ve DAPI (mavi) ile işaretlendi. (B) Farklı dozlarda sTRAIL ile muamele edilen Min6 hücrelerinin proliferasyon yüzdesi grafikte gösterilmektedir. Her grup için n=6 kuyu kullanılmış ve deney iki kez tekrarlanmıştır. Değerler ortalama ± SEM olarak ifade edilmiştir. * $P< 0,05$, ** $P< 0,01$. Bar uzunluğu 100 µm. Büyütme gücü 40X.

4.8. sTRAIL Uygulaması, Kontrol Olarak Kullanılan A549 Hücre Hattında Toksik Etki Gösterdi

TRAIL molekülünün birçok kanser hücrelerinde apoptotik etkisi bilinmektedir. Kullandığımız sTRAIL rekombinant proteininin etkinliği teyit etmek ve deney sisteminin düzgün çalıştığını göstermek amacıyla kontrol amaçlı olarak, A549 akciğer kanser hücre hattı kullanılarak MTT testi uygulandı. Min6 beta hücre hattında olduğu gibi, A549 hücrelerine de beş farklı TRAIL dozu (0, 0.1, 1, 10, 100 ng/ml) 48 saat süreyle uygulandı. Süre sonunda mikroskop altında hücre morfolojileri incelendi ve özellikle yüksek doz sTRAIL uygulanan gruplarda apoptotik hücrelerin sayısında artma, sağlıklı tutunan hücrelerin sayısında ise azalma gözlendi. Yapılan MTT testi sonucunda da, verilen sTRAIL dozlarının, özellikle 1,

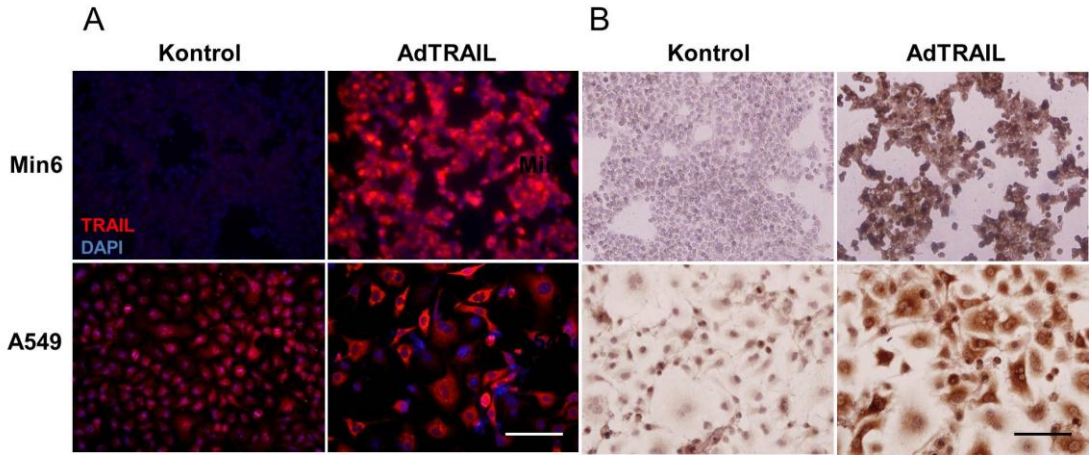
10 ve 100 ng/ml sTRAIL'ın A549 hücreleri üzerinde sitotoksik etki yarattığı belirlendi (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. A549 hücrelerinin sTRAIL ile muamele edilmesi. (A) A549 akciğer kanser hücrelerinin beş farklı sTRAIL ile 48 saat muamele edilmesinin ardından hücre morfolojilerinde gözlenen değişiklikler. (B) MTT testi sonucunda elde edilen hücre canlılığı grafiği. Her grup için n=6 kuyu kullanılmış ve deney iki kez tekrarlanmıştır. Değerler ortalama ± SEM olarak ifade edilmiştir. * P< 0,05, ** P< 0,01, *** P< 0,001. Bar uzunluğu 100 µm. Büyütme gücü 40X.

4.9. TRAIL Geni Adenoviral Vektörler Aracılığıyla Hücrelere Aktarılarak Hücre İçindeki TRAIL Sentezi Artırıldı

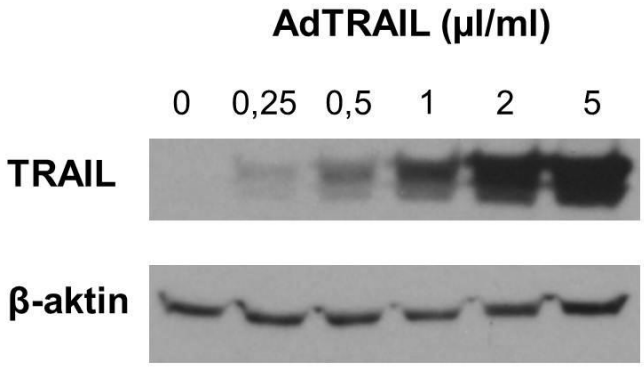
Hücrelere dışarıdan rekombinant protein verilerek gerçekleştirilen sTRAIL uygulamasının yanı sıra, hücrelerin TRAIL sentezi yapması sağlanarak, artan TRAIL sentezinin hücre canlılığı üzerindeki etkisi test edildi. Öncelikle Min6 ve A549 hücreleri TRAIL geni taşıyan adenoviral vektörlerle (5 µl/ml AdTRAIL) enfekte edildi ve gen aktarımının gerçekleştiğinin gösterilmesi amacıyla transdüksiyondan 48 saat sonra hücreler TRAIL antikoru ile boyandı. Hem floresan (Şekil 4.14A) hem de HRP (Şekil 4.14B) işaretli sekonder antikorlar kullanılarak yapılan boyamalar sonucunda, Min6 ve A549 hücrelerinde AdTRAIL ile transdüksiyon sonrasında TRAIL sentezinin arttığı gösterildi.



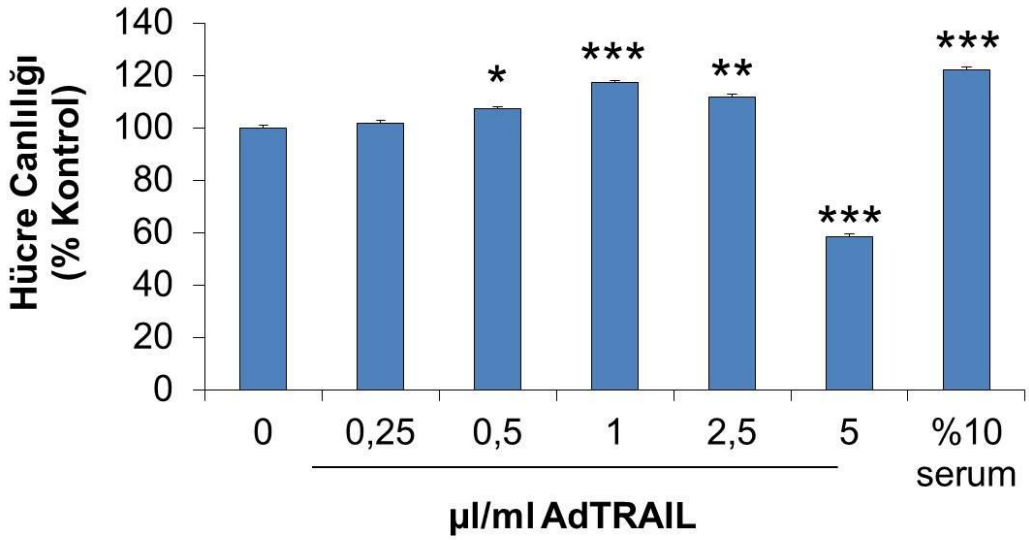
Şekil 4.14. Hücrelerdeki TRAIL sentezi. TRAIL geni taşıyan adenoviral vektörlerle transdükte edilen ve edilmeyen Min6 (üst sıra) ve A549 (alt sıra) hücre hatları TRAIL antikoru kullanılarak boyandı. (A) Immünofloresan boyama yapılan hücrelerde AdTRAIL transdüksiyonu sonrasında TRAIL sentezinin (kırmızı) arttığı görülmektedir (hücre çekirdeği DAPI ile maviye boyandı). (B) İmmünositokimyasal olarak boyanan hücrelerde yine AdTRAIL ile transdüksiyon sonrasında TRAIL sentezinde (kahverengi) artış olduğu teyit edilmiştir (hücre çekirdeği hematoksilenle mor renge boyandı). Kontrol (0 µl/ml AdTRAIL), AdTRAIL transdüksiyonu (5 µl/ml AdTRAIL). Bar uzunluğu 100 µm. Büyütme gücü 40X.

