



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



YÜKSEK LİSANS TEZİ

**İNSÜLİN DİRENCİ GELİŞİMİNDE PANKREATİK
β-HÜCRE FARKLILAŞMASININ MOLEKÜLER
MEKANİZMASININ *İN VİTRO* ARAŞTIRILMASI**

Merve ERÇİN

Biyoloji Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji Programı

Danışman

Doç. Dr. Selda OKTAYOĞLU

Haziran, 2017

İSTANBUL

Bu çalışma 01/06/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı Moleküler Biyoloji Programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi:

İmza
Doç. Dr. Selda GEZGİNCİ-OKTAYOĞLU
(Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

İmza
Prof. Dr. Şehnaz Bolkent
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

İmza
Prof. Dr. Füsün Öztay
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

İmza
Prof. Dr. Ranan Gülhan-Aktaş
Maltepe Üniversitesi
Tıp Fakültesi

İmza
Doç. Dr. Betül Karademir
Marmara Üniversitesi
Tıp Fakültesi

20.04.2016 tarihli resmi gazetede yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi'nin abonesi olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü'nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 45043 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Beni yüksek lisansa kabul eden, güler yüzü, hoşgörüsü ve iyi niyetiyle olduğu kadar korumacı yaklaşımıyla her zaman destek olan ama herşeyden önemlisi bilimsel anlamda bugünlere gelmemi sağlayan biricik danışman hocamı hediye eden değerli hocam Prof. Dr. Şehnaz BOLKENT'e teşekkür ederim.

Danışman hocam Doç. Dr. Selda GEZGİNCİ-OKTAYOĞLU için hangi cümleyi yazarsam yazayım ona karşı hissettiğim sevgiyi, saygıyı, minneti anlatabilecek bir söz bulamam. Çalışmaya ve işine olan sevgisinin ve merakının yanında her türlü davranışıyla örnek aldığım, danışman hocam olduğu için kendimi çok şanslı hissettiğim, yeri geldiğinde danışmanlığım dışında arkadaşım, ablam hatta annem gibi olduğu için ona ne kadar teşekkür etsem azdır.

Laboratuvarlarında immünfluoresan mikroskobu ve görüntüleme cihazlarını kullandığımız, PTEN antikorlarını bizimle paylaşan değerli hocam Prof. Dr. Füsun ÖZTAY'a, ChIP tekniğinde ultrasonikatör cihazını kullandığımız Doç. Dr. Sibel ÖZDEN'e ve ne zaman ihtiyacım olsa yardımını esirgemeyen, güler yüzüyle etrafa neşe saçan sevgili hocam Yard. Doç. Dr. Serap SANCAR-BAŞ'a çok teşekkür ederim.

Manevi destekleriyle her zaman yanımda olan ve her türlü nazımı çeken canım arkadaşlarım Uzman Biyolog Özgecan KAYALAR'a, kahkahalarıyla her daim laboratuvarımızı inleyen Biyolog Merve Yıldırım'a, ekip arkadaşım Biyolog Ertan ÇELİK'e, Biyolog Sevgi BİNAY'a, Biyolog Cansu ÖZAL'a, aramıza yeni katılsa da kendini kısa sürede sevdiren Biyolog Ezgi SARI'ya, laboratuvarımızın pamuk prensesi, Biyolog Suna BEKTAŞ'a ve yüksek lisansa başladığım günden bu yana şu an uzakta olsa bile her zaman yanımdaymışçasına yardımını, dostluğunu hissettiren Uzman Biyolog Neziha BEŞİKTEPE'ye çok teşekkür ederim.

Aynı zamanda S961 molekülünü bize hediye edip ulaştıran Novo Nordisk firmasından Dr. Lauge Schäffer'a ve qRT-PCR cihazlarını kullanmamıza izin veren MedSanTek firmasına da teşekkür ederim.

Hayatta yaptığım bütün seçimlerde beni her türlü destekleyen ve arkamda duran, onların çocuğu olduğum için çok şanslı hissettiğim, canım ailem annem Hülya ERÇİN'e, babam Tahir ERÇİN'e ve sevgili kardeşim Eyüp Emre ERÇİN'e teşekkür ederim.

Haziran, 2017

Merve ERÇİN

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ.....	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİL LİSTESİ.....	v
TABLO LİSTESİ	viii
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	ix
ÖZET.....	xii
SUMMARY	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL KISIMLAR	3
2.1. DİYABET.....	3
2.2. PANKREATİK GELİŞİM VE BETA HÜCRE FARKLILAŞMASI.....	4
2.2.1. Pdx1	5
2.2.2. Ptf1 α (p48)	5
2.2.3. Ngn3.....	6
2.2.4. Beta2/NeuroD	6
2.2.5. Nkx2.....	6
2.2.6. Nkx6.1.....	7
2.2.7. Pax4.....	7
2.2.8. Pax6.....	7
2.2.9. Arx	7
2.2.10. MafA/MafB.....	8
2.3. PANKREASIN ANATOMİSİ VE FONKSİYONU	9
2.4. KÖK HÜCRELER	10
2.5. İNSÜLİN SİNYALİ VE İLİŞKİLİ MOLEKÜLLER	14
2.5.1. Pankreatik β -hücrelerinde İnsülin Sentezi	14
2.5.2. İnsülin Reseptörünün Aktivasyonu ve Regülasyonu	15
2.5.3. İnsülin Reseptör Substrat (IRS)	16
2.5.4. İnsülin Sinyal Yolağı	17
2.6. LEPTİN VE İLİŞKİLİ SİNYAL YOLAKLARI.....	18
2.6.1. JAK/STAT Yolağı	18
2.6.2. Tub	20

2.6.3.	Fosfoinositid 3-Kinaz (PI3K)-AKT Sinyal Yolağı	21
2.6.4.	Wnt/ β -katenin Sinyal Yolağı	21
3.	MALZEME VE YÖNTEM	23
3.1.	HÜCRE KÜLTÜRÜ	23
3.1.1.	Hücrelere Uygulanan Maddelerin Hazırlanışı:	24
3.2.	HÜCRE CANLILIK TESTİ (WST-1)	26
3.3.	GEN EKSPRESYONU ANALİZLERİ.....	26
3.3.1.	RNA İzolasyonu.....	26
3.3.2.	RNA Miktarının Belirlenmesi.....	27
3.3.3.	cDNA Eldesi	27
3.3.4.	cDNA Miktarının Belirlenmesi.....	28
3.3.5.	qRT-PCR ile gen ekspresyon analizi	28
3.4.	AKIM SİTOMETRİK ANALİZLER.....	30
3.4.1.	İnsülin Üreten Hücre Oranlarının Belirlenmesi	30
3.4.2.	Reaktif Oksijen Türleri Seviyelerinin Belirlenmesi.....	31
3.5.	İNSÜLİN SEKRESYON TESTİ.....	31
3.6.	WESTERN EMDİRİMİ YÖNTEMİ.....	32
3.6.1.	Hücre Lizatlarının Hazırlanması	32
3.6.1.1.	<i>Sitoplazmik Fraksiyonun Hazırlanması</i>	<i>32</i>
3.6.1.2.	<i>Nüklear Fraksiyonun Hazırlanması</i>	<i>32</i>
3.6.1.3.	<i>Membran Fraksiyonunun Hazırlanması</i>	<i>32</i>
3.6.2.	Bradford Yöntemi ile Protein Miktar Ölçümü	33
3.6.3.	Protein Örneklerinin Hazırlanması ve Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrophorezi (SDS-PAGE).....	33
3.6.4.	Western Emdirimi	34
3.6.5.	Özgün Protein Bantlarının İşaretleme ve Görüntüleme.....	35
3.7.	EŞ- İMMÜNOPRESİPİTASYON TEKNİĞİ (EŞ-İP).....	37
3.8.	KROMOZOM İMMÜNOPRESİPİTASYON (CHİP).....	37
3.9.	SİRNA İLE TRANSFEKSİYON	38
3.10.	İMMÜNOFLUORESANS İŞARETLEME	39
3.11.	İSTATİSTİKSEL ANALİZLER	39
4.	BULGULAR	40
4.1.	HÜCRE CANLILIK TESTİ BULGULARI.....	40
4.2.	BETA HÜCRE FARKLILAŞMASI İLE İLGİLİ BULGULAR.....	43

4.3. REAKTİF OKSİJEN TÜRLEİNİN ÜRETİMİNDEKİ DEĞİŞİKLİKLER İLE İLGİLİ BULGULAR	45
4.4. İNSÜLİN DİRENCİ KONTROLÜ S961 İLE İLGİLİ BULGULAR	47
4.5. DENEY GRUPLARINDA İNSÜLİN VE LEPTİN DİRENCİ İLE İLGİLİ BULGULAR.....	49
4.6. PTEN'İN BETA HÜCRE FARKLILAŞMASINDAKİ ROLÜ İLE İLGİLİ BULGULAR.....	51
4.7. GSK-3B VE B-KATENİN'İN BETA HÜCRE FARKLILAŞMASI MEKANİZMASINDAKİ ROLÜ İLE İLGİLİ BULGULAR.....	52
4.8. XAV-939 VE DKK-1 İLE İLGİLİ BULGULAR	54
4.9. TUB VE B-KATENİN'İN BETA HÜCRE FARKLILAŞMASINDAKİ ROLÜ İLE İLGİLİ BULGULAR.....	55
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	59
KAYNAKLAR	81
ÖZGEÇMİŞ.....	97

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

- Şekil 2.1:** Pankreatik endokrin hücre farklılaşması sürecinde eksprese edilen transkripsiyon faktörlerinin şeması (Efrat, 2010'dan alınmıştır).8
- Şekil 2.2:** Pankreasın anatomisi (Bendala, 2009'dan alınmıştır).9
- Şekil 2.3:** Pankreasın histolojik organizasyonu. Duktal sistem (C) asinar hücrelerin (A) sekresyonunu toplar, Langerhans adaları (B) asinar dokunun arasına dağılmıştır. (Bendala, 2009'dan alınmıştır).10
- Şekil 2.4:** Kök hücrelerin farklılaşma sürecinde glikoliz ve oksidatif fosforilasyon değişimi (Ito ve Suda, 2014'den alınmıştır).12
- Şekil 2.5:** Kök hücre proliferasyonu ve farklılaşması aşamalarında meydana gelen metabolik değişimin şematik çizimi (Sart, ve diğ., 2014'den alınmıştır).14
- Şekil 2.6:** (A) Proinsülin ve insülinin şematik gösterimi, (B) İnsülin reseptörünün alt birimleri (Sun, 2009'dan alınmıştır).15
- Şekil 2.7:** İnsülin sinyal yolağının şematik gösterimi. IRS: İnsülin reseptör substratı; Glut: Glukoz taşıyıcısı; Grb: Büyüme faktör reseptörüne bağlı protein; Shc: Src homoloğu taşıyan protein; PTEN: Fosfataz ve tensin homoloğu; PDK1: Pürivat dehidrogenaz kinaz, izoenzim 1; pAKT/PKB: Protein kinaz B.17
- Şekil 2.8:** Leptin sinyalinin şematik gösterimi. Leptinin reseptörü Ob-Rb'ye bağlanmasıyla JAK2 aktivasyonu ve reseptör dimerizasyonu uyarılır. Böylece Ob-Rb'nin hücre içi kısmının JAK2 tarafından fosforillenmesiyle STAT3 fosforillenip aktifleşir. Aktif STAT3 nukleusa geçer ve SOCS3'ün de dahil olduğu hedef genlerin transkripsiyonunu sağlar. SOCS3, hem PI3K hem de STAT3 yolaklarının negatif düzenleyicisidir (Sahu, 2011'den uyarlanmıştır).19
- Şekil 3.1:** RNA'dan cDNA'ya çevrim prosedürünün özeti (Superscript III Strand Synthesis Kit (Invitrogen)'in kullanma kılavuzundan tercüme edilmiştir).28
- Şekil 4.1:** (A) 24 ve 48. saat süreyle 5-30 mM glukoz uygulamasının PAK-MKH'lerin canlılığı üzerindeki etkileri, (B) 1-100 nM insülin uygulamasının PAK-MKH'lerin canlılığı üzerindeki etkileri, (C) PAK-MKH membran fraksiyonunda ObR bandı, (D) 24 ve 48. saatteki 0,5- 2 ng/mL leptin uygulamasının PAK-MKH'lerin canlılığı üzerine etkileri, (E) Seçilen uygulama dozları ile oluşturulan tüm deney şartlarının PAK-MKH'lerin canlılığı üzerine etkileri verilmiştir. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 FM'ye göre.42
- Şekil 4.2:** Beta hücre farklılaşması. (A) Beta hücre farklılaşması ile ilgili genlerin ekspresyonunu gösteren qRT-PCR ile elde edilen ürünlerin bantları görüntülenmiştir. En ileri seviyede beta hücre farklılaşma belirteçlerini taşıyan grup olan İ+L kırmızı dikdörtgen içine alınmıştır. (B) Akım sitometrik insülin⁺ hücre sayısını (%) gösteren histogram plotu ve ilgili grafik verilmiştir. (C) 5.5 mM ve 25 mM glukoz uygulandıktan sonra medyuma salınan insülin miktarları (ng/µg protein) verilmiştir. *p<0,05,

***p<0,001 FM'ye göre; ###p<0,001 İ'ye göre, ^{ωωω}p<0,001 FM+L'e göre, ^{φφφ}p<0,001 İ+L'e göre44

Şekil 4.3: Deney şartlarının PAK-MKH'lerde ROS üretimi üzerine etkisi, **(A)** Akım sitometrik DCF fluoresans yoğunluğunun (katlı artış) gösteren dot plot grafikler, **(B)** Analiz sonuçlarını yansıtan grafik, **p<0,01, ***p<0,001 FM'ye göre, ^ψp<0,05 G'ye göre, ^{##}p<0,01 İ'ye göre, ^γp<0,05 G+L'ye göre.....46

Şekil 4.4: S961'in moleküler düzeyde insülin direnci belirteçleri üzerine olan etkisi. **(A)** 1-1000 pM S961'in p-AKT (Ser473) üzerine olan etkisi, **(B)** p-IRS1 (Ser307), SOCS3 ve PTEN protein bantları ve bu bantların yoğunluklarını gösteren grafikler, **(C)** p-IRS1 (Tyr) protein seviyesi, **(D)** İnsülin direnci belirteçlerinde meydana gelen değişimler tablo olarak verilmiştir, **(E)** S961 uygulanan PAK-MKH'lerin insülin⁺ ve DCFDA⁺ hücre oranlarını gösteren grafikler verilmiştir. *p<0,05, **p<0,01 FM'ye göre.....48

Şekil 4.5: PAK-MKH'lere uygulanan deney şartlarının insülin ve leptin sinyali üzerine etkileri. **(A)** p-AKT (Ser473), PTEN, SOCS3 ve p-IRS1 (Ser307 ve Tyr) bantları ve bu bantların yoğunluklarını gösteren grafikler, **(B)** p-IRS1 (Tyr) seviyeleri, **(C)** Elde edilen bulguların değerlendirildiği tablo verilmiştir. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 FM'ye göre; ^{ωω}p<0,01 FM+L'e göre; ^{ψψ}p<0,01 G'ye göre; #p<0,05, ^{##}p<0,01, ^{###}p<0,001 İ'ye göre, ^{φφ}p<0,001 İ+L'ye göre.50

Şekil 4.6. PTEN'in beta hücre farklılaşmasındaki rolü. **(A)** PTEN inhibitörü bpV (HOpic) 1-5 µM dozlarda PAK-MKH'lere 25 saat süreyle uygulanmış ve 5 µM dozda en fazla p-AKT (Ser473) varlığının belirlenmesi sonucunda bu dozun uygulanmasına karar verilmiştir. **(B)** 1 saatlik ön inhibisyon sürecinden sonra bpV (HOpic) ile birlikte uyarıların 24 saat süreyle uygulanmasından 30 gün sonra elde edilen akım sitometrik insülin⁺ hücre oranını (%) gösteren histogram plotu ve ilgili grafik verilmiştir. *p<0,05, **p<0,01 FM'ye göre.51

Şekil 4.7. GSK-3β ve β-katenin'in beta hücre farklılaşması mekanizmasındaki rolü. **(A)** p-GSK3β (Ser9), p-GSK3β (Tyr216) ve β-aktin seviyelerini gösteren bantlar ve bu bantların optik yoğunluklarının β-aktin yoğunluğuna normalizasyon değerleri (A.U.) ile oluşturulan grafikler **(B)** Nuklear ve sitoplazmik β-katenin ile yükleme kontrolleri β-aktin ve TFIIIB seviyelerini gösteren bantlar ve bu bantların optik yoğunluklarının yükleme kontrollerine normalizasyon değerleri (A.U.) verilmiştir. **(C)** Membran fraksiyonunda N-kaderin İP yöntemi ile ayrıldıktan sonra elde edilen örneklerde β-katenin WB yöntemi ile gösterilmiştir. *p<0,05, ***p<0,001 FM'ye göre; #p<0,05, ^{##}p<0,01 İ'ye göre; ⁺p<0,05, G+İ'ye göre.....53

Şekil 4.8: **(A)** XAV-939 ve **(B)** DKK-1 uygulanan PAK-MKH'lerinin insülin⁺ hücre seviyeleri, *p<0,05, **p<0,01 ***p<0,001 FM'ye göre; #p<0,05 İ'ye göre; ^{φφ}p<0,01 İ+L'e göre.54

Şekil 4.9: Tub ve β-katenin'in beta hücre farklılaşmasındaki rolü , **(A)** Tub ve β-katenin genlerinin ekspresyon seviyeleri, **(B)** Nuklear ve membrandaki Tub ile yükleme kontrolleri Pan-kaderin ve TFIIIB seviyelerini gösteren bantlar ve bu bantların optik yoğunluklarının yükleme kontrollerine normalizasyon değerleri (A.U.) verilmiştir. **(C)** Nuklear fraksiyonda Tub İP yöntemi ile ayrıldıktan sonra elde edilen örneklerde β-katenin WB yöntemi ile gösterilmiştir. **(D)** PAK-MKH'lere Tub ve β-katenin siRNA'ları uygulandıktan sonra insülin ve leptin 24 saat süreyle uygulanmış ve 30. günde insülin⁺ hücrelerin sayısı akım sitometrik analiz ile belirlenmiştir. **(E)** İnsülin ve leptin uygulanan hücrelerde çapraz bağlantılı kromatine Tub antikoru uygulanarak immünpresipitasyon tekniği ile ayrılmış fraksiyonda *Mafa*, *pdx1*, *ins1* ve *ins2* genlerinin

promotör bölgeleri qRT-PCR ile gösterilmiştir. * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ FM'ye göre; # $p<0,05$ İ'ye göre; $^{\Phi}p<0,01$ ve $^{\Phi\Phi}p<0,001$ İ+L'ye göre.57

Şekil 4.10: Deney gruplarında PAK-MKH'lerde β -katenin ve Tub'un lokalizasyonu gösterilmiştir. Sol panel β -katenin, sağ panel ise Tub'un hücrel yerleşimini göstermektedir (x200).58

Şekil 5.1: Bu çalışmadan elde edilen sonuçların şematik gösterimi. Elde edilen bulgular PAK-MKH'lere insülin ve leptin uygulanmasının IRS1'i 307. Serin kalıntısından fosforlayarak sinyalin aşağı doğru AKT'ye iletilme aşamasında durmasına neden olmaktadır. Aynı zamanda, seviyesi artan PTEN'in de AKT'nin 473. Serin kalıntısından fosforlanarak aktifleşmesini engellemesi söz konusudur. Yani insülin direnci gelişimi söz konusudur. Artan SOCS3 leptin reseptörünü blokladığından aynı zamanda leptin direnci de gelişmektedir. Diğer taraftan ROS AKT'yi bir miktar aktifleştirerek sinyalin insülin ve leptinden bağımsız olarak iletilmesine, GSK3 β 'nin 9. Serin kalıntısından fosforlanarak inaktivasyonuna ve β -kateninin serbestleşerek nukleusa göç etmesine neden olur. İnsülin ve leptin ile uyarılan Tub'un de nukleusa geçerek β -katenin ile bağlanması ve insülin gen ekspresyonunda rol alan önemli transkripsiyon faktörleri olan *ins1*, *ins2*, *pdx1* ve *MafA* ekspresyonunu artırması ile insülin üretimi meydana gelmektedir.80

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo:3.1: Gen ekspresyonu analizleri için yapılan qRT-PCR yönteminde kullanılan primer ve prob karışımları ile elde edilen ürünlerin katalog numaraları ve oluşan ürünlerin ampikon uzunlukları.....	29
Tablo 3.2: qRT PCR için gerekli reaksiyon içeriğinin hazırlanışı.....	29
Tablo 3.3: qRT-PCR basamakları.	30
Tablo 3.4: SDS-PAGE jellerin hazırlanışı.....	34
Tablo 3.5: Western Blotlama ve eş-immünpresipitasyon yöntemleri için kullanılan antikorlar ve sulandırma oranları.....	36
Tablo 3.6: ChIP tekniği için kullanılan primerlerin dizileri ve ürünlerin ampikon büyüklükleri (bp).....	38

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
%	: Yüzde
μL	: Mikrolitre
AU	: Arbitrary Unit
dL	: Desilitre
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
ng	: Nanogram
$^{\circ}\text{C}$	: Santigrat derece
pM	: Pikomolar
α	: Alfa
β	: Beta
Δ	: Delta
ϵ	: Epsilon

Kısaltmalar	Açıklama
AKT/PKB	: Protein Kinaz B
AMPK	: AMP ile Aktive Olan Protein Kinaz
ATP	: Adenozin Trifosfat
BSA	: Sığır Serum Albumin
ChIP	: Kromatin İmmünpresipitasyon
DAG	: Diaçilgliserol
DCF	: Diklorfloresin
DCFDA	: Diklorofloresin Diasetat
DEPC	: Dietilpirokarbonat
DKK-1	: Dickkopf-1
DMSO	: Dimetilsülfoksit
E	: Embriyonik gün
EKH	: Embriyonik Kök Hücre
ELISA	: Enzim Bağlı İmmünoabsorbent Tekniği
ERK	: Hücre dışı sinyal ile düzenlenen kinaz
FBS	: Fötal Sığır Serum
FITC	: Floresans İzotiosianat
FM	: Tam Medyum
G	: Glukoz
G+İ	: Glukoz+İnsülin
GDM	: Gestasyonal Diyabet
GIP	: Gastrik İnhibitör Peptid
GLP-1	: Glukagon Benzeri Peptid-1
Glut	: Glukoz Taşıyıcısı
Grb10	: Büyüme Faktörü reseptörüne Bağlı Protein 10
GSIS	: Glukoz ile Uyarılan İnsülin Sekresyonu
GSK3	: Glikojen Sentaz kinaz 3
HES-1	: Hairy Enhancer of Split-1

HRP	: Yaban Turbu Peroksidazı
IP₃	: İnositol 1, 4, 5 trifosfat
IR	: İnsülin Reseptörü
IRS	: İnsülin Reseptör Substratı
IRTK	: İnsülin Reseptör Tirozin Kinaz
İ	: İnsülin
ins	: <i>İnsülin</i> geni
İP	: İmmünpresipitasyon
iPS	: Uyarılmış pluripotent Kök hücreler
JAK	: Janus Kinaz
L	: Leptin
LepR	: Leptin Reseptörü
MafA, B	: Musculo Fibrosarcoma Oncogene Family Protein A, B
MAPK	: Mitojen ile Aktive Olan Protein Kinaz
MEM	: Minimum Esansiyel Medyum
MKH	: Mezenkimal Kök Hücre
mRNA	: Haberci RNA
NeuroD	: Nöral Farklılaşma 1
NGF	: Nöral Büyüme Faktörü
Ngn3	: Nörogenin 3
N-kaderin	: Nöral Kaderin
NKx	: NK homeobox
PAK-MKH	: Pankreatik Ada Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler
Pax	: Paired Box
PC-1	: Plazma Membran Proteini-1
PDK-1	: Pürivat Dehidrogenaz Kinaz 1
Pdx1	: Pankreas-Duodenum Transkripsiyon Faktörü 1
PI3K	: Fosfotidilinositol 3 Kinaz
PIP₂	: Fosfotidil insositol 4,5 bifosfat
PLC	: Fosfolipaz C
PTEN	: Fosfotaz ve Tensin Homoloğu
Ptf1	: Pankreas Transkripsiyon Faktörü 1
PTP1B	: Protein Fosfataz 1B
qRT-PCR	: Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RAS	: Sıçan Sarcoma
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
Ser	: Serin
Shh	: Sonic Hedgehog
siRNA	: Susturucu RNA
SOCS3	: Sitokin Sinyalinin Baskılayıcısı 3
Src	: Src Homoloğu Taşıyan Protein
STAT	: Transkripsiyonun Sinyal Dönüştürücü ve Aktivatörü
T1D	: Tip 1 Diyabet
T2D	: Tip 2 Diyabet
TCA	: Trikarboksilik Asit
TCF7L2	: Transkripsiyon Faktörü 7 Benzeri 2
Thr	: Threonin
Tyr	: Tirozin
WNT	: Wingless ve İnt1'in Bileşimi

YKH : Yetişkin Kök Hücre

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İNSÜLİN DİRENCİ GELİŞİMİNDE PANKREATİK β -HÜCRE FARKLILAŞMASININ MOLEKÜLER MEKANİZMASININ *İN VİTRO* ARAŞTIRILMASI

Merve ERÇİN

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman : Doç. Dr. Selda Oktayoğlu

Bu çalışmanın amacı, tip2 diyabetik bireylerin açlık kan örneklerinde glukoz ve insülin seviyelerinin yükselmesi ile belirlenen insülin direnci ve özellikle obeziteye bağlı olarak gelişen açlık kan örneklerinde leptin seviyelerinin yükselmesi ile belirlenen leptin direncinin *in vitro* şartlarda taklit edilerek, bu uyarıların pankreatik adacık kaynaklı mezenkimal kök hücre (PAK-MKH)'leri beta hücrelerine farklılaştırma olasılığının araştırılması ve ilgili moleküler mekanizmanın ortaya konmasıdır.

Bu amaçla PAK-MKH'lere 24 saat süreyle 20 mM glukoz, 1 nM insülin ve 0,5 ng/mL leptin uygulandı. Beta hücre farklılaşmasının tespit edilebilmesi için insülin üretiminde rol alan transkripsiyon faktörleri veya beta hücrelerine özgün proteinler olan *Pdx-1*, *Pax4*, *Nkx2.2*, *Nkx6.1* ve *ins2* genlerinin ekspresyon seviyeleri gerçek zamanlı geri çevrim polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) yöntemiyle gösterildi. Gen ekspresyonu düzeyinde insülin üretimi ile ilgili elde edilen bulgular, insülin⁺ hücrelerin oranının akım sitometrik analizi ile desteklendi. Reaktif oksijen türleri (ROS)'nin üretiminde meydana gelen artış bir farklılaşma belirteci olarak kullanıldı ve ROS üreten hücrelerin oranı DCFDA⁺ hücrelerin akım sitometrik analizi ile gösterildi. Ayrıca, yeni farklılaşan beta hücrelerinin fonksiyon edinimi, yükselen glukoz uyarısına yanıt olarak salınan insülin seviyelerinin enzim bağlı immünosorbent tekniği ile belirlenmesi yoluyla gösterildi. p-IRS1 (Ser307), PTEN ve p-AKT (Ser473) seviyelerinde meydana gelen artışa karşın p-IRS1 (Try) seviyesinin azalması insülin direnci belirteci olarak kabul edilirken, SOCS3 seviyesindeki artış leptin direnci göstergesi olarak kullanıldı. Bu belirteçlerin seviyelerindeki değişimler western emdirimi tekniği ile gösterildi. PI3K/AKT sinyal yolağının negatif bir düzenleyicisi olan PTEN'in bu mekanizmadaki olası rolü bu molekülün farmakolojik bir inhibitörü olan bpV(HOpic) uygulanması yolu ile araştırıldı. Aktivitesi AKT sinyali ile düzenlenen p-GSK-3 β (Ser9 ve Try216) ve β -katenin seviyelerindeki değişimler western emdirimi yöntemiyle gösterildi. β -katenin'in N-kaderin ile olan etkileşimi immunopresipitasyon yöntemini takiben western emdirimi

tekniki ile gösterildi. İlaveten insülin ve leptin sinyalinde önemli bir molekül olan Tub'un membran, sitoplazmik ve nuklear fraksiyonlardaki seviyelerinin western emdirimi tekniği ile gösterilmesi sonucunda bu proteinin aktivasyonu ile ilgili fikir edinildi. β -katenin'in Tub ile olası etkileşimi immunopresipitasyon yöntemini takiben western emdirimi tekniği ile araştırıldı. β -katenin ve Tub'un bu mekanizmadaki rolleri özgün susturucu RNA'lar kullanılarak teyit edildi. β -katenin ve Tub genlerinin ekspresyon seviyelerindeki değişimler qRT-PCR tekniği ile gösterildi. Tub'un insülin sentezinde önemli rol oynayan transkripsiyon faktörleri olan *ins1*, *ins2*, *pdx1* ve *MafA* üretimindeki olası rolleri kromozom immünopresipitasyon tekniğiyle araştırıldı.

Sonuç olarak, uyaran uygulanan tüm gruplarda beta hücre farklılaşmasının başlaması söz konusu olmakla birlikte, insülin ve leptinin birlikte uygulandığı grupta yeni oluşan beta hücrelerinin çok daha yüksek oranda olduğu, hücrelerin farklılaşmanın daha ileri aşamasında ve daha olgun olduğu tespit edildi. Ancak, yeni oluşan beta hücreleri fonksiyonel değildi. Bu gruptaki hücrelerde yüksek oranda SOCS3, p-IRS1 (Ser307) ve PTEN, düşük oranda p-IRS1 (Try) varlığı ile birlikte p-AKT (Ser473) seviyesinin değişmediği tespit edildi. Bu bulgular PAK-MKH'lere insülin ve leptinin birlikte uygulanması sonucu insülin ve leptin direncinin geliştiğini göstermektedir. Yüksek oranda olgun beta hücrelerinin oluşmasını uyaran bu sinyal yolağında esasen AKT/GSK-3 β / β -katenin ve Tub'un rol aldığı gösterildi. β -katenin ve Tub'un nukleusta birbirine bağlandıkları tespit edildi. Ayrıca, Tub'un insülin sentezinde anahtar rol oynayan *ins1*, *ins2*, *pdx1* ve *MafA* genlerinin promotör bölgelerine bağlandığı tespit edildi.

Bu bulgular, tip2 diyabet gelişiminin ilk basamağı olan kompenzasyon aşamasında PAK-MKH'lerde gelişen insülin ve leptin direncinin beta hücre farklılaşmasını belirgin olarak artırdığını açıkça ortaya koymaktadır. Bu farklılaşmanın engellenebilmesi amacıyla AKT/GSK-3 β / β -katenin ve özellikle Tub'u inhibe eden yeni teröpatik ajanların geliştirilebilmesi tip2 diyabet gelişiminin önlenmesi açısından önemli bir adım olabilme potansiyeli taşımaktadır. Diğer taraftan, pankreatik beta hücrelerinin sayıca azaldığı tip2 diyabetin ileri seviyeleri veya beta hücrelerinin hemen hiç bulunmadığı tip1 diyabetin tedavisi için ise tersine AKT/GSK-3 β / β -katenin ve özellikle Tub'u aktive eden yeni teröpatik ajanların geliştirilebilmesi yoluyla endojen PAK-MKH'lerden yeni beta hücrelerinin oluşturulması yoluyla bu hastalıkların tedavisine yeni bir bakış açısı kazandırılabilir.

Haziran 2017, 115 sayfa.

Anahtar kelimeler: β -katenin, insülin direnci, leptin direnci, pankreatik adacık kaynaklı mezenkimal kök hücre, Tub.

SUMMARY

M.Sc. THESIS

THE *IN VITRO* INVESTIGATION OF MOLECULAR MECHANISM OF PANCREATIC β -CELL DIFFERENTIATION IN THE DEVELOPMENT OF INSULIN RESISTANCE

Merve ERCIN

Istanbul University

Institute of Graduate Studies in Science and Engineering

Department of Biology

Supervisor : Assoc. Prof. Selda Oktayoglu

The purpose of this study is to investigate the molecular mechanism of pancreatic xivort-derived mesenchymal stem cell (PID-MSC) differentiation into beta cells in presence of insulin and leptin resistance stimulators by mimicing insulin resistance which is determined by the elevation of glucose and insulin levels in fasting blood samples, and leptin resistance which is determined by the elevation of leptin levels in fasting blood samples especially due to obesity, in type 2 diabetic patients.

xivort hexiv aim, 20 mM glucose, 1 nM insulin and 0.5 ng/mL leptin were administered to PID-MSCs for 24 hours. Expression levels of the *pdx-1*, *pax4*, *nkx2.2*, *nkx6.1* and *ins2* genes, which are specific transcription factors involved in insulin production or beta cell-specific proteins, have been demonstrated by the real time reverse transcription-polimerase chain reaction (qRT-PCR) method for detecting beta cell differentiation. Findings related to insulin production at the level of gene expression were supported by flow cytometric analysis of the insulin⁺ cell ratio. The increase in the production of reactive oxygen species (ROS) was used as a differentiation indicator and the ratio of ROS producing cells was shown by flow cytometric analysis of DCFDA⁺ cells. Function acquisition of newly differentiating beta cells was also demonstrated by determining the level of insulin release in response to elevated glucose stimulation by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The increase in SOCS3 level was used as a leptin resistance indicator, while the decrease in p-IRS1 (Try) level *versus* the increase in p-IRS1 (Ser307), PTEN and p-AKT (Ser473) levels were used as insulin resistance markers. The changes in the levels of these markers were indicated by western blotting. The possible role of PTEN, a negative xivort hexivr of the PI3K/AKT signaling, was investigated by the application of bpV (Hopiv), a pharmacological xivort hexivr of this molecule. Changes in p-GSK-3 β (Ser9 and Try216) and β -catenin levels were

demonstrated by western blotting. The interaction of β -catenin with N-cadherin was demonstrated by immunoprecipitation followed by western blotting. In addition, the level of Tub, which is an important molecule in insulin and leptin pathway, in plasma membrane, cytoplasm, and nuclear fractions demonstrated by western blotting. The possible interaction of β -catenin with Tub was investigated by immunoprecipitation followed by western blotting. The roles of β -catenin and Tub in this mechanism were confirmed using specific silencer RNAs. Changes in expression levels of β -catenin and Tub genes were shown by qRT-PCR technique. Possible roles of Tub in the production of *ins1*, *ins2*, *pdx1* and *MafA*, which are important transcription factors in insulin synthesis, were investigated by chromosome immunoprecipitation technique.

As the result, it was determined that beta cell differentiation was stimulated in all groups, while in the group in which insulin and leptin were applied together, it was found that the newly formed beta cells were much higher, the differentiation was more advanced and they were more mature. However, newly formed beta cells were not functional. It was found that in the cells of this group the level of p-AKT (Ser473) did not change while SOCS3, p-IRS1 (Ser307) and PTEN levels were increased p-IRS1 (Try) level was decreased. These findings suggest that combined administration of insulin and leptin to PID-MSCs results in the development of the insulin and leptin resistance. It was shown that this signaling pathway, which stimulates the formation of mature beta cells at a high rate, is mainly mediated by AKT/GSK-3 β / β -catenin and Tub. B-catenin and Tub were linked to each other in the nucleus under this condition. It was also found that Tub binded to promoter regions of *ins1*, *ins2*, *pdx1* and *MafA* genes, which play key roles in insulin synthesis.

These findings clearly demonstrate that insulin and leptin resistance developed in PID-MSCs in the first stage of the type 2 diabetes development, markedly increases beta cell differentiation. The ability to develop new therapeutic agents that inhibit AKT/GSK-3 β / β -catenin and in particular Tub with the aim of beta cell differentiation inhibition has the potential to be an important step in the prevention of the development of type 2 diabetes. Inversely, endogenous PID-MSCs can be differentiated into beta cells through the development of new therapeutic agents that activate AKT/GSK-3 β / β -catenin and in particular Tub, xvort he treatment of advanced type 2 diabetes, in which pancreatic beta cells are reduced, or type 1 diabetes, in which beta cells are almost never found.

June 2017, 115 pages.

Keywords: β -catenin, insulin resistance, leptin resistance, pancreatic islet-derived mesenchymal stem cell, Tub.

1. GİRİŞ

Diyabet, dünya çapında en sık rastlanan metabolik hastalıklardan biridir ve diyabetik bireylerin sayısı katlanarak artmaktadır. Her iki tip diyabet için uygulanmakta olan tedaviler arasında yer alan ekzojen insülin veya hipoglisemik ajan uygulamaları yalnızca semptomları geriletmekte, ancak kesin tedavi için yetersiz kalmaktadır. Bu durum, beta hücre sayısının artırılması veya rejeneratif tedavi gibi yeni terapötik stratejilerin geliştirilmesini zorunlu kılmaktadır. Son yıllarda araştırmalar hücresel tedavi üzerinde yoğunlaşmaktadır. Hücresel tedavi kapsamında kadavraların pankreaslarından elde edilen beta hücreleri hastalara transplante edilmekte ise de, elde edilen hücrelerin sayıca yetersizliği ve transplantasyon sonrası immün red reaksiyonlarının gelişmesi sebebiyle bu tedavi kısıtlanmaktadır. Son yıllarda çalışmalar, hastanın kendisinden izole edilen mezenkimal kök hücre (MKH)'lerin ve uyarılmış pluripotent kök hücrelerin beta hücrelerine farklılaştırılarak hastaya tekrar transplantasyonu üzerine odaklanmıştır. Hücre transplantasyonuna alternatif bir yaklaşım olarak hastanın pankreasında bulunan endojen beta hücre kütlelerinin büyüme faktörü uygulamalarıyla artırılması düşünülebilir. Her iki yaklaşımın uygulanabilmesi için pankreatik beta hücre kütlelerini düzenleyen moleküler mekanizmanın aydınlatılması gerekmektedir. Tip2 diyabetin başlangıcı olarak bilinen kompenzasyon aşamasında meydana gelen hiperinsülinemi ve hiperglisemi ile paralel olarak artan leptin seviyeleri ile birlikte pankreatik adacıklardaki beta hücrelerinin kütlelerinin de arttığı bilinmektedir. Ancak, halen yeni oluşan beta hücrelerinin kaynağı ve dolayısıyla oluşum mekanizmaları tam olarak aydınlatılamamıştır.