4.10. TRAIL Geni Kodlayan Adenoviral Vektörler Aracılığıyla TRAIL Sentezi Artırılan Min6 Hücrelerinde Hücre Canlılığı/Proliferasyonunda Artış Gözlendi

Adenoviral vektörler aracılığıyla hücrelerde artan TRAIL sentezinin hücre canlılığına etkisinin araştırılması amacıyla, Min6 hücreleri altı farklı dozda (0, 0.25, 0.5, 1, 2, 5 µl/ml) AdTRAIL ile (0, 125, 250, 500, 1250, 2500 MOI) transdükte edildi. Transdüksiyon sonrasında transgenin ifade edilmesi ve etkisini göstermesi amacıyla 48 saat beklendi ve süre sonunda Min6 hücreleri toplanarak hücre lizatı elde edildi. Toplanan hücre lizatları ile yapılan Western Blot sonucunda Min6 hücrelerinde AdTRAIL miktarı arttıkça hücrelerde sentezlenen TRAIL miktarının da arttığı görüldü (Şekil 4.15). TRAIL geni aktarılan Min6 hücrelerine MTT uygulandığında, 0.5, 1, ve 2 µl/ml AdTRAIL transdüksiyonu yapılan gruplarda hücre canlılığının anlamlı derecede arttığı, 5 µl/ml AdTRAIL transdüksiyonunun ise hücrelerde sitotoksik etkiye neden olduğu görüldü (Şekil 4.16).



Şekil 4.15. TRAIL gen aktarımı sonrasında Min6 hücrelerindeki TRAIL sentezi. AdTRAIL ile enfekte edilen Min6 hücrelerinde verilen virüs dozu arttıkça, hücre içinde sentezlenen TRAIL miktarı da artmaktadır.

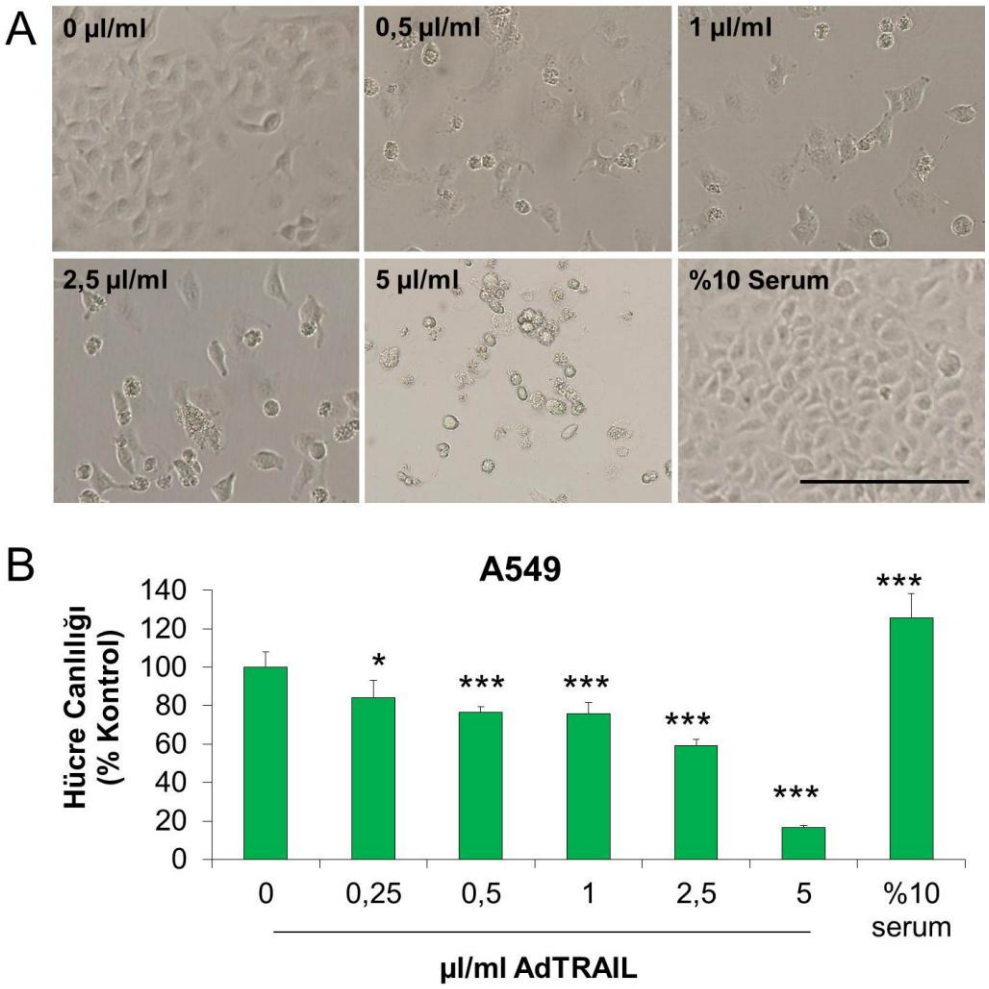


Şekil 4.16. TRAIL gen aktarımının Min6 hücreleri üzerindeki etkisi. MTT testi sonucunda AdTRAIL vektörü ile artan dozlarda enfekte edilen Min6 hücrelerinin hücre canlılığında da artış olduğu gösterilmektedir. Her grup için n=6 kuyu kullanılmış ve deney iki kez tekrarlanmıştır. Değerler ortalama ± SEM olarak ifade edilmiştir. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

4.11. Adenoviral Vektörler Aracılığıyla TRAIL Sentezi Artırılan A549 Hücrelerinde Hücre Canlılığı/Proliferasyonu Azaldı

Adenoviral vektörlerle Min6 hücrelerine aktarılan TRAIL geninin hücre içerisindeki etkinliğinin test edilmesi amacıyla kontrol grubu olarak A549 hücreleri kullanıldı. A549 hücreleri altı farklı dozda (0, 0.25, 0.5, 1, 2, 5 µl/ml) AdTRAIL ile enfekte edildi ve transdüksiyonunun 48.saatinde hücrelerin morfolojileri mikroskop altında incelendi. Transdüksiyon yapılan hücrelerde hücre sayısının belirgin oranda azaldığı ve apoptotik hücre sayısının arttığı gözlendi (Şekil 4.17A). Kantitatif değerlendirme amacıyla yapılan MTT testi sonucunda, AdTRAIL ile enfekte edilen

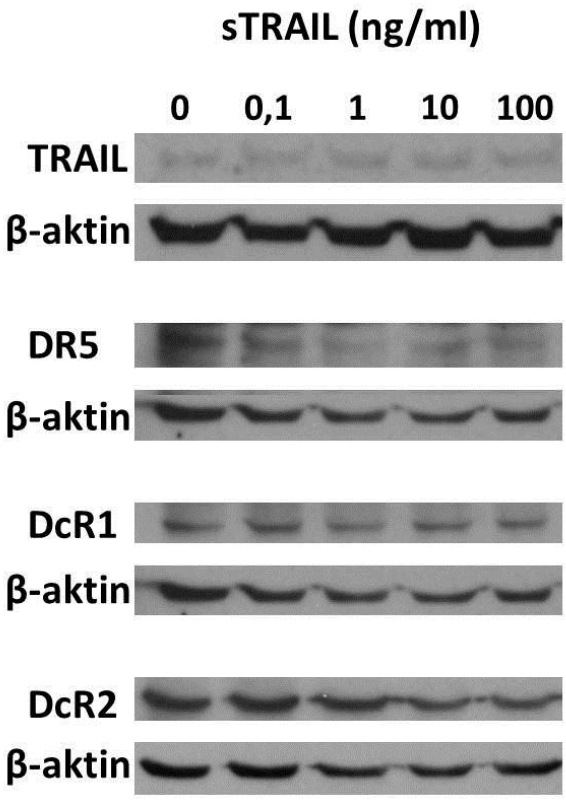
tüm gruplarda hücre canlılığının anlamlı derecede azaldığı gözlendi. Hücrelere verilen virüs dozu arttıkça, sitotoksik etkinin de arttığı gözlendi (Şekil 4.17B).



Şekil 4.17. AdTRAIL transdüksiyonunun A549 hücreleri üzerindeki etkileri. (A) AdTRAIL vektörü ile artan dozlarda enfekte edilen A549 hücreleri mikroskop altında incelendiğinde belirgin bir sitotoksik etki görüldü. (B) MTT testi uygulanan hücrelerin hücre canlılığı grafiği gösterilmiştir. Her grup için n=6 kuyu kullanılmış ve deney iki kez tekrarlanmıştır. Değerler ortalama ± SEM olarak ifade edilmiştir. * P< 0,05, ** P< 0,01, *** P< 0,001. Bar uzunluğu 100 µm. Büyütme gücü 40X.

4.12. sTRAIL ile Muamele Edilen Min6 Hücrelerindeki TRAIL ve Reseptör Sentezleri Belirlendi

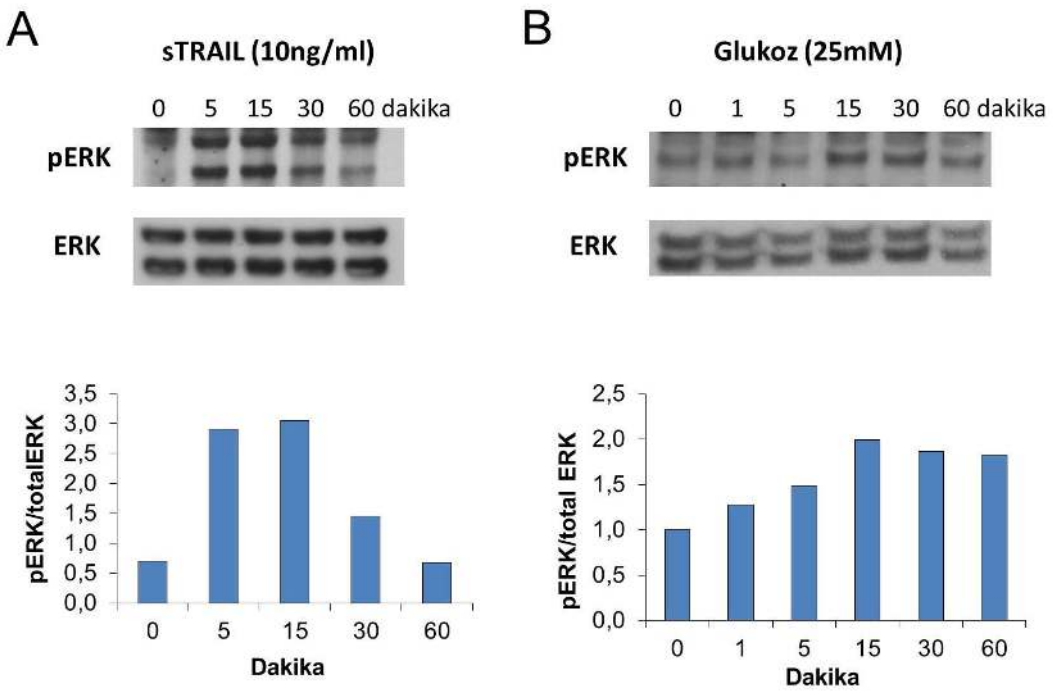
Farklı dozlarda 48 saat sTRAIL ile muamele edilen Min6 fare beta hücrelerindeki TRAIL ve reseptör sentez oranları Western Blot yöntemi ile belirlendi (Şekil 4.18). Min6 hücrelerinde TRAIL sentezinin olduğu ve sTRAIL muamelesi ile değişmediği görüldü. Diğer taraftan DR5 reseptör sentezi sTRAIL muamelesi ile doza bağlı olarak giderek azalmakta iken diğer reseptörlerin (DcR1 ve DcR2) sentezinde değişim olmadığı belirlendi.



Şekil 4.18. Min6 hücrelerindeki TRAIL ve reseptör sentezi. Farklı dozlarda sTRAIL ile 48 saat muamele edilen Min6 hücrelerindeki TRAIL, DR5, DcR1 ve DcR2 sentezleri Western Blot yöntemi ile gösterildi. Yükleme kontrolü olarak β-aktin kullanılmıştır.

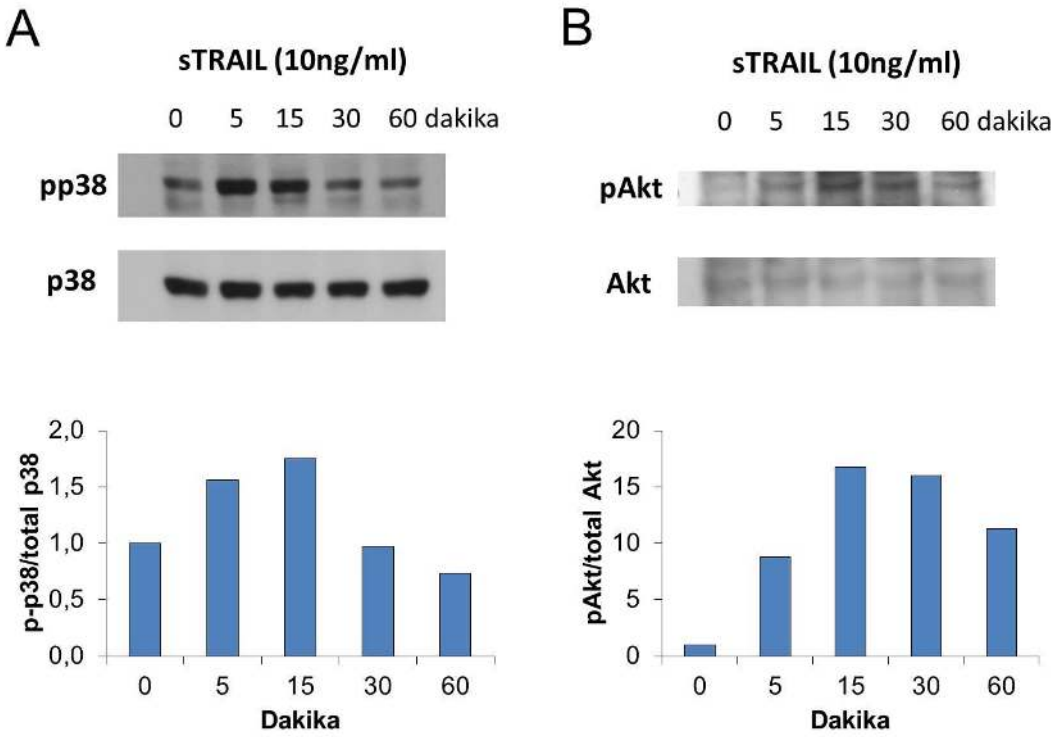
4.13. sTRAIL, ERK, p38 ve Akt Üzerinden Min6 Hücrelerinde Proliferasyon Sağlıyor Olabilir

TRAIL'ın hücre yüzeyinde reseptörüne bağlanmasını takiben, hücre içinde ERK (extracellular signal-regulated kinase), p38/MAPK ve Akt gibi güçlü hücre proliferasyon tetikleyici kinazların aktive olabildiği bilinmektedir. TRAIL molekülünün Min6 hücrelerinde proliferasyonu artırırken kullandığı mekanizmanın aydınlatılması amacıyla, hücre içinde aktive olabileceği düşünülen ERK, p38 ve AKT'nin fosforilasyon düzeyleri araştırıldı. ERK1/2 aktivasyonu için Thr202/Tyr204 fosforilasyon bölgelerini tanıyan, p38/MAPK aktivasyonu için Thr180/Tyr182 fosforilasyon bölgelerini tanıyan ve Akt aktivasyonu için Ser473 fosforilasyonunu tanıyan antikorlar kullanıldı. Min6 hücrelerinde en yüksek proliferasyonun gözlendiği doz (10 ng/ml) daha önceki deneylerle belirlenmişti. Min6 hücreleri 10 ng/ml sTRAIL ile farklı sürlerde (0, 5, 15, 30, 60 dakika) muamele edildiğinde sTRAIL uygulamasının ardından 15. dakikada ERK'nin fosforilasyon düzeyinde artış tespit edildi (Şekil 4.19A). Kontrol amaçlı beta hücrelerinde ERK fosforilasyonunu artırdığı bilinen glukoz muamelesi yapıldı ve Min6 hücrelerinde 25 mM glukoz muamelesinin ERK fosforilasyon düzeyini artırdığı gösterildi (Şekil 4.19B).



Şekil 4.19. sTRAIL muamelesinin ERK fosforilasyonu üzerine etkisi. (A) 10 ng/ml sTRAIL ve (B) kontrol amaçlı 25 mM glukoz ile muamele edilen Min6 hücrelerinde ERK fosforilasyon düzeyleri Western Blot yöntemi ile araştırıldı ve ERK fosforilasyonunda artış gözlendi.

sTRAIL ile muamele edilen Min6 hücrelerinde ERK fosforilasyonun yanısıra p38 ve Akt fosforilasyonu da Western Blot yöntemi ile tayin edildi. sTRAIL (10 ng/ml) ile muamele edilen Min6 hücrelerin p38 ve Akt fosforilasyon düzeylerinde artış olduğu gösterildi (Şekil 4.20).



Şekil 4.20. sTRAIL muamelesinin p38 ve Akt fosforilasyonu üzerine etkisi. 10 ng/ml sTRAIL ile muamele edilen Min6 hücrelerinde (A) p38 ve (B) Akt fosforilasyon düzeylerinin Western Blot yöntemiyle tayini.

TARTIŞMA

İnsülin üreten pankreatik beta hücre kitlesi, hem Tip 1 Diyabet (T1D) hem de Tip 2 Diyabet'te (T2D) giderek azalarak hastalık gelişimine katkıda bulunur. Bu nedenle, fonksiyonel beta hücre kitlesini artırmaya yönelik yeni/tamamlayıcı tedavi yaklaşımlarının geliştirilebilmesi, her iki tip diyabet için de fayda sağlayıcı olacaktır.