Bu çalışmanın çıkış noktası, kompenzasyon aşamasında yeni oluşan beta hücrelerinin PAK-MKH kaynaklı olabileceğinin düşünülmesidir. Bu sebeple kompenzasyonun gelişmesine sebep olan üç ana aracı olan glukoz, leptin ve insülin üzerine odaklanılmıştır. Hiperglisemik şartlarda leptin ve insülin tarafından düzenlenen PAK-MKH'lerin beta hücrelerine farklılaşmasında rol oynayabilecek anahtar moleküllere giden yolun leptin ve insülin reseptörü ile uyarılan ve aynı zamanda hücre farklılaşmasında etkili olabilecek bir

yolak olabileceği düşüncesindeyiz. Bu çalışma kapsamında gerçekleştirdiğimiz çok yönlü moleküler araştırmalar bu ortak yolağın anahtar moleküllerinin GSK3- β tarafından uyarılan ve hücre farklılaşmasını sonuçlandırabilecek özelliğe sahip olan β -katenin ile GSK3- β 'dan bağımsız olarak beta hücre farklılaşmasını meydana getirebilecek bir başka transkripsiyon faktörü olan Tub olabileceğini göstermektedir.

Bu çalışma ile ulaşılmak istenen hedef, tip2 diyabetin gelişmesinde ilk basamak olan kompenzasyon aşamasında meydana gelen beta hücre kütlesindeki artışın PAK-MKH kaynaklı olduğunun açıkça ortaya konarak farklılaşmada rol oynayan moleküler araçların tespit edilebilmesidir. Kompenzasyon aşamasının temel aktörleri olan leptin, glukoz ve insülini PAK-MKH'lere uygulayarak oluşturduğumuz *in vitro* modelde tespit edeceğimiz tek bir molekülün bile endojen beta hücre kütlesinin artırılması için önemli olduğuna ve tedavide kullanılabilecek yeni moleküllerin geliştirilebilmesi için temel oluşturabileceğine inanıyoruz. Yaptığımız kapsamlı literatür taraması sonucunda PAK-MKH'ler üzerine yapılmış herhangi bir leptin uygulamasının olmadığı tespit edildi. Dolayısıyla, bu çalışmada elde edilen tüm bulgular ilk kez literatürde yer alacaktır. Bu çalışma kapsamında elde edilen sonuçlar, tip2 diyabet gelişiminin ilk basamağı olan kompenzasyonun engellenebilmesi için belirlenen molekülleri hedefleyen yeni terapötik ajanların geliştirilebilmesi açısından oldukça önemlidir.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. DİYABET

Diyabet günümüzde 382 milyon insandan fazlasını etkilemektedir ve bu sayının 2035 yılında 592 milyona çıkacağı öngörülmektedir (Uluslararası Diyabet Federasyonu). İnsülin hormonunda ya da etkisindeki yetersizlik sonucu oluşan diyabet hastalığı hiperglisemiye bağlı olarak gelişmektedir ve karbonhidrat, yağ, protein metabolizmasındaki bozuklukların hastalık gelişiminin ilerleyen seviyelerinde gözlenmesi nedeniyle metabolik bir hastalık olarak tanımlanmaktadır. Diyabet; tip 1, tip 2 ve gebelik diyabeti (gestasyonel diabetes mellitus, GDM) olmak üzere başlıca üç gruba ayrılır. Diyabetli hastaların çoğunluğunu tip 1 ve tip 2 diyabetli hastalar oluşturmaktadır (Amerikan Diyabet Derneği, 2009).

Tip 1 diyabet (T1D), insülin üreten pankreatik beta hücrelerinin otoimmün sistem tarafından tahribi sonucunda ortaya çıkan kronik bir hastalıktır ve iki ana evreden oluşur: Birincisi, insülitis olarak adlandırılır ve adacığa T-lenfositlerin invazyonu söz konusu olup beta hücre hedefli bir süreçtir. İkinci evrede ise, beta hücrelerinin yıkımı gerçekleştiğinden insülin üretimi bu aşamadan sonra gerçekleşemez. İnsülin yokluğunda, glukoz insüline duyarlı hücrelere giremez ve kanda glukoz birikimi gözlenir (Weir ve Bonner, 2004).

Tip 2 diyabet (T2D) tüm diyabet olgularının %90'dan fazlasını oluşturmaktadır ve en yaygın görülen diyabet formudur. T2D'nin birçok ölümcül patofizyolojik sonuçları nedeniyle morbidite ve mortalite oranları gün geçtikçe artmaktadır. T2D kardiyovasküler sistem, böbrek, retina ve periferik sinir sistemini de kapsayan geniş etkili komplikasyonlara yol açar (Genuth ve diğ., 2003). T2D metabolik hastalıkların önemli bir grubunu oluşturmaktadır, kronik hiperglisemi ve hiperinsülinemi ile karakterize edilir. Leptin yetersizliği veya leptin direnci, T2D gelişiminde rol almaktadır (Kalra ve diğ., 1999). İskelet kası, karaciğer ve yağ dokusu gibi periferik dokularda insülinin fonksiyonunda meydana gelen azalma insülin direnci olarak bilinir ve T2D'nin gelişmesi ve ilerlemesinin ana etkeni olarak kabul edilmektedir (Leahy ve diğ., 2010). Hastalığın erken evrelerinde insülin direncine bağlı olarak pankreatik beta hücre kütlesi ve

fonksiyonunda artış meydana gelir (Chang-Chen ve diğ., 2008) ve genellikle bu durum hastalığın tanısının konabilmesini uzun yıllar geciktirebilmektedir. Beta hücreleri, insülin direncinin artması durumunda glukotoksisite ve lipotoksisite varlığında gelişen endoplazmik retikulum stresi gibi farklı hücresel mekanizmalar yoluyla ölmektedir (Bensellam ve diğ., 2012).

Obezite, metabolik sendrom ve diyabet hastalıkları ortak birçok moleküler mekanizmayı içerir. Bu hastalıklar birden fazla gen arasındaki etkileşimler, hücresel sinyal moleküllerinin dinamiği ve karmaşık ilişkilerinin çevresel faktörlere bağlı olarak değişmesi sonucu uzun süreler sonunda gelişir. Obezite, dünyada milyonlarca kişiyi etkilemektedir ve hiperinsülinemi, hiperleptinemi ve ada hacminin artması ile karakterize olmasının yanında hipertansiyon, ateroskleroz, insülin direnci ve diyabeti de kapsayan birçok hastalık ile ilişkilidir (Kyrou ve diğ., 2014).

Kanda uzun süre yüksek seviyelerde bulunan glukozun seviyeleri ancak insüline duyarlı hücreler tarafından alınarak düşürülebileceğinden hiperglisemik bireylerde normalden çok daha fazla insüline ihtiyaç vardır. Böyle bir durumda pankreatik adalarda yerleşen beta hücrelerinin ürettiği insülin yetersiz kaldığından daha yüksek insülin gereksinimini karşılayabilmek için beta hücre sayısı artar. Diyabet gelişiminin ilk aşaması olarak bilinen ve kompenzasyon fazı olarak isimlendirilen bu aşamada meydana gelen yeni beta hücrelerinin oluşum mekanizmasının iyi anlaşılması hastalığın erken tanısı ve yeni tedavi stratejilerinin geliştirilebilmesi bakımından oldukça önemlidir (Weir ve Bonner-Weir, 2004).

2.2. PANKREATİK GELİŞİM VE BETA HÜCRE FARKLILAŞMASI

Pankreas gelişimi sürecinde beta hücre farklılaşması temel olarak 4 basamaktan oluşur (Bendala, 2009);

- 1) Kesin endoderm/bağırsak epitelinin oluşumu
- 2) Pankreatik farklılaşma
- 3) Endokrin özgünleşme
- 4) Beta hücre farklılaşması

Embriyonik gelişimin gastrulasyon aşamasını takiben endoderm, mezoderm ve ektoderm olmak üzere üç germ tabakası oluşur. İlkel bağırsak endodermden gelişir ve aldığı sinyallere bağlı olarak karaciğer, pankreas ve bağırsağı oluşturur. Kesin endodermin ön parçasından kökenlenen ön bağırsak pankreas, karaciğer ve akciğeri oluşturur. Bağırsak endodermi ve onu çevreleyen mezoderm arasındaki etkileşim birincil olarak Sonic Hedgehog (Shh) sinyalizasyonu aracılığı ile olur. Shh bağırsak epitelinde yüksek oranda üretilirken Ptf1 α (p48)/Pdx1 bölgesinde regülasyonu baskılanır ve bu bölgede embriyonik gelişimin 8. gününde (E8) pankreas oluşur (Roberts ve diğ., 1995; 1998; de Santa Barbara ve diğ., 2003).

Pankreatik hücrelerin özgülleşmesi belirli transkripsiyon faktörleri tarafından yönlendirilir. Bu transkripsiyon faktörleri aşağıda detaylı olarak açıklanmıştır.

2.2.1. Pdx1

Yetişkinlerde özellikle beta hücrelerinde bulunur ve *insülin* geninin promotörüne bağlanarak anlatımını düzenler (Iratni ve diğ., 2002). Pdx1, embriyonik gelişim sürecinde ilk olarak ön bağırsak endoderminde gözlenir (E8.5, E10). E10. güne kadar dorsal ve pankreatik tomurcuklarda ekspresyonu görülen Pdx1, E11. günde yeni oluşan beta hücrelerinde baskılanır (Jonsson ve diğ., 1995). Pankreas gelişimindeki önemli rolünün yanı sıra Pdx1, yetişkin beta hücrelerinin fenotipik özelliklerinin ortaya çıkması açısından da önemlidir (Ahlgren ve diğ., 1998; Li ve diğ., 2005). Pdx1, bu fonksiyonlarından dolayı kök hücrelerin beta hücrelerine farklılaşma çalışmalarında önemli bir belirteç ve hedef olarak kullanılmaktadır (Bendala, 2009).

2.2.2. Ptf1 α (p48)

Ptf1 α pankreas özgün transkripsiyon faktörü 1'in α alt ünitesidir. Temel helix-loop-helix özelliğine sahip bir proteindir. P48 üretmeyen hayvanların ekzokrin pankreas dokularının gelişmediği gösterilmiştir. Bu bulgu p48'in asinar doku gelişiminde anahtar bir düzenleyici olduğunu düşündürmektedir (Cockell ve diğ., 1989). P48 aynı zamanda pankreatik gelişimin başlamasını sağlar (Kumar ve Melton, 2003; Kubo ve diğ., 2004). *Xenopus*'larda Pdx1 ve Ptf1 α 'nın ekspresyonunun ektopik pankreatik oluşumu için yeterli olduğu gösterilmiştir (Afelik ve diğ., 2006).

Endokrin farklılaşma Notch sinyali aracılığıyla gerçekleşen lateral inhibisyon ile meydana gelir (Chitnis, 1995). Notch reseptörünün aktivasyonu ile Hairy enhancer of split-1 (HES-1) geninin aktivasyonu gerçekleşir. Bu da proendokrin gen olan nörogenin3 (Ngn3)'ün ekspresyonunu baskılar. HES-1 aynı zamanda Notch ligandlarını da baskılar, ancak bu baskılanma tam değildir. Bazal seviyede ligand üretimi görülür. Aktif Notch sinyali varken ileri farklılaşma gözlenmez. Bu yolağın aktivasyonu genellikle proliferasyonla ilişkilidir.

2.2.3. Ngn3

Endokrin progenitor hücre belirteci olan Ngn3, Notch sinyalinin baskılanmasıyla artar (Apelqvist ve diğ., 1999; Jensen ve diğ., 2000). Ngn3⁺ hücrelerin ada kaynaklı hücrelerin tümünü verebildiği gözlenmiştir (Bendala, 2009). Ngn3^{-/-} fareler ada yapısı oluşturmadan doğmuştur (Gradwohl ve diğ., 2000). Ngn3'ün pankreatik progenitör hücrelerde erken ekspresyonu bu hücrelerin glukagon üreten hücrelere farklılaşmasını, adenoviral ekspresyonu nöroendokrin farklılaşmaya (Apelqvist ve diğ., 1997), ektopik ekspresyonu ise mezenkimde kümelenmiş endokrin hücrelere farklılaşmaya neden olmuştur (Grapin-Botton ve diğ., 2001).

2.2.4. Beta2/NeuroD

Beta hücresi transaktivatörü 2 (BETA2)/NeuroD üretmeyen farelerde beta hücre sayısında önemli bir azalma, ada morfogenezinde bozulma ve ekzokrin pankreasta bazı anormallikler gözlenmiştir (Naya ve diğ., 1997). Bu faktör geç endokrin hücre gelişimi için gereklidir. Örneğin, beta hücreleri fonksiyonel olgunluğa erişmek ve korumak için NeuroD'ye ihtiyaç duyarlar (Huang ve diğ., 2000).

2.2.5. Nkx2

NK2 homeobox 2 (Nkx2) geni birçok dokunun farklılaşmasında rol alır (Price, 1993). Nkx2.2 ekspresyonu hem ventral sinir sisteminde hem de olgun alfa, beta ve PP hücrelerinde gözlenmiştir. Nkx2.2 bulunmayan mutant farelerde beta hücrelerinin olmadığı ve diğer endokrin hücre sayılarında da azalma olduğu gözlenmiştir. Nkx2.2 üretmeyen hayvanlarda, pankreatik özelleşmede Pdx1 ekspresyonu etkilenmezken, ikincil geçişte Pdx1 sinyalinde güçlü bir azalma olduğu gözlenmiştir. Bu gözlem sonucunda Nkx2.2'nin beta hücrelerinin terminal farklılaşması için gerekli olduğu düşünülmüştür (Sussel ve diğ., 1998).

2.2.6. Nkx6.1

Nkx6.1 diğerk bir NK homeodomain ailesi üyesidir ve hem pankreas hem de merkezi sinir sisteminde üretilir (Rudnick ve diğ., 1996). Nkx6.1 ekspresyonu ilk olarak E10.5'ta pankreatik epitelde belirlenmiştir. E15.5'ta Pdx1⁺veya Ngn3⁺ hücrelerde kolokalizedir. Nkx6.1 üretmeyen hayvanlarda beta hücrelerinde sayıca azalma olduğu, Nkx2.2'nin ekspresyonunun etkilenmediğı gözlenmiştir ki bu bulgu pankreatik gelişim sürecinde Nkx2.2'nin Nkx6.1'den önce etkin olduğunu düşündürmüştür (Sander ve diğ., 2000).

2.2.7. Pax4

Eşleştirilmiş kutu-içeren gen 4 (Pax4) “eşleştirilmiş kutu” denen bir motif taşıyan multigen ailesinin bir üyesidir (Walther ve diğ., 1991). Pax4 ekspresyonu ilk olarak E9.5'ta gözlenir daha sonra bu ekspresyon sadece beta hücreleri ile sınırlanır. Pax4 üretmeyen hayvanlarda beta ve delta hücrelerinin gelişmediğı, ancak normalde bulunandan daha fazla oranda alfa hücrelerinin bulunduğu gözlenmiştir. Birçok çalışmada Pax4'ün Ngn3'ün bir hedefi olduğu gözlenmiştir (Heremans ve diğ., 2002; Smith ve diğ., 2003; Sosa-Pineda ve diğ., 2004). Pax4 ve Arx arasındaki denge alfa ve beta hücrelerinin gelişimini yönlendirir (Collombat ve diğ., 2003; Heller ve diğ., 2005).

2.2.8. Pax6

Pax6 hem gelişen pankreasta hem de olgun pankreasın alfa, beta veya delta hücrelerinde eksprese edilirken asinar dokuda ekspresyonu gözlenmez (Turque ve diğ., 1994; Sander ve diğ., 1997). Pax6 üretmeyen farelerde pankreatik hormon üreten hücrelerin hepsinde azalma gözlenmiştir (St-Onge ve diğ., 1997).

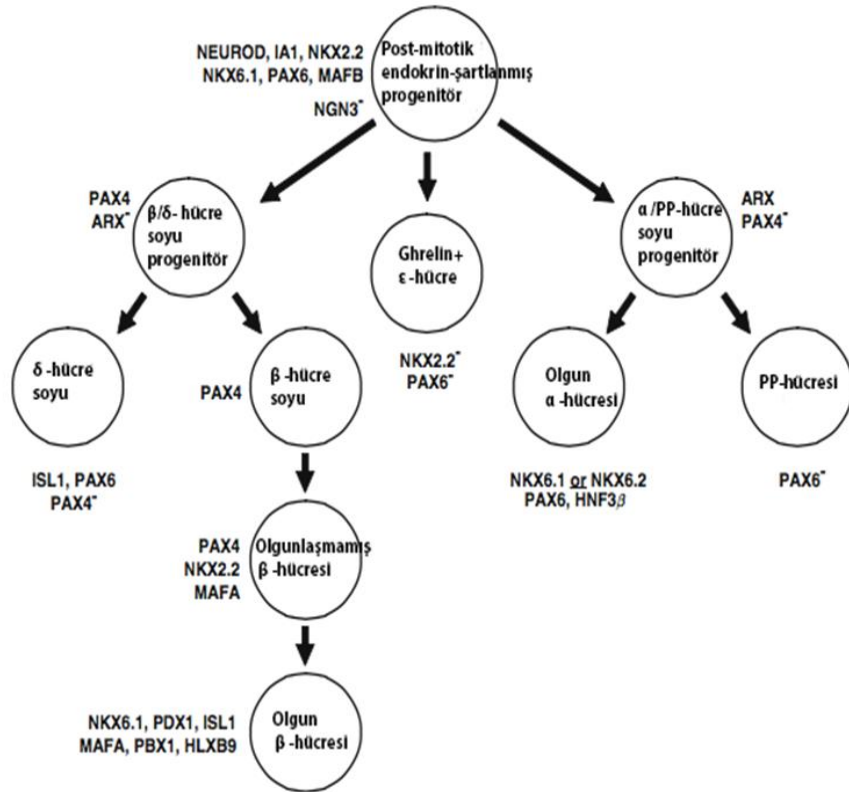
2.2.9. Arx

Arx ekspresyonu ilk olarak pankreatik taslağın proliferatif epitelinde belirlense de sonraki aşamalarda endokrin hücre tipleri ile sınırlanmaktadır. Ngn3 üretmeyen hayvanlar Arx eksprese etmezler (Collombat ve diğ., 2003). Arx^{-/-} mutantlar alfa hücrelerinden yoksundur buna karşın delta hücre sayısında artış gözlenir. Pax4/Arx mutant hayvanlarda ise alfa ve beta hücreleri delta hücreleri ile yer değiştirmiştir. E.12.5'e kadar mutant embriyolarda glukagon⁺ hücreler belirlenmiş olduğundan, Arx'in erken alfa hücre farklılaşması için gerekli olmadığı düşünülmüştür. Bu da Arx'in asıl rolünün ikincil geçişte olduğunu düşündürmektedir. Arx, alfa hücre farklılaşmasını uyarır, beta ve delta hücre farklılaşmasını ise antagonize eder (Collombat ve diğ., 2005).

2.2.10. MafA/MafB

Maf transkripsiyon faktörleri pankreasın birçok farklılaşma aşamasıyla ilişkilidir (Kawauchi ve diğ., 1999; Ochi ve diğ., 2004). Pankreasta en iyi tanımlanan Maf faktörleri MafA ve MafB'dir ve bunlar özellikle sırasıyla beta ve alfa hücrelerinde gözlenir (Nishimura ve diğ., 2006). Beta hücrelerinin olgunlaşmasında, fonksiyon ediniminde ve yaşamlarını sürdürmelerinde MafB'nin MafA'ya değişimi önemlidir (Nishimura ve diğ., 2006). Ayrıca, MafB beta hücrelerinin olgunlaşmasında rol alan Pdx1, Nkx6.1 ve Glut2'nin regülasyonu için önemlidir (Artner ve diğ., 2007).

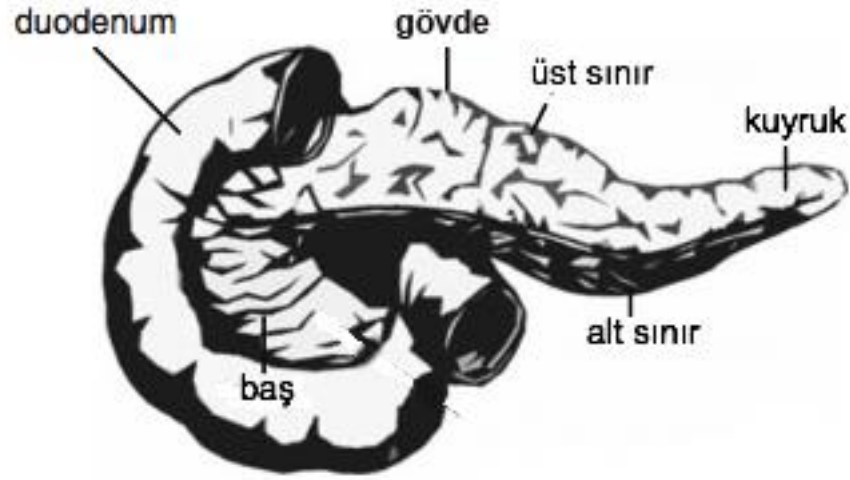
Endokrin pankreatik gelişimi yönlendiren ve yukarıda detaylı bir şekilde açıklanan transkripsiyon faktörlerinin farklılaşma sürecindeki rolleri **Şekil 2.1:**'de şemalandırılarak özetlenmiştir.



Şekil 2.1: Pankreatik endokrin hücre farklılaşma sürecinde eksprese edilen transkripsiyon faktörlerinin şeması (Efrat, 2010'dan alınmıştır).

2.3. PANKREASIN ANATOMİSİ VE FONKSİYONU

Pankreas endokrin ve ekzokrin fonksiyonlara sahip bir organdır. Pankreas tam olarak belirgin olmayan üç bölgeden oluşur. Kalın bölge baş, daha incelen kısım kuyruk bu iki bölge arasında kalan alan ise gövde olarak adlandırılır ki bu da boyun denen bir bölge ile başa bağlanır. Abdomenin posterior duvarında, midenin altında enine konumlanmıştır ve ince bağırsağın duodenum bölgesine bağlanır (Gray, 1918).

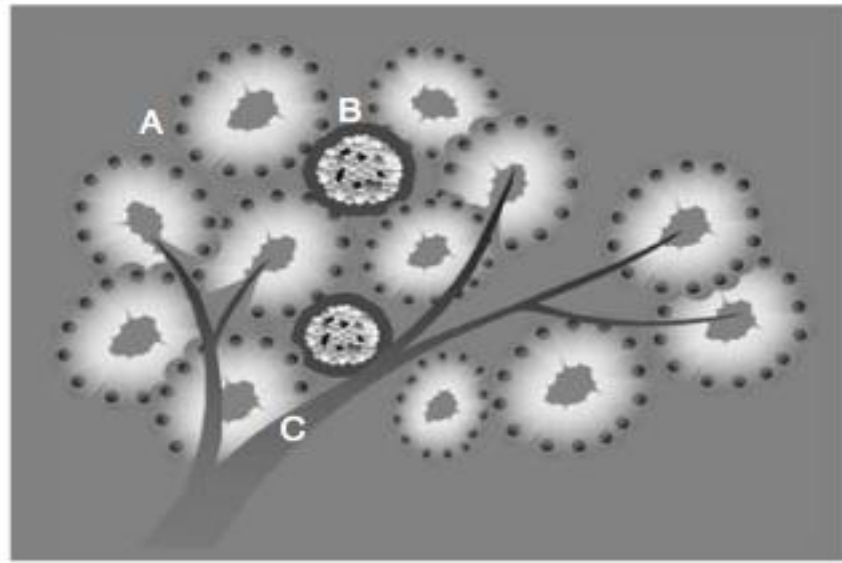


Şekil 2.2: Pankreasın anatomisi (Bendala, 2009'dan alınmıştır).

Organın yaklaşık %90-95'i ekzokrin dokudan oluşur ve temel görevi duodenuma sindirim enzimlerini salgılamaktır. Salgılanan enzimler inaktif formdadır ve ince bağırsak lümeninde bulunan diğer proteazlarla etkileştikleri zaman aktive olurlar. Böylece asınar hücrelerin kendi salgıladıkları enzimler tarafından sindirimi önlenmiş olur. Duktal hücreler ise bikarbonat iyonu salgırlar. Bu olay sekretin denen hormon tarafından düzenlenen bir biyokimyasal süreçtir ve gastrik asit sekresyonu sonucu değişen duodenal pH'yı düzenler (Bendala, 2009).

Pankreasın endokrin parçası Langerhans adaları denen hücre kümelerinden oluşur. Bu adalar ilk olarak 1869 yılında Alman biyolog Paul Langerhans tarafından keşfedilmiştir. Adalar, alfa (α), beta (β), delta (Δ), PP ve epsilon (ϵ) olmak üzere 5 tip hücreden oluşur. Bu hücreler sırasıyla glukagon, insülin, somatostatin ve ghrelin hormonlarını salgırlar. Pankreasın endokrin parçası glukoz homeostazını sağlamaktan sorumludur ve bunu

insülin ve glukagon hormonlarını kana salgılayarak gerçekleştirir. İnsülin, proinsülin denen prekürsör proteinin kesilmesi sonucunda oluşan iki zincirli bir polipeptiddir. Beta hücreleri bu hormonu glukozu cevaben salgılar. İnsülin glukozun sistematik olarak alınımını sağlayarak kan glukoz seviyesini düşürür. Karaciğerde alınan glukoz glikojene dönüştürülerek depo edilir (Bollen ve diğ., 1998; Agius, 2008). Glukoz seviyeleri düşük iken ise alfa hücreleri insüline zıt çalışan glukagon hormonu salgırlar. Böylece karaciğerde glikojenin glukozu parçalandıktan sonra kana verilmesi sağlanarak kandaki glukoz seviyesi artar (Hems ve Whitton, 1980; Boden, 2004).



Şekil 2.3: Pankreasın histolojik organizasyonu. Duktal sistem (C) asinar hücrelerin (A) sekresyonunu toplar, Langerhans adaları (B) asinar dokunun arasına dağılmıştır. (Bendala, 2009'dan alınmıştır).

2.4. KÖK HÜCRELER

Diyabetin hücresel tedavisine ilişkin birçok çalışma yürütölmektedir. Bunlardan bazıları; yapay pankreas üretilmesi, pankreas transplantasyonu, ada transplantasyonu, hücre kökenli tedaviler, gen tedavileri ve rejeneratif tedavilerdir. Her yöntemin kendi içerisinde kısıtlamaları bulunmaktadır; donör yetersizliği, immun baskılayıcı ilaçların zararları, hücre kökenli tedavide saf hücre nesillerinin elde edilme zorluğu bunlar arasında sayılabilir. Ancak, tüm bu tedavilerin tabanında insülin salgılayan beta hücrelerinin yerine konması yatmaktadır ve beta hücrelerinin kaynağı ve elde edilme yollarına ilişkin

çeşitli görüş ve çalışmalar bulunmaktadır. Araştırmalar içerisinde izole edilip kültüre edilen kök hücrelerin ya da yetişkin veya fetal pankreas dokusundan elde edilen ada öncül hücrelerinin kullanımına ilişkin yaklaşımlar bulunmaktadır (Cilaker-Micili ve Ozogul, 2007). Bazı araştırmacılar ada kök hücrelerine benzer hücrelerin pankreas kanalında veya adacıklarda bulunabileceğini düşünmektedirler (Grapin-Botton, 2001; Karaoz ve diğ., 2010).

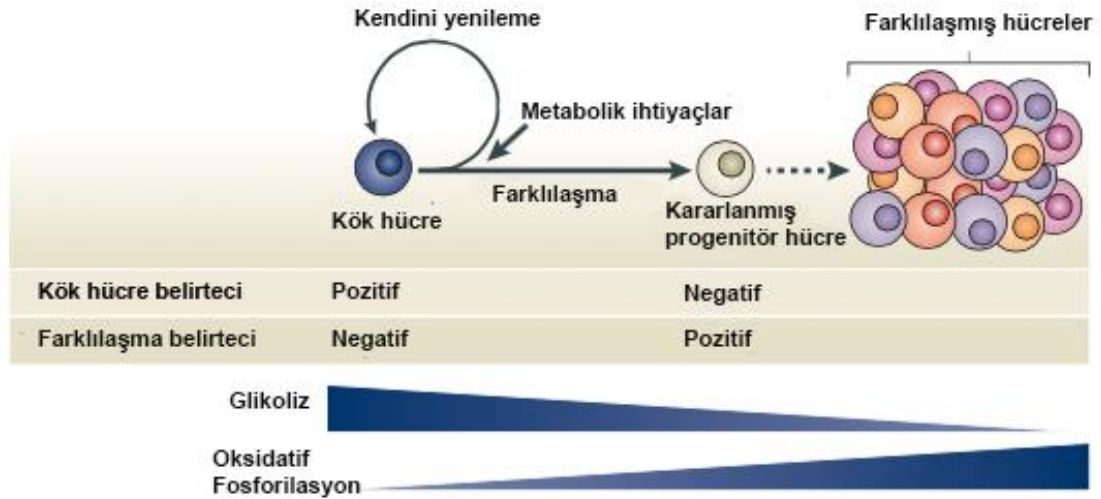
Diyabetin tedavisinde kullanılmak üzere embriyonik kök hücreler, uyarılmış pluripotent kök hücreler, MKH'ler gibi birçok kök hücre türü önerilmiştir (Chhabra ve diğ., 2013; Lilly ve diğ., 2016).

Kök hücreler kendini yenileme, değişik tipte hücrelere farklılaşma (potensi) ve klon oluşturma yeteneğine (klonalite), sahip hücrelerdir (Smith, 2001; Weissman ve diğ., 2001). Kök hücreler asimetrik bölünme yoluyla bir yandan kendi yedeğini (kendini yenileme) meydana getirirken, diğer yandan yenilenecek dokunun gereksinimi olan ve farklılaşma yönünde ilerleyecek olan hücrelere dönüşürler. Kök hücreler, gelişimsel potansiyellerine göre totipotent, pluripotent, multipotent, oligopotent ve unipotent olmak üzere gruplara ayrılırlar. Totipotent hücreler her üç germ tabakasına ait hücreleri ve ekstraembriyonik dokuları oluşturabilir. Pluripotent hücreler ektoderm, mezoderm ve endoderm kökenli organları içeren uygun embriyoyu oluşturabilirler. Multipotent kök hücreler, sadece organın dokuya özgün progenitörlerine farklılaşabilirler. Unipotent ya da oligopotent kök/progenitör hücreler ise sadece bir ya da bir kaç fonksiyonel hücre tipini oluşturabilirler (Can, 2014).

Memelilerde zigotun 5-6 kez bölünmesiyle blastokist oluşur, bu aşamadaki hücreler sırayla önce ara oluşumları, sonra da kalıcı olan bütün dokuları ve organları oluşturmak üzere giderek çoğalır (proliferasyon), kararlanır (determinasyon) ve farklılaşır (differensiyasyon). Bir blastokistin iç hücre kitlesinde yer alan hücreler embriyonik kök hücreler (EKH) olarak adlandırılır. Bu hücreler pluripotent özelliktedir yani embriyodan kökenlenecek olan bütün doku ve organları verebilirler. Ancak yüksek telomeraz aktivitelerinden dolayı kontrolsüz çoğalma ile tümör hücresine dönüşme olasılıkları da yüksektir (Can, 2014).

Öte yandan, gelişmekte olan organizmada embriyonik kök hücreler bulunmaz. Ancak, başta kemik iliği olmak üzere, çeşitli organlarda ve bu organların belirli doku bölgelerinde, gerektiğinde kendini çoğaltabilen, kararlanabilen ve farklılaşabilen hücreler bulunur. Bunlara yetişkin kök hücreleri (YKH) veya dokuya özgü kök hücreler denir. Bu hücreler genellikle pluripotent özellikte değildir (Can, 2014).

Kök hücre popülasyonu kendini yenileme ve hücre farklılaşması arasındaki dengeye bağlıdır (Weissman ve diğ., 2001). Kök hücreler “niş” adı verilen özelleşmiş bir mikroçevrede bulunurlar. Burada kök hücreleri kendini yenileme kapasitelerini korumak amacıyla sessiz evrede tutacak olan özel koşullar bulunur (Ito ve Suda, 2014). Diğer yandan hücre metabolizması bir hücrenin proliferasyonuna, farklılaşmasına ya da sessiz evrede kalıp kalmamasına karar verebilir. Zigot, çok hücreli organizmaya gelişirken embriyoda, erken pluripotent kök hücrelerde, erişkin kök hücrelerinde, doku progenitörlerinde ve son olarak olgun erişkin dokularda hızlı hücre büyümesi, doku formasyonu ve organogenez için farklı metabolik gereksinimlere ihtiyaç vardır (Wanet ve diğ., 2015).

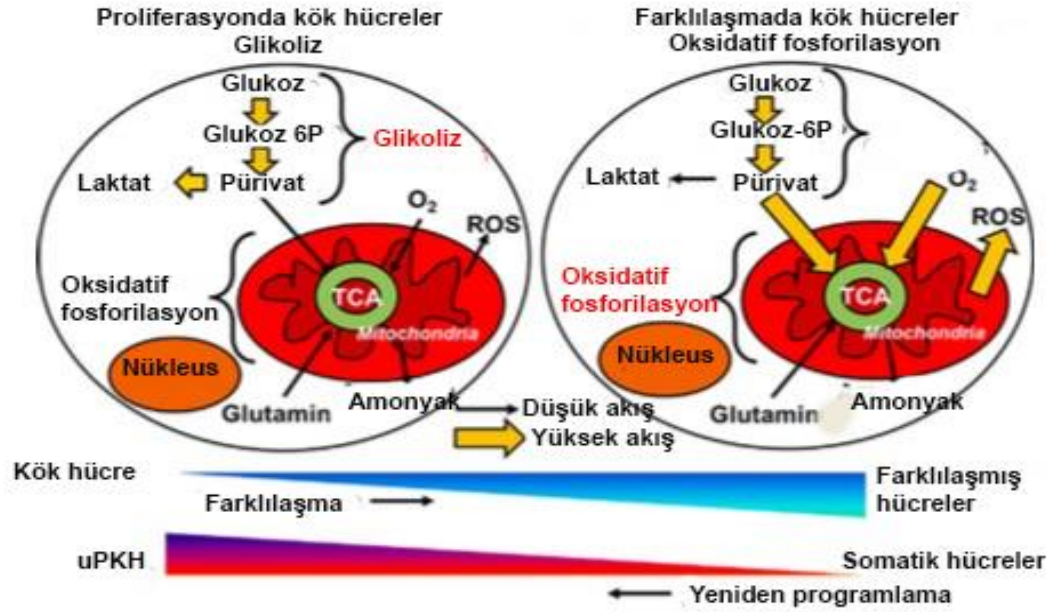


Şekil 2.4: Kök hücrelerin farklılaşma sürecinde glikoliz ve oksidatif fosforilasyon değişimi (Ito ve Suda, 2014’den alınmıştır).

Sessiz evrede bulunan MKH’ler, artan hücre içi reaktif oksijen türleri (ROS)’ne karşı hassastırlar ve hayat boyu yenilenme kapasitelerini koruyabilmek amacıyla ROS’un oluşturduğu hücresel hasardan uzak dururlar (Rossi ve diğ., 2008; Suda ve diğ., 2011).

MKH'ler *in vivo* ortamda hipoksik koşullarda bulunur. Farklılaşmış olan osteoblast hücrelerine kıyasla MKH'ler, glikolitik enzimleri yüksek oranda eksprese ederken, oksidatif fosforilasyon için gerekli olan enzimleri düşük oranda üretirler. MKH'ler terminal farklılaşmasını tamamlamış somatik hücrelerden farklı olarak enerji ihtiyaçlarını karşılayabilmek için daha çok glikolizi tercih ederler (Chen ve diğ., 2008).

Glukoz, metabolik süreçte, glikoliz ile pürivata metabolize olur. Pürivat ise ya laktat dehidrogenaz enzimi ile laktata ya da mitokondride pürivat dehidrogenaz tarafından trikarboksilik asit döngüsünde kullanılmak üzere asetil-CoA'ya dekarboksile olur. Pürivatın laktat ya da asetil CoA'ya dönüşmesi oksijen varlığına göre değişir. Hipoksik koşullar altında asetil CoA üretimi azalırken pürivat laktata dönüştürülür. Oksijen varlığı dışında diğer bir değişken de hücresel büyüme ve proliferasyondur. Büyüme, makromoleküllerin ve ATP'nin üretimine ihtiyaç duyar. Bazı kanser hücrelerinde bu Warburg etkisi ile gerçekleşir. Warburg etkisi, normoksik koşullara rağmen artmış glikoliz ile tanımlanır (Lunt ve diğ., 2011). Normoksik koşullar altında ROS'un artışı MKH'leri hipoksiye bağlı sessiz evreden çıkarıp onları daha proliferatif bir aşamaya sokar. Bu da, kök hücre farklılaşmasını başlatmak için ortak bir mekanizma olabilir. Oksidatif fosforilasyondan glikolize geçiş, farklılaşmış somatik hücrelerin uyarılmış pluripotent kök hücrelerine (iPS) dönüştürülmesi sırasında da görülür ve metabolik yeniden programlamanın bir göstergesidir (Folmes ve diğ., 2011; Shyh-Chang ve diğ., 2013).



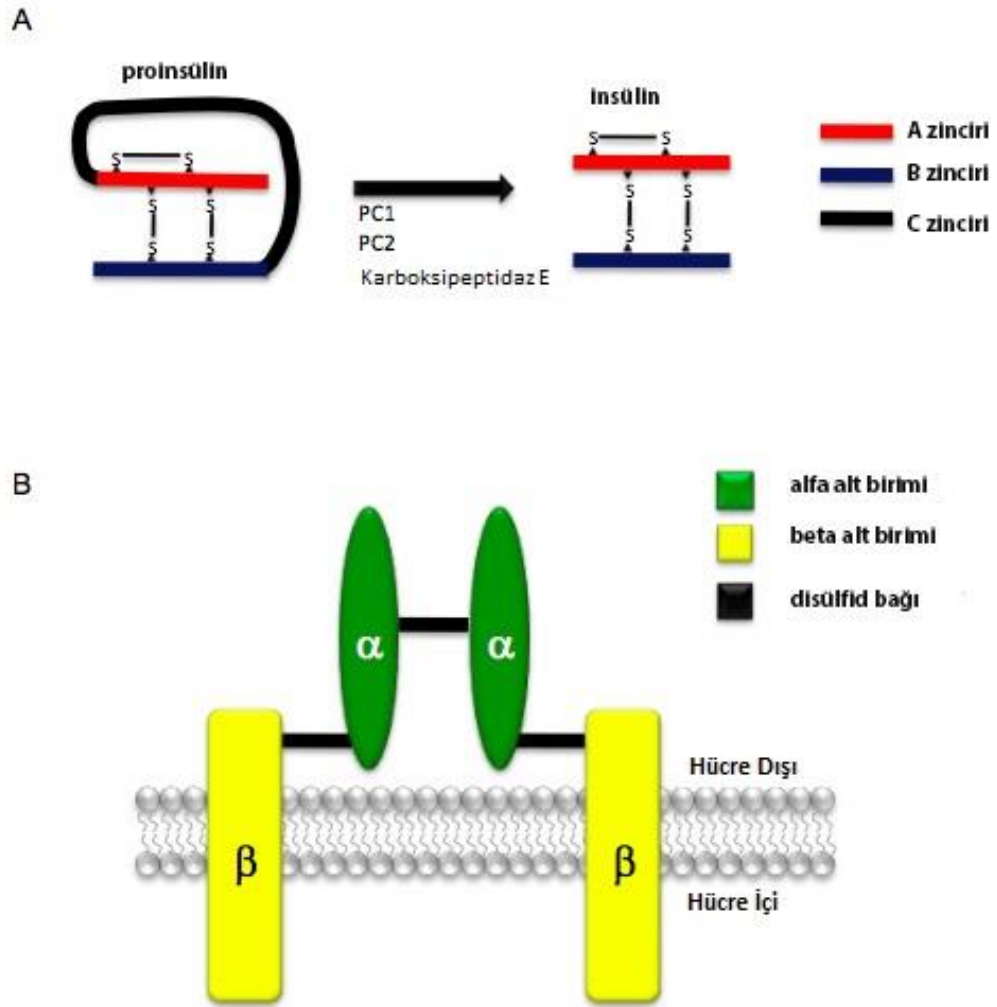
Şekil 2.5: Kök hücre proliferasyonu ve farklılaşması aşamalarında meydana gelen metabolik değişimin şematik çizimi (Sart, ve diğ., 2014'den alınmıştır).