İmmun sistemin önemli komponentlerinden biri olan TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL), TNF-alfa ve FasL'a olan homolojisinden dolayı, bir apoptotik ligand olarak tanımlanmıştır. Malign hücrelerde güçlü bir apoptoz indükleyicisi olarak bilinen TRAIL'ın normal hücre fizyolojisindeki rolü ise henüz tam olarak bilinmemektedir. TRAIL'ın indüklediği sinyal yolları aydınlatıldıkça, bu molekülün ilk keşfedildiğinde düşünülenden daha farklı fonksiyonları olabileceği görülmüştür. Bu alanda yapılan çalışmalar, TRAIL'ın apoptozun yanı sıra, farklı hücrelerde sağ kalımı, proliferasyonu ve farklılaşmayı tetikleyebileceğini göstermiştir. TRAIL'ın, diyabetin gelişim mekanizmasında da önemli rolü olabileceği birçok farklı çalışma ile gösterilmiş, ancak bu rol henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Ancak, elde edilen bulgular, TRAIL eksikliğinin T1D gibi otoimmün hastalıkların gelişimini hızlandırdığı yönündedir ve T2D gibi inflamasyon ile tetiklendiği düşünülen bozuklukların gelişiminde de önemli rol oynayabileceğini akla getirmektedir. Bu fonksiyonların pankreatik adacıklarla ne derece ilişkilendirilebileceği, yapılacak ileri çalışmalarla ortaya çıkabilecektir. Genel olarak TRAIL'ın pankreatik beta hücreleri üzerinde koruyucu rol gösterdiği düşünülüyor olsa da, bu molekülün beta hücreleri üzerindeki etkisi tam olarak aydınlatılmamıştır. TRAIL'ın vasküler endotel hücrelerde [64], vasküler düz kas hücrelerinde [82] ve romatoid artrit sinoviyal fibroblast hücrelerinde [65] koruyucu etki gösterdiği, sağkalımı indüklediği, bu etkisi yanında bu hücrelerin proliferasyonunu da tetikleyebildiği gösterilmiştir. Çalışmamızda, TRAIL'ın pankreatik beta hücreleri üzerindeki biyolojik etkisinin tanımlanması ve olası proliferatif etkisinin gösterilmesi hedeflendi.

Bu hedefimiz doğrultusunda, pankreatik beta hücresi olarak, sıçanlardan elde ettiğimiz pankreatik adacıklarda mevcut olan beta hücreleri ve Min6 fare insulinoma hücre hattı kullanıldı (Şekil 4.1). Pankreatik adacıklar ya da "Langerhans adacıkları", beta hücrelerinin çoğunlukta bulunduğu endokrin hücre kümeleridir ve morfolojileri türler arası farklılık gösterir [101]. Örneğin insan adacıklarında endokrin hücreler heterojen bir dağılım gösterirken, kemirgen adacıklarında alfa hücreleri çoğunlukta olmak üzere, beta hücresi dışındaki hücreler genellikle adacığın dış çevresinde, beta hücreleri ise merkezinde yer alır. Böyle bir yapıya sahip olan sıçan Langerhans adacıkları bütün olarak kullanıldığında, etkisi test edilmek istenen molekülün, küresel yapıdaki adacığın dış kısmında konumlanmış olan beta hücresi dışındaki

diğer hücrelerle, özellikle alfa hücreleri ile etkileşime geçmesi daha muhtemeldir. Uyguladığımız çözülebilir TRAIL (sTRAIL) molekülü adacığın içine nüfuz edemeyeceğinden, hedeflediğimiz beta hücrelerine ulaşabilmek için pankreatik adacıklar enzimatik olarak dağıtılarak primer hücre kültürü kuruldu (Şekil 4.2). Pankreatik adacıklarda enzimatik yolla dağıtılan hücreler, sonrasında tekrar bir araya gelerek yine dışta beta hücresi dışındaki hücreler ve merkezde beta hücreleri yer almak üzere yeniden organize olma eğilimindedir [102]. Çalışmamızda kurulan tek hücre kültürlerinde de adacıkların tek hücreye ayrıldıktan sonra tekrar bir araya gelme eğiliminde oldukları görüldü. Ancak, TRAIL uygulamaları, dağıtılan adacık hücrelerinin biraraya gelmeleri için gereken süre bitmeden tamamlanmıştır.

Pankreatik adacıkların dağıtılmasıyla tek düşen hücreler kültür kabının yüzeyine çok zayıf tutunurlar [103]. Tutunmanın güçlü olması amacıyla kültür kabının yüzeyinin katyonik özellikteki poli-L-lizin (pLL) ile kaplanması sıklıkla uygulanan bir yöntemdir [104]. Çalışmamızda pLL ile kaplanan kuyularda, dağılan adacık hücrelerinin, muhtemelen pLL'in tutucu etkisinden dolayı yeniden bir araya gelmedikleri gözlendi (Şekil 4.3). Ayrıca, daha önce RIN-5F beta hücreleriyle yapılan bir çalışmada, pLL'nin beta hücreleriyle güçlü bağlantılar kurduğu ve pLL'nin beta hücrelerinde proliferasyonu artırıcı etkilerinin olduğu gösterilmiştir [99]. Dolayısıyla çalışmamızda kullanılan primer adacık hücreleri, pLL gibi bir dış etkenin olmadığı ortamda, kendi doğal süreçlerinde TRAIL ile muamele edildi. Yine adacık beta hücreleri, doğal ortamlarının bozulmaması ve proliferasyon açısından *in vivo* metabolik özelliklerinin korunması amacıyla alfa, delta ve PP hücreleri gibi adacıklarda yer alan beta hücresi dışındaki diğer hücrelerle birlikte kültüre edildi. Kültürün hücre kompozisyonu belirlendiğinde büyük çoğunluğunun beta hücreleri olduğu, diğer hücrelerin ise tüm hücrelerin yaklaşık dörtte birini oluşturduğu gösterildi (Şekil 4.4).

TRAIL'ın pankreatik beta hücrelerindeki biyolojik etkisinin gösterilmesi amacıyla primer adacık hücre kültürüne farklı dozlarda TRAIL eklendiğinde, hücrelerde apoptoz oranında artış olmadığı, aksine sağkalım ve proliferasyonda artış olduğu görüldü (Şekil 4.5, 4.6, 4.7, 4.8). Bu durum, primer sıçan pankreatik adacık hücre kültürünün TRAIL aracılı apoptoza dirençli olduğuna işaret etmektedir. Nitekim, daha önce farklı adacık primer hücre kültürlerinde yapılan çalışmalar da bulgularımızı destekler niteliktedir. Örneğin Ou ve ekibi tarafından yapılan bir çalışmada, TRAIL ile muamele edilen primer insan adacık hücrelerinin apoptoza dirençli olduğu gösterilmiştir [86]. Daha sonra Mi ve ekibi tarafından gerçekleştirilen başka bir çalışmada ise, NOD farelerden izole edilen pankreatik adacıklar farklı dozlarda (25, 50, 100 ng/ml) TRAIL ile muamele edildiğinde, TNFα ve IFNγ'nın aksine, apoptoz indüklenmemiştir; bunun yanında, Min6 hücrelerinde de TRAIL'ın apoptotik etkisine rastlanmamıştır [84]. TRAIL uygulaması sonrası özellikle pankreatik beta hücrelerine spesifik insülin ve Ki67 proliferasyon marker'ı ile ikili boyamalar sonucunda, TRAIL'ın bu hücrelerde proliferasyonu yaklaşık 1,5 kat artırdığını gözledik (Şekil 4.8). Bulgularımızın bu anlamda literatüre önemli katkı sağlayacağını düşünüyoruz. TRAIL'ın primer beta hücrelerindeki proliferatif etkisi, çalışmamızda özellikle düşük doz (1 ng/ml) TRAIL uygulandığında gözlenmiştir. Kavurma ve ekibi tarafından, vasküler düz kas hücrelerinde sadece düşük doz

TRAIL'ın (0,1-1 ng/ml) proliferasyonu tetikleyebildiği, daha yüksek dozlarda uygulanan TRAIL'ın (10-400 ng/ml) proliferasyonu indüklemediğinin gösterilmesi, bulgularımızı desteklemektedir [83]. Yazarlar bu durumu, düşük TRAIL dozunun, hücre içinde lipid raft oluşturmayarak apoptotik olmayan yolağı aktive edebileceğini, yüksek TRAIL dozunun ise hücre içinde lipid raft oluşturarak apoptotik sinyal yolağını aktive edebileceğini söyleyerek açıklamışlardır. Yine de TRAIL'ın bu bifazik etkisi hala açıklığa kavuşmamıştır.