2.5. İNSÜLİN SİNYALİ VE İLİŞKİLİ MOLEKÜLLER

2.5.1. Pankreatik β -hücrelerinde İnsülin Sentezi

İnsülin geni *ins1*, 11. kromozomun kısa kolunda yerleşmiştir ve öncül proinsülini kodlar (Owerbach ve diğ., 1980). Proinsülin, prohormon değiştiriciler (PC1 ve PC2) tarafından proteolitik modifikasyona uğrar ve ekzoproteaz karboksipeptidaz E, molekülün C-peptid adı verilen merkez bölgesini keserek çıkarır (Steiner ve diğ., 1996; Goodge ve Hutton, 2000). Geri kalan iki parça A-zinciri (21 amino asit) ve B-zinciri (30 amino asit) olarak adlandırılır. A-zinciri iç disülfid bağı taşır ve B-zincirine iki disülfid bağı ile bağlanır. Böylece 58 kDa ağırlığında olan insülin molekülü oluşur. Pankreatik beta hücreleri insülini sentezler ve salınmaya hazır bir şekilde sekresyon granüllerinde depolar. İnsülin genellikle yemek sonrasında salınır. Glukoz, amino asitler ve inkretinler (Gastrik inhibitör peptid (GIP) ve glukagon benzeri peptid-1 (GLP-1)) insülin sekresyonunu tetikler. Glukoz beta hücrelerine glukoz taşıyıcısı 2 (GLUT2) ile girer ve ATP üretebilmek için glikoliz ve solunum siklusuna katılır. ATP'deki artış ATP-bağımlı potasyum (K_{ATP}) kanallarının kapanmasını sağlar ve hücre depolarize olur. Beta hücrelerinin depolarizasyonu voltaj-bağımlı kalsiyum (Ca^{+2}) kanallarının açılmasını ve

Ca^{+2} akışını sağlar. Ca^{+2} seviyesindeki bu artış fosfolipaz C (PLC)'yi aktive eder ve bir membran fosfolipidi olan fosfolipid inositol 4,5-bifosfatı (PIP_2) inositol 1,4,5-trifosfat (IP_3) ve diaçilgliserole (DAG) parçalar. IP_3 daha sonra endoplazmik retikulum (ER)'dan Ca^{+2} salınımını sağlayarak hücre içi Ca^{+2} seviyesini artırır, bu da daha önce sentezlenmiş ve sekresyon vesikülleri içinde depolanmış olan insülinin ekzositozunu sağlar (Rutter, 2001) .



Şekil 2.6: (A) Proinsülin ve insülinin şematik gösterimi, **(B)** İnsülin reseptörünün alt birimleri (Sun, 2009'dan alınmıştır).

2.5.2. İnsülin Reseptörünün Aktivasyonu ve Regülasyonu

İnsülin sinyalizasyonu insülinin reseptörüne bağlanması ile başlar. İnsülin reseptörü (IR) 350 kDa ağırlığında tetramerik bir transmembran glikoproteindir ve her biri 135 kDa

ağırlığında olan iki α alt ünitesi ile her biri 95 kDa ağırlığında olan iki β alt ünitesinden oluşur. Bu alt üniteler disülfid bağı ile birbirine bağlıdır. α - β kompleksleri α -altüniteleri arasında disülfid bağı oluşturarak dimerize olurlar ve böylece sağlam bir tetramerik IR oluşur (Lawrence ve diğ., 2007). IR, reseptör tirozin kinaz ailesine mensuptur. Bu enzimler fosfat gruplarını diğer proteinlerin tirozin kalıntılarına aktarırlar. İnsülin IR'nin ekstrasellüler α -alt ünitelerine bağlanır ve β -alt ünitelerinin aktivasyonu aracılığıyla otofosforilasyon sağlanıp tam katalitik fonksiyon kazanılır (Kahn ve Folli, 1993; Lee ve Pilch, 1994). IR aktivitesi birçok mekanizma tarafından düzenlenir. Protein tirozin fosfataz 1B (PTP1B) gibi tirozin fosfatazlar direkt olarak IR ile etkileşime girer ve IR'nin önemli rezidülerinden fosfat kopararak aktivitesini baskılar. PTP1B üretmeyen farelerde insülin duyarlılığında artış olduğu gösterilmiştir (Elchelby ve diğ., 1999). IR'nin kinaz aktivitesi, sitokin sinyal baskılayıcısı-1 ve 3 (SOCS1 ve 3), büyüme faktörü reseptörüne bağlı protein 10 (Grb10) ve hücre plazma membran proteini-1 (PC-1) gibi proteinlerin fiziksel olarak IR ve insülin reseptör substratı (IRS) arasındaki etkileşimi engellemesinden etkilenir (Ueki ve diğ., 2004).

2.5.3. İnsülin Reseptör Substrat (IRS)

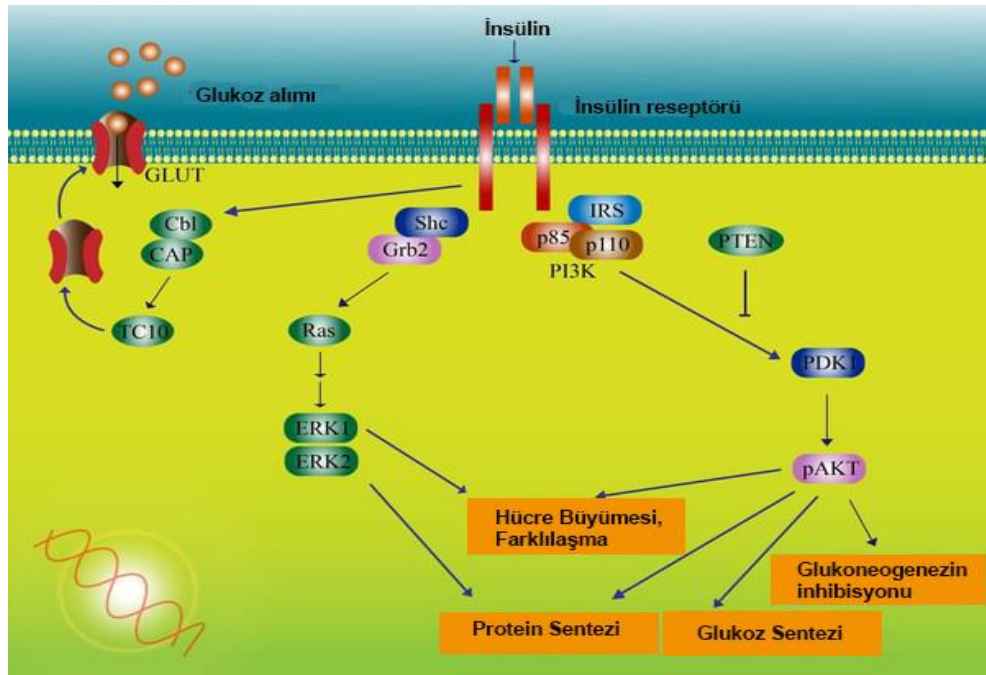
İnsülin reseptör substratları 1-6 (IRS1-6) ve Src-homoloji-2 gibi birçok IR substratı bulunmaktadır. IRS proteinleri N-terminal bölgelerinde fosfotirozin-bağlanma (PTB) bölgesi ve pleckstrin-homoloji bölgesi bulundurulur. Bu bölgeler IR'ye yüksek afinite gösterirler ve IR'ye bağlanmadan sorumludurlar. IR proteininin merkez ve C-terminal bölgeleri ise IR tarafından fosforillenebilen birçok protein tirozin fosforilasyon bölgesi içerirler (Taniguchi ve diğ., 2006). IRS proteinleri ekspresyon profillerine göre farklılık gösterirler. IRS1 üretmeyen farelerde beta hücrelerinde glukozu cevaben uyarılan insülin sekresyonunda bozukluklar ve insülin ekspresyonunda iki kata kadar azalma gözlenmiştir (Kulkarni ve diğ., 1999). *In vitro* araştırmalarda IRS1'in glukoz alınımla yakından ilişkili olduğu gözlenmiştir (Huang ve diğ., 2005). IRS1'in yetmişin üzerinde serin fosforilasyon bölgesi bulunmaktadır ve artan serin fosforilasyonu sıklıkla insülin direnci aşamasında gözlenmektedir. Mayalarda IRS1'in 307. Serin kalıntısından fosforillenmesinin IR ile etkileşimini bozduğu gösterilmiştir (Aguirre ve diğ., 2000).

Schäffer ve arkadaşları (2008),
GSLDESFYDWFERQLGGGSGGSSLEEEWAQIQCEVWG RGCPSTY peptid dizisine

sahip olan S961 molekülünü, biyosentetik olarak *E. coli*'de üretmiştir. Bu molekül insülin reseptör antagonistidir ve IR'ye insüline oranla 30-1000 kat daha fazla seçiciliği olduğundan insülin reseptörüne bağlanarak insülin direncine sebep olur.

2.5.4. İnsülin Sinyal Yolağı

İnsülin, reseptörüne bağlandığında reseptörün belirli tirozin bakiyeleri otfosforillenir ve IRS fosforilasyonu gerçekleşir (Cheatham ve Kahn, 1995). İnsülin reseptörünün kinaz aktivitesi aracılığıyla iki farklı sinyal yolağı olan PI3-K/Akt ve Ras/Mitojen ile aktive olan protein kinaz (MAPK) yolakları uyarılır. Bu sinyal yolakları gen ekspresyonu, hücre döngüsü, hücre proliferasyonu ve vesikül trafiği gibi farklı hücresel süreçleri düzenler. Bu süreçler ile ilişkili olarak glukoz, lipid ve protein metabolizması bozuklukları ile kanser ve diğer patolojiler gelişebilmektedir (Nandi ve diğ., 2004). İnsülin ile uyarılan sinyal yolağı **Şekil 2.7:**'de özetlenmiştir.



Şekil 2.7: İnsülin sinyal yolağının şematik gösterimi. IRS: İnsülin reseptör substratı; Glut: Glukoz taşıyıcısı; Grb: Büyüme faktör reseptörüne bağlı protein; Shc: Src homologu taşıyan protein; PTEN: Fosfataz ve tensin homologu; PDK1: Pürivat dehidrogenaz kinaz, izoenzim 1; pAKT/PKB: Protein kinaz B.

2.6. LEPTİN VE İLİŞKİLİ SİNYAL YOLAKLARI

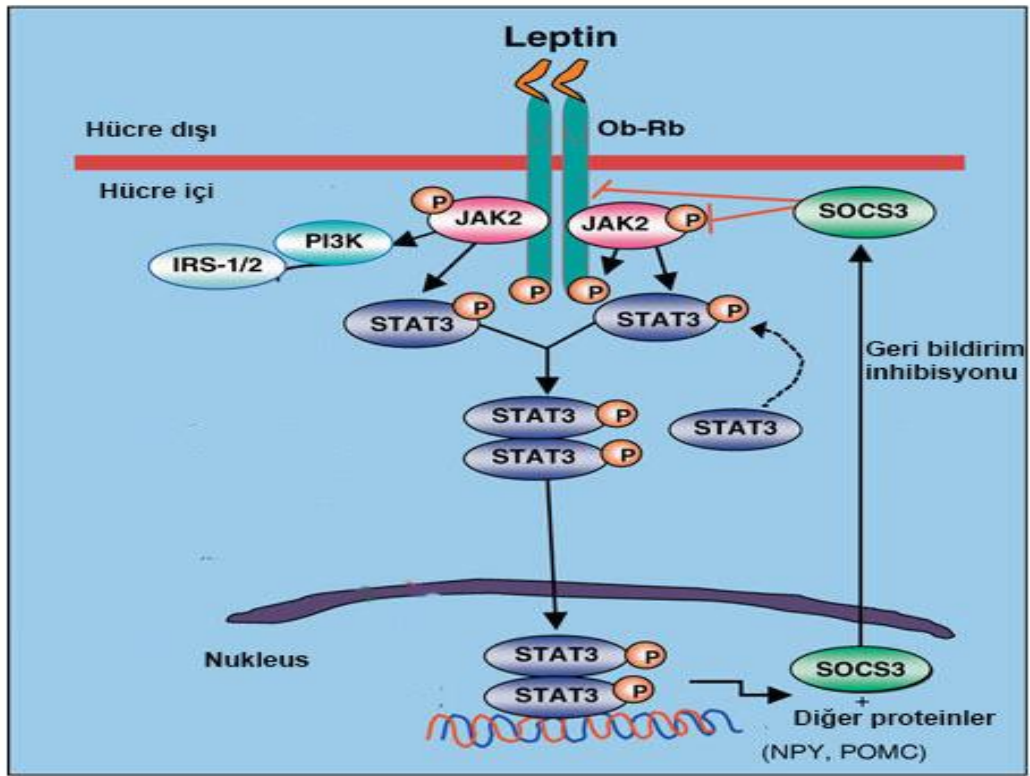
Obez bireylerde leptin seviyelerinde artış gözlenir (Kulkarni ve diğ., 1999). Leptin, *obese (Ob)* geninin bir ürünü olan 16 kDa ağırlığında bir hormondur, birincil olarak adipoz dokudan salınır ve vücut ağırlığının düzenlenmesinde rol alır. Leptin reseptörü (LEPR), sınıf I sitokin reseptör ailesine aittir ve beş izoformu bulunur. Dördünün ilk 862 amino asit dizisi aynıdır, karboksi terminal bölgelerinin uzunluğuna ve dizisine göre farklılık gösterirler. Beşinci izoform ise çözünebilen ya da salgılanan izoformdur, leptine bağlanıp kan dolaşımında dolaşır ve transmembran bölge taşımaz. İnsanlarda sıçanlardan farklı olarak bu çözünebilen izoformun transkripti bulunmaz. LEPR çözünebilen izoform, transmembran izoformun proteolitik kesilmesi sonucunda oluşur. Uzun LEPR izoformu (LEPRb) bütün leptin sinyal yollarını aktive eden formdur (Chua ve diğ., 1996; 1997). Kısa izoformun (LEPRa) fonksiyonu ise leptine bağlanıp kan-beyin bariyerinde taşınmasını sağlamaktır (Li ve diğ., 2013). Her beş izoform N-terminal ekstrasellüler bölge içerir ve bu bölge ligandın bağlanması için gereklidir.

Leptin, beta hücrelerinde insülin salınımını, glukoz taşınmasını, ATP seviyelerini baskılar ve ATP bağımlı potasyum kanallarını aktive ederek hiperpolarizasyona sebep olur (Kieffer ve diğ., 1997; Seufert ve diğ., 1999; Lam ve diğ., 2004). İnsülin, adipoz dokunun artmasını sağlayıp leptin, sentez ve salınımını artırırken, leptin insülin salınımını inhibe eder (Kieffer ve Habener, 2000).

2.6.1. JAK/STAT Yolağı

Leptinin LEPRb'ye bağlanmasıyla Janus Kinaz-2 (JAK2) aktive olur ve LEPRb'yi birçok tirozin bakiyesinden fosforiller (Eyckerman ve diğ., 2000). p-LEPRb (Tyr985), SHP2'ye bağanarak ERK yolağının aktivasyonunu başlatır (Banks ve diğ., 2000). Beyine spesifik SHP2 delesyonunun leptin direnci ve obeziteye neden olduğunun tespit edilmesi leptinin fonksiyonlarını gösterebilmesi için LEPRb/SHP2/ERK yolağının gerekli olduğunu düşündürmüştür (Zhang ve diğ., 2004). p-LEPRb (Tyr985) aynı zamanda leptin sinyalinin negatif yönde düzenleyen SOCS3'e de bağlanır (Bjorbak ve diğ., 2000). p-LEPRb (Tyr1077) Sinyal Kuvvetlendirici ve Aktivatör Transkripsiyon (STAT) 5'e bağlanır (Gong ve diğ., 2007). p-LEPRb (Tyr1138) JAK2'nin STAT3'ü fosforilleyerek aktivasyonunu sağlar (Banks ve diğ., 2000). JAK2/STAT3 yolağı leptin etkisinin en iyi

bilinen yolağıdır. Farelerde beyine spesifik STAT3 delesyonu leptin direnci ve obezite ile sonuçlanır (Gao ve diğ., 2004). Bu bulgu, leptinin enerji dengesi ve vücut ağırlığını korumasında JAK2/STAT3 yolağının etkin olduğunu göstermektedir. STAT ailesi üyelerinin fosforillenmesiyle bu proteinler nukleusa geçerek gen transkripsiyonunu düzenler (Seufert, 2004). Ayrıca, leptin hipotalamusta yer alan arkuat nukleustaki nöronların membranında yerleşen reseptörüne bağlandığında benzer bir şekilde JAK/STAT yolağı aracılığıyla, hem yağ asidi oksidasyonunu uyarma yoluyla enerji kullanımını artırarak hem de iştahı kapatarak vücut ağırlığının azalmasına neden olur (Cui ve diğ., 2017). Leptin ile uyarılan JAK/STAT aracılı sinyal yolağı **Şekil 2.8:**'de özetlenmiştir.



Şekil 2.8: Leptin sinyalinin şematik gösterimi. Leptinin reseptörü Ob-Rb'ye bağlanmasıyla JAK2 aktivasyonu ve reseptör dimerizasyonu uyarılır. Böylece Ob-Rb'nin hücre içi kısmının JAK2 tarafından fosforillenmesiyle STAT3 fosforillenip aktifleşir. Aktif STAT3 nukleusa geçer ve SOCS3'ün de dahil olduğu hedef genlerin transkripsiyonunu sağlar. SOCS3, hem PI3K hem de STAT3 yolaklarının negatif düzenleyicisidir (Sahu, 2011'den uyarlanmıştır).

2.6.2.Tub

İnsülin ve leptin sinyalinde rol oynayan yeni bir protein tanımlanmıştır (Prada ve diğ., 2013). Bu proteinin üretilmesinden sorumlu olan *Tub* geninde spontan mutasyon olan fareler “tubby” olarak adlandırılmış ve obezite ile ilişkili olarak insülin direnci taşıdıkları belirlenmiştir (Coyle ve diğ., 2008). Tubby fareler kilo artışı ile beraber kanlarında yüksek insülin seviyesi göstermelerine (hiperinsülinemik) karşın normal kan glukoz seviyelerine (normoglisemik) sahiptirler (Coleman ve Eicher, 1990; Wang ve diğ., 2006).

Tub proteini birincil olarak merkezi sinir sisteminde (van Vliet-Ostapchouk ve diğ., 2008) üretilmektedir. Pankreatik β -hücreleri ile nöronal hücreler birçok benzer biyolojik özelliğe sahiptir. Örneğin; nörotrofik bir faktör olan NGF ve reseptör sistemleri bu hücrelerde de tanımlanmıştır ve bu sistemin beta hücreleri için en az insülin kadar önemli olduğu önceki çalışmalarımızda gösterilmiştir (Gezginci-Oktayoglu ve Bolkent, 2011; Gezginci-Oktayoglu ve diğ., 2012). Ayrıca leptine duyarlı dokular arasında yer alan beyaz yağ dokusunda da yüksek oranda Tub proteini bulunduğu gösterilmiştir (Prada ve diğ., 2013).

Tub proteinin fonksiyonları sadece birkaç çalışmada araştırılmıştır: Boggon ve arkadaşları (1999) korunmuş Tub proteinin karboksi uç bölgesinin DNA’ya bağlanan yapıda olduğunu ve amino terminal kısmının transkripsiyonun düzenlenmesini sağlayabileceğini öne sürmüştür. Ayrıca, aynı ekip, primer nöronlarda 5-HT_{2c} reseptörlerinin serotonin ile aktivasyonunda Tub proteinin plazma zarından nükleusa göç ettiğini göstererek hipotezlerini kanıtlamışlardır. Tub, fosfotidilinositol 4,5-bifosfat üzerinden plazma membranına bağlıdır. Sinyaller G-protein bağlı reseptörler tarafından $G\alpha_q$ ’yu fosforiller ve fosfolipaz C- β aktivitesi ile Tub serbest kalıp transkripsiyon faktörü olarak görev alabileceği nükleusa göç eder (Ikeda ve diğ., 2002).

Tub’un *in vivo* ve *in vitro* şartlar altında insülin reseptör tirozin kinaz (IRTK) ve leptin reseptör (LEPRb) ile ilişkili JAK2 tarafından fosforlanarak aktive olduğu gösterilmiştir (Ikeda ve diğ., 2002; Prada ve diğ., 2013). Leptin ya da insülin enjeksiyonu sonucu nükleusa göç eden Tub, insülin ve leptinin enerji dengesi ve glukoz metabolizmasının kontrolünde anahtar role sahiptir (Prada ve diğ., 2013), Kapeller ve arkadaşları (1999)

Tub genini hamster ovaryum hücrelerine transfekte ederek stabil olarak insülin reseptörü ekspresyonunu sağlamayı başarmıştır.

2.6.3.Fosfoinositid 3-Kinaz (PI3K)-AKT Sinyal Yolağı

Leptinin etkilediği bir diğer yolak fosfoinositid 3-kinaz (PI3K) yolağıdır ki bu yolak insülin tarafından da aktive edilir. Ning ve arkadaşları (2006) bu etkinin protein ve lipid fosfataz PTEN (tensin homolojisine sahip fosfataz)'in inhibisyonunu kapsadığını göstermiştir. PTEN, fosfatidilinositol (3,4,5) trifosfat (PtdIns(3,4,5P3))'ın defosforilasyonunu sağlayarak bu molekülün seviyelerinin azalmasına neden olur. Leptin, PtdIns(3,4,5P3)'ı artırarak ATP'ye bağımlı potasyum kanallarının aktivasyonunda artışa, beta hücrelerinin plazma membranında hiperpolarizasyona ve dolayısıyla glukozla uyarılan insülin sekresyonu (GSIS) inhibisyonuna neden olur. PTEN, PI3K/Akt sinyal yolağının negatif bir düzenleyicisidir (Wijesekara ve diğ., 2005). PTEN'in bu potansiyel rolü Wang ve arkadaşları (2010) tarafından leptin hasarlı *ob/ob* tip 2 diyabetli farelerde PTEN delesyonunun beta hücrelerinin fonksiyonunu ve kütlesini koruduğunun gösterilmesiyle desteklenmiştir. Bu bulgular, önceki hipotezlerin genişleyerek doğrulanmasını ve beta hücreleri ile adipoz doku arasında var olan iki yönlü hormonal ilişkinin açıkça ortaya konarak aşırı yağlanmanın pankreatik fonksiyon bozukluklarına neden olduğunu düşündürmüştür.

2.6.4.Wnt/ β -katenin Sinyal Yolağı

Bu yolağın birçok bileşeni pankreatik beta hücre proliferasyonunda, normal kolesterol metabolizmasında, glukoz ile uyarılan insülin sekresyonu ve glukagon benzeri peptid 1 (GLP-1) üretilmesinde rol alır. Çalışmalar Wnt sinyal yolağının bir üyesi olan *transkripsiyon faktörü 7 benzeri 2 (TCF7L2)* geninin tip 2 diyabete yatkınlık ile ilişkili olduğunu ve bu gende tespit edilen tüm mutasyonların tip 2 diyabet gelişme riski ile çok yakından ilişkili olduğunu göstermiştir. Ayrıca, Wnt-5b'nin polimorfizmlerinin de tip 2 diyabet için yüksek risk oluşturduğu bildirilmiştir (Sun ve diğ., 2009).

Wnt proteinleri hücrede bilinen üç yolağı etkinleştirirler. **i.) Wnt/ β -katenin yolağı**, kanonik Wnt yolağı olarak ta bilinir. Kısaca, Wnt uyarısı GSK-3 β , kazein kinaz-I α , APC ve Aksin'den oluşan β -katenin fosforilasyon kompleksinin dağılmasına, β -katenin'in

nukleusa göç etmesine ve TCF transkripsiyon faktörüne bağlanarak Wnt hedefli genlerin ekspresyonuna yol açmaktadır. **ii.) Planar Hücre Kutuplaşma Yolağı (PKHY)**, gelişmekte olan epitel tabakalarının embriyoda doğru eksende kutuplaşmalarını sağlar ve Rho ailesi GTPaz'lar tarafından kontrol edilir; **iii.) Wnt/kalsiyum yolağı**, hücre içinde kalsiyum iyonu artışını uyarır. Wnt proteinleri bu üç yolakta da önce Frizzled ailesinden olan hücre yüzeyi reseptörlerine bağlanır. Frizzled ailesi reseptörleri G proteinine kenetli reseptörlerdir (Can, 2014).

β -katenin'in sinyal yolaklarındaki etkisi sadece Wnt bağımlı değildir. β -katenin aynı zamanda kaderin tabanlı adhezyon sisteminin önemli bir bileşenidir. Kaderin/katenin tabanlı adhezyon sistemi birbiriyle ilişkili olan hücreler arasında büyük öneme sahiptir (Howard ve diğ., 2011). Mezenkimal kök hücrelerin plazma membranında yer alan N-kaderin β -catenin'e bağlanır (Ouyang ve diğ., 2013). Farklılaşmaya giden hücrelerin adhezyon sistemlerinde değişiklikler meydana gelir. Bunun sonucunda β -katenin serbest kalır. Serbest kalan β -katenin Wnt sinyaline bağımlı olmaksızın aynı yolakta etkisini gösterebilir (Brenz, 2005). Örneğin; N-kaderin'den ayrılan β -katenin nukleusa geçerek transkripsiyonda rol oynar (Kam ve Quaranta, 2009).

Wnt/ β -katenin sinyalinin progenitör hücrelerin proliferasyonunun devamlılığının sağlanmasında önemli olduğu bilinmektedir (Chenn ve Walsh, 2000). İlginç olarak, Wnt/ β -katenin sinyalinin kök hücrelerin nöral farklılaşmasının gerçekleşmesi için de gerekli olduğu saptanmıştır (Muroyama ve diğ., 2004). Wnt/ β -katenin sinyaline yanıt olarak gelişen bu zıt hücrel olayların açıklanabilmesi için geliştirilen bir modelde β -katenin-CBP-aracılı transkripsiyonun hücre proliferasyonu için; β -katenin/p300-aracılı transkripsiyonun ise farklılaşma programının başlaması için gerekli olduğu gösterilmiştir (Teo ve diğ., 2005).

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. HÜCRE KÜLTÜRÜ

Bu çalışmada ekibimizin önceki projeleri kapsamında erişkin erkek *Wistar albino* sıçanların pankreatik adacıklarından izole edilip karakterize edilen PAK-MKH'ler (4-10. Pasaj) kullanılmıştır. Bu hücrelerin izolasyonu Eberhardt ve arkadaşlarının (2006) yayınladıkları protokole göre kısaca şu şekilde yapılmıştır: Erişkin sıçanlar (250-300 gr) ketazol (200 mg/kg, Richterpharma) ile bayıltılarak, pankreatik kanal aracılığı ile kollagenaz (1 mg/mL, Roche) uygulanmıştır. Adalar, ficoll gradiyent santrifugasyonu ile ekzokrin kısımdan ayrıldıktan (Gezginci-Oktayoglu ve diğ. 2012; 2015) sonra tam medyum içinde bir kültür flaskına ekilerek pankreatik kök hücrelerin ayrılması ve kültür flaskına tutunarak çoğalması beklenmiştir. %70 konfluensiye ulaşmış olan kök hücreler (Pasaj 0) fosfat tamponu ile yıkandıktan sonra %0,25 tripsin-etilen diamin tetra asetik asit (Tripsin-EDTA) solusyonunun uygulanmasıyla tutunmuş oldukları flaskın yüzeyinden kaldırılmış ve pasajlar devam ettirilmiştir. PAK-MKH'lerin karakterizasyonu için i.) Mezenkimal kök hücrelerin karakterizasyonunda varlık veya yoklukları anahtar veri olarak kabul edilen 7 yüzey antijeni özgün antikorlarıyla işaretlenerek, akım sitometrik analiz ile bu antijenleri eksprese eden hücrelerin yoğunluğu belirlenmiştir. Bu belirteçler: CD29 (Integrin- β 1 zinciri Ha2/5), CD45, CD54, CD90 (Thy-1/Thy-1.1), CD106'dır. Negatif kontrol olan CD45 taşıyan hücreler <%0,5 iken, pozitif belirteçler, >%99 olan hücre popülasyonları deneye alınmıştır. ii.) Mezenkimal kök hücrelerin en sık kullanılan sitoplazmik belirteçleri olan Vimentin, CD105/Endoglin, Fibronektin ve Nestin proteinleri western emdirimi tekniğiyle gösterilmiştir. iii.) Kök hücrelerin önemli bir özelliği olan farklılaşma yeteneğinin gösterilmesi için %80 konfluensiye ulaşmış olan Pasaj 3 hücrelerinin pankreatik beta hücrelerine, adipositlere ve osteositlere farklılaşma yetenekleri uygun protokoller kullanılarak gösterilmiştir. iv.) Kök hücrelerin karakteristik özelliği olarak bilinen yüksek proliferasyon kapasiteleri 1., 4., 7., 11., 14. ve 17. günlerde WST-1 (4-3-4-Iodophenyl-2-4-nitrophenyl-2H-5-tetrazolio-1,3-benzene disulfonate) uygulamasıyla ölçülmüştür. Tüm bu testler sonucunda izole edilen PAK-MKH'lerin yüksek saflıkta, sağlıklı ve fonksiyonel olduğuna karar verilerek deneyler gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada iki farklı erişkin sıçandan izole edilen PAK-MKH'ler kullanıldı. Hücreler ısıyla inaktive edilmiş %15 fetal sıgır serumu (FBS; Lifetech), %1 antibiyotik karışımı (100 ünite/mL, penisilin G100, 100 µl/mL, streptomisin, PES;

Lifetech) ve %1 L-glutamin (200 nM, Lifetech) içeren modifiye edilmiş Eagle medyumda (MEM; Gibco)'da, 37 °C'de, %5 CO₂ ve %95 nem içeren inkübatörde kültüre edildiler (Karaoz ve diğ., 2010).

3.1.1. Hücrelere Uygulanan Maddelerin Hazırlanışı:

Glukozun Çözünmesi ve Doz Tayini

Ana stok olarak 1 M glukoz (Sigma) MEM içerisinde hazırlandıktan sonra 5, 10, 15, 20, 25 ve 30 mM konsantrasyonlarına sulandırılarak uygun çalışma dozu WST-1 hücre canlılık testi ile belirlendi.

İnsülinin Çözünmesi ve Doz Tayini

Ana stok olarak 10 µM insülin (Sigma) şekilde MEM içerisinde hazırlandıktan sonra 1, 10 ve 100 nM konsantrasyonlarına sulandırılarak uygun çalışma dozu WST-1 hücre canlılık testi ile belirlendi.

Leptinin Çözünmesi ve Doz Tayini

Ana stok olarak 1 mg leptin (L) (Sigma), 1 mL, 20 mM Tris HCl pH 8.0 (Sigma) tamponunda çözülerek hazırlandı. Ana stok, 0.5, 1, 1.5, 2 ng/mL konsantrasyonlarına sulandırılarak uygun çalışma dozu WST-1 hücre canlılık testi ile belirlendi.

Deney şartları:

Tam Medyum (FM): %10 FBS+ MEM

Tam Medyum + Leptin (FM+L): 0,5 ng/mL Leptin +%10 FBS+ MEM

Glukoz (G): 20 mM Glukoz+%10 FBS+ MEM

Glukoz + Leptin (G+L): 0,5 ng/mL Leptin+ 20 mM glukoz+ %10 FBS+ MEM

İnsülin (İ): 1 nM insulin+%10 FBS+ MEM

İnsülin + Leptin (İ+L): 0,5 ng/mL Leptin+ 1 nM insülin+ %10 FBS+ MEM

Glukoz + İnsülin (G+İ): 20 mM glukoz+ 1nM insülin+ %10 FBS+ MEM

Glukoz + İnsülin + Leptin (G+İ+L): 0,5 ng/mL Leptin+ 20 mM glukoz+ 1 nM insülin+%10 FBS+ MEM

XAV 939'in Çözünmesi ve Doz Tayini

5 mg XAV (Santa Cruz), 16 mL DMSO'da çözüldü ve 5 µM konsantrasyonda hücrelere uygulandı. XAV deney şartlarından 1 saat önce hücrelere uygulanarak ön inhibisyon sağlandı. Daha sonra deney medyumlarına tekrar XAV eklenerek 24 saat standart kültür şartlarında inkübe edildi.

DKK-1'in Çözünmesi ve Doz Tayini

DKK-1 (R&D Systems), %0,1 sığır serum albumin içeren steril PBS'te 100 µg/mL konsantrasyonda hazırlandı. DKK-1 deney şartlarından 1 saat önce hücrelere uygulanarak ön inhibisyon sağlandı. Daha sonra deney medyumlarına tekrar DKK-1 eklenerek 24 saat standart kültür şartlarında inkübe edildi.

bpv-(HOpic)'in Çözünmesi ve Doz Tayini

Bpv-(HOpic) (Santa Cruz), stok solüsyonu 1mM konsantrasyonda DMSO'da çözülerek hazırlandı. 6 kuyulu kültür kaplarına ekilmiş olan hücrelere 1, 2, 3, 4 ve 5 µM konsantrasyonlarda uygulandı. 24 saat inkübasyon süresinin sonunda hücrelerden lizat elde edildi. Elde edilen lizatlarda uygun inhibisyon dozunu belirleyebilmek için p-AKT (Ser473) seviyeleri western emdirimi tekniği ile gösterildi. Bpv-(Hopic), PTEN inhibitörü olduğundan dolayı p-AKT inhibisyonuna neden olmaktadır. PTEN'de p-AKT'yi inhibe eder. PTEN, Bpv-(HOpic) ile inhibe edildiği zaman p-AKT (Ser473) seviyelerinin artması beklenir.

S961'in Çözünmesi ve Doz Tayini

S961 (Novo Nordisk), 1µM konsantrasyonda saf suda hazırlandı. 6 kuyulu kültür kaplarına ekilmiş olan hücrelere 1, 10, 100 ve 1000 pM konsantrasyonlarda tam medyum içerisinde uygulandı. 24 saat kültüre edilen hücrelerden lizat elde edildi. S961, insülin

reseptör antagonisti olduğundan dolayı insülin direncine sebep olup insülin sinyal yolağını inhibe eder. Dolayısıyla S961'in doz tayini için p-AKT (Ser473) protein düzeylerine western emdirimi yöntemi ile bakıldı.

3.2. HÜCRE CANLILIK TESTİ (WST-1)

Bu testin prensibi suda çözünen tetrazolium tuzu (WST-1)'nin mitokondriyal dehidrogenazlar tarafından açık sarı renkli formazana dönüştürülmesidir. Oluşan formazan hücrelerden kültür medyumuna salınır ve 420-480 nm dalga boyunda maksimum absorbanı verir. Formazanın miktarı direkt olarak canlı hücre sayısı ile ilişkilidir (Wakai ve diğ., 2015).

Deney şartları PAK-MKH'lere 24 saat uygulandıktan sonra, uygulanan maddelerin hücreler üzerindeki toksik veya proliferatif etkilerinin test edilmesi amacıyla WST-1 (Roche) kullanıldı. 96 kuyucuklu kültür kaplarına 5000 adet ekilen hücrelere 10 µL WST-1 uygulandı ve 4 saat boyunca 37 °C'de, %5 CO₂ ve %95 nem içeren etüvde inkübe edildi. Bu inkübasyon periyodundan sonra mikrolaka okuyucuda (BioTek µQuant) 420-480 nm dalga boyunda oluşan formazan miktarı ölçüldü.

3.3. GEN EKSPRESYONU ANALİZLERİ

Deney şartları, PAK-MKH'lere 24 saat süreyle uygulandıktan sonra beta hücre farklılaşması gen anlatımı düzeyinde gerçek zamanlı geri çevrim polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) tekniği kullanılarak gösterildi. Bu teknik 5 basamakta gerçekleştirildi:

3.3.1. RNA İzolasyonu

PAK-MKH'ler 6 kuyulu kültür kaplarına ekildi. Hücreler kültür kaplarının yüzeyini doldurduktan sonra deney medyumları koyuldu ve 24 saat sonra medyum kaldırılıp soğuk PBS ile yıkandıktan sonra Trizol Reagent (Sigma) uygulandı ve pipetajlanarak homojenizasyon yapıldı. Hücresel içerik endorf tüplere alındı ve kloroform eklendi. 12.000 rpm'de 10 dk. +4 °C'de santrifüj yapıldı. Şeffaf kloroform fazı toplandı ve başka bir endorf tüpe aktarıldı. Üzerine izopropanol ekildikten sonra 12.000 rpm'de +4

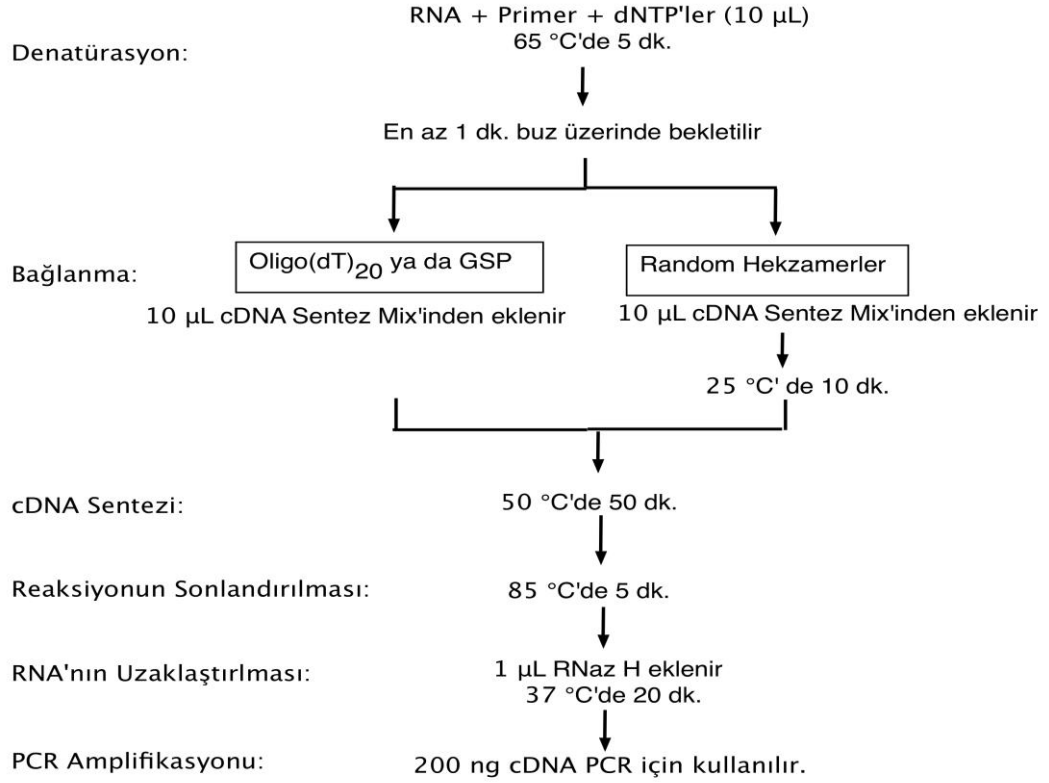
°C’de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve peletin üzerine %78 etanol eklenerek 7600 rpm’de +4 °C’de 5 dakika santrifüj edildi. Üst sıvı yavaşça döküldükten sonra tüpte kalan etanolün uçması için tüpler, 30 dakika oda ısısında bekletildi. Kuruyan tüplerin üzerine %1 dietilpirokarbonat (DEPC; Sigma) içeren su koyuldu. Elde edilen nukleik asit karışımındaki RNA’nın saflaştırılması için DNaz (Ambion) eklenerek, 37 °C’de 30 dakika inkübe edildi ve 15 mM EDTA (Sigma) 75 °C’de 5 dakika uygulanarak DNAaz’ın inhibisyonu sağlandı.

3.3.2. RNA Miktarının Belirlenmesi

İzolasyondan sonra elde edilen RNA miktarı Qubit RNA Assay Kit (Invitrogen) ile üreticisinin talimatlarına göre fluorimetrik olarak ölçüldü. Kısaca; kitte bulunan fluorometrik boya solüsyonu 1:200 dilüsyonda hazırlandı ve standartlar 1:20, örnekler ise 1:200 dilüsyonda bu boya solüsyonunun içine sulandırılıp 2 dakika oda ısısında, karanlıkta inkübe edildikten sonra RNA miktarları (ng/mL) Qubit 2.0 (Invitrogen) cihazında ölçüldü.

3.3.3. cDNA Eldesi

Saf olarak elde edilen RNA, Superscript III First Strand Synthesis Kit (Invitrogen) kullanılarak cDNA’ya çevirildi. Her örnekten 1 µg RNA cDNA’ya çevrilmek üzere işleme alındı. cDNA eldesi için gerçekleştirilen basamaklar **Şekil 3. 1:**’de özetlenmiştir.



Şekil 3.1: RNA'dan cDNA'ya çevrim prosedürünün özeti (Superscript III Strand Synthesis Kit (Invitrogen)'in kullanma kılavuzundan tercüme edilmiştir).

3.3.4. cDNA Miktarının Belirlenmesi

cDNA miktarı Qubit ssDNA Assay Kit (Invitrogen) ile üreticisinin talimatlarına göre fluorimetrik olarak ölçüldü. Kısaca; kitte bulunan fluorometrik boya solüsyonu 1:200 dilüsyonda hazırlandı ve standartlar 1:20, örnekler ise 1:200 dilüsyonda olacak şekilde bu boya solüsyonuna eklenip 2 dakika oda ısısında karanlıkta inkübe edildi. cDNA miktarları (ng/mL) Qubit 2.0 (Invitrogen) cihazında belirlendi.

3.3.5. qRT-PCR ile gen ekspresyon analizi

PAK-MKH'lerin uygulanan şartlar altında beta hücrelerine farklılaşma olasılığı, **Tablo 3.1:**'de verilmiş olan, beta hücrelerine özgün genlerin ekspresyon seviyelerinin qRT-PCR tekniği ile belirlenmesi ile tespit edildi. Bu işlem için 200 ng cDNA, 25 µL TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems) ve primer+prob karışımı (Applied Biosystems) PCR tüplerine eklenerek üreticinin talimatlarına uygun olarak qRT-PCR işlemi gerçekleştirildi. Kontrol olarak *ACTB* geni kullanıldı. Uygulanan qRT-PCR aşamaları **Tablo 3.3:**'de verilmiştir.

Tablo 3.1: Gen ekspresyonu analizleri için yapılan qRT-PCR yönteminde kullanılan primer ve prob karışımları ile elde edilen ürünlerin katalog numaraları ve oluşan ürünlerin amplikon uzunlukları.

Gen	Katalog Numarası	Amplikon Uzunluğu
<i>ins2</i>	Rn01774648_g1	148
<i>Pdx1</i>	Rn00755591_m1	53
<i>Nkx6.1</i>	Rn00581973_m1	69
<i>Nkx2.2</i>	Rn04244749_m1	78
<i>Pax6</i>	Rn00443072_m1	56
<i>Pax4</i>	Rn01646603_g1	68
<i>ACTB</i>	Ambion, 4387430	-

Tablo 3.2: qRT PCR için gerekli reaksiyon içeriğinin hazırlanışı.

PCR Reaksiyon Karışımı İçeriği	50 µL hacim için reaksiyon başına (µL)
	Tek Reaksiyon
TaqMan Gen Ekspresyon Assay (Primerler)	2.5
TaqMan Gen Ekspresyon Master Mix (MM)	25
cDNA (200 ng)	Değişir!
RNaz içermeyen su	50 µL- cDNA miktarı

Tablo 3.3: qRT-PCR basamakları.

qRT-PCR Aşamaları	Sıcaklık	Zaman
cDNA Denatürasyonu	95 °C	5 dk.
Primerlerin DNA Zincirlarına Bağlanması	65 °C	10 dk.
Uzama ve 5' ekzonukleaz aktivite	72 °C	50 dk.
Siklusun tamamlanması ve ürünlerin oluşması	85 °C	5 dk.

3.4. AKIM SİTOMETRİK ANALİZLER

3.4.1. İnsülin Üreten Hücre Oranlarının Belirlenmesi

Bu yöntem için; 6 kuyulu kültür kaplarına ekilen PAK-MKH'ler, kap yüzeyini doldurduktan sonra deney şartları, XAV veya DKK-1 24 saat süreyle uygulandı. Medyum kaldırılıp 30 gün boyunca normal kültür medyumunu olan %15 FBS'li MEM uygulandı. Burada amaç, 24 saat içinde başlayan farklılaşmanın terminal döneme erişerek olgun beta hücrelerinin gelişimini tamamlamalarını sağlamaktır. 30. günün sonunda hücreler Tripsin-EDTA (Sigma) ile kaldırıldı ve %2 paraformaldehit (Merck) ile +4°C'de 10 dakika fiks edildikten sonra %0,5 Triton X-100 (Sigma) içeren PBS'te 10 dakika boyunca permeabilize edildi. Sonrasında 1:10 oranında FBS içinde sulandırılan insülin antikoru (Santa Cruz) ile çalkalayıcı üzerinde 30 dakika boyunca oda ısısında inkübasyonu sağlandı. Primer antikor uygulanmasından sonra hücreler PBS ile yıkandı. FITC bağlı anti-tavşan sekonder antikor (Invitrogen) 1:10 oranında, karanlıkta, oda ısısında, 30 dakika boyunca uygulandı. PBS ile yıkandı ve FACS Calibur (BD) cihazında FL1 kanalında analize alındı (Hui ve diğ., 2001). Net fluoresan yoğunluk hesaplanırken örneklerin fluoresans yoğunluğundan yalnızca sekonder antikor uygulanan hücrelerin fluoresans yoğunluğu çıkarıldı.

3.4.2. Reaktif Oksijen Türleri Seviyelerinin Belirlenmesi

Hücre içine geçebilen 2', 7' –diklorofloresin diasetat (DCFDA) boyası hidroksil, peroksil ve diğer reaktif oksijen türleri (ROS)'nin üretim seviyelerinin belirlenmesinde kullanılmaktadır. DCFDA hücreye girdikten sonra hücresel esterase tarafından fluorensans olmayan bir bileşene deasetilize olur. Sonra ROS tarafından 2', 7' –diklorofloresine (DCF) okside olur. DCF yüksek oranda fluorensandır ve DCF yoğunluğu akım sitometri cihazı ile ölçülebilir.

6 kuyulu kültür kaplarına ekildikten sonra 24 saat boyunca deney medyumlarına maruz kalan hücreler 30 gün süreyle normal medyumlarında inkübe edildi. Daha sonra %0,25 tripsin-EDTA ile kaldırılıp 5×10^4 hücre olacak şekilde akım sitometri tüplerine alındı. FBS'nin ortamdan uzaklaştırılması için hücreler bir kez PBS ile yıkandı ve tüplere 100 μ L FBS içermeyen MEM ile 10 μ g/ml DCFDA eklenerek 30 dakika boyunca karanlıkta standart kültür şartlarında inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon sonrası hücreler FACS Calibur cihazında (BD), FL1 kanalında analize alındı. Net fluorensan yoğunluk hesaplanırken tam medyum uygulanmış olan hücrelerin fluorensans yoğunluğu 1 kabul edilip diğer şartlardaki ROS üretim seviyeleri, FM'ye oranla katlı değişiklik olarak hesaplandı.

3.5. İNSÜLİN SEKRESYON TESTİ

Farklılaşan beta hücrelerinin fonksiyon edinimini test etmek amacıyla bu hücrelerin yükselen glukoza cevaben insülin salabilme kapasiteleri ölçüldü. Bu amaçla madde uygulamasından 30 gün sonra hücreler PBS ile yıkandı, 5,5 mM glukoz ve %0,5 BSA içeren DMEM'de iki saat süreyle inkübe edildiler. Kültür medyumunu toplandıktan sonra hücreler PBS ile yıkandı ve 25 mM glukoz içeren DMEM'de iki saat süreyle inkübe edildiler. Toplanan medyumların insülin seviyeleri Sandviç ELISA tekniği ile kitin (Milipore) öngördüğü protokol uygulanarak belirlendi. Hücrelerin içerdiği toplam protein miktarı Bradford testi ile hesaplandı ve insülin seviyeleri protein seviyelerine oranlanarak normalizasyon yapıldı (Gezginci-Oktayoglu ve diğ., 2012).

3.6. WESTERN EMDİRİMİ YÖNTEMİ

Bu yöntem 5 basamakta gerçekleştirildi.

3.6.1. Hücre Lizatlarının Hazırlanması

3.6.1.1. Sitoplazmik Fraksiyonun Hazırlanması

Hücreler T75 flaska ekildi ve hücreler flaskın yüzeyini doldurduktan sonra deney medyumları 24 saat süre ile uygulandı. Hücreler Tripsin-EDTA uygulanarak tutundukları yüzeyden kaldırıldı. PBS (Ca ve Mg içermeyen, pH 7.4) ile yıkandıktan sonra 1500 rpm hızda 5 dakika santrifüj edildi. Pelete proteaz inhibitörü (Roche-Complete Mini) eklenmiş lizis tamponu (Invitrogen) uygulandı. Buz üzerinde tutulan tüp 10 dakikada bir kez vortekslenerek 30 dakika boyunca inkübasyon devam ettirildi. Buzda bekleterek soğutmak koşuluyla 5 saniye süreyle 5 kez ultrasonikasyon yaparak homjenizasyon işlemi tamamlandı. +4 °C’de 13.000 rpm hızda 10 dakika süreyle santrifüj edildi. Süpernatant sitoplazmik fraksiyon olarak kullanıldı. Pelet ise nuklear fraksiyonu elde edebilmek için kullanıldı.

3.6.1.2. Nuklear Fraksiyonun Hazırlanması

Bu yöntem için, buz üzerinde pelete lizis solusyonu [5 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES), 1,5 mM Magnezyum Klorür ($MgCl_2$), 0,2 mM Etilen diamin tetra asetik asit (EDTA), 0,5 mM Ditiotreitol (DTT), %26 Gliserol (v/v), 4,6 M Sodyum Klorür (NaCl) pH:7,9)] eklendi, böylece nuklear zarların parçalanarak DNA’nın solüsyona geçmesi sağlandı. Buzda bekleterek soğutmak koşuluyla 5 saniye süreyle 10 kez ultrasonikasyon yaparak homojenizasyon işlemi tamamlandı. Tüpler, 30 dakika buz üzerinde bekletilip 24.000 g’de 20 dakika süreyle 4 °C’de santrifüj edildi ve supernatant nuklear fraksiyon olarak kullanıldı (Abcam protokol kitapçığı).

3.6.1.3 Membran Fraksiyonunun Hazırlanması

Bu yöntem Mem-Per Plus Membran Protein Extraction Kit (Thermo) prosedürüne göre yapıldı. Kısaca T75 flaska ekilmiş olan hücreler kazıyıcı yardımıyla kazınıp permeabilizasyon tamponuna alındı. Daha sonra 16.000 g’de 15 dk santrifüjlenen hücrelere solubilization tamponu koyuldu ve 30 dk. boyunca çalkalayıcıda devamlı çalkalanması sağlandı. Tekrar 16.000 g’de 15 dk. +4 °C’de santrifüjlendi. Süpernatant toplanıp Bradford yöntemi ile proteinlerin miktarı hesaplandı.

3.6.2. Bradford Yöntemi ile Protein Miktar Ölçümü

Bu testin prensibi Coomassie Brilliant Blue G-250 boyasının proteinlerin arjinin gibi temel ve aromatik amino asitleri ile reaksiyona girerek renk değiştirmesidir. Bu boya asidik koşullarda kırmızı renklidir. Test edilen proteine bağlandığında ise maviye dönüşür ve oluşan renk 595 nm dalga boyunda maksimum absorbans verir.

Bradford Boyasının Hazırlanışı: 25 mg Coomassie Brilliant Blue G-250, 12,5 ml % 95 etanolde çözündürülüp, 25 mL % 85 fosforik asit (H_3PO_4) eklendikten sonra, hazırlanan boya çözeltisi fitre kağıdı ile süzülür ve oda sıcaklığında saklanır.

Standart Çözeltilerin Hazırlanışı:

1,46 mg/mL Bovine serum albumin (BSA)'den 80, 40, 20, 10 ve 8 μ g/mL konsantrasyonlarda standart çözeltiler hazırlandı. Örnekler 1:100 oranında ultra saf su ile sulandırılıp 160 μ L örnek + 40 μ L Bradford boyası olacak şekilde 96 kuyulu mikrolakalara eklenip, 5 dakika inkübe edildikten sonra mikrolaka okuyucuda (Biotek- μ quant) 595 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçüldü. Standart grafik kullanılarak protein miktarları hesaplandı

3.6.3. Protein Örneklerinin Hazırlanması ve Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)

Her bir deney şartının sitoplazmik, nuklear ve membran örneklerinden alınan 50 μ g protein öncelikle β -merkaptoetanol (Bio-Rad) içeren laemmli solüsyonu ile karıştırılıp 100 °C'de 5 dakika süreyle kuru blok ısıtıcıda (Techne, Dri-Block) kaynatılarak proteinlerin denature olması sağlandı. Örnekler **Tablo 3.4:**'de detaylı olarak verilen %7,5 ve %10'luk SDS-PAGE jellere yüklendi.

Tablo 3.4: SDS-PAGE jellerin hazırlanışı.

Malzemeler	% 10 Alt Jel	% 7,5 Alt Jel	%3 Üst Jel
% 30, 1:27 Bis-Akrilamid (Bio-Rad)	3.33 mL	2.5 mL	550 µL
pH 8.8 Tris HCl (Bio-Rad)	2.5 mL	2.5 mL	-
pH 6.8 Tris-HCl (Bio-Rad)	-	-	980 µL
%10 SDS	100 µL	100 µL	50 µL
% 10 APS (Amonyum persülfat) (Bio-Rad)	66 µL	66 µL	50 µL
TEMED (N,N,N',N' Tetra Etilen Metilendiamin) (Bio-Rad)	5 µL	5 µL	7 µL

Jeller MiniProteon Tetra (Bio-Rad) dikey elektroforez sistemine yerleştirilip, 70 voltta 30 dakika, 100 voltta 45 dakika ve 120 voltta bitene kadar elektriksel alana maruz bırakıldı. Protein bantlarının moleküler ağırlıklarına (8-200 kDa) göre yerlerinin tespit edilebilmesi için geniş aralıklı protein standardı (Santa Cruz) kullanıldı.

3.6.4. Western Emdirimi

SDS-PAGE ile jelde yürütülerek birbirlerinden ayrılan protein bantları, ıslak aktarım ile jelden nitroselüloz membrana (Santa Cruz), 80 mA, 'da 1 gece, +4 °C'de aktarıldı.

3.6.5. Özgün Protein Bantlarının İşaretlemesi ve Görüntülemesi

Proteinlerin aktarıldığı membran, özgün olmayan bağlanmaları engellemek amacıyla %5 oranında yağsız süt tozu (Santa Cruz) içeren TBS-T tamponunda hazırlanan bloklama solüsyonu ile 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. Membranlar, bloklama işlemi sonrası **Tablo 3.5:**'de belirtilen ve %2,5 oranında yağsız süt tozu içeren TBS-T tamponunda hazırlanan antikorlar ile bir gece, +4 °C'de inkübe edildiler. Bu işlem sonrasında membranlar TBS-T ile yıkandı ve **Tablo 3.5:**'de belirtilen sekonder antikorlar 1 saat süreyle oda sıcaklığında uygulandı. Özgün protein bantları, Luminol (Santa Cruz) kullanılarak kemilüminesans olarak görünür kılındı. Bantlar, Kodak GL1500 jel görüntüleme sistemi ile görüntülendi ve Kodak Molecular Imaging Systems yazılımı ile densitometrik analizleri yapıldı. Protein örneklerine ait bant yoğunlukları, sitoplazmik fraksiyon için β -aktin, nüklear fraksiyon için TFIIB, membran fraksiyonu için pankaderin proteininin yoğunluğuna normalize edilerek deney şartları arasında protein miktarlarındaki değişimler belirlendi.

Tablo 3.5: Western Blotlama ve eş-immünpresipitasyon yöntemleri için kullanılan antikorlar ve sulandırma oranları.

Antikor	Konak	Dilüsyon	Marka
PTEN	Tavşan	1:200	Santa Cruz
β -catenin	Tavşan	1:500	Santa Cruz
β -actin	Fare	1:500	Santa Cruz
SOCS 3	Tavşan	1:1000	CST
p-IRS1 (Ser307)	Tavşan	1:1000	CST
Tub	Keçi	1:500	Santa Cruz
p-AKT (Ser473)	Tavşan	1:1000	CST
p-GSK3- β (Ser9)	Tavşan	1:1000	CST
p-GSK3- β (Tyr279/216)	Tavşan	1:500	Santa Cruz
N-cadherin	Tavşan	1:500	Santa Cruz
TFIIB	Tavşan	1:500	Santa Cruz
Pan-Cadherin	Keçi	1:500	Santa Cruz
IRS1	Tavşan	1:500	Santa Cruz
p-Tyr	Fare	1:500	Santa Cruz
anti-tavşan	Sığır	1:5000	Santa Cruz
anti-keçi	Sığır	1:5000	Santa Cruz
anti-fare		1:3000	CST

3.7.EŞ- İMMÜNOPRESİPİTASYON TEKNİĞİ (EŞ-İP)

Protein-protein etkileşimi araştırmaları için Eş-İP tekniği kullanıldı. Bu yöntem için 500 µg protein içeren nuklear fraksiyon örneklerine, 10 µL Tub antikoruna eklenerek 1 saat boyunca 4°C’de çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi. Daha sonra 20 µL Protein A/G plus Agaroz boncukları (Santa Cruz) eklendi ve çalkalayıcı üzerinde 4°C’de, bir gece boyunca inkübasyona bırakıldı. Antikor-boncuk kompleksi 2500 rpm hızda 5 dk. santrifüj edildi. Pelet, RIPA (Radioimmunoprecipitation Assay Buffer) tamponu ile 4 kez yıkandı ve son yıkamadan sonra supernatant atıldı ve 40 µL laemmli+β-merkaptoetanol karışımı uygulanıp 5 dakika süre ile, 100°C’de kuru blok ısıtıcıda denatürasyon işlemi uygulandıktan sonra örnekler, %10 SDS poliakrilamid jele yüklendi. Nitroselüloz membrana aktarımı yapılan protein bantları β-katenin antikoruna ile “özgün protein bantlarının işaretlenmesi ve görüntülenmesi” kısmında detaylı olarak anlatıldığı şekilde görüntülemeye alındı.

3.8.KROMOZOM İMMUNPRESİPİTASYON (CHİP)

Tub’un insülin üretiminde fonksiyonel transkripsiyon faktörleri olan *ins1*, *ins2*, *pdx1* ve *MafA* genlerinin transkripsiyonunu başlatma olasılığının gösterilebilmesi için kromozom immünopresipitasyon (ChİP) tekniği EZ-ChİP (Millipore) kitinin kullanım talimatına göre uygulandı. Kısaca, hücrelere formaldehit uygulaması ile DNA ve protein çapraz bağlantıları sabitlendi, DNA çapraz bağlarını 200-1000 baz çiftlik (bp) uzunlukta parçalara ayırmak için %40 amplifikasyonda 15 pulse ultrasonikasyon uygulaması yapılmasını takiben 50 U mikrokokal nükleaz (Thermo) uygulandı. Parçalanmış DNA’lar daha sonra RNaz A uygulamasıyla saflaştırıldı. Çapraz bağlanmış protein/DNA’nın immünpresipitasyonu Protein G agaroz boncukları ve ardından Tub veya β-catenin’e özgün primer antikorlar uygulanarak gerçekleştirildi. Protein/DNA komplekslerindeki çapraz bağlar proteinaz K uygulamasıyla açılarak DNA serbestleştirildi. Serbestleşen DNA’nın kolonlar ile saflaştırılmasından sonra SYBRgreen kullanılarak DNA fraksiyonunda qRT-PCR yöntemiyle *ins1*, *ins2*, *pdx1* ve *MafA* genlerinin promotor bölgelerinin varlığı araştırıldı.

Tablo 3.6: ChIP tekniği için kullanılan primerlerin dizileri ve ürünlerin ampikon büyüklükleri (bp)

Gen	Dizi (5'-3')		Ampikon Büyükülüğü (bp)
<i>ins2</i>	Forward	GCTCAGCCAAGGACAAGGAGG	19
	Reverse	GTTACTGAATCCCCACTAG	21
<i>MafA</i>	Forward	ACGTCCAATGAGCGCTTTCT	20
	Reverse	GCTGAAGCTGTAATTTCCAAACAC	24
<i>ins1</i>	Forward	CCAATGAGCGCTTTCTGCAGACTT	24
	Reverse	AGGAGAGTACATACGTGCTTGCTG	24
<i>Pdx1</i>	Forward	AGAGATCAGCCTGCTGAGAGAGAA	24
	Reverse	TACTGCTCCTCACTATTCATGGTGGC	26

3.9. SİRNA İLE TRANSFEKSİYON

PAK-MKH'lere Tub ve β -katenin'e özgün siRNA'lar uygulanarak bu genlerin susturulması sağlandı ve ardından hücre kültürü uygulamaları aynı düzende tekrar edildi. Transfeksiyon işlemi için hücreler antibiyotiksiz medyum içerisinde 6 kuyulu kültür kaplarına ekildi. 1,5 mL'lik ependorf içerisinde 150 μ L Opti-MEM (Lifetech) ve 50 pM siRNA koyuldu. Başka bir ependorfa ise 150 μ L Opti-MEM ve 9 μ L lipofectamin (Lifetech) koyuldu. Bu iki ependorfun içeriği karıştırılıp oda ısında 20 dk. inkübe edildikten sonra hücrelere uygulandı. Tub siRNA (Ambion-4390771), β -katenin siRNA (Ambion-AM16708), negatif kontrol siRNA 1-2 (Ambion-4390843, 4390846) ve pozitif kontrol KIF11 Stealth RNAi (Ambion-AM4639) ile GAPDH siRNA (Ambion-4390849) için ayrı tüplerde sulandırma işlemi yapıldı. Hücreler 24 saat 37°C ve %5 CO₂'li ortamda inkübe edildi. Transfeksiyonun etkinliği pozitif kontrol RNAi uygulanmış hücrelerin morfolojilerinin gözlenmesiyle takip edildi. KIF11/Eg5 gen ekspresyonu baskılanmış hücreler mitotik duraklamaya girerek yuvarlak şekil aldıklarından, bu morfoloji tranfeksiyon işleminin başarıyla gerçekleştiğinin işareti olarak kabul edildi. Transfeksiyon etkinliği Tub ve β -katenin gen ekspresyon ve protein seviyelerindeki azalmanın sırasıyla qRT-PCR ve western emdirimi teknikleriyle gösterilmesiyle kontrol edildi. Transfeksiyon işlemi yapıldıktan 24 saat sonra deney medyumuna insülin ve leptin uygulandı. 24 saat deney medyumunda inkübe edilen hücreler daha sonra insülin pozitif

hücrelerin akım sitometri cihazında gösterilebilmesi için 30 gün boyunca tam medyumda inkübe edildi.

3.10. İMMÜNOFLUORESANS İŞARETLEME

1×10^5 hücre 12mm boyutlardaki cam lamellerin üzerine ekildi ve deney medyumları 24 saat süreyle uygulandı. Hücreler, PBS ile yıkandıktan sonra %4 paraformaldehitte (Merck) 15 dk oda ısısında fikse edildi. PBS ile yıkandı. İkinci bir fiksasyon adımı olarak metanol (Sigma) 10 dakika boyunca -20°C 'de uygulandı. Endojen peroksidaz aktivitesinin inaktivasyonu için %0,5 Hidrojen peroksit (H_2O_2) eklenerek 20 dakika çalkalandı. Antijen iyileştirme işlemi için 4 N Hidrojen Klorür (HCL) ile 20 dk muamele edildi. Hücreler, %2 BSA ve %0,01 triton X-100 içeren PBS ile hazırlanan bloklama solüsyonunda 45 dakika inkübe edildi. Antikorlar 1:100 oranında sulandırılarak $+4^{\circ}\text{C}$ 'de bir gece boyunca inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün hücreler, PBS ile yıkandı ve sekonder antikorlar uygulandı. β -katenin için cy3-anti-tavşan IgG (Chemicon) (1:300), Tub için FITC-anti-keçi IgG (Santa Cruz) (1:100) 45 dakika süreyle oda ısısında uygulandı. Hücreler PBS ile yıkandıktan sonra floresans ışımalarına uygun kapatma solüsyonu (Dako) ile kapatılıp x20 objektif ve x10 oküler taşıyan floresans ataçmanlı mikroskopta (Nikon-Ti-S) görüntülemeye alındı.

3.11. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

Elde edilen sonuçlar $\text{mean} \pm \text{SEM}$ olarak hesaplandı. Graph-Pad Prism 5 programı kullanılarak One-way ANOVA testini takiben çoklu karşılaştırmalar için Tukey post hoc testi uygulandı. Sadece “Hücre Canlılık Testi Bulgularında” Two-way ANOVA testini takiben çoklu karşılaştırmalar için Bonferroni post hoc testi uygulandı. $p < 0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. HÜCRE CANLILIK TESTİ BULGULARI

In vitro ortamda insülin direncini taklit edebilmek amacıyla PAK-MKH'lere glukoz, insülin ve leptin uygulanması planlandı. Hücreler için toksik olmayan ve hücre canlılığının desteklendiği dozların WST-1 canlılık testi ile belirlenerek deneyde kullanılması amaçlandı. Kök hücrelerin asimetrik bölünme yoluyla kendilerini yenilerken aynı zamanda farklılaştıkları göz önünde bulundurularak artmış canlı hücre sayısının farklılaşmanın bir işareti olabileceği düşünüldüğünden en yüksek oranda canlı hücre belirlenen dozlar deney için uygun görüldü. Bazal seviyelerden ileri hiperglisemik seviyelere kadar (5, 10, 15, 20, 25 ve 30 mM) glukoz 24 ve 48 saat süre ile PAK-MKH'lere uygulandı. Glukoz konsantrasyonları arasında 24 ve 48. saatte dozlar kontrol şartı olan FM'ye oranla hücre canlılığında anlamlı bir artış gözlemlendi ($p < 0,001$). Genel olarak 24 saat glukoz uygulanan hücrelerde canlılığın daha yüksek olduğu belirlendi. 24. saat glukoz uygulanan hücrelerin canlılıkları sırasıyla; FM: $1,00 \pm 0,00$, 5 mM: $3,02 \pm 0,02$, 10 mM: $2,87 \pm 0,19$, 15 mM: $2,41 \pm 0,24$, 20 mM: $3,17 \pm 0,09$, 25 mM: $2,07 \pm 0,10$, 30 mM: $1,95 \pm 0,08$ iken, 48. saat glukoz uygulanan hücrelerin canlılıkları sırasıyla; FM: $1,00 \pm 0,00$, 5 mM: $2,34 \pm 0,18$, 10 mM: $2,13 \pm 0,18$, 15 mM: $2,41 \pm 0,24$, 20 mM: $3,49 \pm 0,06$, 25 mM: $2,52 \pm 0,24$, 30 mM: $1,77 \pm 0,03$ olarak hesaplandı. 24 saat süreyle uygulanan glukoz konsantrasyonları arasında canlı hücre oranının en yüksek olduğu 20 mM glukoz deneyde kullanılmak için uygun görüldü (**Şekil 4.1:(A)**).

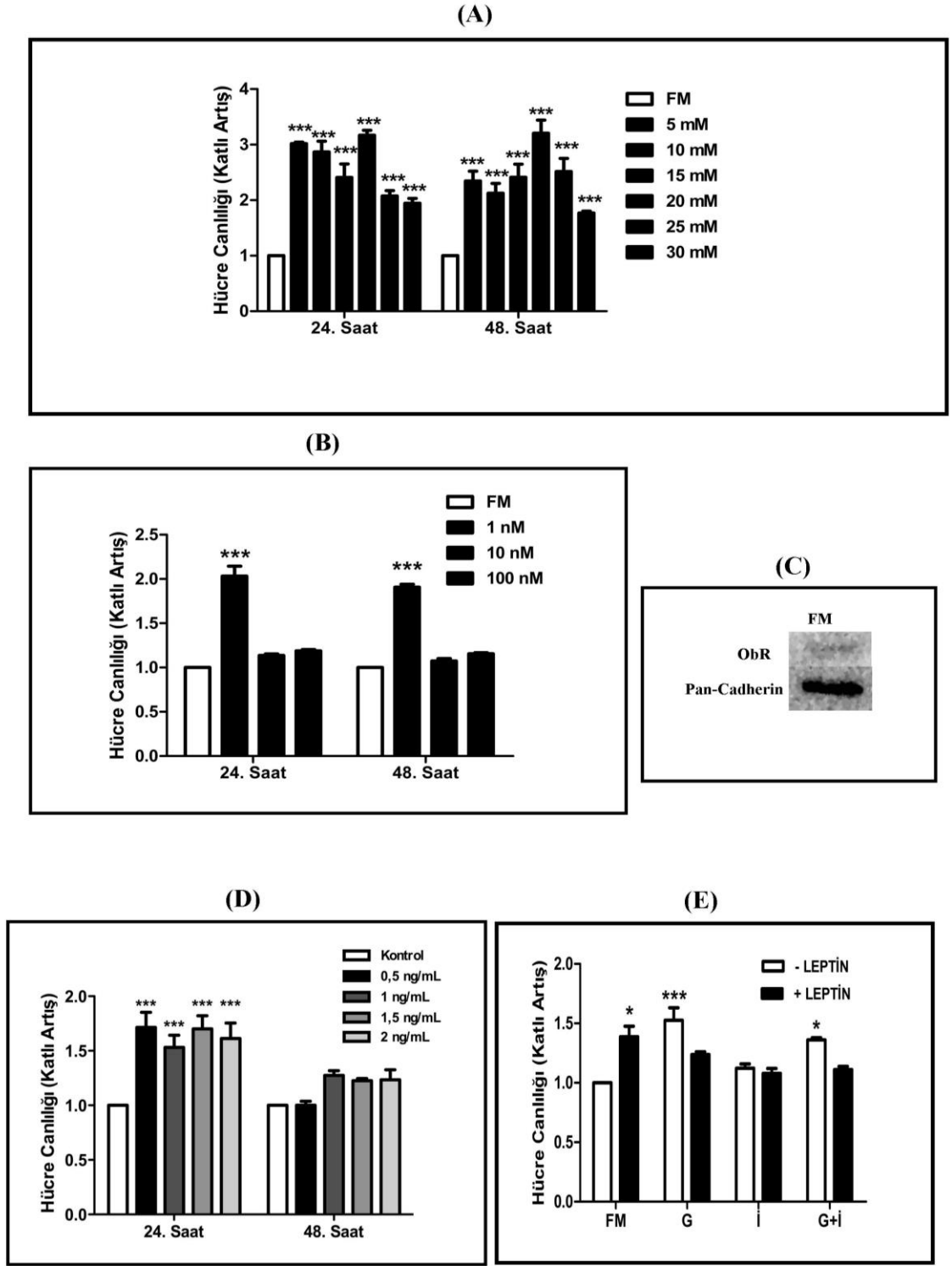
1, 10 ve 100 nM insülinin 24 ve 48 saat süreyle PAK-MKH'lere uygulanmasını takiben yapılan WST-1 testi sonuçlarına göre uygulanan dozlardan 1 nM'da hem 24 saatte hem de 48. saatte anlamlı bir artış gözlemlense de ($p < 0,001$), 24 saatlik uygulamada canlı hücre oranı daha yüksekti. Bundan dolayı, PAK-MKH'lere 24 saat süreyle 1 nM insülin uygulanması deney için uygun görüldü. 24 saat insülin uygulanan hücrelerin canlılık oranları sırasıyla; FM: $1,00 \pm 0,00$, 1 nM: $2,03 \pm 0,11$, 10 nM: $1,14 \pm 0,02$, 100 nM: $1,19 \pm 0,02$. 48. saat insülin uygulanan hücrelerin canlılık oranları sırasıyla; FM: $1,00 \pm 0,00$, 1 nM: $1,91 \pm 0,04$, 10 nM: $1,07 \pm 0,03$, 100 nM: $1,16 \pm 0,01$. (**Şekil 4.1: (B)**)

PAK-MKH'lerden elde edilen membran fraksiyonlarında leptin reseptörü ObR varlığı ve seviyesi gösterildi (**Şekil 4.1: (C)**). Bu hücrelerin çok düşük seviyelerde ObR taşıdığı tespit edilerek yüksek leptin varlığında hızlıca leptin sinyalinin kesilebileceği, yani leptin

direnci gelişebileceği öngörüldü. Bu noktadan yola çıkarak düşük konsantrasyonlarda leptinin hücrelere denenmesine karar verildi.

0,5, 1, 1,5, 2 ng/mL leptinin PAK-MKH'lere 24 ve 48 saat süreyle uygulanması sonucunda hücre canlılığının tüm dozlarda, kontrol şartına oranla 24. saatte belirgin olarak arttığı gözlemlendi ($p<0,001$). 24. saatte uygulanan dozlar arasında anlamlı bir fark olmadığından en düşük doz olan 0,5 ng/mL uygulama dozu olarak seçildi. 24 saat leptin uygulanan hücrelerin canlılık oranları sırasıyla; FM: $1,00\pm 0,00$, 0,5 ng/mL: $1,72\pm 0,14$, 1 ng/mL: $1,53\pm 0,11$, 1,5 ng/mL: $1,70\pm 0,12$, 2 ng/mL: $1,61\pm 0,14$. 48 saat leptin uygulanan hücrelerin canlılık oranları sırasıyla; FM: $1,00\pm 0,00$, 0,5 ng/mL: $1,00\pm 0,04$, 1 ng/mL: $1,32\pm 0,03$, 1,5 ng/mL: $1,27\pm 0,04$, 2 ng/mL: $1,23\pm 0,02$ olarak hesaplandı. (Şekil 4.1: (D))

Tüm deney şartları arasındaki hücre canlılığı seviyelerinde 24. saatte FM'ye oranla FM+L ($p<0,05$), G ($p<0,001$) ve G+İ ($p<0,05$) şartlarında anlamlı bir artış belirlendi. Deney gruplarında belirlenen canlı hücre oranları sırasıyla FM: $1,00\pm 0,00$, FM+L: $1,39\pm 0,09$, G: $1,53\pm 0,11$, G+L: $1,24\pm 0,02$, İ: $1,12\pm 0,04$, İ+L: $1,1\pm 0,04$, G+İ: $1,36\pm 0,02$, G+İ+L: $1,11\pm 0,03$ olarak hesaplandı (Şekil 4.1: (E)).