TRAIL'ın primer sıçan beta hücrelerinde gözlediğimiz etkilerinin sıçanlara özgü olma ihtimalini dışlamak için, TRAIL'ın etkisi Min6 fare beta hücre hattında da test edildi. Bu sayede, sadece beta hücrelerinden oluşan bir hücre kitlesi üzerinde de uygulamalar gerçekleştirildi. Min6 hücreleri, farede pankreatik beta hücrelerinde SV-40 large T-antijeninin sentez edilmesi ile oluşturulmuş, glukoza duyarlı insulin salınımı yapabilen hücre hatlarıdır. Bu hücrelerin farklı dozlarda sTRAIL ile muamele edilmesi sonucunda yine proliferasyon oranında artış gözlenmesi, TRAIL'ın etkisinin sadece sıçan primer beta hücrelerine özgü olmadığını gösterdi. Min6 hücrelerinde nispeten en güçlü proliferasyon, hem MTT testi hem de Ki67 boyama sonuçlarından görüldüğü üzere, 10 ng/ml sTRAIL dozu ile sağlandı (Şekil 4.10, 4.11, 4.12). Primer beta hücrelerinde en fazla proliferatif etkinin 1 ng/ml sTRAIL dozu ile yapılan uygulamada görülmesi, bunun yanında Min6 hücrelerinde proliferatif etkinin en yoğun olarak 10 ng/ml dozda gözlenmesi, hücrelerin kökeni, transformasyon özelliği, ya da uygulama sırasında kullanılan hücre yoğunluğu (85 bin primer adacık hücresi/kuyu, 200 bin Min6 hücresi/kuyu) ile ilgili olabilir. Ancak sTRAIL'ın öne sürülen bifazik etkisi, primer beta hücrelerinde gözlendiği kadar belirgin olmamakla birlikte Min6 hücrelerinde de görülmektedir.

Min6 hücrelerine artan dozlarda TRAIL uygulaması sonrası, MTT hücre canlılık testinde 1, 10, ve 100 ng/ml TRAIL dozlarının, özellikle uygulamanın 48. saatinde bu hücrelerde hücre canlılığını artırıcı yönde etki ettiği gözlenmiştir (Şekil 4.10 ve 4.11). MTT bir tetrazolyum tuzudur. Tetrazolyum tuzlarının indirgenerek mavi-mor renkli formazan bileşiğine dönüştürülmesi, çoğunlukla sitozolde yer alan NAD(P)H-bağımlı oksidoredüktaz enzimler tarafından gerçekleştirilir. Dolayısıyla, MTT'nin formazana indirgenmesi, hücresel metabolik aktivite ile artar. Timositler ve splenositler gibi dinlenme halindeki hücrelerin, canlı olmalarına rağmen metabolik aktiviteleri düşük olduğundan MTT testinde çok düşük değerler verdikleri bilinmektedir. Hızlı bölünen hücrelerde ise yüksek değerler tespit edilir. Dolayısıyla MTT, hücrenin metabolik etkinliğini yani canlılık derecesini ve bölünme etkinliğini gösterir [105]. Çalışmamızda Min6 hücrelerinde 1, 10 ve 100 ng TRAIL uygulamaları sonucunda gözlenen metabolik aktivite seviyesi, yapılan MTT testinde hiç TRAIL verilmemiş veya 0,1 ng/ml TRAIL verilmiş hücrelere oranla istatistiksel olarak anlamlı seviyede yüksek bulundu (Şekil 4.11). Bu durum, TRAIL'ın bu hücrelerde hücre canlılığını ve hücre bölünmesini artırıcı yönde etki gösterdiğini kanıtlamaktadır. TRAIL'ın apoptotik etkisini göstermek için kontrol hücre hattı olarak kullanılan A549 akciğer kanseri hücre hattında sTRAIL uygulaması ise, beklendiği üzere, hücre canlılığında doza bağımlı azalmaya neden oldu (Şekil 4.13).

Dışarıdan kültür ortamına rekombinant sTRAIL verilmesi yanında, Min6 hücrelerine TRAIL kodlayan adenoviral vektörlerle gen aktarımı yapılarak hücrelerin kendilerinin sentezledikleri TRAIL'ın etkisinin de araştırılması amaçlandı. TRAIL kodlayan adenovirüslerin Min6 hücrelerini transdüksiyonunu takiben, yeni sentezlenen TRAIL proteini hücre membranına giderek burada transmembran protein olarak yerleşir. TRAIL, sistein proteazlar ve matriks metalloproteinaz-2 (MMP-2) tarafından kesilerek çözülebilir TRAIL (sTRAIL) olarak salınarak reseptörlerine bağlanabildiği gibi, membrana bağlı şekilde de reseptörlerine bağlanıp ilgili sinyal yollarını aktive edebilir [62]. Deneysel süreçte öncelikle adenoviral vektörlerin transdüksiyonel etkinliklerinin ölçülmesi amacıyla, hücreler artan dozlarda adenoviral vektörler ile muamele edildi. Artan virüs dozuna bağlı olarak hücrelerde sentezlenen TRAIL protein miktarında immunofloresan, immunositokimya ve Western Blot sonuçlarına göre gözlenen artış, adenoviral vektörlerin etkin gen transferi gerçekleştirmiş olduğunu kanıtladı (Şekil 4.14, 4.15). Farklı dozlarda adenoviral vektör uygulamasının hücre proliferasyonu üzerindeki etkisine bakıldığında ise, en çok 1 μl/ml viral dozda olmak üzere, 0,5, 1 ve 2,5 μl/ml viral dozlarda, hücre proliferasyonunda istatistiksel olarak önemli seviyede artış gözlendi. sTRAIL formunun hücrelerin bulunduğu kültür ortamına ekzojen olarak uygulanması ile adenoviral vektörler aracılığıyla uygulama arasında doğal olarak farklılıklar vardır. sTRAIL uygulamasında uygulanan dozun etkinliği, sTRAIL'ın hücrelerle direk temasına bağlıdır. Oysa adenoviral vektör aracılı aktarımda, süreçteki hız sınırlayıcı faktörlerden biri, adenoviral vektörlerin transdüksiyon etkinliği, sonrasında hücrelerde TRAIL sentezinin gerçekleşme oranı ve sentezlenen TRAIL'ın hücre yüzeyinde eksprese edilme oranıdır. Bunun yanında, adenoviral vektörlerin taşıdığı TRAIL geni, CMV promotoru altında yer aldığı için, gen aktarımı yapılan Min6 hücrelerinde sürekli transgen sentezi gerçekleşir. Dolayısıyla hücreler, rekombinant protein uygulamasında olduğu gibi sabit miktarda protein (10 ng/ml gibi) yerine, hücrenin durumuna göre yoğunluğu giderek artan TRAIL konsantrasyonuna veya en azından sürekli TRAIL uygulamasına maruz kalabilir. Dolayısıyla, farklı dozlara bağlı olarak gözlenen etkinlik derecelerinin iki uygulama şekli arasında farklılık göstermesi doğaldır. Adenoviral vektör uygulamasını takiben Min6 hücrelerinde görülen proliferasyon oranlarının sTRAIL muamelesinde olduğu gibi doza bağlı bir eğri oluşturması, sonuçta adenovirüs aracılı TRAIL aktarımının Min6 hücreleri üzerindeki proliferasyon tetikleyici etkisini teyit etmektedir.

Kullanılan rekombinant sTRAIL proteininin ve adenoviral vektör aracılı TRAIL aktarımının beta hücreleri üzerindeki etkinliğinin test edilmesi amacıyla yapılan deneylerimizde kontrol hücreler olarak A549 akciğer adenokarsinom hücre hattı kullanıldı. A549 hücrelerinde hem sTRAIL hem de AdTRAIL uygulaması sonrası hücre canlılığında azalma görülmesi, sTRAIL rekombinant proteininin ve adenoviral yolla aktarılan TRAIL'ın fonksiyonel olduğunu gösterdi (Şekil 4.13 ve 4.17).