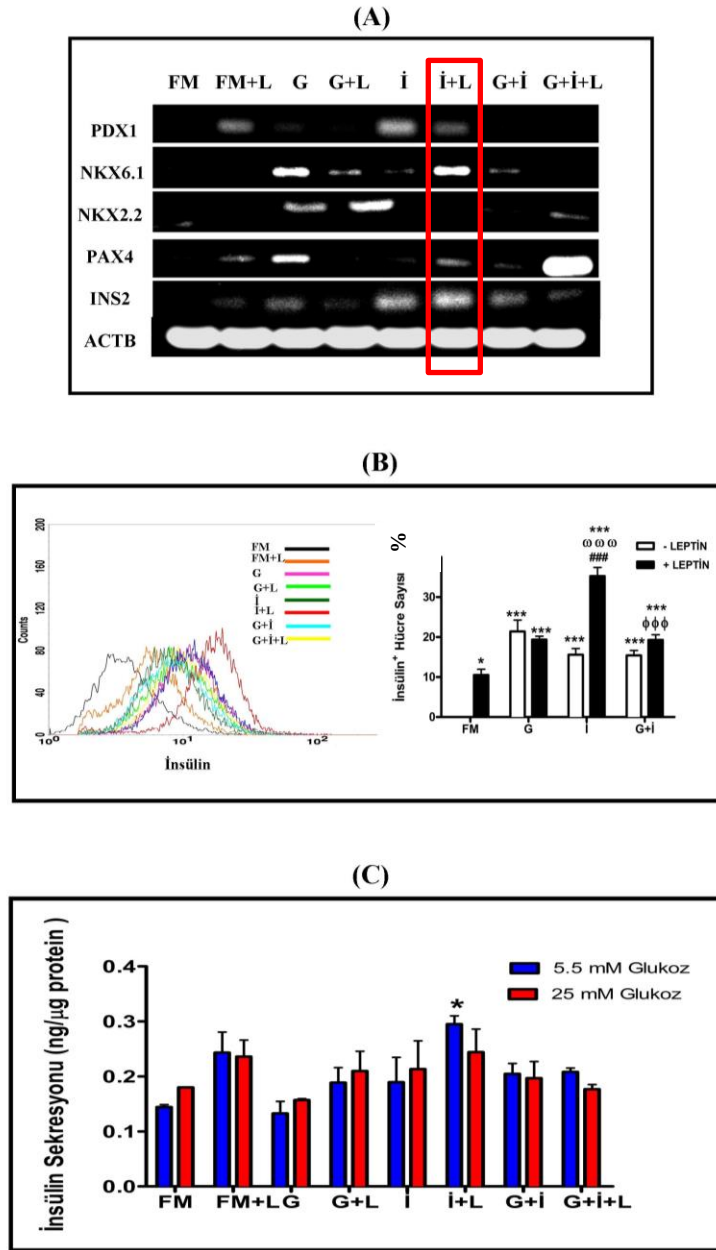
Şekil 4.1: (A) 24 ve 48. saat süreyle 5-30 mM glukoz uygulamasının PAK-MKH'lerin canlılığı üzerindeki etkileri, (B) 1-100 nM insülin uygulamasının PAK-MKH'lerin canlılığı üzerindeki etkileri, (C) PAK-MKH membran fraksiyonunda ObR bandı, (D) 24 ve 48. saatteki 0,5- 2 ng/mL leptin uygulamasının PAK-MKH'lerin canlılığı üzerine etkileri, (E) Seçilen uygulama dozları ile oluşturulan tüm deney şartlarının PAK-MKH'lerin canlılığı üzerine etkileri verilmiştir. * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ FM'ye göre.

4.2. BETA HÜCRE FARKLILAŞMASI İLE İLGİLİ BULGULAR

Tam medyum (FM), leptin (0,5 ng/mL; FM+L), glukoz (20 mM; G), glukoz+leptin (G+L), insülin (1nM; İ), insülin+leptin (İ+L), glukoz+insülin (G+İ) ve glukoz+insülin+leptin (G+İ+L), 24 saat süreyle PAK-MKH'lere uygulandı. Deney süresinin sonunda hücrelerden RNA izolasyonu yapılarak *ins2*, *nkx2.2*, *nkx6.1*, *pdx1*, ve *pax4* genlerinin ekspresyonu qRT-PCR yöntemi ile araştırıldı. Elde edilen sonuçlar uyaranların PAK-MKH'leri beta hücre farklılaşmasına yönlendirdiğini, ancak farklılaşmanın İ+L grubunda olgunlaşma seviyesinde iken, diğer gruplarda erken aşamada olduğunu düşündürmektedir (**Şekil 4.2: (A)**).

Farklılaşmanın erken aşamalarında insülin üretimi ile ilgili transkripsiyon faktörlerinin gen ekspresyonu tespit edilmiş olsa da olgun insülin proteininin üretilmesi uzun zaman almaktadır. Olgun beta hücrelerinin özgün belirteci olan insülin üretiminin gösterilmesi terminal farklılaşmanın tespiti için şarttır. Bu amaçla insülin⁺ hücreler madde uygulamasını takiben 30 gün sonra akım sitometri tekniği ile tespit edildi. Sonuç olarak uygulanan maddelerin, beta hücre farklılaşmasını uyardığı, ancak insülin+leptin uygulamasının belirgin olarak daha fazla oranda farklılaşmaya neden olduğu tespit edildi. Leptin uygulamasının genel olarak beta hücre farklılaşmasını artırdığı, ancak glukoz ile birlikte leptin uygulanmasının bu etkiyi engellediği belirlendi. Glukoz ile birlikte uygulanan leptine ilaveten insülin uygulanmasının glukozun bu etkisini ortadan kaldırdığı gözlemlendi. Belirlenen insülin⁺ hücre popülasyonu oranları (%) sırasıyla; FM: 0,00± 0,00, FM+L: 10,50±1,45, G: 21,43±2,83, G+L: 19,33±0,90, İ: 15,58±1,58, İ+L: 35,25±2,18, G+İ: 15,43±1,21, G+İ+L: 19,29±1,28'dir (**Şekil 4.2: (B)**).

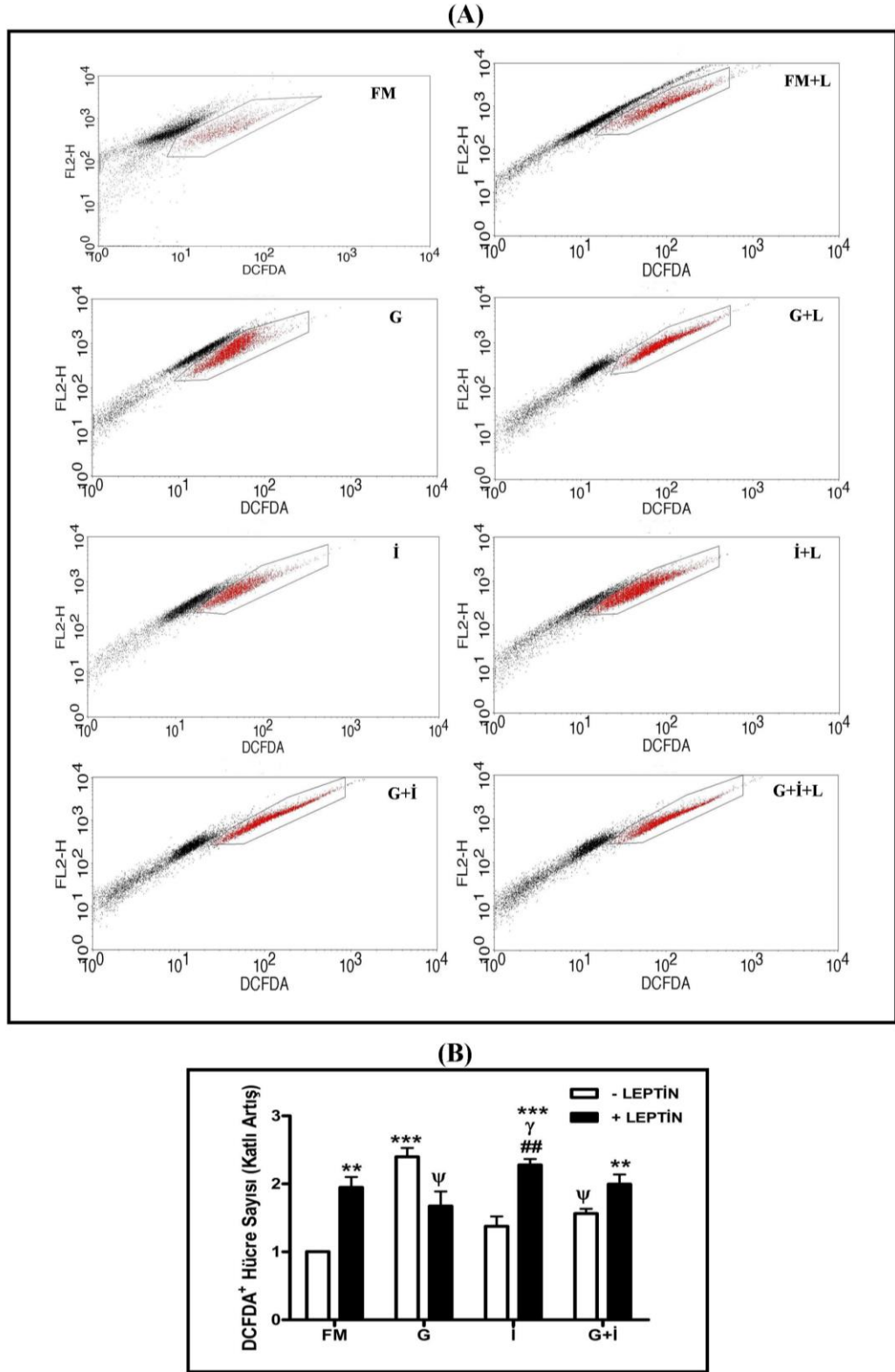
Farklılaşan beta hücrelerinin fonksiyon edinimini test etmek amacıyla yükselen glukoz seviyelerine cevaben yükselen seviyelerde insülin salabilme kapasiteleri ölçüldü. Bu amaçla madde uygulamasından 30 gün sonra hücreler serum içermeyen 5.5 mM/L glukoz ve %0,5 BSA içeren DMEM iki saat süreyle inkübe edildi. Elde edilen bulgular yeni oluşan beta hücrelerinin fonksiyonel olmadığını göstermektedir. Diğer taraftan insülin+leptin uygulanan hücrelerde bazal insülin salınımindaki farklılık, bu grupta daha fazla beta hücresi bulunduğunu destekler nitelikteydi (**Şekil 4.2: (C)**).



Şekil 4.2: Beta hücre farklılaşması. **(A)** Beta hücre farklılaşması ile ilgili genlerin ekspresyonunu gösteren qRT-PCR ile elde edilen ürünlerin bantları görüntülenmiştir. En ileri seviyede beta hücre farklılaşma belirteçlerini taşıyan grup olan I+L kırmızı dikdörtgen içine alınmıştır. **(B)** Akım sitometrik insülin⁺ hücre sayısını (%) gösteren histogram plotu ve ilgili grafik verilmiştir. **(C)** 5.5 mM ve 25 mM glukoz uygulandıktan sonra medyuma salınan insülin miktarları (ng/μg protein) verilmiştir. *p<0,05, ***p<0,001 FM'ye göre; ###p<0,001 I'ye göre, ^{ωωω}p<0,001 FM+L'e göre, ^{φφφ}p<0,001 I+L'e göre .

4.3. REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİNİN ÜRETİMİNDEKİ DEĞİŞİKLİKLER İLE İLGİLİ BULGULAR

Yükselen ROS seviyeleri kök hücre farklılaşması belirteci olarak kullanıldı. ROS seviyelerindeki değişimler akım sitometri yöntemi ile deney şartları uygulandıktan 30 gün sonra hücrelere uygulanan ROS indükatörü DCFH-DA kullanılarak ölçüldü. FM+L ($p<0,01$), G ($p<0,001$), İ+L ($p<0,001$) ve G+İ+L ($p<0,01$) gruplarında ROS seviyelerinde FM'ye oranla anlamlı bir artış belirlendi. Leptin uygulamasının genel olarak ROS üretimini artırdığı, ancak glukoz ile birlikte leptin uygulanmasının bu etkiyi engellediği belirlendi ($p<0,05$). Glukoz ile birlikte uygulanan leptine ilaveten insülin uygulamasının glukozun bu etkisini ortadan kaldırdığı gözlemlendi. Hücrelerde ölçülen ROS seviyeleri sırasıyla; FM: $1,00\pm0,00$, FM+L: $1,95\pm0,15$, G: $2,40\pm0,13$, G+L: $1,68\pm0,21$, İ: $1,38\pm0,15$, İ+L: $2,28\pm0,09$, G+İ: $1,56\pm0,07$, G+İ+L: $2,00\pm0,14$ olarak hesaplandı (**Şekil 4.3:**)



Şekil 4.3: Deney şartlarının PAK-MKH'lerde ROS üretimi üzerine etkisi, **(A)** Akım sitometrik DCF fluoresans yoğunluğunun (katlı artış) gösteren dot plot grafikler, **(B)** Analiz sonuçlarını yansıtan grafik, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ FM'ye göre, $\Psi p < 0,05$ G'ye göre, ## $p < 0,01$ i'ye göre, $\gamma p < 0,05$ G+L'ye göre

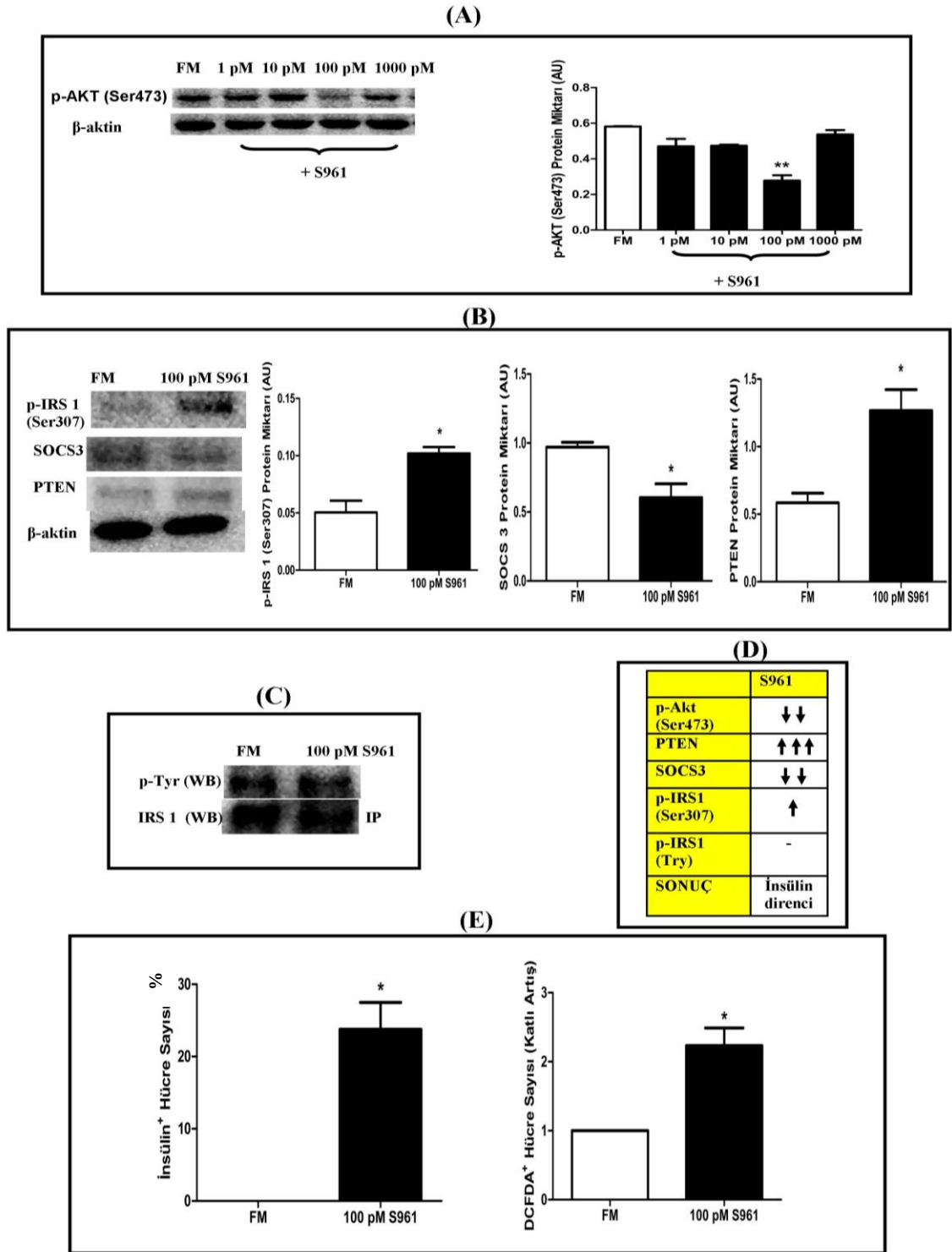
4.4. İNSÜLİN DİRENCİ KONTROLÜ S961 İLE İLGİLİ BULGULAR

Uygulanan deney şartlarından hangilerinin PAK-MKH'lerde insülin direnci gelişimine neden olduğunun gösterilebilmesi amacıyla bir insülin reseptör antagonisti olan S961 molekülü pozitif kontrol olarak hücrelere uygulandı. 24 saat süreyle, 1, 10, 100 ve 1000 pM S961 uygulanan hücrelerden elde edilen lizatlarda insülin sinyalinin ana molekülü olan p-AKT (Ser473)'ün protein seviyelerindeki değişim western emdirimi yöntemi ile belirlendi. Sonuç olarak 100 pM S961 uygulanan hücrelerde p-AKT (Ser473) seviyelerinde FM'ye oranla anlamlı bir azalma gözlemlendiğinden ($p<0,01$) deneylere bu doz ile devam edilmesi uygun görüldü. p-AKT (Ser473) seviyelerindeki değişim sırasıyla; FM: $0,58\pm0,00$, 1 pM: $0,47\pm0,04$, 10 pM: $0,47\pm0,01$, 100 pM: $0,28\pm0,03$, 1000 pM: $0,54\pm0,03$ olarak belirlendi (**Şekil 4.4: (A)**).

p-AKT (Ser473) seviyelerindeki azalmanın yanı sıra insülin direnç belirtici olarak gösterilen p-IRS1 (Ser307), SOCS3 ve PTEN seviyelerinde meydana gelen değişimler de belirlendi. Sonuç olarak p-IRS1 (Ser307) seviyelerinde (FM: $0,05\pm0,01$, S961: $0,10\pm0,01$) ve PTEN protein seviyelerinde (FM: $0,59\pm0,07$, S961: $1,27\pm0,16$) FM'ye oranla artış gözlenirken (sırasıyla; $p<0,05$ ve $p<0,05$) SOCS3 protein seviyelerinde anlamlı bir azalma görüldü ($p<0,05$) (FM: $0,97\pm0,03$, S961: $0,60\pm0,10$) (**Şekil 4.4: (B)**).

S961 uygulanan hücrelerde p-IRS1 (Tyr) seviyelerinde meydana gelen değişimin gösterilmesi için ise eş immünpresipitasyon tekniği kullanıldı. FM'ye oranla S961 uygulanan hücrelerde p-IRS1 (Tyr) seviyelerinde FM'ye oranla bir fark gözlenmedi (**Şekil 4.4: (C)**).

S961 ile PAK-MKH'lerde gelişen insülin direncinin hücre farklılaşması ve ROS üretimi açısından meydana getirdiği değişimlerin gözlenebilmesi amacıyla akım sitometri yöntemiyle insülin⁺ ve ROS üreten hücre oranları belirlendi. Elde edilen bulgulara göre hem insülin⁺ hücre sayısında (%) (FM: $0,00\pm0,00$, S961: $23,76\pm3,73$) hem de ROS üretiminde (FM: $1,00\pm0,00$, S961: $2,23\pm0,26$) FM'ye oranla anlamlı bir artış gözlemlendi ($p<0,05$) (**Şekil 4.4: (E)**).



Şekil 4.4: S961'in moleküler düzeyde insülin direnci belirteçleri üzerine olan etkisi. **(A)** 1-1000 pM S961'in p-AKT (Ser473) üzerine olan etkisi, **(B)** p-IRS1 (Ser307), SOCS3 ve PTEN protein bantları ve bu bantların yoğunluklarını gösteren grafikler, **(C)** p-IRS1 (Tyr) protein seviyesi, **(D)** İnsülin direnci belirteçlerinde meydana gelen değişimler tablo olarak verilmiştir, **(E)** S961 uygulanan PAK-MKH'lerin insülin⁺ ve DCFDA⁺ hücre oranlarını gösteren grafikler verilmiştir. *p<0,05, **p<0,01 FM'ye göre.

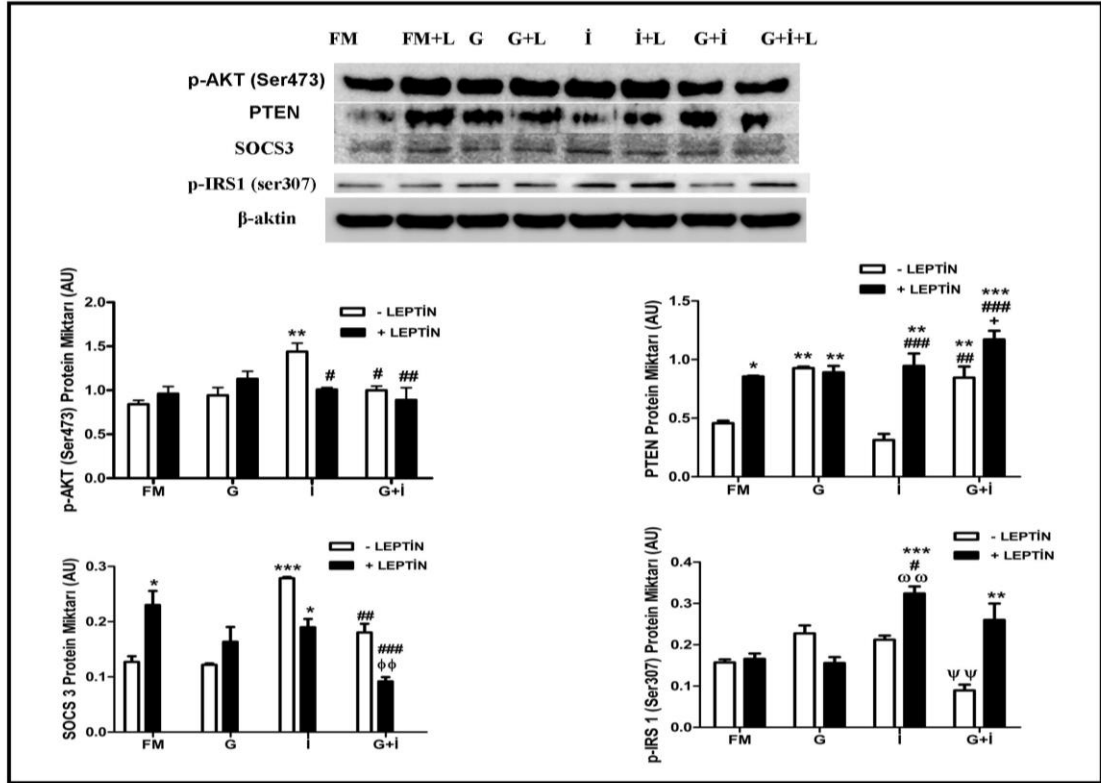
4.5. DENEY GRUPLARINDA İNSÜLİN VE LEPTİN DİRENCİ İLE İLGİLİ

BULGULAR

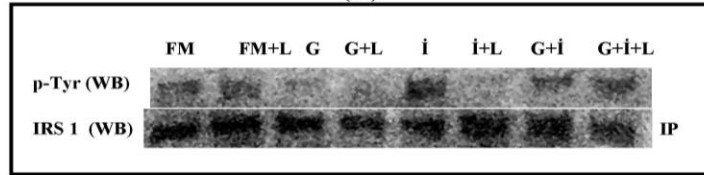
İnsülin sinyal yolağının önemli bir molekülü olan p-AKT (Ser473) protein seviyelerinde İ grubunda FM'ye oranla anlamlı bir artış gözlemlendi ($p<0,05$). İ+L ($p<0,05$), G+İ ($p<0,05$) ve G+İ+L ($p<0,01$) gruplarında ise İ grubuna oranla anlamlı bir azalma görüldü (FM: $0,84\pm0,045$ FM+L: $0,96\pm0,081$ G: $0,94\pm0,089$ G+L: $1,13\pm0,09$ İ: $1,44\pm0,10$ İ+L: $1,01\pm0,02$ G+İ: $1,00\pm0,05$ G+İ+L: $0,89\pm0,14$). PTEN miktarında İ grubu dışındaki tüm gruplarda FM'ye oranla anlamlı bir yükselme olduğu belirlendi. Aynı zamanda İ+L ($p<0,001$), G+İ ($0,01$) ve G+İ+L ($p<0,001$) gruplarında İ'ye oranla anlamlı bir artış gözlemlendi (FM: $0,46\pm0,02$, FM+L: $0,86\pm0,01$, G: $0,93\pm0,01$, G+L: $0,89\pm0,055$, İ: $0,31\pm0,05$, İ+L: $0,95\pm0,11$, G+İ: $0,85\pm0,09$, G+İ+L: $1,17\pm0,07$). SOCS3 seviyelerinde FM+L ($p<0,05$), İ ($p<0,001$) ve İ+L ($p<0,05$) gruplarında FM'ye oranla anlamlı bir artış gözlemlendi. G+İ ($p<0,01$) ve G+İ+L ($p<0,001$) gruplarında İ'ye oranla anlamlı bir azalma gözlemlendi (FM: $0,13\pm0,01$, FM+L: $0,23\pm0,03$, G: $0,12\pm0,00$, G+L: $0,16\pm0,03$, İ: $0,30\pm0,017$, İ+L: $0,22\pm0,03$, G+İ: $0,17\pm0,01$, G+İ+L: $0,09\pm0,01$). p-IRS1 (Ser307) seviyelerinde ise İ+L ($p<0,001$) ve G+İ+L ($p<0,01$) gruplarında FM'ye kıyasla anlamlı bir artış gözlemlendi. Aynı zamanda İ+L grubunda FM+L ($p<0,05$) ve İ ($p<0,01$)'ye oranla anlamlı bir artış belirlendi (FM: $0,13\pm0,02$, FM+L: $0,15\pm0,00$, G: $0,21\pm0,02$, G+L: $0,19\pm0,03$, İ: $0,21\pm0,01$, İ+L: $0,31\pm0,01$, G+İ: $0,08\pm0,01$, G+İ+L: $0,26\pm0,04$) (**Şekil 4.5: (A)**).

İnsülin sinyal yolağının aktivasyonunun bir göstergesi olan p-IRS1 (Tyr) seviyelerindeki değişimler ise eş immünpresipitasyon tekniği ile belirlendi. Elde edilen bulgulara göre İ grubunda FM'ye kıyasla p-IRS1 (Tyr) miktarında artış olduğu İ+L grubunda ise p-IRS1 (Tyr)'nin neredeyse hiç bulunmadığı gözlemlendi. Ayrıca G+İ ve G+İ+L gruplarında FM'ye kıyasla bir değişim olmadığı görüldü (**Şekil 4.5: (B)**).

(A)



(B)



(C)

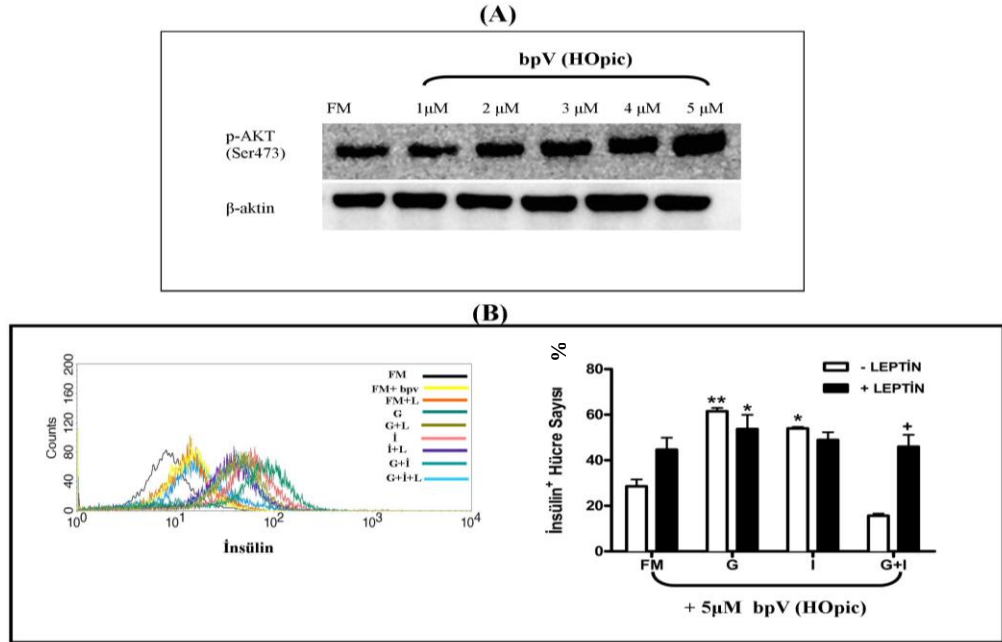
	FM+L	G	G+L	İ	İ+L	G+İ	G+İ+L
p-Akt (Ser473)	-	↑	↑↑	↑↑↑	-	↑	-
PTEN	↑↑	↑↑	↑↑	↓	↑↑	↑	↑↑↑
SOCS3	↑↑	-	↑	↑↑↑	↑	↑	↓
p-IRS1 (Ser307)	-	↑	-	↑	↑↑↑	↓	↑↑
p-IRS1 (Tyr)	↑	↓	↓↓	↑↑↑	↓↓	↑	↑↑
SONUÇ	Leptin direnci	pIRS1(Ser307) fosforilasyonu yolu ile Akt inhibisyonu	Uyarılmış leptin sinyali	Uyarılmış insülin sinyali ve leptin direnci	Leptin ve insülin direnci	Uyarılmış insülin sinyali	İnsülin direnci

Şekil 4.5: PAK-MKH'lere uygulanan deney şartlarının insülin ve leptin sinyali üzerine etkileri. **(A)** p-AKT (Ser473), PTEN, SOCS3 ve p-IRS1 (Ser307 ve Tyr) bantları ve bu bantların yoğunluklarını gösteren grafikler, **(B)** p-IRS1 (Tyr) seviyeleri, **(C)** Elde edilen bulguların değerlendirildiği tablo verilmiştir. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ FM'ye göre; $\omega\omega$ $p < 0,01$ FM+L'e göre; $\psi\psi$ $p < 0,01$ G'ye göre; ϕ $p < 0,05$, $\#\#\#$ $p < 0,001$ İ'ye göre, $\phi\phi$ $p < 0,001$ İ+L'ye göre.

4.6. PTEN'İN BETA HÜCRE FARKLILAŞMASINDAKİ ROLÜ İLE İLGİLİ BULGULAR

PTEN inhibitörü bpV (Hopic) PAK-MKH'lere 1-5 μ M dozda 25 saat süreyle uygulanarak inhibisyon etkinliği p-AKT (Ser473) seviyelerinin western emdirimi yöntemiyle gösterilmesiyle kontrol edildi ve 5 μ M dozda inhibisyonun başarılı bir şekilde gerçekleştiği teyit edildi (Şekil 4.6: (A)).

PTEN inhibitörü bpV (Hopic) (5 μ M) leptin, glukoz veya insülinin belirtilen doz ve sürelerde uygulanmasından 1 saat önce uygulanarak deney aynı düzende tekrar edildi. PTEN inhibisyonunun beta hücre farklılaşmasını belirgin olarak artırdığı belirlendi. İnsülin⁺ hücre popülasyonu oranları sırasıyla (%); FM: 28,55 $\pm$ 3,02, FM+L: 44,64 $\pm$ 5,26, G: 61,49 $\pm$ 1,47, G+L: 53,71 $\pm$ 6,24, İ: 53,95 $\pm$ 0,68, İ+L: 48,91 $\pm$ 3,37, G+İ: 15,67 $\pm$ 0,88, G+İ+L: 46,00 $\pm$ 5,17 idi. Beta hücre popülasyonu oranının en yüksek glukoz ve en düşük glukoz+insülin grubunda olduğu belirlendi. Bu bulgu, glukoz ile uyarılan beta hücre farklılaşmasında PTEN'in negatif bir düzenleyici olarak iş gördüğünü, insülinin ise bu negatif regülasyonu baskıladığını düşündürmektedir (Şekil 4.6: (B)).



Şekil 4.6. PTEN'in beta hücre farklılaşmasındaki rolü. **(A)** PTEN inhibitörü bpV (Hopic) 1-5 μ M dozlarında PAK-MKH'lere 25 saat süreyle uygulanmış ve 5 μ M dozda en fazla p-AKT (Ser473) varlığının belirlenmesi sonucunda bu dozun uygulanmasına karar verilmiştir. **(B)** 1 saatlik ön inhibisyon sürecinden sonra bpV (Hopic) ile birlikte uyarıların 24 saat süreyle uygulanmasından 30 gün sonra elde edilen akım sitometrik insülin⁺ hücre oranını (%) gösteren histogram plotu ve ilgili grafik verilmiştir. *p<0,05, **p<0,01 FM'ye göre.

4.7. GSK-3B VE B-KATENİN'İN BETA HÜCRE FARKLILAŞMASI

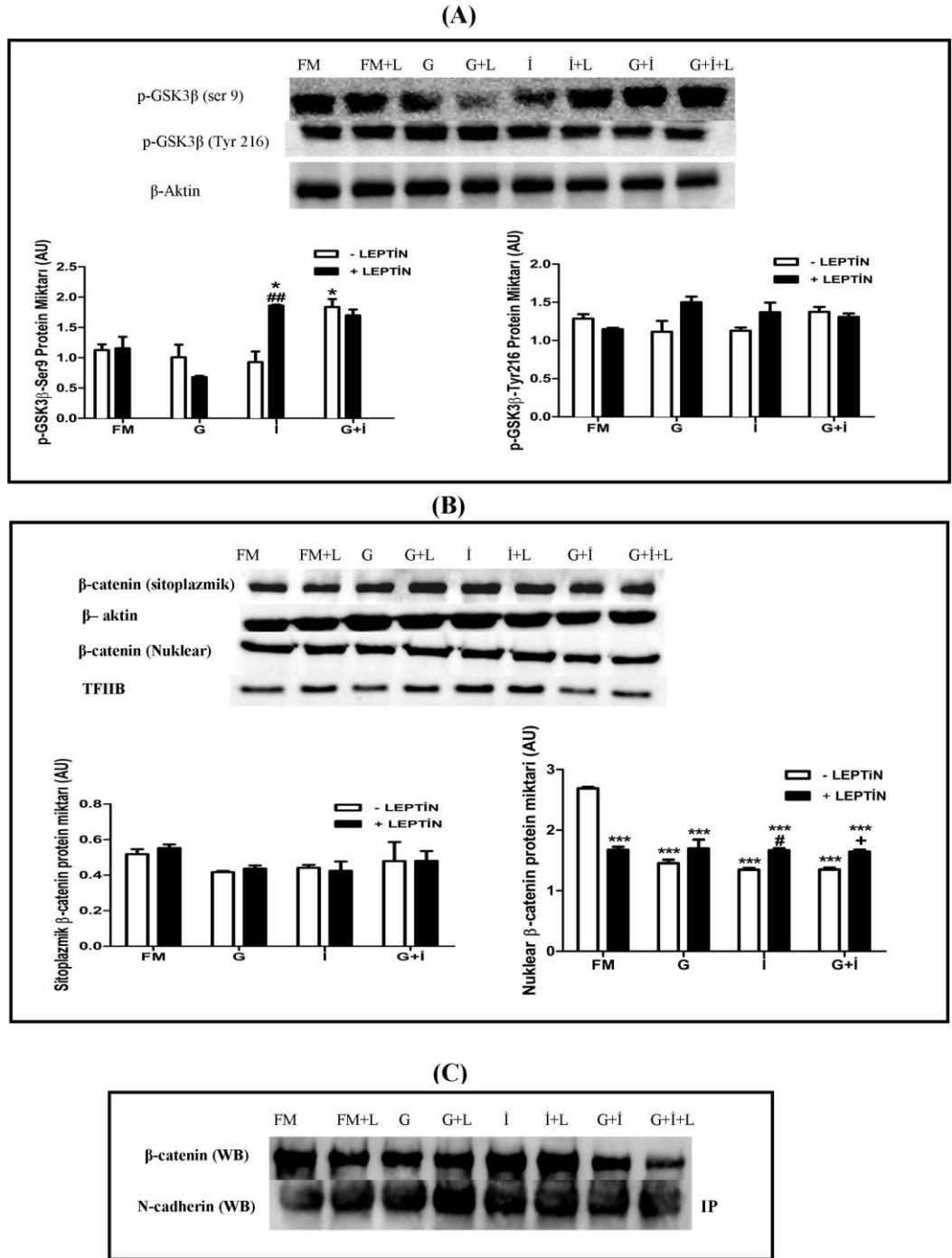
MEKANİZMASINDAKİ ROLÜ İLE İLGİLİ BULGULAR

p-GSK3- β (Ser9) seviyelerinde İ+L ($p<0,05$), G+İ ($p<0,05$) ve G+İ+L ($p>0,05$) gruplarında kontrole oranla bir artış gözlemlendi. Bu bulgu glukoz veya leptin varlığında insülinin p-GSK3- β (Ser9) seviyelerini artırarak bu proteinin inaktivasyonunu sağladığını düşündürdü. Ayrıca G+L grubundaki kayda değer azalma glukoz ve leptin uygulamasının β -katenin'in stabilizasyonunu bozarak onu yıkıma yönlendirdiğinin bir göstergesi olarak değerlendirildi. p-GSK3- β (Ser9) seviyeleri sırasıyla; FM: $1,13\pm0,01$, FM+L: $1,15\pm0,19$, G: $1,01\pm0,21$, G+L: $0,68\pm0,02$, İ: $0,93\pm0,17$, İ+L: $1,86\pm0,01$, G+İ: $1,84\pm0,13$, G+İ+L: $1,79\pm0,05$ idi (**Şekil 4.7: (A)**).

p-GSK3- β (Tyr216) seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık kaydedilmedi. G+L grubundaki yükselme glukoz ve leptin uygulamasının β -katenin'in stabilizasyonunu bozarak onu yıkıma yönlendirdiğini destekler nitelikteydi. p-GSK3- β (Tyr216) seviyeleri sırasıyla; FM: $1,29\pm0,06$, FM+L: $1,15\pm0,02$, G: $1,11\pm0,14$, G+L: $1,50\pm0,07$, İ: $1,13\pm0,04$, İ+L: $1,37\pm0,13$, G+İ: $1,38\pm0,07$, G+İ+L: $1,31\pm0,05$ idi (**Şekil 4.7: (A)**).

Bu çalışmada ayrıca β -katenin'in sitoplazmik ve nuklear fraksiyonlardaki seviyeleri ölçülmüştür. Gruplar arasında sitoplazmik β -katenin seviyelerinde anlamlı bir değişiklik gözlemlenmedi. Sitoplazmik β -katenin seviyeleri sırasıyla; FM: $0,52\pm0,03$, FM+L: $0,55\pm0,02$, G: $0,42\pm0,00$, G+L: $0,44\pm0,02$, İ: $0,44\pm0,02$, İ+L: $0,43\pm0,05$, G+İ: $0,48\pm0,11$, G+İ+L: $0,48\pm0,06$ idi. Buna karşın, nuklear β -katenin seviyelerinde tüm gruplarda FM'ye oranla belirgin bir azalma olduğu belirlendi ($p<0,001$). Diğer taraftan FM+L grubu hariç leptin uygulanan gruplarda nuklear β -katenin seviyelerinin uygulanmayan gruplardan daha yüksek olduğu dikkati çekti. Nuklear β -katenin seviyeleri sırasıyla; FM: $2,67\pm0,02$, FM+L: $1,67\pm0,05$, G: $1,46\pm0,06$, G+L: $1,70\pm0,15$, İ: $1,35\pm0,03$, İ+L: $1,67\pm0,03$, G+İ: $1,35\pm0,03$, G+İ+L: $1,64\pm0,03$ olarak hesaplandı (**Şekil 4.7: (B)**).

Ayrıca, N-kaderin İP yöntemiyle ayrıldıktan sonra β -katenin ile olan bağlantısı WB tekniğiyle gösterildi. N-kaderin/ β -katenin bağlantısının en yüksek İ ve İ+L grubunda olduğu; G+İ+L grubunda ise belirgin bir azalma olduğu gözlemlendi (**Şekil 4.7: (C)**).

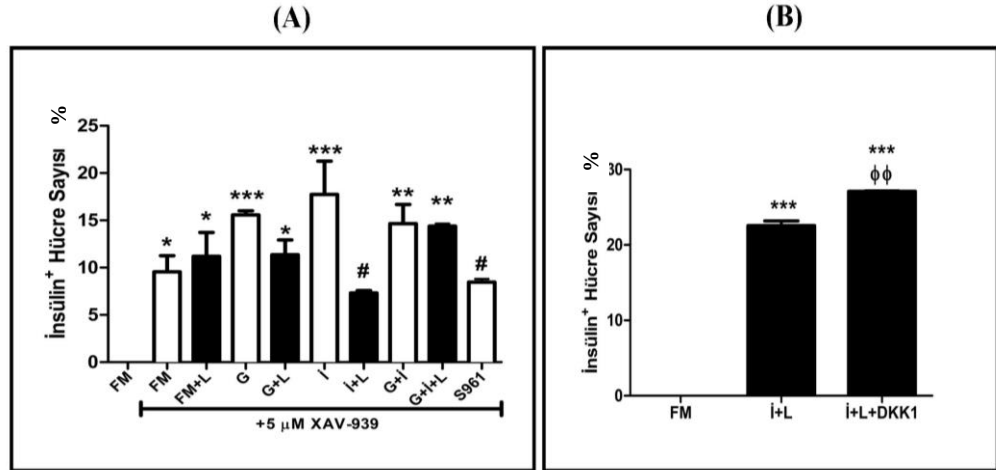


Şekil 4.7. GSK-3 β ve β -katenin'in beta hücre farklılaşması mekanizmasındaki rolü. **(A)** p-GSK3 β (Ser9), p-GSK3 β (Tyr216) ve β -aktin seviyelerini gösteren bantlar ve bu bantların optik yoğunluklarının β -aktin yoğunluğuna normalizasyon değerleri (A.U.) ile oluşturulan grafikler **(B)** Nuklear ve sitoplazmik β -katenin ile yükleme kontrolleri β -aktin ve TFIIB seviyelerini gösteren bantlar ve bu bantların optik yoğunluklarının yükleme kontrollerine normalizasyon değerleri (A.U.) verilmiştir. **(C)** Membran fraksiyonunda N-kaderin İP yöntemi ile ayrıldıktan sonra elde edilen örneklerde β -katenin WB yöntemi ile gösterilmiştir. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ FM'ye göre; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ İ'ye göre; + $p < 0,05$, G+İ'ye göre.

4.8. XAV-939 VE DKK-1 İLE İLGİLİ BULGULAR

XAV-939, β -katenin'in bir inhibitörüdür. β -katenin sinyali yokluğunda insülin⁺ hücre sayısında meydana gelen değişimlerin belirlenebilmesi için akım sitometri tekniği kullanıldı. Sonuç olarak XAV-939 uygulanan gruplarda FM ($p<0,05$), FM+L ($p<0,05$), G ($p<0,001$), G+L ($p<0,05$), İ ($p<0,001$), G+İ+L ($p<0,01$) şartlarında FM'ye oranla anlamlı bir artış gözlemlendi. İ+L ve S961 uygulanan şartlarda ise İ'ye kıyasla anlamlı bir azalma belirlendi ($p<0,05$), (FM: $0,00\pm0,00$, FM+XAV: $9,55\pm1,72$, FM+L: $11,21\pm2,51$, G: $15,56\pm0,45$, G+L: $11,37\pm1,56$, İ: $17,74\pm3,54$, İ+L: $7,32\pm0,27$, G+İ: $14,66\pm2,02$, G+İ+L: $14,40\pm0,27$, S961: $8,48\pm0,34$) (Şekil 4. 8: (A)).

DKK-1, Wnt sinyalinin bir inhibitörüdür. En yüksek beta hücre farklılaşmasının tespit edildiği insülin ve leptin uygulanan grupta DKK-1 uygulamasının insülin⁺ hücre oranlarında meydana getirdiği değişiklik akım sitometri yöntemi ile belirlendi. Elde edilen bulgulara göre; İ+L ve DKK-1+İ+L uygulanmış olan gruplarda, insülin⁺ hücre oranında FM'ye kıyasla anlamlı bir artış gözlemlendi ($p<0,001$). DKK-1+ İ+L grubunda İ+L uygulanan şarta kıyasla da anlamlı bir artış ($p<0,01$) belirlenmiş olsa da elde edilen değerlerin birbirine çok yakın olduğu dikkat çekiciydi (FM: $0,00\pm0,00$, İ+L: $22,57\pm0,63$, İ+L+DKK-1: $27,11\pm0,05$) (Şekil 4.8: (B)).



Şekil 4.8: (A) XAV-939 ve (B) DKK-1 uygulanan PAK-MKH'lerinin insülin⁺ hücre seviyeleri, * $p<0,05$, ** $p<0,01$ *** $p<0,001$ FM'ye göre; # $p<0,05$ İ'ye göre; $\phi\phi$ $p<0,01$ İ+L'e göre.

4.9. TUB VE β -KATENİN'İN BETA HÜCRE FARKLILAŞMASINDAKİ ROLÜ İLE İLGİLİ BULGULAR

Tüm gruplarda *Tub* ve β -*katenin* genlerinin ekspresyon seviyeleri qRT-PCR yöntemiyle ölçüldü. Gruplarda her iki gen için de benzer ekspresyon profilleri gözlemlendi. Bu genlerin kontrol grubunda en yüksek seviyede eksprese edildiği belirlendi. Bu gruplar arasında *Tub* geninin ekspresyonunun en yüksek olduğu grup insülin gibi görünse de bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi. *Tub* geninin ekspresyon seviyeleri sırasıyla; FM: $1,00 \pm 0,00$, FM+L: $0,01 \pm 0,01$, G: $0,02 \pm 0,01$, G+L: $0,07 \pm 0,06$, İ: $0,15 \pm 0,15$, İ+L: $0,06 \pm 0,06$, G+İ: $0,03 \pm 0,03$, G+İ+L: $0,04 \pm 0,00$ 'dir. Madde uygulanan gruplar arasında β -*katenin* geninin ekspresyonunun en yüksek olduğu gruplar FM+L, G+L, İ ve İ+L gibi görünse de bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi. β -*katenin* geninin ekspresyon seviyeleri sırasıyla; FM: $1,00 \pm 0,00$, FM+L: $0,11 \pm 0,05$, G: $0,04 \pm 0,02$, G+L: $0,19 \pm 0,04$, İ: $0,16 \pm 0,16$, İ+L: $0,13 \pm 0,12$, G+İ: $0,07 \pm 0,04$, G+İ+L: $0,10 \pm 0,07$ 'dir (**Şekil 4.9: (A)**). Bu bulgular *Tub* ve β -*katenin* genlerinin ekspresyonlarının farklılaşma sırasında baskılandığını düşündürmektedir.

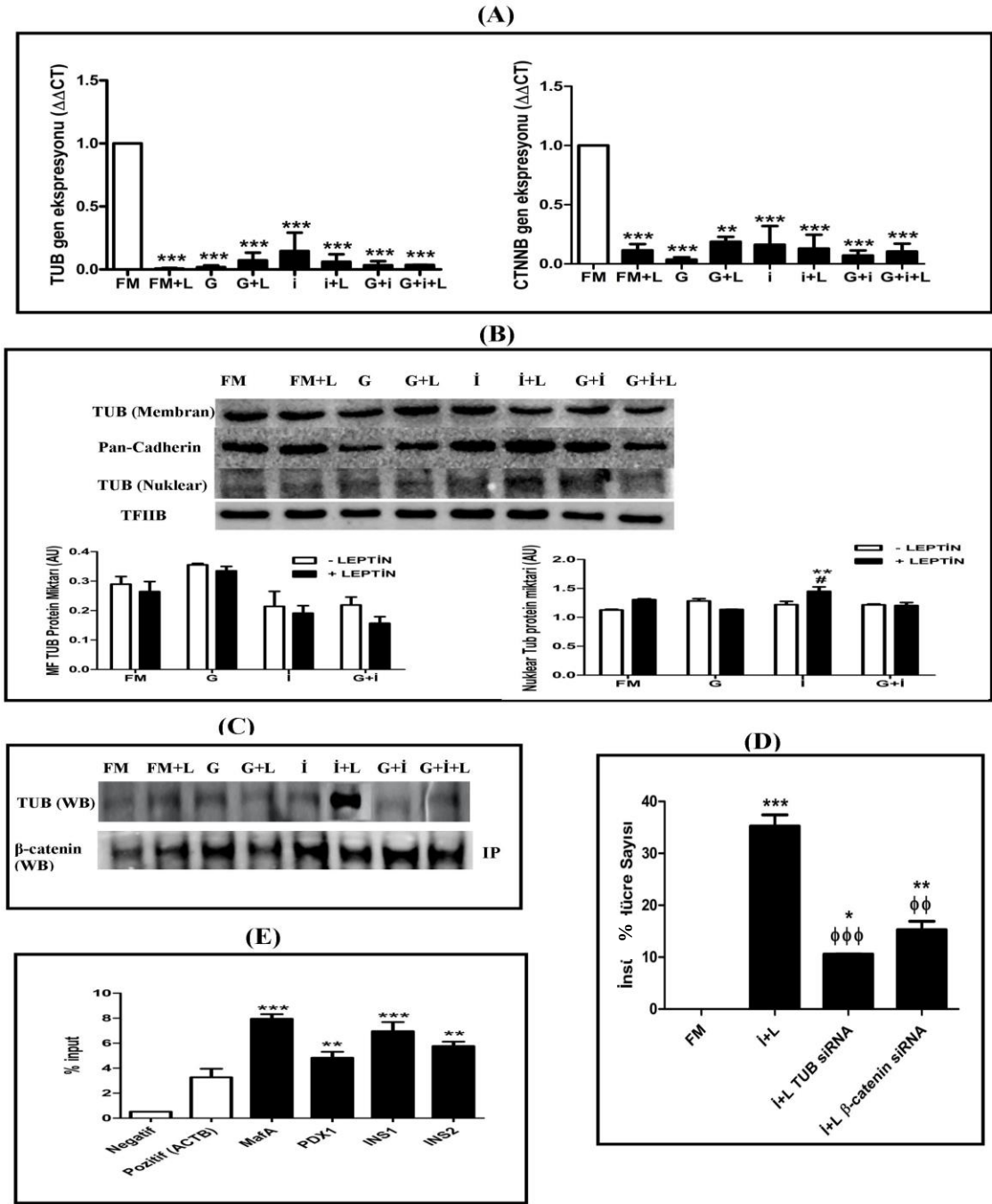
Tub proteinin varlığı PAK-MKH'lerin membran, sitoplazmik ve nuklear fraksiyonlarında western blotlama tekniği aracılığı ile araştırıldı. Membran fraksiyonunda *Tub* seviyelerinde gruplar arasında belirgin bir farklılık tespit edilemese de insülin uygulanan gruplarda azalma olduğu gözlemlendi. Membran *Tub* seviyeleri sırasıyla; FM: $0,29 \pm 0,04$, FM+L: $0,26 \pm 0,06$, G: $0,35 \pm 0,19$, G+L: $0,33 \pm 0,24$, İ: $0,21 \pm 0,09$, İ+L: $0,19 \pm 0,04$, G+İ: $0,22 \pm 0,04$, G+İ+L: $0,16 \pm 0,02$ idi. Sitoplazmik fraksiyonda *Tub* bulunmadığı tespit edildi. En yüksek *Tub* seviyelerinin nuklear fraksiyonda olduğu belirlendi. İnsülin ve leptin uygulanan gruptaki artış istatistiksel olarak anlamlıydı ($p < 0,01$). Nuklear *Tub* seviyeleri sırasıyla; FM: $1,13 \pm 0,02$, FM+L: $1,31 \pm 0,02$, G: $1,28 \pm 0,04$, G+L: $1,14 \pm 0,01$, İ: $1,22 \pm 0,06$, İ+L: $1,45 \pm 0,08$, G+İ: $1,22 \pm 0,02$, G+İ+L: $1,21 \pm 0,05$ idi (**Şekil 4.9: (B)**).

Tub ve β -*katenin*'in olası ilişkisini araştırmak amacıyla nuklear fraksiyonda β -*katenin* İP yöntemiyle ayrılarak bu fraksiyonda *Tub* WB tekniğiyle gösterildi. İnsülin ve leptin uygulanan grupta nuklear β -*katenin* fraksiyonunda yüksek seviyelerde *Tub* bulunması, bu uyarıların *Tub* ve β -*catenin*'in nuklear translokasyonuna neden olduğunu ve burada birbirlerine bağlandıklarını göstermekte idi (**Şekil 4.9: (C)**). Ayrıca, immünfluoresan

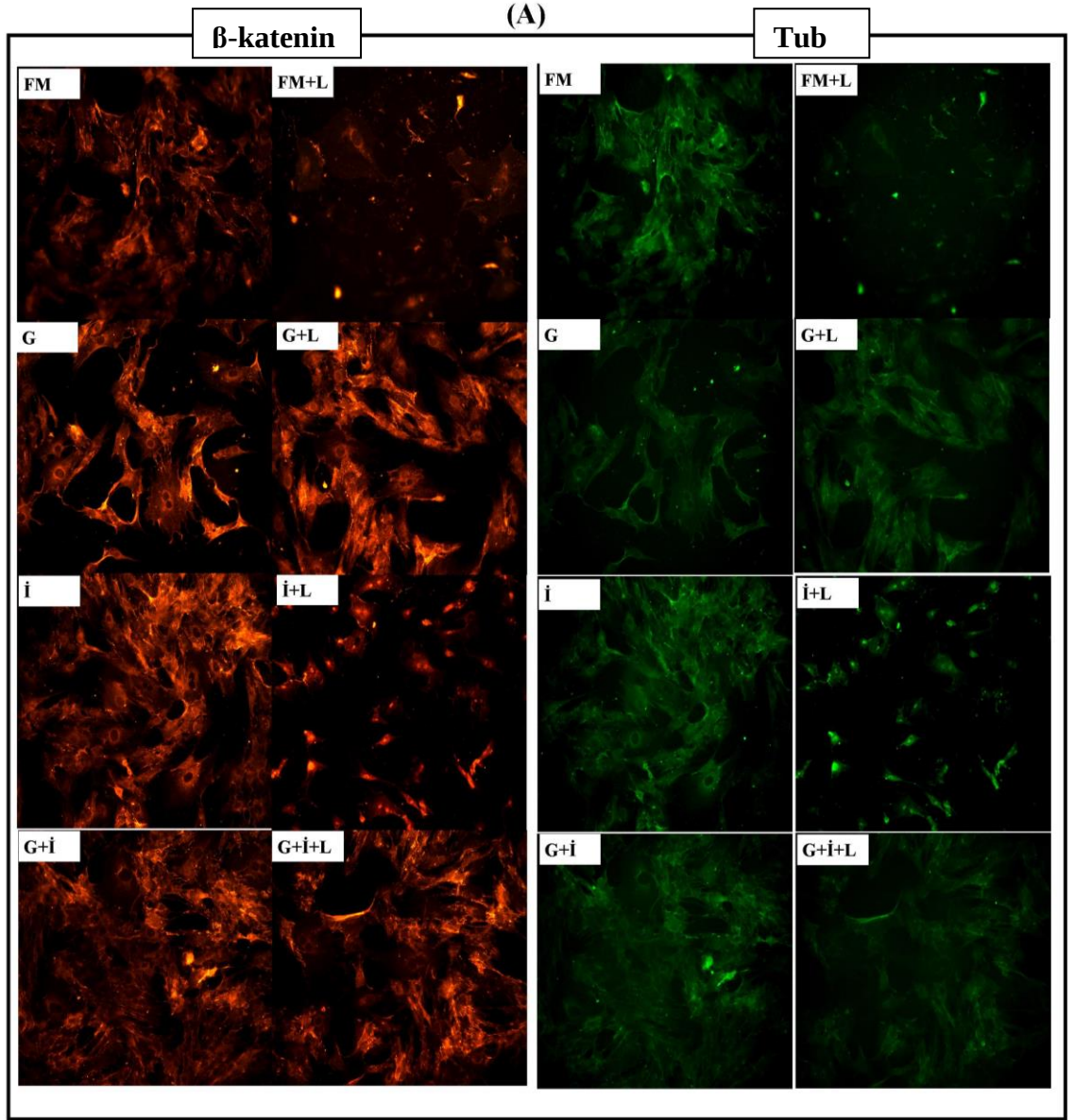
işaretleme ile β -katenin'in ve Tub'un lokalizasyonları tüm deney şartlarında gösterilerek İ+L grubunda Tub ve β -katenin'in nuklear translokasyonu desteklendi (**Şekil 4.10:**).

İnsülin ve leptin uygulanan grupta Tub ve β -katenin'in nukleustaki yoğunluğu ve etkileşiminin yanı sıra bu grupta beta hücre farklılaşmasının belirgin olarak yüksek olması, bu iki transkripsiyon faktörünün bu mekanizmada önemli rol oynayabileceğini düşündürdü. Bu hipotezin doğrulanabilmesi için PAK-MKH'lere Tub ve β -katenin siRNA'ları ayrı ayrı uygulanarak deney süresinin sonunda insülin⁺ hücrelerin yoğunluğu akım sitometri cihazı ile belirlendi. Elde edilen sonuçlara göre en yüksek oranda beta hücre farklılaşması belirlenen İ+L grubuna Tub ve β -katenin siRNA'ları uygulandığında İ+L şartına kıyasla anlamlı bir azalma olduğu tespit edildi (sırasıyla $p<0,001$ ve $p<0,01$). İnsülin⁺ hücre sayıları (%) sırasıyla FM: $0,00\pm0,00$, I+L: $35,25\pm2,18$, I+L+Tub siRNA: $10,59\pm0,03$, I+L+ β -katenin siRNA: $15,30\pm1,64$ idi (**Şekil 4.9: (D)**). Bu bulgu Tub ve β -katenin'in beta hücre farklılaşmasında önemli bir rol oynadığını açıkça göstermektedir.

İnsülin ve leptin uygulanan grupta Tub'un nukleustaki yoğunluğunun yanı sıra bu grupta beta hücre farklılaşmasının belirgin olarak yüksek olması, bu transkripsiyon faktörünün insülin üretiminde fonksiyonel olan transkripsiyon faktörlerinin üretimini artırabileceğini düşündürdü. Bu hipotezi doğrulayabilmek amacıyla kromozom immunopresipitasyon (ChIP) tekniği ile insülin ve leptin uygulanan grupta Tub'un bağlandığı DNA bölgeleri izole edildikten sonra qRT-PCR yöntemi ile insülin sentezinde rol alan transkripsiyon faktörlerine ait genlerin promotör bölgelerinin varlığı araştırıldı. Sonuç olarak, Tub'un *MafA*, *Pdx1*, *ins1* ve *ins2* genlerinin promotörlerine bağlandığı tespit edildi (Negatif Kontrol: $0,52\pm0,00$, Pozitif Kontrol (*ACTB*): $3,27\pm0,69$, *MafA*: $7,96\pm0,37$, *PDX1*: $4,84\pm0,48$, *INS1*: $6,97\pm0,73$, *INS2*: $5,77\pm1,34$) (**Şekil 4.9: (E)**).



Şekil 4.9: Tub ve β -katenin'in beta hücre farklılaşmasındaki rolü , **(A)** *Tub* ve β -katenin genlerinin ekspresyon seviyeleri, **(B)** Nuklear ve membrandaki Tub ile yükleme kontrolleri Pan-kaderin ve TFIIB seviyelerini gösteren bantlar ve bu bantların optik yoğunluklarının yükleme kontrollerine normalizasyon değerleri (A.U.) verilmiştir. **(C)** Nuklear fraksiyonda Tub İP yöntemi ile ayrıldıktan sonra elde edilen örneklerde β -katenin WB yöntemi ile gösterilmiştir. **(D)** PAK-MKH'lere Tub ve β -katenin siRNA'ları uygulandıktan sonra insülin ve leptin 24 saat süreyle uygulanmış ve 30. günde insülin⁺ hücrelerin sayısı akım sitometrik analiz ile belirlenmiştir. **(E)** İnsülin ve leptin uygulanan hücrelerde çapraz bağlantılı kromatine Tub antikoruna uygulanarak immünpresipitasyon tekniği ile ayrılmış fraksiyonda *MafA*, *pdx1*, *ins1* ve *ins2* genlerinin promotör bölgeleri qRT-PCR ile gösterilmiştir. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ FM'ye göre; # $p < 0,05$ I'ye göre; $\Phi\Phi\Phi$ $p < 0,01$ ve $\Phi\Phi\Phi\Phi$ $p < 0,001$ I+L'ye göre.



Şekil 4.10: Deney gruplarında PAK-MKH'lerde β -katenin ve Tub'un lokalizasyonu gösterilmiştir. Sol panel β -katenin, sağ panel ise Tub'un hücresel yerleşimini göstermektedir (x200).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

146 farklı ülkeden toplam 4.4 milyon katılımcıyla yapılan oldukça kapsamlı bir epidemiyolojik çalışmada 1980-2014 yılları arasında diyabetin dünyada artış oranı belirlenmiştir. Bu çalışmanın sonuçları belirtilen zaman diliminde yetişkinlerde diyabet prevalansının araştırma yapılan hemen her ülkede artmış veya en iyi ihtimalle değişmeden kalmış olduğunu göstermektedir. Nüfus artışı ve yaşlanma ile birlikte dünya genelinde diyabetli yetişkinlerin sayısı dört kata kadar artabilmektedir. Diyabetik birey oranı, düşük ve orta gelirli ülkelerde yüksek gelirli ülkelere göre daha hızlı bir şekilde artmaktadır. Bu çalışmada küresel yaş standardize diyabet prevalansının 1980-2014 yılları arasında erkeklerde %4.3'den %9'a, kadınlarda ise %5'den % 7.9'a yükseldiği belirlenmiştir. Diyabetli yetişkinlerin sayısı 1980'de 108 milyon iken, 2014'te 422 milyona yükselmiştir. Ülkemizde de diyabet hızla artmaktadır. Türkiye'nin diyabetik hasta popülasyonu bakımından 1980 yılında dünyada sıralamasında 68. iken, 2014 yılı itibarıyla 33. sıraya yükseldiği bildirilmiştir. Bu çalışmanın bulgularından yola çıkılarak yapılan tahminlere göre 2025 yılında Türkiye nüfusunun yaklaşık %20'sinin diyabet hastası olması beklenmektedir (NCD-RISC, 2016). Diyabet, dünyadaki ölüm, morbidite ve sağlık sisteminin yüksek maliyetli harcamalarının önemli bir nedenidir (Global Burden of Metabolic Risk Factors for Chronic Diseases Collaboration, 2014; Seuring ve diğ., 2015). Bu nedenle, acilen diyabeti ve komplikasyonlarını önleyebilmek için bireylerin yaşam kalitesini yükseltmek, hastalığın erken teşhisini güçlendirmek, farmakolojik veya hücresel tedavi yöntemlerini geliştirmek gerekmektedir.

Diyabet, kan glukoz seviyesinin yükselmesi ile tanımlanan bir hastalıktır ve doğrudan pankreatik beta hücre kütlesi ile ilişkilidir. Glukoz ve hormonal etkilerle düzenlenen beta hücre proliferasyon, apoptotik ölüm ve özel şartlarda progenitör hücrelerden veya diğer pankreatik hücrelerden kaynaklanan farklılaşma beta hücre kütlesini etkileyen temel faktörlerdir. Gebelik, obezite ve periferik dokuların insüline olan duyarlılığında meydana gelen değişiklikler gibi etkenlerle meydana gelen beta hücre kütlesindeki farklılıklar kan glukozunun kronik olarak yükselmesi ve ileri seviyelerde diyabete yol açabilmektedir (Kahn, 1996; Mathis ve diğ., 2001; Saltiel ve Kahn, 2001).

İnsülinin etkilerine karşı direnç, Tip 2 diyabet gelişiminde önemli bir süreçtir (Brüning ve diğ., 1997; Kahn, 1994). Pre-diyabetik durumda, pankreatik beta hücreleri yüksek kan glukoz seviyelerini indirgeyebilmek ve gerekli olan yüksek insülin gereksinimini karşılayabilmek için insülin sekresyonunu artırır. Hastalık gelişiminin bu aşaması kompensatuar hiperinsülinemi olarak adlandırılır. Ancak, insülin üretimini çokça artıran pankreatik beta hücrelerinin özellikle endoplazmik retikulum stresinden kaynaklanan ölümü dolayısıyla hastalığın ilerleyen aşamalarında glikoz homeostazı bozulur (Muoio ve Newgard, 2008). İnsülin direnci ve telafi edici hiperinsülinemiye ilaveten obez hastalarda ve diyetle indüklenen fare obezite modellerinde kan leptin seviyelerinin artmasının leptin direnci gelişimine neden olduğu bildirilmiştir (Frederich ve diğ. 1995; Friedman, 2009, Maffei ve diğ., 1995). Leptinin ve insülinin etkilerine karşı direnç sadece periferik dokularda değil, aynı zamanda merkezi sinir sistemi hücrelerinde de ortaya çıkar. Dolayısıyla bu bireylerde gıda alımı ve vücut ağırlığı artışı söz konusudur (Könner ve diğ. , 2009; Myers ve diğ., 2010; Clegg ve diğ., 2011).

İnsülin ve leptin sinyali birçok ortak molekülü içerir. Leptinin uzun leptin reseptörüne (ObRb) bağlanması, Janus kinazı (JAK) 2'nin aktivasyonuna, ardından reseptörün JAK2 aracılı fosforilasyonuna ve aktive edici transkripsiyon (STAT) 3 moleküllerinin aktivasyonuna yol açar. Aktive edilmiş STAT3, nukleusa yer değiştiren ve sitokin sinyalinin baskılayıcısı (SOCS) 3'ün de içinde bulunduğu hedef genleri aktive eden bir dimer oluşturur. Artmış STAT3 aracılı SOCS3 ekspresyonu leptin ve insülin sinyalizasyonunun inhibisyonuna yol açar. Bu nedenle SOCS3 hem insülin, hem de leptin direncinin moleküler bir belirteci olarak kullanılmaktadır. Fosforile JAK2 ayrıca PIP3 aracılığıyla IRS/PI3 kinaz sinyal yolunu doğrudan aktive eder (Könner ve Brüning, 2012).

Diyabet araştırmalarında odaklanılan önemli noktalardan birisi erişkin pankreasında beta hücre rejenerasyonun nasıl sağlanabileceğidir. Bilindiği üzere erişkin beta hücrelerinin proliferasyon kapasitesi çok düşüktür (Bonner-Weir ve diğ., 2010). Öyleyse gebelikte, obezitede ve kısmi pankreatektomiden sonra gözlenen artmış beta hücre kütlesini oluşturan yeni beta hücreleri nasıl oluşmaktadır? Yeni beta hücrelerinin kaynağı kök/öncül hücreler mi, yoksa diğer tip pankreatik hücreler midir? Literatürde birbiriyle çelişen bulgulara rastlanmakta ise de, elde edilen bulgular pankreatik kök hücreleri

kavramının doğmasına ve bu hücrelerin erişkin pankreasta yeni oluşan beta hücrelerinin kaynağı olduğuna dair görüşlerin ortaya çıkmasına yol açmıştır (Bonner-Weir ve Sharma, 2002). Bu görüş, nakledilen adacıkların işlevlerini sürdürebilmesinden de destek almaktadır. Bilindiği üzere beta hücreleri yaşamlarını çok uzun süre devam ettiremezler (Bonner-Weir ve diğ., 2000). Nakledilen adacıkların işlevini devam ettirebilmesi adacık içinde pankreatik kök hücrelerin veya progenitörlerin varlığıyla açıklanabilir (Can, 2014).

Bu çalışmada ekibimizin önceki çalışmaları kapsamında erişkin (2.5-3 aylık) erkek *Wistar albino* sıçanların pankreatik adacıklarından izole edilen PAK-MKH'ler kullanıldı. Bu hücreler %99 civarında CD29 (Integrin- β 1 zinciri Ha2/5), CD45, CD54, CD90 (Thy-1/Thy-1.1), CD106 taşımaları bakımından MKH immünofenotipine uygunlardı. Negatif kontrol olan CD45'i taşıyan hücreler ise <%0.5 olarak hesaplandı. İzole edilen hücreler MKH belirteçleri olarak bilinen Vimentin, CD105/Endoglin, Fibronektin ve Nestin proteinlerini de üretiyorlardı. Ayrıca bu hücreler, uygun uyaranlar varlığında pankreatik beta hücrelerine, adipositlere ve osteositlere farklılaşabilme yeteneğine sahipti. Kök hücrelerin karakteristik özelliği olan kendini yenileme kültüre alınan hücrelerin ilerleyen günlerde sayıca artmasının gösterilmesi ile teyid edildi. Bu hücrelerin karakterizasyonu ile ilgili olarak elde ettiğimiz tüm bulgular Karaöz ve arkadaşlarının (2010) yayınladıkları PAK-MKH'lerin karakteristik özellikleri ile benzerdi. Bu bulgular bir başka çalışma kapsamında elde edildiğinden tezin "Bulgular" bölümünde sunulamamıştır. Laboratuvarımızda gerçekleştirilen tüm bu testler sonucunda izole edilen PAK-MKH'lerin yüksek saflıkta, sağlıklı ve fonksiyonel olduğuna karar verildi.

Bu çalışmada tip 2 diyabet *in vitro* taklit edilerek PAK-MKH'lerin beta hücrelerine farklılaşma olasılıkları test edildi. Bilindiği üzere tip 2 diyabetin en belirgin bulgusu olan insülin direnci açlık kan şekerinin ve insülin seviyelerinin yüksek değerlerde olması ile tanımlanır. Henüz kliniğe yansımamış olmakla birlikte insülin direnci olan hastalarda aynı zamanda açlık kan leptin seviyelerinin de yüksek olduğu gözlenmiştir. İnsüline dirençli tip 2 diyabetik bireylerde vücut yağ oranından bağımsız olarak insülin direnci ve leptin seviyelerinin yüksek olduğunun belirlenmesi bu hormonlar arasındaki fonksiyonel ilişkiyi göstermektedir (Fischer ve diğ., 2002). Bu bilgilerin ışığında çalışmamızda PAK-MKH'lere glukoz, insülin ve leptin uygulanarak *in vitro* ortamda tip2 diyabet taklit edildi. Glukoz, insülin ve leptin'in PAK-MKH'lerin canlılığını desteklediği doz ve süresinin

tespit edilebilmesi için ön deneyler yapıldı. Bu deneylerin kapsamında 5-30 mM glukoz, 1-100 nM insülin veya 0.5-2.0 ng/mL leptin 24 ve 48 saat süreyle PAK-MKH'lere uygulandı. Hücre canlılığının yüksek olduğu ve aynı zamanda hiperglisemik konsantrasyona uygun olan 20 mM glukozun (Renström ve diğ., 2007) 24 saat uygulanması çalışmamız için uygun görüldü. Denenen insülin konsantrasyonları arasında hücre canlılığını destekleyen 1 nM insülinin literatürde daha önce de insülin direnci gelişimi için kullanıldığı belirlendi (Zhao ve diğ., 2014) ve 24 saat uygulama süresi uygun görüldü. Mezenkimal kök hücrelere *in vitro* ortamda leptin uygulanan çalışmalarda leptin dozları değişkenlik göstermekte ise de düşük veya yüksek konsantrasyonda kök hücre farklılaşma oranlarının benzer olması (Um ve diğ., 2011), bu hücrelerdeki leptin reseptör ekspresyonunun düşük olduğunu düşündürmektedir. Bu hipotezin doğrulanabilmesi için PAK-MKH'lerden elde edilen membran fraksiyonunda western emdirimi yöntemi ile ObR gösterildi. Sonuç olarak PAK-MKH'lerin düşük miktarda ObR taşıdıkları belirlendi. Bu bulgudan yola çıkılarak düşük konsantrasyonlarda (0,5-2 ng/mL) canlılık testleri yapılmış ve 24 saat 0.5 ng/mL leptin uygulamasının hücre canlılığını desteklediği tespit edilmiştir. Bilindiği üzere MKH'ler asimetric bölünerek hem hücre sayılarını korurlar, hem de farklılaşmaya gidecek olan hücreleri verirler (Chen ve diğ., 2016). Dolayısı ile ortamdaki canlı hücrelerin sayıca artıyor olması uygulanan maddeye PAK-MKH'lerin farklılaşma yönünde yanıt veriyor olabileceğini düşündürdü. Ayrıca, tüm deney şartları 24 saat süre ile PAK-MKH'lere uygulanarak canlılık testleri yapıldı. Uygulanan deney şartlarında kullanılan maddelerin belirtilen doz ve sürede hücre canlılığı üzerinde olumsuz bir etkisi gözlenmedi. Leptin uygulanan grupta canlı hücre oranında belirgin bir artış gözlemlendi. Buna karşın, glukoz uygulanan grupta canlı hücre oranında belirgin bir artış gözlenirken, bu hücrelere glukoz ve leptinin birlikte uygulanmasının bu artışı baskıladığı belirlendi. Leptinin glukoz varlığında gösterdiği bu zıt etki hücrenin önemli bir enerji sensörü olan AMPK (Kahn ve diğ., 2005) üzerinden açıklanabilir. Su ve arkadaşları (2012) leptin ve glukoz arasında bir çapraz geçiş tarif etmiştir. Bu çalışmaya göre glikoliz, leptinin JAK2/STAT3 yolağını uyarması için gereklidir. Ayrıca, AMPK'yı leptin sinyalizasyonunda potansiyel bir negatif regülatör olarak tespit etmişlerdir. Bu çalışmaya göre, glikoz, en azından kısmen, AMPK'nın leptin sinyallemesini bastırma kabiliyetini inhibe ederek leptin sinyalinin ilerlemesini sağlamaktadır. Bu bulgulardan yola çıkarak PAK-MKH'lerde leptinin besin varlığına bağlı olarak AMPK üzerinden hücre canlılığını düzenleyebileceğini söylemek mümkündür.

Bahsi geçen uyarıların 24 saat sonunda beta hücre farklılaşmasını başlatıp başlatmadığı bu süreçte rol alan anahtar transkripsiyon faktörlerinin ve beta hücrelerine özgün bazı moleküllerin mRNA seviyelerinin gösterilmesiyle araştırıldı. Bu transkripsiyon faktörlerinin beta hücre farklılaşmasındaki rollerinin iyi anlaşılabilmesi açısından embriyonik pankreas gelişimi sürecini kısaca özetlemek yerinde olacaktır. Pankreas, midenin arkasında konumlanan ön bağırsak endoderminin dorsal ve ventral bölgelerinden köken alır. Genetik olarak değiştirilmiş farelerle yapılan çalışmalar pankreatik özgünleşme, büyüme ve farklılaşmayı düzenleyen hiyerarşik bir transkripsiyon faktör ilişkisinin varlığını göstermiştir (Collombat ve diğ., 2003; Jorgensen ve diğ., 2007). Pankreas oluşumuna katılan endodermal bölge, homeodomain faktör *pdx1* ifade eder (Offield ve diğ., 1996). Gelişimin takip eden basamağında heliks-loop-heliks faktör *neurogenin3* (*NGN3*), epiteliyal pankreatik progenitor hücrelerde endokrin farklılaşma programını başlatır. *NGN3* geni hasarlı farelerde endokrin hücre oluşumu söz konusu değildir (Gradwohl ve diğ., 2000) ve çalışmalar *NGN3* ifade eden hücrelerin adacık hücrelerinin progenitorü olduğunu göstermektedir (Gu ve diğ., 2002). Gelişimin ilerleyen basamaklarında ilave transkripsiyon faktörleri özgün endokrin hücre kaderini belirler. *Pax4* ve *Arx*'in antagonistik role sahip olduğu ve endokrin alt türlerin (*Pax4* β/δ , *Arx* α /PP-hücre farklılaşmasında etkindir) özelleştirilmesinde rol aldığı gösterilmiştir. *Pax-4* geni hasarlı olan farelerde seçici olarak β ve δ -hücreleri azalırken, α -hücreleri artmakta; *Arx* geni hasarlı olan farelerde ise zıt fenotip gözlenmektedir (Collombat ve diğ., 2003).

Çalışmamızda, uyarıların 24 saat süreyle uygulanmasını takiben gerçekleştirilen gen ekspresyonu analizlerinde leptin uygulanan hücrelerde düşük seviyede *pdx1*, *pax4* ve *ins2*; glukoz uygulanan hücrelerde yüksek seviyede *nkx2.2*, *nkx6.1* ile *pax4*, daha düşük seviyede *ins2*; glukoz ve leptin uygulanan hücrelerde yüksek seviyede *nkx2.2* ve daha düşük seviyede *nkx6.1*; insülin uygulanan hücrelerde *pdx1* ve *ins2*; insülin ve leptin uygulanan hücrelerde yüksek seviyelerde *nkx6.1* ile *ins2*, daha düşük seviyelerde *pdx1* ile *pax4*; glukoz ve insülin uygulanan hücrelerde düşük seviyelerde *nkx6.1*, *pax4* *ins2*; glukoz, insülin ve leptin uygulanan hücrelerde ise çok yüksek seviyede *pax4* ile düşük seviyede *nkx2.2* ile *ins2* eksprese edildiği belirlendi. Bu bulgulardan yola çıkarak deney şartlarının tümünün beta hücre farklılaşmasını uyardığını, ancak bu grupların farklılaşmanın farklı aşamalarında olduğunu söylemek mümkündür. İnsülini kodlayan

ins2 geninin ekspresyon seviyeleri gruplar arasında kıyaslanacak olursa en yüksek ekspresyonunun insülin ve leptin uygulanan hücrelerde olduğu; yalnızca insülin uygulanan hücrelerde de daha düşük olmakla birlikte belirgin bir artış olduğu dikkat çekmektedir. Bu iki grup arasındaki en belirgin farklılık ise yalnızca insülin uygulanan hücrelerde gözlenen yok denecek kadar az *nkx6.1* ve çok belirgin *nkx2.2* ekspresyonuna karşın; insülin ve leptin uygulanan hücrelerde bu durumun tersine çok yüksek seviyede *nkx6.1* ekspresyonu ile beraber *nkx2.2* ekspresyonunun olmamasıdır.