TRAIL'ın beta hücreleri üzerinde gözlediğimiz proliferatif etkisinin mekanizmasının aydınlatılabilmesi amacıyla, proliferasyonu tetikleyebilen kinazlar olan ERK1/2, p38/MAPK ve Akt'nin, TRAIL uygulaması sonrasındaki aktivasyon oranlarını araştırdık. TRAIL'ın örneğin primer insan vasküler endotel hücrelerde Akt

ve ERK yollarını aktive ederek sağkalımı ve proliferasyonu indüklediği gösterilmiştir [64]. Yine vasküler düz kas hücrelerinde de TRAIL'ın Akt ve ERK fosforilasyonu yaptığı ama p38/MAPK fosforilasyonu yapmadığı gösterilmiştir [82]. Romatoid artiritli hastaların sinoviyal fibroblast hücrelerinde ise TRAIL'ın ERK ve Akt'nin yanı sıra p38 aktivasyonu da yaptığı belirlenmiştir [65]. Min6 hücrelerinin, daha önce en yüksek proliferasyonu sağladığı gösterilen 10 ng/ml TRAIL ile muamele edilmesi sonrasında, 15. dakikada ERK, p38 ve Akt fosforilasyonlarının bazal seviyeye kıyasla artış gösterdiği gözlendi (Şekil 4.19 ve 4.20). Min6 hücreleri, transforme hücre hattı olması nedeniyle yavaş da olsa prolifere olan hücrelerdir. Bu nedenle, bu hücrelerde bazal seviyede kinaz fosforilasyonu gözlemek doğaldır. TRAIL uygulamasının, fosforilasyonu bu bazal seviyenin üzerine çıkardığı gözlenmiştir. Bu durum, TRAIL'ın beta hücrelerinde ERK1/2, p38 ve Akt aktivasyonu yaparak beta hücrelerinde proliferasyonu artırıcı etkisi olabileceğini gösterse de, bu etkinin ERK, p38 ve Akt inhibitörleri kullanılarak teyit edilmesi bilgi verici olacaktır. Bunun yanında, proliferasyon yollarında görev alan farklı moleküllerin aktivasyon durumlarının araştırılması da düşünülebilir.

TRAIL'ın, çalışmamızda kullanılan primer sıçan pankreatik beta hücrelerinde ve Min6 fare beta hücre hattında indüklediği proliferasyon oranı (yaklaşık 1,5 kat), ilk değerlendirmede düşük bir oran olarak görülebilir. Ancak TRAIL'ın proliferatif etkisinin insan vasküler endotel hücrelerde, romatoid artrit sinoviyal fibroblastlarında ve insan ve sıçan vasküler düz kas hücrelerinde gösterildiği önceki çalışmalarda, TRAIL'ın adı geçen hücrelerin proliferasyon oranını yaklaşık 1,5-2 kat yükselttiği görülmektedir [64, 65, 82]. Ayrıca, TRAIL'ın hücreler üzerindeki biyolojik etkilerinin hücre tipine, hücrelerin farklılaşma derecelerine, ortam şartlarına ve diğer moleküller ile etkileşimine bağlı olarak değişebileceği bilinmektedir. Bu çerçevede daha ileri araştırmalar, TRAIL'ın beta hücreleri üzerindeki biyolojik etkisinin ve proliferatif rolünün daha iyi değerlendirilmesine katkıda bulunacaktır.

Sonuç olarak, TRAIL'ın sıçan primer pankreatik beta hücrelerinde ve Min6 fare beta hücre hattında proliferasyonu 1,5 kata kadar artırabildiği gözlendi. Bunun yanında, TRAIL'ın bu hücrelerde apoptozu indüklemediği ve hücre canlılığını artırıcı yönde etki ettiği gösterildi. Bulgularımızın, halen tartışmalı bir konu olan, TRAIL'ın pankreatik beta hücreleri üzerindeki etkisinin, buna bağlı olarak da diyabetteki rolünün daha iyi anlaşılması yönünde katkıda bulunacağına inanıyoruz.

SONUÇLAR

Çalışmamızda, TRAIL'ın pankreatik beta hücreleri üzerinde hücre canlılığı, hücre ölümü ve proliferasyonla ilişkili etkileri araştırıldı. Yapılan deneylerde, TRAIL'ın primer sıçan pankreatik adacık hücrelerinde veya Min6 fare beta hücre hattında apoptozu tetiklemediği, tersine hücre canlılığını ve proliferasyonu indükleyebildiği gözlendi. TRAIL'in beta hücreleri üzerinde proliferatif etkisi, daha önce bildirilmemiştir. Ayrıca, gözlediğimiz proliferatif etkinin mekanizması araştırıldı ve TRAIL'ın bu hücrelerdeki proliferatif etkisini ERK1/2, p38 ve Akt yolaklarını aktive ederek gösteriyor olabileceği gözlendi. Bu bulgular, TRAIL'ın beta hücreleri üzerinde koruyucu etkisi olan ve çoğalmayı teşvik eden bir molekül olduğunu göstermektedir. TRAIL, pankreatik beta hücreleri üzerinde çalışmamızla tanımlanan yeni rolü ile daha ileri çalışmaların da katkısıyla, beta hücre kitlesinin korunması/artırılması için kullanılabilecek aday bir molekül olabilir. Bulgularımızın, TRAIL'ın pankreatik beta hücreleri üzerinde henüz tam olarak aydınlatılamamış olan etkisinin, buna bağlı olarak da diyabetteki rolünün daha iyi anlaşılmasına katkısı olacağına inanıyoruz.

KAYNAKLAR

1. Shaw, J.E., R.A. Sicree, and P.Z. Zimmet, *Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030.* Diabetes Res Clin Pract, 2010. **87**(1): p. 4-14.
2. federation, I.d., *IDF diabetes atlas.* 2011. **5 edn**.
3. Satman, I., et al., *Population-based study of diabetes and risk characteristics in Turkey: results of the turkish diabetes epidemiology study (TURDEP).* Diabetes Care, 2002. **25**(9): p. 1551-6.
4. Kahn, C.R., Weir G.C., King, G.L., Moses, A.C., Smith, R.J., Jacobson, A.M., *Joslin's Diabetes Mellitus*, 2006, Lippincott Williams & Wilkins.
5. Trucco, M., *Regeneration of the pancreatic beta cell.* J Clin Invest, 2005. **115**(1): p. 5-12.
6. Dirice E, K.R., *Pathways underlying β-cell regeneration in type 1, type 2 and gestational diabetes*, in *Islet cell growth factors*, R.N. Kulkarni, Editor 2010, Landes Bioscience: Austin, Texas, USA. p. 1-13.
7. Cnop, M., et al., *Mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 and type 2 diabetes: many differences, few similarities.* Diabetes, 2005. **54 Suppl 2**: p. S97-107.
8. Bonner-Weir, S., D.F. Trent, and G.C. Weir, *Partial pancreatectomy in the rat and subsequent defect in glucose-induced insulin release.* J Clin Invest, 1983. **71**(6): p. 1544-53.
9. Hayashi, K., R. Kojima, and M. Ito, *Strain differences in the diabetogenic activity of streptozotocin in mice.* Biol Pharm Bull, 2006. **29**(6): p. 1110-9.
10. Nir, T., D.A. Melton, and Y. Dor, *Recovery from diabetes in mice by beta cell regeneration.* J Clin Invest, 2007. **117**(9): p. 2553-61.
11. Matveyenko, A.V. and P.C. Butler, *Relationship between beta-cell mass and diabetes onset.* Diabetes Obes Metab, 2008. **10 Suppl 4**: p. 23-31.
12. Karadimos, M.J., et al., *beta-cell preservation and regeneration for diabetes treatment: where are we now?* Diabetes Manag (Lond), 2012. **2**(3): p. 213-222.
13. Bailes, B.K., *Diabetes mellitus and its chronic complications.* AORN J, 2002. **76**(2): p. 266-76, 278-82; quiz 283-6.
14. Shapiro, A.M., et al., *International trial of the Edmonton protocol for islet transplantation.* N Engl J Med, 2006. **355**(13): p. 1318-30.
15. Robertson, R.P., et al., *Pancreas and islet transplantation for patients with diabetes.* Diabetes Care, 2000. **23**(1): p. 112-6.
16. Lumelsky, N., et al., *Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets.* Science, 2001. **292**(5520): p. 1389-94.
17. Takahashi, K. and S. Yamanaka, *Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors.* Cell, 2006. **126**(4): p. 663-76.