Arx ve Pax4 proteinlerinin göreceli seviyelerinin, ikincil geçiş sırasında iki endokrin öncül popülasyonun tanımlanmasına yol açtığı bilinmektedir. Her iki popülasyon da *nkx2.2* ve *Pax6* ifadeleri ile tanımlanmaktadır. Bununla birlikte, *Pax4* ekspresyonu yalnızca β - ve δ -hücrelerini verecek hücrelerde tespit edilmiştir. *Nkx2.2* ekspresyonunun olmaması, buna karşın *Pax4*, *Pdx1*, *Nkx6.1* ve *ins2*'nin ekspresyonu ileri seviyede beta hücre farklılaşmasının ve olgunlaşmasının bir göstergesidir (Dominguez-Bendala, 2009). Çalışmamızda elde edilen bulgulara göre insülin ve leptin uygulamasının 24 saat içinde belirgin olarak beta hücre farklılaşmasını ve olgunlaşmasını uyardığı gözlenmektedir.

Diğer taraftan, 24 saatlik madde uygulama süresinden sonra tam medyuma alınan hücrelerde beta hücre farklılaşmasının tamamlanması amacıyla 30 gün standart hücre kültürü şartlarında inkübasyon devam ettirildi. Bu sürenin sonunda gerçekleştirilen akım sitometrik analizler ile tüm gruplarda insülin⁺ hücre sayısının tam medyum uygulanan kontrol gruba göre anlamlı bir artış gösterdiğini, ancak insülin⁺ hücre sayısındaki en belirgin artışın insülin ve leptin uygulanan grupta meydana geldiği tespit etmiş bulunuyoruz. Ayrıca, aynı deney gruplarına bazal seviyede (5.5 mM) ve yüksek (25mM) konsantrasyonda glukozun uygulanması sonucu medyuma salınan insülin miktarları ELISA yöntemiyle ölçüldü. Bu testin amacı PAK-MKH'lerin farklılaşmasıyla oluşan yeni beta hücrelerinin yükselen glukozu yanıt olarak artan insülin sekresyonu yapma kapasitelerinin ölçülmesi ile bu hücrelerin fonksiyon edinimi ile ilgili fikir sahibi olmaktır. Elde edilen sonuçlar, beta hücre farklılaşması sonuçlarıyla paralel olarak, insülin ve leptin uygulanan gruplarda daha fazla olmak üzere bazal glukoz uyarısına karşın insülin sekresyonu yapıldığını göstermektedir. Ancak, belirtilen deney şartlarında yüksek glukoz uyarısına karşı artan seviyede insülin sekresyonu tespit edilememiştir. Bu bulgu PAK-MKH'lerden yeni farklılaşan beta hücrelerinin artan glukoz

konsantrasyonlarına duyarlı olmadığı yani bu hücrelerin fonksiyonel olmadığını göstermektedir. Genel olarak tip 1 diyabetin hücresel tedavisinde kullanılmak üzere yeni oluşturulmaya çalışılan beta hücrelerinin kaynağı olarak embriyonik kök hücreler (Pagliuca ve Melton, 2013) veya benzer karakterli iPS hücreleri (Pellegrini ve diğ., 2015) tercih edilmektedir. Bu tip pluripotent karakterli kök hücrelerden türetilmiş insülin ifade eden hücrelerin de yükselen konsantrasyonlarda glukozu yanıt olarak artan seviyelerde insülin salgılayamadıkları bildirilmiştir (D'Amour ve diğ., 2006). Buna karşın, embriyonik kök hücrelerden veya iPS hücrelerden türevlendirilen endodermal progenitör hücre hatlarından oluşturulan insülin⁺ hücrelerin glukozu duyarlı olarak insülin salgıladıkları belirtilmiştir (Cheng ve diğ., 2012). Çalışmalar arasında gözlenen farklılıklar kullanılan farklılaşma protokollerindeki farklılıktan kaynaklanıyor olabilir. Bir diğer görüş, *in vitro* şartlar altında farklılaştırılan beta hücrelerinin *in vivo* transplantasyonu takiben yerleştikleri mikro çevrelerde bulunan diğer tip hücreler ile veya salınan bazı faktörler ile olgunlaşmalarını tamamlayarak fonksiyon kazanma ihtimali üzerinde yoğunlaşmaktadır. Millman ve arkadaşlarının son olarak yayınladığı (2016) çalışmalarında yeni farklılaştırılan beta hücrelerinin *in vitro* koşullarda fonksiyon kazanabilmesinin kaynak olarak kullanılan kök hücrenin tipine de bağlı olduğu bulgusu üzerinde durulması gereken önemli bir noktadır. Bahsi geçen çalışmada diyabetik olmayan ve tip 1 diyabetik hastaların fibroblastlarının yeniden programlanmasıyla elde edilen iPS hücrelerinden farklılaştırılan beta hücrelerinin *in vitro* şartlarda yükselen glukoz seviyelerine duyarlı olarak artan seviyelerde insülin salgılayabildiği gösterilmiştir.

Hücre solunumu ve enerji üretiminin gerçekleştiği organel olan mitokondri hücre metabolizmasında merkezi rol oynar. Mitokondriler oksidatif fosforilasyon (OXPHOS) üzerinden enerji üretiminde önemli bir rol oynamanın yanı sıra, amino asit, yağ asidi ve steroid metabolizmasında ve aynı zamanda reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimine, kalsiyum homeostazı, ve apoptoz gibi hücre sinyal yollarında önemli roller alırlar. Mitokondriyal zar potansiyelindeki bir artış, elektron transfer zincirinin bileşenlerinden (NADH, FADH₂) alınan tek elektronun oksijene transfer edilmesi yoluyla reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini artırır. Son veriler kök hücre pluripotensisinin düzenlenmesinde mitokondri ve oksidatif metabolizmanın güçlü ve doğrudan katılımını destekler niteliktedir. Pluripotent kök hücre farklılaşmasının mitokondriyal biyogenezin uyarılmasıyla olan ilişkisine ek olarak meydana gelen metabolik değişimi dikkat

çekicidir. Farklılaşma sırasında glikoliz temelli bir metabolizmadan artan OXPHOS temelli metabolizmaya geçiş olmaktadır. Somatik hücrelerin pluripotent kök hücrelere yeniden programlanması sırasında ise tersinir yönde değişiklikler meydana gelmektedir. Bir başka deyişle yüksek oksidatif metabolizma sonucu meydana gelen ROS üretimindeki artış kök hücre farklılaşmasının önemli bir belirteçidir (Wanet ve diğ., 2015). Çalışmamızda bahsedilen çalışmalara benzer bir şekilde beta hücre farklılaşması bulgularına paralel olarak ROS üretiminin kontrole göre anlamlı bir artış gösterdiği tespit edilmiştir.

Akım sitometrik analizler en yüksek insülin⁺ hücre sayısının insülin ve leptin uygulanan grupta olduğunu göstermektedir. Bu bulgu bize PAK-MKH'lerde insülin direnci gelişiminin insülin+leptin grubunda glukoz+insülin+leptin grubuna göre daha yüksek oranda meydana gelmiş olabileme ihtimalini düşündürdü. Bu hipotezi doğrulayabilmek için PAK-MKH'lere insülin reseptör antagonisti özelliğinden dolayı insülin direncine yol açan bir molekül olan S961 (Vikram ve Jena, 2010) insülin direnci pozitif kontrolü olarak uygulandı. İnsülin direnci geliştirebilmek için uygun S961 konsantrasyonu belirleyebilmek amacıyla 1-1000pM S961 PAK-MKH'lere 24 saat süreyle uygulandı. Bu hücrelerde insülin direnci gelişimini takip edebilmek için insülin sinyalinin ana molekülü olan p-AKT (Ser 473) seviyelerindeki azalma belirlendi. p-AKT (Ser 473) seviyelerindeki en belirgin azalma 100 pM S961 uygulamasında meydana geldiğinden deneylere bu konsantrasyon ile devam edildi. Diğer insülin direnci parametreleri olarak insülin sinyal yolağının önemli molekülleri olan PTEN, SOCS3 ve p-IRS1 (Ser307) ve p-IRS1 (Try) seviyelerindeki değişimler western emdirimi tekniği ile gösterildi. Bilindiği üzere insülin/PI3K sinyalizasyonunun negatif bir düzenleyicisi olan PTEN, insülin direncini pozitif yönde düzenler (Gupta ve Dey, 2012). SOCS3, insülin sinyalini negatif yönde düzenlediğinden insülin direnci ile ilişkilendirilmektedir. SOCS3'ün ekspresyonu obez bireylerde artar ve insülin reseptörünün tirozin kinaz aktivitesinin inhibisyonu, IRS proteinlerinin reseptörüne bağlanmak için yarışma ve IRS proteinlerini parçalanmaya hedefleme yoluyla insülin direncine neden olur (Ueki ve diğ., 2004; Sachithanandan ve diğ., 2010). Bilindiği üzere IRS1 tirozin kalıntılarından fosforillendiğinde aktif iken (Myers ve White, 1996), serin kalıntılarından fosforillendiğinde inhibe olur (Boucher ve diğ., 2014). Her ne kadar inhibitör IRS-1 serin fosforilasyonu molekülün birçok farklı amino asit kalıntısında meydana gelmekte ise de (Boura Halfon ve Zick, 2009), bunlar

arasında en iyi tanımlanmış modifikasyon 307. Serin kalıntısında meydana gelenidir (Aguirre ve diğ., 2002). Obez ve diyabetik farelerde IRS-1 Ser-307 fosforilasyonu artar (Hirosumi ve diğ., 2002; Um ve diğ., 2004). Çalışmamızda pozitif insülin direnci kontrol grubu olarak kullanılan S961 uygulanmış PAK-MKH'lerde azalmış p-AKT (Ser 473) ve SOCS3'e karşılık, p-IRS1 (Ser307) ve PTEN seviyelerinde artış gözlenirken, p-IRS1 (Try) seviyesinin değişmediği belirlendi. SOCS3 seviyesi hariç, diğer tüm parametreler insülin direnci gelişimini doğrulamaktaydı. SOCS3 ekspresyonu ve dolayısıyla fonksiyonunun hücre tipine ve uyarana göre değişiklik gösterdiği bilinmektedir (Baker ve diğ., 2009). Çalışmalar, SOCS3'ün kök hücrelerin farklılaşması ile olan ilişkisine yoğunlaşırken (Cao ve diğ., 2006, Liu ve diğ., 2015), kök hücrelerde insülin direncini tanımlayan az sayıda çalışmada SOCS3 seviyelerinin araştırılmadığı belirlenmiştir. Ayrıca, S961 uygulanan hücrelerde beta hücre farklılaşması ve ROS üretimi oranları akım sitometri tekniği kullanılarak belirlendi. İnsülin direnci kontrol grubu olarak kullanılan S961 uygulanan hücrelerde beta hücre farklılaşması ve ROS üretiminin arttığı belirlendi.

Çalışmamızda, yalnızca leptin uygulanan PAK-MKH'lerde belirlenen değişmemiş p-AKT (Ser473) ve p-IRS1 (Ser307) ile artmış p-IRS1 (Try), PTEN ve SOCS3 seviyeleri bu grupta leptin direnci gelişmiş olduğunu düşündürdü. Bilindiği üzere SOCS3 ifadesi leptin tarafından uyarılır ve SOCS3 aktivasyonu, leptin reseptörleri üzerindeki sinyal iletiminde önemli olan STAT3 fosforilasyonunu inhibe eder. Dolayısıyla bu tür inhibisyon leptinin biyolojik fonksiyonunun bozulması ile tanımlanan leptin direncine neden olur (Lubis ve diğ., 2008). Bu grupta nispeten düşük oranda gözlenen beta hücre farklılaşması şaşırtıcı değildi. Leptinin endotel hücre farklılaşması (Kurtovic ve diğ., 2015) ve adipogeneze (Yue ve diğ., 2016) neden olduğu da gösterilmiştir. Literatürdeki benzer birçok çalışmanın hiçbirisi kök hücre farklılaşmasında leptin direncinin olası etkisine değinmemektedir. Yalnızca glukoz uygulanan PAK-MKH'lerde belirlenen azalmış p-IRS1 (Try), değişmemiş SOCS3, hafif artmış p-AKT (Ser473), artmış p-IRS1 (Ser307) ve PTEN seviyeleri bu grupta IRS1(Ser307) fosforilasyonu yolu ile AKT inhibisyonu geliştiğini düşündürdü. Glukoz+leptin uygulanan PAK-MKH'lerde azalmış p-IRS1 (Try), değişmemiş p-IRS1 (Ser307), hafif artmış SOCS3 ve artmış p-AKT (Ser473) ve PTEN seviyeleri bu grupta uyarılmış leptin sinyalizasyonunu düşündürdü. Yalnızca insülin uygulanan PAK-MKH'lerde hafif azalmış PTEN, hafif artmış p-IRS1 (Ser307), artmış p-IRS1 (Try), SOCS3 ve p-AKT (Ser473) seviyeleri bu grupta uyarılmış

insülin sinyalizasyonu aracılığıyla leptin direnci geliştiğini düşündürdü. İnsülin ve leptin sinyal zincirini aşırı ifade eden hücreler olan HEK293 hücrelerinde insülinin leptin reseptör sinyalini janus kinaz-2 seviyesinde inhibe ettiğini ve bunun hiperinsülinemiye bağlı leptin direnci için potansiyel bir mekanizma olduğunun gösterilmiş olması (Kellerer ve diğ., 2001) bu hipotezi desteklemektedir. İnsülin+leptin uygulanan PAK-MKH'lerde azalmış p-IRS1 (Try), değişmemiş p-AKT (Ser473) ile artmış PTEN, p-IRS1 (Ser307) ve SOCS3 seviyeleri bu grupta insülin ve leptin direncinin birlikte geliştiğini düşündürdü. Çalışmamızda en yüksek oranda beta hücre farklılaşması tespit ettiğimiz bu grupta insülin ve leptin direncinin bir arada gelişiyor olmasının beta hücre farklılaşmasını artırma olasılığı yüksek görünüyordu. Glukoz+insülin uygulanan PAK-MKH'lerde azalmış p-IRS1 (Ser307), artmış p-IRS1 (Try), SOCS3, p-AKT (Ser473) ve PTEN seviyeleri bu grupta uyarılmış insülin sinyalini düşündürdü. Glukoz+insülin+leptin uygulanan PAK-MKH'lerde ise azalmış SOCS3 ve p-AKT (Ser473) ile artmış p-IRS1 (Ser307), p-IRS1 (Try) ve PTEN seviyeleri bu grupta insülin direnci gelişimini düşündürdü. İnsülin direnci pozitif kontrolü olarak kullanılan S961 uygulamasının insülin direnci belirteçleri ile en çok uyum gösteren grubun glukoz+insülin+leptin uygulanan PAK-MKH'ler olduğu tespit edildi. Bu iki grupta p-IRS1 (Try) seviyeleri nispeten yüksek, buna karşın leptin ve insülin direnci gelişen insülin+leptin verilen PAK-MKH'lerde bu molekül hemen hemen hiç gözlenmedi. Bu bulgu, insülin direncine ilaveten gelişen leptin direnci ile artış gösteren beta hücre farklılaşmasında insülin sinyalinin tamamen kesilmiş olmasının önemli bir değişim olabileceğini düşündürmektedir. Glukozun leptin direnci gelişimini engellemesinde rol alan molekülün AMPK olduğu gösterilmiştir. Su ve arkadaşları (2012) glikozun, en azından kısmen, AMPK'nın leptin sinyallemesini bastırma kabiliyetini inhibe ederek leptin sinyalinin ilerlemesini sağlamakta olduğunu göstermişlerdir. Diğer bir deyişle glukoz, AMPK aracılığı ile leptin hassasiyetini artırmaktadır.

İnsülin+leptin uygulanan PAK-MKH'lerin yüksek oranda beta hücrelerine farklılaşıyor olması bizi bu çalışmada insülin ve leptin'in beta hücre farklılaşmasındaki olası rollerini ve ilişkili moleküler mekanizmalarda yer alabilecek araçları mercek altına almaya yönlendirdi. İlk olarak leptin ve insülin tarafından etkilenen ortak bir yolak olan fosfoinositid 3-kinaz (PI3K) yolağına odaklandık. Ning ve arkadaşları (2006) bu yolağın protein ve lipid fosfataz PTEN inhibisyonunu kapsadığını göstermiştir. PTEN, PIP3

[fosfatidilinositol (3,4,5) trifosfat (PtdIns(3,4,5P₃)]'ün defosforilasyonunu sağlayarak bu molekülün seviyelerinin azalmasına neden olur. PTEN, PI3K/AKT sinyal yolağının negatif bir düzenleyicisidir (Wijesekara ve diğ., 2005). PTEN'in bu rolü Wang ve arkadaşları (2010) tarafından leptin hasarlı *ob/ob* tip 2 diyabetik farelerde PTEN delesyonunun beta hücrelerinin fonksiyonunu ve kütlelerini koruduğunun gösterilmesiyle desteklenmiştir.

Pankreatik beta hücrelerinin insülin direncine uyum kapasitesi, kan glukoz seviyelerinin korunması ve Tip 2 diyabet gelişimi bakımından önemlidir. İnsülin reseptör substratı (IRS-2) / fosfoinositid 3-kinaz (PI3K) yolu, beta hücre kütlelerinin ve fonksiyonunun düzenlenmesinde kritik bir rol oynamaktadır. Protein kinaz B olarak da bilinen serin-treonin kinaz AKT, PI3K yolağının başlıca hedeflerinden biridir ve PTEN tarafından negatif yönde düzenlenir. AKT sinyal yolağı pankreatik beta hücrelerinin hücre döngüsünün ilerlemesi ve hayatta kalması ile ilişkilendirilmiştir (Elghazi ve Bernal-Mizrachi, 2009). AKT'nin beta hücre kütlelerinin, fonksiyonunun ve plastisitenin modülasyonu ile bağlantılı mekanizmalarının anlaşılması, diyabet hastalığının tedavisini olumlu yönde etkileyecektir.

PTEN'in çeşitli hücrelerdeki rolü iyi tanımlanmış olsa da (Franke, 2008), beta hücre kütleleri ve fonksiyonundaki rolü daha az çalışılmıştır. Beta hücrelerinde PTEN'in rolüne ilişkin ilk dolaylı kanıt, *Irs2*^{-/-} farelerde PTEN haploetersizliği ile ortaya çıkan beta hücre kütlelerinin ve fonksiyonunun restorasyonu ve kan şekerinin normalleşmesidir (Kushner ve diğ., 2005). Bununla birlikte, beta hücrelerinde PTEN'in silinmesi (*RIP-cre; PTEN*^{loxP/loxP}), hafif açlık hipoglisemisi, gelişmiş glukoz toleransı, beta hücrelerinin çoğalması, hücre büyüklüğü ve kütlelerinde artış ile sonuçlanmıştır (Stiles ve diğ., 2006). Bu fareler ayrıca AKT sinyal belirteçlerinde artış, streptozotosin kaynaklı diyabete direnç ve yüksek düzeylerde *Pdx1*, *Glut2* ve *Irs2* gen ekspresyonu sergilemektedir (Nguyen ve diğ., 2006). AKT/PTEN'in beta hücre farklılaşmasının düzenlenmesindeki önemi ise *Pdx1-Cre* transgenik hücre hattı kullanılarak pankreas öncü hücrelerinde PTEN'in koşullu silindiği farelerde AKT sinyalinin aktive edilmesi yoluyla araştırılmıştır. Bu fareler muhtemelen sentroasinar hücrelerin genişlemesinden kaynaklanan yoğun duktal yapı ile ekzokrin doku sergilemektedir (Stanger ve diğ., 2005).

AKT sinyalinin, pankreasın değişik kısımlarının farklılaşmasını ve esnekliğini düzenlemedeki önemi, Akt1'in Cre ile bağımlı şekilde aktivasyonunu sağlayan bir çift reporter sistem (*caAkt*) taşıyan bir fare modeli kullanılarak gösterilmiştir (Elghazi ve diğ., 2008). Bu model, Cre aracılı rekombinasyon üzerine *caAkt* mutantını ifade eden hücrelerde soy taraması yapmayı sağlar (Elghazi ve diğ., 2008). Pankreas epiteli, asinar veya beta hücrelerindeki mutant *caAkt* ekspresyonu sırasıyla *Pdx1-Cre*, *Elastase-Cre* veya *RIP-Cre* farelerde bu hayvan modeli kullanılarak araştırılmıştır. Bu soy takip deneylerinden elde edilen önemli bir sonuç, asinar veya beta hücrelerinde AKT sinyalinin aktivasyonunun sırasıyla duktal veya beta hücrelerinde asinar/duktal transdiferensiyasyona neden olduğunun tespit edilmiş olmasıdır. Sonuç olarak, bu bulgular AKT sinyalizasyonunun modülasyonunun *in vivo* olarak farklılaşmış pankreatik hücrelerin kaderini düzenlediğini ve AKT sinyalinin modüle edilmesinin rejeneratif tıpta kullanılmak üzere yeni doku oluşturmada potansiyel bir hedef olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir. Ancak, AKT sinyalinin pankreas gelişimi, farklılaşması ve hücresel plastisitedeki önemi ile ilgili literatürde çok az bilgi bulunmaktadır. Bu hücresel olaylar ile ilgili moleküler mekanizmaların daha iyi anlaşılması, diyabet için alternatif bir terapi olarak *in vitro* ve *in vivo* beta hücre kütlelerini genişletmek için kullanılabilecek yeni farmakolojik hedefler sağlayabilecektir.

Çalışmamızda, PAK-MKH'lerin beta hücrelerine farklılaşmasında PTEN'in olası rolünün araştırılması için bu hücrelere PTEN'in farmakolojik bir inhibitörü olan bpV(HOpic) uygulandı ve sonuç olarak PTEN inhibisyonunun beta hücre farklılaşmasını belirgin olarak artırdığı belirlendi. Bu uygulama sonucunda, beta hücre popülasyonunun en yüksek glukoz ve en düşük glukoz+insülin grubunda olduğu belirlendi. Bu bulgu, glukoz ile uyarılan beta hücre farklılaşmasında PTEN'in negatif bir regülatör olarak iş gördüğünü, insülinin ise bu negatif regülasyonu baskıladığını düşündürmektedir. Stiles ve arkadaşları (2006), kemirgen pankreas gelişimi sırasında insülin üreten beta hücrelerinde *PTEN* genini silmişler ve beta hücre farklılaşmasında bir değişim olmaksızın embriyonik gelişim ve erken postnatal yaşam süresince progenitor hücre ve beta hücre proliferasyonunun arttığını ve hücre ölümünün azaldığını rapor etmişlerdir. Sonuç olarak bu mutant pankreasta daha çok sayıda ve daha büyük adacıklar geliştiğini ve total beta hücre sayısının belirgin olarak arttığını göstermişlerdir. PTEN kaybı, hipoglisemiye neden olmuş ve hayvanları streptozotosin ile uyarılan diyabetten korumuştur. Bu bulgu,

PTEN'in progenitör hücreleri artırarak beta hücre farklılaşmasına katkıda bulunduğunu düşündürmektedir. Çalışmamızda, PTEN inhibisyonunun en belirgin olarak beta hücre farklılaşmasını insülin ve glukoz uygulanan grupta meydana getirmesi PTEN'in insülin sinyali ile ilişkili fonksiyonunu düşündürmektedir. Wang ve arkadaşlarının (2010) yaptığı çalışmada PTEN (+/-) fareler, reaktif oksijen türüne bağlı tip 2 diyabet ve yaşlanma ile artan insülin direncine karşı koruma sergilemiştir. Tüm bulgular, PTEN-kontrollü sinyal yolunun modüle edilmesinin beta hücre koruması ve yenilenme tedavileri için potansiyel bir yaklaşım olabileceğine işaret etmektedir.

Bir sonraki aşamada, insülin ve leptin reseptörleriyle aktivite kazanan, AKT'nin bir başka önemli efektörü olan GSK3- β tarafından uyarılan ve hücre farklılaşmasını sonuçlandırabilecek önemli bir molekül olan β -katenin'e odaklandık. β -katenin hem hücre-hücre adezyonunda hem de gen ifadesinin düzenlenmesinde rol alır. Epitel hücrelerinde β -katenin moleküllerinin çoğu hücre-hücre yapışma birimlerinde kaderin proteiniyle birlikte bulunur. β -katenin bu birimlerde kaderin moleküllerini hücre içindeki aktin iskeletine tutunduran aracı bir proteindir. Buna karşın, gerek epitel gerekse epitel olmayan hücrelerde kaderin molekülleriyle ilişkisi olmayan β -katenin proteinleri sitoplazmada hızla parçalanır. Bu parçalanmada GSK3- β 'nin 216. Tirozin bakiyesinden fosforlanarak aktifleşmesi ve β -katenin'i aksin-APC-GSK3 ve CK1'den oluşan parçalama kompleksi tarafından fosforlaması temel rol oynar. AKT tarafından GSK3- β 'nin 9. Serin bakiyesinden fosforlanması durumunda ise GSK3- β inaktifleşir ve β -katenin sitoplazmada serbest kalarak nukleusa geçerek hedef genlerin ekspresyonuna yol açar (Can, 2014).

Çalışmamızda, p-GSK3- β (Ser9) protein seviyelerinde insülin+leptin, glukoz+insülin ve glukoz+insülin+leptin şartlarında kontrole oranla anlamlı bir artış belirlendi. Bu bulgu, insülin sinyalinin p-GSK3- β (Ser9) seviyelerini artırdığını desteklemektedir. Nemoto ve arkadaşları (2010) kültürlenmiş sığır adrenal kromafin hücrelerinde, insülininin (100 nM) GSK3- β 'nin Ser9 fosforilasyonunda %104'e kadar hızlı bir şekilde (<5 dk) ve sürekli (24 saate kadar) bir artışa neden olduğunu göstermiştir. Ayrıca, glukoz+leptin grubundaki kayda değer azalma glukoz ve leptin uygulamasının β -katenin'in stabilizasyonunu bozarak onu yıkıma yönlendirdiğinin bir göstergesi olarak değerlendirildi. p-GSK3- β (Tyr216) protein seviyelerinde ise istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık kaydedilmedi.

Glukoz+leptin grubundaki yükselme glukoz ve leptin uygulamasının β -katenin'in stabilizasyonunu bozarak onu yıkıma yönlendirdiğini destekler nitelikteydi.

GSK-3 β 'nın 9. serin bakiyesinden fosforlanması kazein kinaz-I α , APC ve Aksin'den oluşan β -katenin fosforilasyon kompleksinin dağılmasına ve β -katenin'in nukleusa göç ederek hedef genlerin ekspresyonunu başlatmasına yol açmaktadır. Bu çalışmada β -katenin gen ekspresyon seviyeleri ile sitoplazmik ve nuklear fraksiyonlardaki β -katenin protein seviyeleri ölçüldü. Farklılaşma gözlenen gruplarda β -katenin gen ekspresyonunun baskılandığı tespit edildi. Ancak, bu gruplar arasında sitoplazmik β -katenin seviyelerinde anlamlı bir değişiklik gözlenmedi. Buna karşın, nuklear β -katenin seviyelerinde tüm gruplarda kontrole oranla belirgin bir azalma olduğu belirlendi. β -katenin'in kök hücre karakterinin korunması ile ilgili fonksiyonları (Fevr ve diğ., 2007) göz önünde bulundurularak uyaran uygulanan gruplardaki nuklear β -katenin seviyelerindeki bu düşme farklılaşma ile ilişkilendirildi.

Genel olarak β -katenin'in kök hücre karakterinin korunması ile ilgili fonksiyonları öne çıkmakta ise de, bazı çalışmalarda Wnt/ β -katenin sinyalinin kök hücre farklılaşmasında yaygın rol oynadığı gösterilmiştir. Shi ve arkadaşlarının (2013) yaptıkları bir çalışmada insan yağ dokusu kökenli kök hücrelerin beta hücrelerine farklılaşması sırasında Wnt sinyalinin rolü araştırılmıştır. Özgün olarak, Wnt1, β -katenin ve GSK3 β protein seviyelerinin 0. günden 9. güne kadar kademeli olarak arttığı ve farklılaşmanın 12. gününe kadar hızla azaldığı tespit edilmiştir. Wnt yolağının iki ana hedefi olan TCF-1 ve siklin D1'in ifadesi de benzer bir şekilde değişim göstererek Wnt sinyalinin beta hücre farklılaşması sırasında geçici olarak aktive edildiğini teyid etmiştir. İlginç olarak Wnt sinyalinin inhibisyonu beta hücre farklılaşmasını engellememiş; bunun yerine, PDX-1, insülin, IRS-1 ve IRS-2 dahil olmak üzere beta hücrelerinde özel belirteçlerin artmasına neden olmuştur. Farklılaşan hücrelerde Wnt sinyali inhibe edilip 9. günde Wnt1 ile muamele edilmiş ve 12. günde gen ekspresyon analizleri yapılmıştır. Dikkat çekici bir şekilde, Wnt1 uygulaması, beta hücrelerine özgün belirteçlerin azalmış ifadesi ile sonuçlanmıştır. Tüm bu veriler, Wnt'nin beta hücre farklılaşmasında gerekli olmayabileceğini, ancak beta hücre olgunlaşmasında rol alabileceğini düşündürmektedir.

Yüksek glukoz varlığında artan insülin ihtiyacı pankreatik beta hücre kütlesinin artmasına ve uzun vadede tip2 diyabet gelişimine yol açar. Diyabet hastalarında yapılan genom taramaları, tip 2 diyabetin ortaya çıkmasında önemli bir faktör olan insülin duyarlılığı ile ilişkili birkaç gen ortaya çıkarmıştır ve bunların birçoğu Wnt sinyalinin bir parçasıdır. Pdx1⁺ pankreatik progenitörlerde β -katenin geninin silinmesi, beta hücre kütlesinin azalmasına ve bozulmuş glukoz toleransına neden olur. Şaşırtıcı bir şekilde, β -katenin kaybı, insülin duyarlılığının artmasını ve bu farelerin yüksek yağ diyetine dirençli olmasını sağlamıştır (Elghazi ve diğ., 2012). Çalışmamızda insülin+leptin ile uyarılan beta hücre farklılaşmasının Wnt aracılığı ile başlatılma olasılığını değerlendirmek üzere PAK-MKH'lere insülin ve leptin ile birlikte Dickkopf-1 (DKK1) uygulandı. Bu protein, Wnt sinyal iletimini başlatmak için Frizzled serpentin reseptörü ile birlikte hareket eden bir Wnt reseptörü olan LRP6 için yüksek afiniteli antagonistik bir ligandır (Semenov ve diğ., 2008). DKK1+insülin+leptin uygulaması sonucunda beta hücre farklılaşmasının insülin+leptin uygulanan gruptan biraz yüksek olmakla birlikte yakın oranda olduğunun belirlenmesi ile bu mekanizmanın Wnt aracılığıyla başlatılmadığı düşünüldü. Diğer taraftan, yukarıda detaylı olarak tartışılan farklılaşma ile paralel olarak değişiklik gösteren β -katenin'in nukleusa yer değiştirmesi bu molekülün özellikle leptin ile uyarılan beta hücre farklılaşmasında rol alabileceğini düşündürmektedir. β -katenin'in beta hücre farklılaşmasındaki rolünü netleştirebilmek amacıyla PAK-MKH'lere uyarılar ile birlikte özgün bir β -katenin inhibitörü olan XAV-939 (Fang ve diğ., 2016) uygulanarak insülin⁺ hücre sayısı akım sitometri tekniği ile belirlendi. Elde edilen sonuçlara göre XAV-939 uygulaması hücre farklılaşmasını tersinir yönde etkilemektedir. Örneğin, tam medyum veya insülin uygulanan PAK-MKH'lere XAV-939 uygulanması beta hücre farklılaşmasını artırırken, insülin+leptin veya S961 uygulanan hücrelerde beta hücre farklılaşmasını baskıladı. Tüm bulgular biraraya getirildiğinde β -katenin'in leptin varlığına bağlı olarak gelişen beta hücre farklılaşması ve olgunlaşmasına katkıda bulunduğu düşünülmektedir.

β -katenin birçok moleküler etkileşime giren ve önemli hücresel olayların sonuçlanmasına aracılık eden merkezi bir transkripsiyon faktörüdür. β -katenin'in sitoplazmada N-kaderin ile olan bağlantısının kesilmesi ya fosforile β -katenin'in yıkımına veya fosforlanmamış β -katenin'in serbest kalarak nukleusa geçişini gösteren bir diğer olaydır. Çalışmamızda, N-kaderin immünpresipitasyon yöntemiyle ayrılarak β -katenin ile olan bağlantısı western

blotlama tekniğiyle gösterildi. Elde edilen sonuçlara göre N-kaderin/ β -katenin bağlantısının en yüksek insülin ve insülin+leptin gruplarında olduğu; glukoz+insülin+leptin grubunda ise belirgin bir azalma olduğu belirlendi. Bu bulgular, insülinin N-kaderin/ β -katenin bağlantısını artırırken, glukozun bu bağlantıyı azalttığını düşündürmektedir. İnsülin ve insülin+leptin gruplarında ise N-kaderin/ β -katenin bağlantısının artmış olması bu hücrelerin birbirine daha sıkı bağlanmış olabileceğini düşündürmektedir. Pankreatik beta hücrelerinin *in vivo* olgunlaşmasının hücre-hücre temasına bağımlı olduğunun belirlenmesi (Santos-Silva ve diğ., 2012), bu gruplarda yeni oluşan beta hücrelerinin diğer gruplara kıyasla daha olgun olma ihtimalini doğurmaktadır. Ayrıca, kaderin hücre adezyon molekülü ailesi, dokuların oluşumu ve bakımı için gereken yapışkan etkileşimleri yönlendirmektedir. Çok sayıda morfogenetik süreç için gerekli olan N-kaderin'in farelerde E9.5'deki pankreatik epitelde eksprese edildiğini, ancak daha sonra endokrin doku ile sınırlandırıldığı gösterilmiştir (Esni ve diğ., 2001). N-kaderin'in pankreasa özgün olarak üretilmemesi sonucunda, bu molekülün pankreatik gelişim için vazgeçilmez olduğu ve beta hücrelerinde insülin vesiküllerinin oluşumu için gerekli olduğunu ortaya koymuştur. N-kaderin eksikliği bulunan beta hücrelerinde insülin salgılayıcı vesiküllerin sayısının önemli ölçüde azalması ve bununla ilişkili olarak insülin sekresyonunun azaldığı bildirilmiştir (Johansson ve diğ., 2010). Tüm bu bulgular ve çalışmamızda yalnızca insülin veya insülin+leptin uygulanan hücrelerde tespit edilen *pdx1* ve *ins2* genlerinin upregülasyonu bu gruplarda yeni oluşan beta hücrelerinin diğer gruplardaki hücrelere göre daha olgun olduğu düşüncesini desteklemektedir.

Çalışmamızda, insülin ve leptin reseptörleriyle uyarılıp GSK3- β 'dan bağımsız olarak beta hücre farklılaşmasını meydana getirebilecek bir başka transkripsiyon faktörü olan Tub'un olası rolü de araştırılmıştır. Farelerde *Tub* geninin mutasyonu sonucu obezite gelişmektedir ki bu bulgu Tub'un enerji dengesinde önemli bir regülatör olabileceğini düşündürmektedir. Prada ve arkadaşlarının (2013) yapmış oldukları çalışmalarda insülin, leptin ve obezitenin hipotalamusta Tub'u modüle edip edemeyeceği; enerji dengesi, nöropeptid ekspresyonu ve hepatik glukoz metabolizması üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Bu grubun elde ettiği sonuçlar, Tub'un *in vivo* ortamda merkezi sinir sistemi hücrelerinde doğrudan insülin ve leptin reseptörlerinin substratı olduğunu ortaya koymuştur. Aynı çalışmada, insülin reseptörünün tirozin kinaz aktivitesi sayesinde doğrudan Tub'un tirozin fosforilasyonunu başlattığı; ancak leptinin Tub fosforilasyonunu

başlatabilmek için bir kinaz olarak JAK2'yi kullandığı gösterilmiştir. Ayrıca, Tub, plazma membranından nukleusa doğru ilerleyen bir transkripsiyon faktörü gibi davranmaktadır (Santagata ve diğ., 2001). Bahsi geçen çalışmadan elde edilen bulgular açlık sırasında p-Tub (Tyr)'nin azaldığını, besin alımından sonra tekrar arttığını göstermektedir. Ayrıca bu bulgular Tub'un aktivitesinin beslenmeye bağlı olarak değiştiğini de göstermektedir. Yine Prada ve arkadaşlarının (2013) çalışmasında farelerin hipotalamusunda *Tub* antisense oligonukleotid uygulanarak Tub ekspresyonunun inhibisyonu sağlanmış ve sonuç olarak gıda alımı ve yağlanmanın arttığı bildirilmiştir. Bu farelerde açlık kan şekeri, karaciğerde glikoz üretimi ve karaciğerin PEPCCK ekspresyonunda bir artış olduğu belirlenmiştir. Bu veriler, enerji dengesinin kontrol edilmesine paralel olarak hipotalamustaki Tub'un hepatik glukoz metabolizmasının düzenlenmesinde rol oynayabileceğini düşündürmektedir.

Tub, bir transkripsiyon regülatörü olarak tanımlanmış olsa da, bu işlevinin altında yatan moleküler mekanizmanın ayrıntıları tam olarak belirlenememiştir. Tub'un heterotrimerik GTP bağlayıcı protein (G protein) bağlı reseptörler aracılığıyla gelişen sinyal iletimi sırasında aktifleştiği bilinmektedir. Tub, karboksil terminalinde yer alan "Tubby bölgesi" aracılığıyla fosfatidilinositol 4,5-bisfosfat'a bağlanarak plazma zarına tutunur. X-ışını kristalografisi ile bu etkileşim atomik seviyede ortaya konmuş ve Tubby bölgelerinin fosforile-fosfatidil-inositol bağlayıcı faktörler olduğu sonucuna varılmıştır. Reseptör aracılı G protein α_q ($G\alpha_q$)'nun aktivasyonu aracılığıyla aktiflenen fosfolipaz C- β , Tub'un plazma membranından salınarak nukleusa geçişini uyarır. Tub benzeri protein 3 (TULP3)'ün yerleşimi de benzer şekilde düzenlenmiştir. Bu veriler, tubby proteinlerin fosfoinositid hidrolizine bağımlı bir şekilde nukleusa geçerek, G-protein sinyalleme ile gen ekspresyonu düzenlenmesi arasında bağlantı sağlayan membrana bağlı bir transkripsiyon düzenleyicisi olarak işlev gördüğünü göstermektedir (Santagata ve diğ., 2001). Bu bağlamda, insülin ve leptin'in PLC β aracılığıyla Tub'un translokasyonunu uyardığı düşünülmektedir, zira PLC β 'nin bir inhibitörü insülin ve leptin ile uyarılan Tub'un nuklear translokasyonu üzerindeki etkilerini bloke edebilmiştir (Prada ve diğ., 2013).