18. Yamanaka, S., *A fresh look at iPS cells.* Cell, 2009. **137**(1): p. 13-7.
19. Park, I.H., et al., *Disease-specific induced pluripotent stem cells.* Cell, 2008. **134**(5): p. 877-86.
20. Teo, A.K., et al., *Derivation of human induced pluripotent stem cells from patients with maturity onset diabetes of the young.* J Biol Chem, 2013. **288**(8): p. 5353-6.
21. Shaer, A., et al., *Differentiation of Human-Induced Pluripotent Stem Cells Into Insulin-Producing Clusters.* Exp Clin Transplant, 2014.
22. Meier, J.J., et al., *Sustained beta cell apoptosis in patients with long-standing type 1 diabetes: indirect evidence for islet regeneration?* Diabetologia, 2005. **48**(11): p. 2221-8.
23. Gradwohl, G., et al., *neurogenin3 is required for the development of the four endocrine cell lineages of the pancreas.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(4): p. 1607-11.
24. Gu, G., J. Dubauskaite, and D.A. Melton, *Direct evidence for the pancreatic lineage: NGN3+ cells are islet progenitors and are distinct from duct progenitors.* Development, 2002. **129**(10): p. 2447-57.
25. McEvoy, R.C. and K.L. Madson, *Pancreatic insulin-, glucagon-, and somatostatin-positive islet cell populations during the perinatal development of the rat. II. Changes in hormone content and concentration.* Biol Neonate, 1980. **38**(5-6): p. 255-9.
26. Bouwens, L., et al., *Cytokeratins as markers of ductal cell differentiation and islet neogenesis in the neonatal rat pancreas.* Diabetes, 1994. **43**(11): p. 1279-83.
27. Teta, M., et al., *Very slow turnover of beta-cells in aged adult mice.* Diabetes, 2005. **54**(9): p. 2557-67.
28. Meier, J.J., et al., *Beta-cell replication is the primary mechanism subserving the postnatal expansion of beta-cell mass in humans.* Diabetes, 2008. **57**(6): p. 1584-94.
29. Finegood, D.T., L. Scaglia, and S. Bonner-Weir, *Dynamics of beta-cell mass in the growing rat pancreas. Estimation with a simple mathematical model.* Diabetes, 1995. **44**(3): p. 249-56.
30. Bonner-Weir, S., *Islet growth and development in the adult.* J Mol Endocrinol, 2000. **24**(3): p. 297-302.
31. Dor, Y., et al., *Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation.* Nature, 2004. **429**(6987): p. 41-6.
32. Teta, M., et al., *Growth and regeneration of adult beta cells does not involve specialized progenitors.* Dev Cell, 2007. **12**(5): p. 817-26.
33. Parsons, J.A., T.C. Brelje, and R.L. Sorenson, *Adaptation of islets of Langerhans to pregnancy: increased islet cell proliferation and insulin secretion correlates with the onset of placental lactogen secretion.* Endocrinology, 1992. **130**(3): p. 1459-66.
34. Kloppel, G., et al., *Islet pathology and the pathogenesis of type 1 and type 2 diabetes mellitus revisited.* Surv Synth Pathol Res, 1985. **4**(2): p. 110-25.
35. Pick, A., et al., *Role of apoptosis in failure of beta-cell mass compensation for insulin resistance and beta-cell defects in the male Zucker diabetic fatty rat.* Diabetes, 1998. **47**(3): p. 358-64.

36. Bruning, J.C., et al., *Development of a novel polygenic model of NIDDM in mice heterozygous for IR and IRS-1 null alleles.* Cell, 1997. **88**(4): p. 561-72.
37. Michael, M.D., et al., *Loss of insulin signaling in hepatocytes leads to severe insulin resistance and progressive hepatic dysfunction.* Mol Cell, 2000. **6**(1): p. 87-97.
38. Kulkarni, R.N., et al., *PDX-1 haploinsufficiency limits the compensatory islet hyperplasia that occurs in response to insulin resistance.* J Clin Invest, 2004. **114**(6): p. 828-36.
39. Cano, D.A., et al., *Regulated beta-cell regeneration in the adult mouse pancreas.* Diabetes, 2008. **57**(4): p. 958-66.
40. Terauchi, Y., et al., *Glucokinase and IRS-2 are required for compensatory beta cell hyperplasia in response to high-fat diet-induced insulin resistance.* J Clin Invest, 2007. **117**(1): p. 246-57.
41. Saisho, Y., et al., *beta-cell mass and turnover in humans: effects of obesity and aging.* Diabetes Care, 2013. **36**(1): p. 111-7.
42. Bonner-Weir, S., et al., *Compensatory growth of pancreatic beta-cells in adult rats after short-term glucose infusion.* Diabetes, 1989. **38**(1): p. 49-53.
43. Alonso, L.C., et al., *Glucose infusion in mice: a new model to induce beta-cell replication.* Diabetes, 2007. **56**(7): p. 1792-801.
44. Georgia, S. and A. Bhushan, *Beta cell replication is the primary mechanism for maintaining postnatal beta cell mass.* J Clin Invest, 2004. **114**(7): p. 963-8.
45. Kushner, J.A., et al., *Cyclins D2 and D1 are essential for postnatal pancreatic beta-cell growth.* Molecular and Cellular Biology, 2005. **25**(9): p. 3752-3762.
46. Rane, S.G., et al., *Loss of Cdk4 expression causes insulin-deficient diabetes and Cdk4 activation results in beta-islet cell hyperplasia.* Nature Genetics, 1999. **22**(1): p. 44-52.
47. Fajas, L., et al., *Impaired pancreatic growth, beta cell mass, and beta cell function in E2F1(-/-) mice.* Journal of Clinical Investigation, 2004. **113**(9): p. 1288-1295.
48. Iglesias, A., et al., *Diabetes and exocrine pancreatic insufficiency in E2F1/E2F2 double-mutant mice.* Journal of Clinical Investigation, 2004. **113**(10): p. 1398-1407.
49. Latres, E., et al., *Limited overlapping roles of p15(INK4b) and p18(INK4c) cell cycle inhibitors in proliferation and tumorigenesis.* Embo Journal, 2000. **19**(13): p. 3496-3506.
50. Pei, X.H., et al., *Genetic evidence for functional dependency of p18(Ink4c) on cdk4.* Molecular and Cellular Biology, 2004. **24**(15): p. 6653-6664.
51. Uchida, T., et al., *Deletion of Cdkn1b ameliorates hyperglycemia by maintaining compensatory hyperinsulinemia in diabetic mice.* Nat Med, 2005. **11**(2): p. 175-182.
52. Heit, J.J., et al., *Calcineurin/NFAT signalling regulates pancreatic beta-cell growth and function.* Nature, 2006. **443**(7109): p. 345-349.
53. Crabtree, J.S., et al., *Of mice and MEN1: Insulinomas in a conditional mouse knockout.* Molecular and Cellular Biology, 2003. **23**(17): p. 6075-6085.

54. Kubota, N., et al., *Disruption of insulin receptor substrate 2 causes type 2 diabetes because of liver insulin resistance and lack of compensatory beta-cell hyperplasia.* Diabetes, 2000. **49**(11): p. 1880-1889.
55. Harvey, M., et al., *Mice Deficient in Both P53 and Rb Develop Tumors Primarily of Endocrine Origin.* Cancer Research, 1995. **55**(5): p. 1146-1151.
56. Flier, S.N., R.N. Kulkarni, and C.R. Kahn, *Evidence for a circulating islet cell growth factor in insulin-resistant states.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(13): p. 7475-80.
57. Porat, S., et al., *Control of pancreatic beta cell regeneration by glucose metabolism.* Cell Metab, 2011. **13**(4): p. 440-9.
58. Sachdeva, M.M. and D.A. Stoffers, *Minireview: Meeting the demand for insulin: molecular mechanisms of adaptive postnatal beta-cell mass expansion.* Mol Endocrinol, 2009. **23**(6): p. 747-58.
59. Drucker, D.J., *The biology of incretin hormones.* Cell Metab, 2006. **3**(3): p. 153-65.
60. Tarabra, E., S. Pelengaris, and M. Khan, *A simple matter of life and death-the trials of postnatal Beta-cell mass regulation.* Int J Endocrinol, 2012. **2012**: p. 516718.
61. Yi, P., J.S. Park, and D.A. Melton, *Betatrophin: a hormone that controls pancreatic beta cell proliferation.* Cell, 2013. **153**(4): p. 747-58.
62. Wiley, S.R., et al., *Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis.* Immunity, 1995. **3**(6): p. 673-82.
63. Chan, J., et al., *TRAIL promotes VSMC proliferation and neointima formation in a FGF-2-, Sp1 phosphorylation-, and NFkappaB-dependent manner.* Circ Res, 2010. **106**(6): p. 1061-71.
64. Secchiero, P., et al., *TRAIL promotes the survival and proliferation of primary human vascular endothelial cells by activating the Akt and ERK pathways.* Circulation, 2003. **107**(17): p. 2250-6.
65. Morel, J., et al., *Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) induces rheumatoid arthritis synovial fibroblast proliferation through mitogen-activated protein kinases and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt.* J Biol Chem, 2005. **280**(16): p. 15709-18.
66. Di Bartolo, B.A., et al., *TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) protects against diabetes and atherosclerosis in Apoe (-)/(-) mice.* Diabetologia, 2011. **54**(12): p. 3157-67.
67. Lamhamedi-Cherradi, S.E., et al., *Critical roles of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in type 1 diabetes.* Diabetes, 2003. **52**(9): p. 2274-8.
68. Keuper, M., et al., *TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) regulates adipocyte metabolism by caspase-mediated cleavage of PPARgamma.* Cell Death Dis, 2013. **4**: p. e474.
69. Harith, H.H., M.J. Morris, and M.M. Kavurma, *On the TRAIL of obesity and diabetes.* Trends Endocrinol Metab, 2013. **24**(11): p. 578-87.
70. Griffith, T.S. and D.H. Lynch, *TRAIL: a molecule with multiple receptors and control mechanisms.* Curr Opin Immunol, 1998. **10**(5): p. 559-63.
71. Aktas, O., U. Schulze-Topphoff, and F. Zipp, *The role of TRAIL/TRAIL receptors in central nervous system pathology.* Front Biosci, 2007. **12**: p. 2912-21.

72. Kischkel, F.C., et al., *Apo2L/TRAIL-dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to death receptors 4 and 5.* Immunity, 2000. **12**(6): p. 611-20.
73. Kischkel, F.C., et al., *Death receptor recruitment of endogenous caspase-10 and apoptosis initiation in the absence of caspase-8.* J Biol Chem, 2001. **276**(49): p. 46639-46.
74. Di Pietro, R. and G. Zauli, *Emerging non-apoptotic functions of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)/Apo2L.* J Cell Physiol, 2004. **201**(3): p. 331-40.
75. Secchiero, P., et al., *Aberrant expression of TRAIL in B chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) cells.* J Cell Physiol, 2005. **205**(2): p. 246-52.
76. Lancaster, J.M., et al., *High expression of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand is associated with favorable ovarian cancer survival.* Clin Cancer Res, 2003. **9**(2): p. 762-6.
77. Azijli, K., et al., *Non-canonical kinase signaling by the death ligand TRAIL in cancer cells: discord in the death receptor family.* Cell Death Differ, 2013. **20**(7): p. 858-68.
78. Gonzalvez, F. and A. Ashkenazi, *New insights into apoptosis signaling by Apo2L/TRAIL.* Oncogene, 2010. **29**(34): p. 4752-65.
79. LeBlanc, H.N. and A. Ashkenazi, *Apo2L/TRAIL and its death and decoy receptors.* Cell Death Differ, 2003. **10**(1): p. 66-75.
80. Secchiero, P., et al., *Evidence for a proangiogenic activity of TNF-related apoptosis-inducing ligand.* Neoplasia, 2004. **6**(4): p. 364-73.
81. Sheridan, J.P., et al., *Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors.* Science, 1997. **277**(5327): p. 818-21.
82. Secchiero, P., et al., *TRAIL promotes the survival, migration and proliferation of vascular smooth muscle cells.* Cell Mol Life Sci, 2004. **61**(15): p. 1965-74.
83. Kavurma, M.M., et al., *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, 2008. **283**(12): p. 7754-62.
84. Mi, Q.S., et al., *Blockade of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand exacerbates type 1 diabetes in NOD mice.* Diabetes, 2003. **52**(8): p. 1967-75.
85. Kang, S., et al., *TRAIL upregulates decoy receptor 1 and mediates resistance to apoptosis in insulin-secreting INS-1 cells.* Biochem Biophys Res Commun, 2010. **396**(3): p. 731-5.
86. Ou, D., et al., *TNF-related apoptosis-inducing ligand death pathway-mediated human beta-cell destruction.* Diabetologia, 2002. **45**(12): p. 1678-88.
87. Mathis, D., L. Vence, and C. Benoist, *beta-Cell death during progression to diabetes.* Nature, 2001. **414**(6865): p. 792-8.
88. Cheung, S.S., et al., *Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand and CD56 expression in patients with type 1 diabetes mellitus.* Pancreas, 2005. **30**(2): p. 105-14.
89. Xiang, G., et al., *Circulating level of TRAIL concentration is positively associated with endothelial function and increased by diabetic therapy in the*

newly diagnosed type 2 diabetic patients. Clin Endocrinol (Oxf), 2014. **80**(2): p. 228-34.
90. Bisgin, A., A.D. Yalcin, and R.M. Gorczynski, *Circulating soluble tumor necrosis factor related apoptosis inducing-ligand (TRAIL) is decreased in type-2 newly diagnosed, non-drug using diabetic patients.* Diabetes Res Clin Pract, 2012. **96**(3): p. e84-6.
91. Sanlioglu, A.D., et al., *High levels of endogenous tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand expression correlate with increased cell death in human pancreas.* Pancreas, 2008. **36**(4): p. 385-93.
92. Dirice, E., et al., *TRAIL and DcR1 expressions are differentially regulated in the pancreatic islets of STZ- versus CY-applied NOD mice.* Exp Diabetes Res, 2011. **2011**: p. 625813.
93. Zauli, G., et al., *Treatment with recombinant tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand alleviates the severity of streptozotocin-induced diabetes.* Diabetes, 2010. **59**(5): p. 1261-5.
94. Kang, S., et al., *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, 2010. **151**(12): p. 5638-46.
95. Dirice, E., et al., *Adenovirus-mediated TRAIL gene (Ad5hTRAIL) delivery into pancreatic islets prolongs normoglycemia in streptozotocin-induced diabetic rats.* Hum Gene Ther, 2009. **20**(10): p. 1177-89.
96. Aydin, C., et al., *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, 2007. **18**(1): p. 39-50.
97. Sanlioglu, A.D., et al., *DcR2 (TRAIL-R4) siRNA and adenovirus delivery of TRAIL (Ad5hTRAIL) break down in vitro tumorigenic potential of prostate carcinoma cells.* Cancer Gene Ther, 2007. **14**(12): p. 976-84.
98. Miyazaki, J., et al., *Establishment of a pancreatic beta cell line that retains glucose-inducible insulin secretion: special reference to expression of glucose transporter isoforms.* Endocrinology, 1990. **127**(1): p. 126-32.
99. Guoping Chen, N.K.a.T.T., *Effects of ECM Proteins and Cationic Polymers on the Adhesion and Proliferation of Rat Islet Cells.* The Open Biotechnology Journal, 2008. **2**: p. 133-137.
100. Lu, H., et al., *Effects of poly(L-lysine), poly(acrylic acid) and poly(ethylene glycol) on the adhesion, proliferation and chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells.* J Biomater Sci Polym Ed, 2009. **20**(5-6): p. 577-89.
101. Steiner, D.J., et al., *Pancreatic islet plasticity: interspecies comparison of islet architecture and composition.* Islets, 2010. **2**(3): p. 135-45.
102. Montesano, R., et al., *Collagen matrix promotes reorganization of pancreatic endocrine cell monolayers into islet-like organoids.* J Cell Biol, 1983. **97**(3): p. 935-9.
103. Bosco, D., et al., *Importance of cell-matrix interactions in rat islet beta-cell secretion in vitro: role of alpha6beta1 integrin.* Diabetes, 2000. **49**(2): p. 233-43.

104. Mazia, D., G. Schatten, and W. Sale, *Adhesion of cells to surfaces coated with polylysine. Applications to electron microscopy.* J Cell Biol, 1975. **66**(1): p. 198-200.
105. Berridge, M.V., P.M. Herst, and A.S. Tan, *Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction.* Biotechnol Annu Rev, 2005. **11**: p. 127-52.

ÖZGEÇMİŞ

1984 yılında Çankırı'da doğan Sevim KAHRAMAN DİRİCE, ilköğrenimini 1990-1996 yılları arasında Bursa Hürriyet İlköğretim Okulunda yapmış, 1996 yılında Antalya'ya gelerek eğitimine burada devam etmiştir. Antalya Aldemir Atilla Anadolu Lisesinde 1998-2002 yılları arasında lise öğrenimini gördükten sonra 2002-2006 yılları arasında YÖK bursu ile kazandığı T.C. Haliç Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünde lisans öğrenimini tamamlamıştır. Akdeniz Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda, Tıbbi Genetik Yüksek Lisansı yapmaya hak kazanmış ve 2006-2009 yılları arasında yüksek lisans çalışmalarını yapmıştır. Yüksek Lisans sırasında adenoviral vektör aracılı gen transferi ve transgen sentezinin in vivo floresan yöntemlerle takibi üzerinde çalışmış ve 2010 yılında çalışmalarını *"Molecular Imaging and Biology"* dergisinde yayımlamıştır.

Yüksek lisansı takiben 2009 yılında Tıbbi Genetik Doktora Programına başlamış ve doktora döneminde diyabet hastalığının moleküler temelinin aydınlatılması ve yeni tedavi yöntemleri geliştirilmesi üzerinde çalışmıştır. Adacık nakillerinde graft ömrünün uzatılması ile ilgili yayın 2010 Diyabet Kongresinde en iyi bilimsel yayın birinciliği ödülü, graftın in vivo takibi ile yayını ise 2013 yılında en iyi ikinci bilimsel yayın ödülü almıştır. Diyabet alanında yayımlanan toplam dört makalesi ve yayımlanma aşamasında olan bir makalesi bulunmaktadır.

Doktora dönemi boyunca üçer aylık görevlendirmelerle Harvard Tıp Fakültesi bünyesindeki Joslin Diyabet Merkezinde Dr. Rohit N. Kulkarni'nin Laboratuvarına gitmiş ve orada yapılan çalışmalara katılmıştır. Tıbbi Genetik doktora programına kayıtlı olduğu süre boyunca araştırma görevlisi kadrosunda çalışmıştır.