Leptin ve insülin direnci ile ilgili sinyal mekanizmaları obezitede merkezi rol oynamaktadır (El-Haschimi ve diğ., 2000; Calvarheira ve diğ., 2003; Prada ve diğ., 2005).

İnsülin veya leptine yanıt olarak Tub'un tirozin fosforilasyonunda ve nükleer translokasyonunda azalma olduğunu gösteren veriler, yüksek yağlı diyetle beslenen farelerde Tub'un hipotalamik insülin ve leptin direncine katkıda bulunabileceğini düşündürmüştür. Prada ve arkadaşları (2013), Tub'un PTP1B ile ilişkili olduğunu ve bu etkileşimin yüksek yağlı diyetle beslenen farelerde arttığını gözlemlemişlerdir. Dahası, yüksek yağlı diyetle beslenen farelerin hipotalamusundaki PTPaz aktivitesi ile ilişkili olarak Tub seviyesinde bir artış olduğunu gözlemlemişler ve bu sonuç, *PTP1B*-antisense oligonukleotid enjeksiyonu ile engellenmiştir. Bu bulgular, Tub'un bir PTP1B substratı olabileceğini düşündürmektedir. Bu olay, leptin veya insülin kaynaklı Tub tirozin fosforilasyonunun, yüksek yağlı diyetle beslenen farelerde engellendiği moleküler mekanizmalardan biri olabilir; bu da defosforile IR, IRS-1 ve JAK2'ye ilaveten, PTP1B ile Tub'un fosfataz aktivitesine sahip olabileceğini düşündürmektedir.

Prada ve arkadaşları (2013), Tub'un hipotalamusta *in vivo* IRTK ve LEPR ile ilişkili JAK2'nin bir substratı olduğunu kanıtlamışlardır. Leptin veya insülin enjeksiyonundan sonra Tub, nukleusa geçer ve bu durum, oreksin mRNA seviyelerinin değişmesi ile paraleldir. *Tub* antisense oligonukleotid enjeksiyonu ile meydana gelen Tub ekspresyonundaki azalma besin alımı, yağlanma, açlık kan şekeri ve hepatik glikoz üretimini artırır ve oksijen tüketimini azaltır; tüm bu bulgular Tub'un insülin ve leptin'in enerji dengesi ve glukoz metabolizması üzerindeki etkilerinde önemli bir role sahip olduğuna işaret etmektedir. Yüksek yağlı diyetle beslenen farelerin hipotalamusunda, leptin ve insülin ile uyarılan p-Tub (Try) seviyelerinde belirgin bir azalma ve nukleusa geçiş vardır; buna Tub/PTP1B etkileşimindeki artış da eşlik etmektedir. Bu sonuçlar, Tub'un AKT/Foxo1 ve STAT3 yollarından bağımsız olarak hareket eden, *in vivo* hipotalamik insülin ve leptin sinyalinin bir parçası olduğunu ve onun düzenlenmesinin metabolizma üzerinde belirgin etkileri olduğunu göstermektedir.

Yukarıda detaylı olarak özetlendiği gibi Tub ile ilgili çalışmalar merkezi sinir sistemi üzerinde yoğunlaşmaktadır. Bu transkripsiyon faktörünün pankreatik etkileriyle ilgili herhangi bir çalışmaya ratlanmamıştır. Çalışmamızda nörogenez ile beta hücre farklılaşmasının birbirine benzer noktalarının fazla olması da göz önünde bulundurularak Tub'un insülin ve/veya leptin ile uyarılan beta hücre farklılaşması mekanizmasındaki rolü araştırılmıştır. Literatürde ilk kez PAK-MKH'lerde *Tub* geninin ekspresyon seviyeleri

qRT-PCR yöntemiyle gösterilmiş ve elde edilen bulgulara göre uyaran uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre belirgin bir azalma olduğu tespit edilmiştir. Bu bulgu, PAK-MKH'lerin beta hücrelerine farklılaşması sırasında *Tub* geninin ekspresyonunun baskılandığını göstermektedir. *Tub* proteinin varlığı PAK-MKH'lerin membran, sitoplazmik ve nuklear fraksiyonlarında western blotlama tekniği ile araştırıldı. Membran fraksiyonunda *Tub* seviyelerinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilemese de, insülin uygulanan gruplarda azalma olduğu gözlemlendi. Sitoplazmik fraksiyonda *Tub* bulunmadığı tespit edildi. En yüksek *Tub* seviyelerinin nuklear fraksiyonda olduğu belirlendi; insülin ve leptin uygulanan gruptaki artış istatistiksel olarak anlamlıydı. Bu bulgunun beta hücre farklılaşması sonuçlarıyla paralel olması *Tub*'un bu süreçte önemi bir rol oynayabileceğine işaret etmektedir. *Tub* ve benzeri proteinleri (TULP1-TULP3) kodlayan genler, gelişim sırasında ve farklılaşma sonrası süreçte nöronal hücrelerin devamlılığı ve işlevinde önemli bir rol oynar (Ikeda ve diğ., 2002). Bu bilgi *Tub*'un hücre farklılaşmasında rol oynadığını desteklemektedir.

Çalışmamızda elde edilen bulgulara göre nuklear *Tub* ve β -katenin seviyelerindeki değişimler birbirine benzer olduğundan *Tub* ve β -katenin'in olası ilişkisi araştırıldı. Bu amaçla nuklear fraksiyonda β -katenin immünpresipitasyon yöntemiyle ayrılarak bu proteinin *Tub* ile olası ilişkisi western blotlama tekniğiyle gösterildi. İnsülin ve leptin uygulanan grupta nuklear β -katenin fraksiyonunda yüksek seviyelerde *Tub* bulunması, bu uyarıların *Tub* ve β -katenin'in nuklear translokasyonuna neden olduğunu ve burada birbirlerine bağlandıklarını göstermekteydi.

İnsülin ve leptin uygulanan grupta *Tub* ve β -katenin'in nukleustaki yoğunluğu ve etkileşiminin yanı sıra, bu grupta beta hücre farklılaşmasının belirgin olarak yüksek olması, bu iki transkripsiyon faktörünün beta hücre farklılaşmasında anahtar rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Bu hipotezin doğrulanabilmesi için PAK-MKH'lere *Tub* ve β -katenin siRNA'ları ayrı ayrı uygulanarak deney süresinin sonunda insülin pozitif hücrelerin yoğunluğu akım sitometrik analiz ile belirlendi. Elde edilen bulgulara göre en yüksek oranda beta hücre farklılaşması belirlediğimiz insülin+leptin grubuna *Tub* siRNA uygulandığında daha yüksek oranda olmakla birlikte, β -katenin siRNA uygulandığında da belirgin bir azalma tespit edildi. Bu bulgu, *Tub* ve β -katenin'in PAK-MKH'lerin beta hücrelerine farklılaşma sürecinde anahtar rol oynadığını açıkça

göstermekteydi. Tub'un bu etkiyi nasıl gösterdiğini araştırmak için Tub'un insülin üretiminde önemli rol oynayan transkripsiyon faktörlerinin genlerinin promotör bölgelerine bağlanarak gen ekspresyonunu artırabilme olasılığı değerlendirildi. Bu hipotezi doğrulayabilmek amacıyla ChIP tekniği ile insülin ve leptin uygulanan grupta Tub'un bağlandığı DNA bölgeleri izole edildi ve sonrasında qRT-PCR yöntemi ile belirtilen genlerin promotör bölgelerinin varlığı araştırıldı. Elde edilen bulgular Tub'un *ins1*, *ins2*, *pdx1* ve *MafA* genlerinin promotör bölgelerine bağlanarak bu transkripsiyon faktörlerinin üretimini artırmak yoluyla insülin üretimine katkıda bulunduğunu düşündürmektedir. Ayrıca, Tub'un MafA geninin promotör bölgesine daha yüksek oranda bağlanıyor olması insülin ve leptin uygulanan grupta yeni oluşan beta hücrelerinin diğer gruplara göre daha olgun olduğu bulgusunu desteklemektedir. β -katenin'in insülin üretiminde rol alan bu transkripsiyon faktörleri ile olan ilişkilerinin gösterilebilmesinin de bu transkripsiyon faktörünün beta hücre farklılaşmasındaki rolünü aydınlatmak açısından önemli bir adım olacağı açıktır.

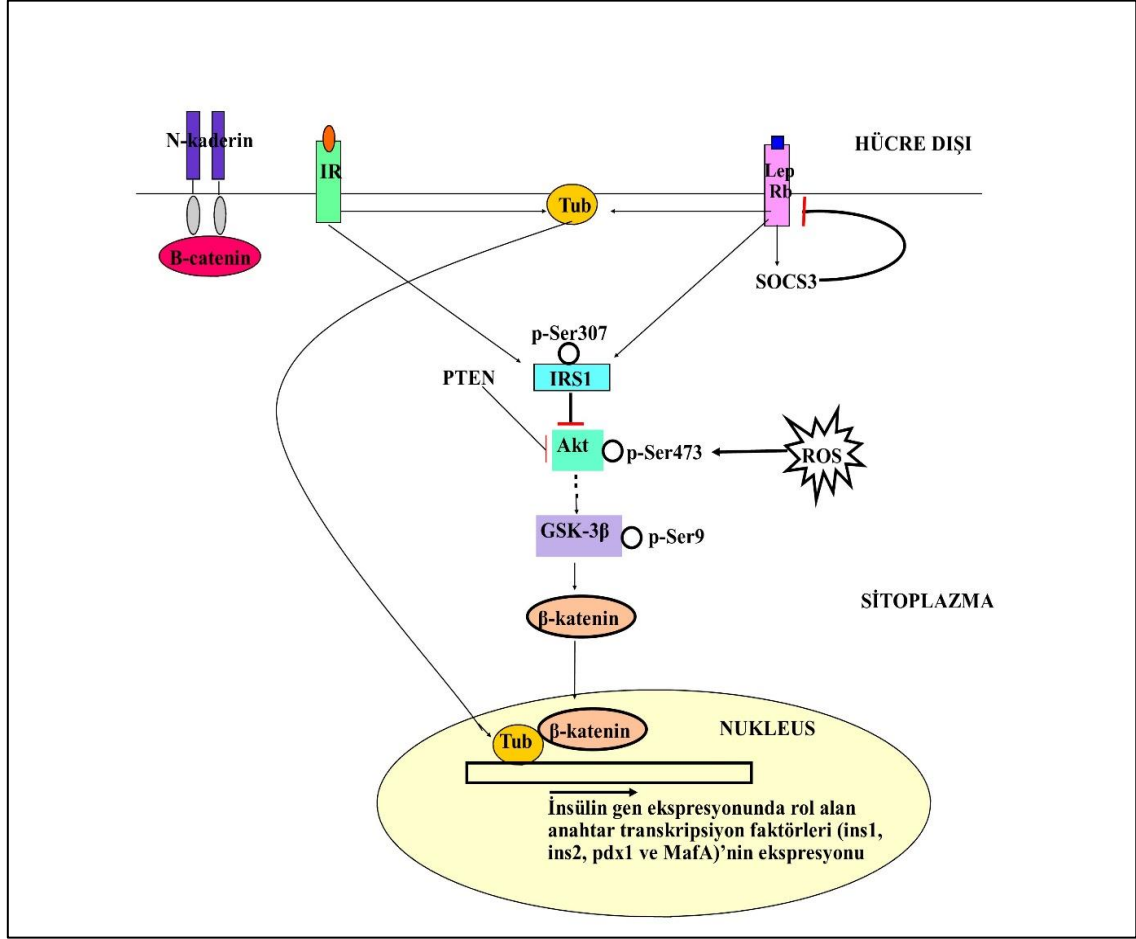
Sonuç olarak; PAK-MKH'lere 24 saat süreyle 20 mM glukoz, 1 nM insülin ve 0.5 ng/mL leptin uygulanmasının;

1. Beta hücre farklılaşmasına neden olduğu belirlenmiştir. İnsülin⁺ hücre sayılarına göre beta hücre farklılaşma oranlarının $\mathbf{\dot{I}+L>G>G+L=G+\dot{I}+L>\dot{I}=G+\dot{I}>FM+L}$ sıralamasında olduğu tespit edilmiştir. Bu uyaranlar arasından insülin ve insülin+leptin uygulamasıyla oluşan beta hücrelerinin daha olgun oldukları belirlenmiştir. Ancak, yeni gelişen β -hücreleri yükselen glukoz seviyelerine yanıt vermekte yetersizdir, bir başka deyişle fonksiyonel değildirler.
2. Leptin'in leptin direncine yol açtığı, ancak glukoz varlığında bu direncin kırılarak leptin sinyalinin ilerlediği belirlenmiştir.
3. Glukozun pIRS1 (Ser307) fosforilasyonu yolu ile AKT inhibisyonuna neden olduğu gösterilmiştir.
4. İnsülin uygulanan hücrelerde insülin sinyalinin uyarıldığı ve buna bağlı olarak leptin direnci geliştiği gösterilmiştir.

5. İnsülin ve leptinin birlikte uygulanması ile insülin ve leptin direnci geliştiği tespit edilmiştir.
6. Glukoz ve insülinin birlikte uygulanması ile insülin sinyalinin uyarıldığı, ancak leptin varlığında bu sinyalin engellenmesi ile insülin direnci geliştiği belirlenmiştir.
7. En yüksek oranda beta hücre farklılaşmasının insülin ile birlikte leptin uygulanan grupta olması insülin ve leptin direncinin birlikte gelişmesinin PAK-MKH'lerin beta hücrelerine farklılaşmasını arttırdığını göstermektedir.
8. Glukoz ile uyarılan beta hücre farklılaşmasında PTEN'in negatif bir regülatör olarak iş gördüğü, insülinin ise bu negatif regülasyonu PTEN inhibisyonu yolu ile baskıladığını gösteren bulgular elde edilmiştir.
9. Beta hücre farklılaşması sırasında *β-katenin* gen ekspresyonunun baskılandığı tespit edilmiştir.
10. Literatürde ilk defa PAK-MKH'lerde *Tub* geninin ekspresyonu gösterilmiş olup, beta hücre farklılaşması sırasında *Tub* gen ekspresyonunun baskılandığı tespit edilmiştir.
11. *Tub*'un insülin ve leptinin birlikte uygulandığı grupta nukleusta *β-katenin* ile bağlandığı gösterilmiştir.
12. *Tub*'un *ins1*, *ins2*, *pdx1* ve *MafA* genlerinin promotör bölgelerine bağlanarak insülin sentezinde rol oynadığı tespit edilmiştir.

Özetle, bu çalışmada insülin ve leptin direncinin beta hücre farklılaşmasını belirgin olarak artırdığını ve bunu esasen AKT/GSK-3 β /*β-katenin* ve *Tub* aracılığı ile meydana geldiği gösterilmiştir. Bu bulgular, tip2 diyabet gelişiminin ilk basamağı olan kompenzasyon aşamasında PAK-MKH'lerin beta hücrelerine farklılaştığını açıkça ortaya koymaktadır. Bu farklılaşmanın engellenebilmesi amacıyla AKT/GSK-3 β /*β-katenin* ve özellikle *Tub*'u hedefleyen yeni teröpatik ajanların geliştirilebilmesi tip2 diyabetin önlenmesi açısından önemli bir adım olabilme potansiyeli taşımaktadır. *Tub*'u hedefleyen farmakolojik ajanların, monoklonal antikörlerin, miRNA/lncRNA'ların veya antisense oligonuklotidlerin pre-diyabetik bireylere enjeksiyonu ile tip2 diyabet engellenebilir. Diğer taraftan, beta hücre yokluğu ile tanımlanan tip 1 diyabet veya ileri seviyede tip 2 diyabet hastalarında *β-katenin* ve *Tub*'un uyarılması ile yeni beta hücreleri oluşturularak yeni rejeneratif tedavi stratejileri geliştirilebilir.

Bu çalışmadan elde edilen yukarıda detaylı olarak bahsedilen sonuçlar **Şekil 5.1:**' de şemalandırılarak özetlenmiştir.



Şekil 5.1: Bu çalışmadan elde edilen sonuçların şematik gösterimi. Elde edilen bulgular PAK-MKH'lere insülin ve leptin uygulanmasının IRS1'i 307. Serin kalıntısından fosforlayarak sinyalin aşağı doğru AKT'ye iletilme aşamasında durmasına neden olmaktadır. Aynı zamanda, seviyesi artan PTEN'in de AKT'nin 473. Serin kalıntısından fosforlanarak aktifleşmesini engellemesi söz konusudur. Yani insülin direnci gelişimi söz konusudur. Artan SOCS3 leptin reseptörünü blokladığından aynı zamanda leptin direnci de gelişmektedir. Diğer taraftan ROS AKT'yi bir miktar aktifleştirerek sinyalin insülin ve leptinden bağımsız olarak iletilmesine, GSK3β'nin 9. Serin kalıntısından fosforlanarak inaktivasyonuna ve β-kataninin serbestleşerek nukleusa göç etmesine neden olur. İnsülin ve leptin ile uyarılan Tub'un de nukleusa geçerek β-katanin ile bağlanması ve insülin gen ekspresyonunda rol alan önemli transkripsiyon faktörleri olan *ins1*, *ins2*, *pdx1* ve *MafA* ekspresyonunu artırması ile insülin üretimi meydana gelmektedir.

KAYNAKLAR

- Afelik, S., Chen, Y., Pieler, T., 2006, Combined ectopic expression of Pdx1 and Ptf1a/p48 results in the stable conversion of posterior endoderm into endocrine and exocrine pancreatic tissue, *Genes Dev*, 20 , 1441–1446.
- Agius, L., 2008, Glucokinase and molecular aspects of liver glycogen metabolism, *Biochem J*, 414, 1–18 (2008).
- Aguirre, V., et al., 2000, The c-Jun NH(2)-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser(307), *J Biol Chem*, 275, 9047-9054.
- Aguirre, V., Werner, E.D., Giraud, J., Lee, Y.H., Shoelson, S.E., White, M.F., 2002, Phosphorylation of Ser307 in insulin receptor substrate-1 blocks interactions with the insulin receptor and inhibits insulin action, *J Biol Chem*, 277, 1531–1537.
- Ahlgren, U., Jonsson, J., Jonsson, L., Simu, K., Edlund, H., 1998, Beta-cell-specific inactivation of the mouse *Ipf1/Pdx1* gene results in loss of the beta-cell phenotype and maturity onset diabetes. *Genes Dev*, 12, 1763–1768
- Apelqvist, A., Ahlgren, U., Edlund, H., 1997, Sonic hedgehog directs specialised mesoderm differentiation in the intestine and pancreas, *Curr Biol*, 7, 801–804.
- Apelqvist, A., Li, H., Sommer, L., Beatus, P., Anderson, D.J., Honjo, T., Hrabe de Angelis, M., Lendahl, U., Edlund, H., 1999, Notch signalling controls pancreatic cell differentiation, *Nature*, 400 , 877–881.
- Artner, I., Blanchi, B., Raum, J.C., Guo, M., Kaneko, T., Cordes, S., Sieweke, M., Stein, R., 2007, MafB is required for islet beta cell maturation, *Proc Natl Acad Sci USA*, 104 , 3853–3858
- Baker, B.J., Akhtar, L.N., Benveniste, E.N., 2009, SOCS1 and SOCS3 in the control of CNS immunity, *Trends Immunol*, 30, 392-400.
- Banks, A.S., Davis, S.M., Bates, S.H., Myers, M.G., Jr., 2000, Activation of downstream signals by the long form of the leptin receptor, *Journal of Biological Chemistry*, 275, 14563–14572.
- Bendela, J.,D., 2009, Pancreatic Stem Cells, Humana Press, ISBN: 978-1-60761-131-8.
- Bensellam, M., Laybutt, D.R., Jonas, J.C., 2012, The molecular mechanisms of pancreatic β -cell glucotoxicity: recent findings and future research directions, *Molecular and Cellular Endocrinology*, 364, 1-27.
- Bienz, M., 2005, Beta-Katenin: a pivot between cell adhesion and Wnt signalling, *Curr Biol*, 15, 64-67.

- Bjorbak, C., Lavery, H.J., Bates, S.H., Olson, R.K., Davis, S.M., Flier, J.S., Myers, M.G., Jr., 2000, SOCS3 mediates feedback inhibition of the leptin receptor via Tyr985, *Journal of Biological Chemistry*, 275, 40649-40657.
- Boden, G., 2004, Gluconeogenesis and glycogenolysis in health and diabetes, *J Investig Med*, 52, 375–378
- Boggon ,T.J., Shan, W.S., Santagata, S., Myers, S.C., Shapiro, L., 1999, Implication of tubby proteins as transcription factors by structure-based functional analysis, *Science*, 286, 2119-2125.
- Bollen, M., Keppens, S., Stalmans, W., 1998, Specific features of glycogen metabolism in the liver, *Biochem J*, 336 , 19–31.
- Bonner-Weir, S., Taneja, M., Weir, G.C., Tatarkiewicz, K., Song, K.H., Sharma, A., O’Neil, J.J., 2000, In vitro cultivation of human islets from expanded ductal tissue, *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 97, 7999–8004.
- Bonner-Weir, S., Sharma, A., 2002, Pancreatic stem cells, *J Pathol*, 197, 519-526.
- Bonner-Weir, S., Li, W.C., Ouziel-Yahalom, L., Guo, L., Weir, G.C., Sharma, A., 2010, Beta-cell growth and regeneration: replication is only part of the story. *Diabetes*, 59, 2340-2348.
- Boucher, J., Kleinridders, A., Kahn, C.R., 2014, İnsülin receptor signaling in normal and insülin-resistant states, *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 1;6(1), 009191.
- Boura-Halfon, S., Zick, Y., 2009, Phosphorylation of IRS proteins, insülin action, and insülin resistance, *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 296, 581–591.
- Brüning, J.C., Winnay, J., Bonner-Weir, S., Taylor, S.I., Accili, D., Kahn, C.R., 1997, Development of a novel polygenic model of NIDDM in mice heterozygous for IR and IRS-1 null alleles, *Cell*, 21,561-572.
- Can, A., 2014, Sinyal molekülleri ve hücrede sinyal iletimi/Kök Hücre-Biyolojisi, Türleri ve Tedavide Kullanımları, *Ankara, Akademisyen Tıp Kitapevi*, 128-142.
- Carvalho, J., Qiu, Y., Chawla, A., 2013, Blood spotlight on leukocytes and obesity, *Blood*, 122, 3263-3267.
- Cao, F., Hata, R., Zhu, P., Ma, Y.J., Tanaka, J., Hanakawa, Y., Hashimoto, K., Niinobe, M., Yoshikawa, K., Sakanaka, M., 2006, Overexpression of SOCS3 inhibits astroglialogenesis and promotes maintenance of neural stem cells. *J Neurochem*, 98, 459-470.
- Chang-Chen, K.J., Mullur, R., Bernal-Mizrachi, E., 2008, β -cell failure as a complication of diabetes, *Reviews in Endocrine&Metabolic Disorders*, 9, 329-343.
- Cheatham, B., Kahn, C.R., 1995, İnsülin action and the insülin signaling network, *Endocrine Reviews*, 16, 117-142.

- Chen, C., Fingerhut, J.M., Yamashita, Y.M., 2016, The inside and outside of asymmetric stem cell division, *Curr Opin Cell Biol.* 43, 1-6.
- Chen, C.T., Shih, Y.R., Kuo, T.K., Lee, O.K., Wei, Y.H., 2008, Coordinated changes of mitochondrial biogenesis and antioxidant enzymes during osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells, *Stem Cells*, 26, 960–968.
- Cheng, X., Ying, L., Lu, L., Galvão, A. M., Mills, J. A., Lin, H.C., Kotton, D.N., Shen S.S., Nostro, M.C., Choi, J.K., 2012, Self-renewing endodermal progenitor lines generated from human pluripotent stem cells, *Cell Stem Cell*, 10, 371-384.
- Chenn, A., Walsh, C.A., 2000, Regulation of cerebral cortical size by control of cell cycle exit in neural precursors, *Science*, 297, 365-369.
- Chhabra, P., Brayman, K.L., 2013, Stem cell therapy to cure type 1 diabetes: from hype to hope. *Stem Cells Transl Med*, 2, 328-336.
- Chitnis, A.B., 1995, The role of Notch in lateral inhibition and cell fate specification, *Mol Cell Neurosci*, 6, 311–321.
- Chua, Jr. S.C., White, D.W., Wu-Peng, X.S., Liu, S.M., Okada, N., Kershaw, E.E., Chung, W.K., Power-Kehoe, L., Chua, M., Tartaglia, L.A., Leibel, R.L., 1996, Phenotype of fatty due to Gln269Pro mutation in the leptin receptor (Lepr), *Diabetes*, 45, 1141–1143.
- Chua, Jr. S.C., Koutras, I.K., Han, L., Liu, S.M., Kay, J., Young, S.J., Chung, W.K., Leibel, R.L., 1997, Fine structure of the murine leptin receptor gene: splice site suppression is required to form two alternatively spliced transcripts, *Genomics*, 45, 264–270.
- Cilaker-Micili, S., Ozogul, C., 2007, Diyabette Kök Hücreler, *DEU*, 21, 109-117.
- Clegg, D.J., Gotoh, K., Kemp, C., Wortman, M.D., Benoit, S.C., Brown, L.M., D'Alessio, D., Tso, P., Seeley, R.J., Woods, S.C., 2011, Consumption of a high-fat diet induces central insulin resistance independent of adiposity, *Physiol Behav*, 18, 10-16.
- Cockell, M., Stevenson, B.J., Strubin, M., Hagenbuchle, O., Wellauer, P.K., 1989, Identification of a cell-specific DNA-binding activity that interacts with a transcriptional activator of genes expressed in the acinar pancreas, *Mol Cell Biol*, 9, 2464–2476.
- Coleman, D.L., Eicher, E.M. 1990, Fat (fat) and tubby (tub): two autosomal recessive mutations causing obesity syndromes in the Mouse, *J Hered*, 81, 424-427.
- Collombat, P., Mansouri, A., Hecksher-Sorensen, J., Serup, P., Krull, J., Gradwohl, G., Gruss, P., 2003, Opposing actions of Arx and Pax4 in endocrine pancreas development, *Genes Dev*, 17, 2591–2603.
- Collombat, P., Hecksher-Sorensen, J., Broccoli, V., Krull, J., Ponte, I., Mundiger, T., Smith, J., Gruss, P., Serup, P., Mansouri, A., 2005, The simultaneous loss of Arx and Pax4 genes promotes a somatostatin-producing cell fate specification at the expense of the alpha- and beta-cell lineages in the mouse endocrine pancreas, *Development*, 132, 2969–2980.

- Coyle, C.A., Strand, S.C., Good, D.J., 2008, Reduced activity without hyperphagia contributes to obesity in Tubby mutant mice, *Physiol Behaviour*, 95,168-175.
- Cui, H., López, M., Rahmouni, K., 2017, The cellular and molecular bases of leptin and ghrelin resistance in obesity, *Nat Rev Endocrinol*, 13, 338-351.
- D'Amour, K., A., Bang, A.G., Eliazar, S., Kelly, O.G., Agulnick, A.D., Smart, N.G., Moorman, M.A., Kroon, E., Carpenter, M.K., Baetge, E.E., 2006, Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells, *Nat. Biotechnol*, 24, 1392-1401.
- de Santa Barbara, P., van den Brink, G.R., Roberts, D.J. , 2003, Development and differentiation of the intestinal epithelium. *Cell Mol Life Sci*. 60, 1322–1332.
- Dominguez-Bendala, J., 2009, Pancreatic Development In Pancreatic Stem Cells. *Humana Press*, 11-31.
- Eberhardt, M., Salmon, P., von Mach, M.A., Hengstler, J.G., Brulport, M., Linscheid, P., Seboek, D., Oberholzer, J., Barbero, A., Martin, I., Müller, B., Trono, D., Zulewski, H., 2006, Multipotential nestin and Isl-1 positive mesenchymal stem cells isolated from human pancreatic islets, *Biochem Biophys Res Commun*, 345, 1167-1176.
- Efrat, S., Stem Cell Therapy for Diabetes, 2010, Humana Press, Israel, ISBN: 978-1-60761-365-7.
- Elchebly, M., Payette, P., Michaliszyn, E., Cromlish, W., Collins, S., Loy, A.,L., Normandin, D., Cheng, A., Himms-Hagen, J., Chan, C.,C., Ramachandran, C., Gresser, M.,J., Tremblay, M.,L., Kennedy, B.,P., 1999, Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene, *Science*, 283, 1544-1548.
- Elghazi, L., Bernal-Mizrachi, E., 2009, Akt and PTEN: beta-cell mass and pancreas plasticity, *Trends Endocrinol Metab* 20, 243-251.
- Elghazi, L., Gould, A.P., Weiss, A.J., Barker, D.J., Callaghan, J, Opland D, Myers M, Cras-Méneur C, Bernal-Mizrachi E., 2012, Importance of β -Katenin in glucose and energy homeostasis, *Sci Rep*, 2, 693.
- Elghazi, L., Weiss, A.J., Gould, A.P., Hegedus, B., Gutmann, D.H., Bernal-Mizrachi, E., 2008, Generation of a reporter mouse line expressing Akt and EGFP upon Cre-mediated recombination, *Genesis*, 46, 256–264.
- El-Haschimi, K., Pierroz, D.D., Hileman, S.M., Bjørbaek, C., Flier, J.S., 2000, Two defects contribute to hypothalamic leptin resistance in mice with diet-induced obesity, *J Clin Invest*, 105, 1827–1832.
- Esni, F., Johansson, B.R., Radice, G.L., Semb, H., 2001, Dorsal pancreas agenesis in N-kaderin-deficient mice, *Dev Biol*, 238, 202–212.

- Eyckerman, S., Broekaert, D., Verhee, A., Vandekerckhove, J., Tavernier, J., 2000, Identification of the Y985 and Y1077 motifs as SOCS3 recruitment sites in the murine leptin receptor, *FEBS Letters*, 486, 33-37.
- Fang, S., Liu, S., Chen, Y., 2016, β -catenin is involved in BMP9-induced differentiation of C3H10T1/2 cells into cardiomyocyte-like cells, *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi*. 32, 750-754.
- Fevr, T., Robine, S., Louvard, D., Huelsken, J., 2007, Wnt/beta-catenin is essential for intestinal homeostasis and maintenance of intestinal stem cells, *Mol Cell Biol*, 27,b 7551-7559.
- Fischer, S., Hanefeld, M., Haffner, S.M., Fusch, C., Schwanebeck, U., Köhler, C., Fückner, K., Julius, U., 2002, Insulin-resistant patients with type 2 diabetes mellitus have higher serum leptin levels independently of body fat mass, *Acta Diabetol*, 39, 105-110.
- Folmes, C.D., Nelson T.,J., Martinez-Fernandez, A., .Arrell, D.,K., Lindor, J.,Z., Dzeja, P.,P., Ikeda, Y., Perez-Terzic, C., Terzic, A., ,2011, Somatic oxidative bioenergetics transitions into pluripotency-dependent glycolysis to facilitate nuclear reprogramming, *Cell Metab*, 14, 264–271.
- Franke, T.F., 2008, PI3K/Akt: getting it right matters, *Oncogene*, 27, 6473–6488.
- Frederich, R.C., Hamann, A., Anderson, S., Löllmann, B., Lowell, B.B., Flier, J.S., 1995, Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action, *Nat Med*. 1, 1311-1314.
- Friedman, J.M., 2009, Leptin at 14 y of age: an ongoing story, *Am J Clin Nutr*. 89, 973-979.
- Gao, Q., Wolfgang, M.J., Neschen, S., Morino, K., Horvath, T.L., Shulman, G.I., Fu, X.Y. 2004. “Disruption of neural signal transducer and activator of transcription 3 causes obesity, diabetes, infertility, and thermal dysregulation”, *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 101, 4661–4666.
- Genuth, S., Alberti, K.G., Bennett, P, ve diğ., 2003, Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Follow-up report on the diagnosis of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 26, 3160–3167
- Gezginci-Oktayoglu, S., Bolkent, S., 2011, 4-Methylcatechol prevents NGF/p75(NTR)-mediated apoptosis via NGF/TrkA system in pancreatic β cells, *Neuropeptides*, 45, 143-150.
- Gezginci-Oktayoglu, S., Karatug, A., Bolkent, S., 2012, The relation among NGF, EGF and insulin is important for triggering pancreatic β cell apoptosis, *Diabetes Metabolism Research and Reviews*, 28, 654-662.
- Gezginci-Oktayoglu, S., Karatug, A., Bolkent, S., 2015, Nerve growth factor neutralization suppresses β -cell proliferation through activin A and betacellulin, *Pancreas*, 44, 243-249.
- Global Burden of Metabolic Risk Factors for Chronic Diseases Collaboration. Cardiovascular disease, chronic kidney disease, and diabetes mortality burden of cardiometabolic risk

- factors from 1980 to 2010: a comparative risk assessment, 2014, *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2, 634–647.
- Gong, Y., Ishida-Takahashi, R., Villanueva, E.C., Fingar, D.C., Münzberg, H., Myers, M.G., Jr., 2007, The long form of the leptin receptor regulates STAT5 and ribosomal protein S6 via alternate mechanisms, *Journal of Biological Chemistry*, 282, 31019–31027.
- Goodge, K.A., J.C. Hutton, 2000, Translational regulation of proinsulin biosynthesis and proinsulin conversion in the pancreatic beta-cell, *Semin Cell Dev Biol*, 4, 235–242.
- Gradwohl, G.A., Dierich, M., LeMeur, F., Guillemot., 2000, Neurogenin3 is required for the development of the four endocrine cell lineages of the pancreas, *Proc. Natl. Acad. Sci*, 97, 1607–1611.
- Grapin-Botton, A., Majithia, A.R., Melton, D.A., 2001, Key events of pancreas formation are triggered in gut endoderm by ectopic expression of pancreatic regulatory genes. *Genes Dev*, 15, 444–454.
- Gray, H., 1918, *Anatomy of the Human Body*, Bartleby.com, Philadelphia.
- Gu, G., Dubauskaite, J., Melton, D.A., 2002, Direct evidence for the pancreatic lineage:NGN3_cells are islet progenitors an are distinct from duct progenitors, *Development*, 129, 2447–2457.
- Gupta, A., Dey, C.S., 2012, PTEN, a widely known negative regulator of insülin/PI3K signaling, positively regulates neuronal insülin resistance, *Mol Biol Cell*, 19, 3882–3898.
- Heller, R.S., Jenny, M., Collombat, P., Mansouri, A., Tomasetto, C., Madsen, O.D., Mellitzer, G., Gradwohl, G., Serup, P., 2005, Genetic determinants of pancreatic epsilon-cell development, *Dev Biol*, 286, 217–224.
- Hems, D.A., Whitton, P.D., 1980, Control of hepatic glycogenolysis, *Physiol Rev*, 60, 1–50.
- Heremans, Y., Van De Casteele, M., in't Veld, P., Gradwohl, G., Serup, P., Madsen, O., Pipeleers, D., Heimberg, H., 2002, Recapitulation of embryonic neuroendocrine differentiation in adult human pancreatic duct cells expressing neurogenin 3. *J Cell Biol*, 159, 303–312.
- Hirosumi, J., Tuncman, G., Chang, L., Gorgun, C.Z., Uysal, K.T., Maeda, K., Karin, M., Hotamisligil, G.S., 2002, A central role for JNK in obesity and insülin resistance, *Nature* 420, 333–336.
- Howard, S., Deroo, T., Fujita, Y., Itasaki, N.A., 2011, Positive role of kaderin in Wnt/ β -catenin signalling during epithelial-mesenchymal transition, *PloS One*, 6, 23899.
- Huang, H.P., Liu, M., El-Hodiri, H.M., Chu, K., Jamrich, M., Tsai, M.,J., 2000, Regulation of the pancreatic islet-specific gene BETA2 (neuroD) by neurogenin 3, *Mol Cell Biol*, 20, 3292–3307.

- Huang, C., Thirone, A.,C., Huang, X., Klip, A., 2005, Differential contribution of insulin receptor substrates 1 versus 2 to insulin signaling and glucose uptake in l6 myotubes, *J Biol Chem*, 280, 19426-19435.
- Hui, H., Wright, C., Perfetti, R., 2001, Glucagon-like peptide 1 induces differentiation of islet duodenal homeobox-1-positive pancreatic ductal cells into insulin-secreting cells, *Diabetes*, 50, 785-796.
- Ikeda, A., Nishina, P.M., Naggert, J.K., 2002, The tubby-like proteins, a family with roles in neuronal development and function, *J Cell Scii*, 115, 9-14.
- Iratni, R., Yan, Y.T., Chen, C., Ding, J., Zhang, Y., Price, S.M., Reinberg, D., Shen, M.M., 2002, Inhibition of excess nodal signaling during mouse gastrulation by the transcriptional corepressor DRAP1, *Science*, 298, 1996–1999.
- Ito, K., Suda, T., 2014, Metabolic requirements for the maintenance of self-renewing stem cells, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15, 243-256.
- Jensen, J., Pedersen, E.E., Galante, P., Hald, J., Heller, R.S., Ishibashi, M., Kageyama, R., Guillemot, F., Serup, P., Madsen, O.D., 2000, Control of endodermal endocrine development by Hes-1, *Nat Genet*, 24 , 36–44.
- Jetton, T.L., Lausier, J., LaRock, K., Trotman, W.E., Larmie, B., Habibovic, A., Peshavaria, M., Leahy, J.L., 2005, Mechanisms of compensatory β -cell growth in insulin-resistant rats: roles of Akt kinase, *Diabetes*, 54, 2294-2304.
- Johansson, J.,K., Voss, U., Kesavan, G., Kostetskii, I., Wierup, N., Radice, G.,L., Semb, H., 2010, N-cadherin is dispensable for pancreas development but required for β -cell granule turnover, *Genesis*, 48, 374-381.
- Jonsson, J., Ahlgren, U., Edlund, T., Edlund, H., 1995, IPF1, a homeodomain protein with a dual function in pancreas development. *Int J Dev Biol*. 39, 789–798 .
- Jorgensen, M.C., Ahnfelt-Ronne, J., Hald, J., Madsen, O.D., Serup, P., Hecksher-Sorensen, J., 2007, An illustrated review of early pancreas development in the Mouse, *Endocr Rev*, 28, 685-705.
- Kahn, B.B., Alquier, T., Carling, D, Hardie, D.G., 2005, AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism, *Cell Metab*, 1, 15–25.
- Kahn, C.R., Folli, F., 1993, Molecular determinants of insulin action, *Horm Res*, 39, 93-101. 7.
- Kahn, CR., 1994, Banting Lecture. Insulin action, diabetogenes, and the cause of type II diabetes. *Diabetes*, 43, 1066-1084.
- Kahn, S., 1996, Regulation of B-cell function in vivo, *Diabetes Rev*, 4, 372–380

- Kalra, S.P., Dube, M.G., Pu, S., Xu, B., Horvath, T.L., Kalra, P.S., 1999, Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight, *Endocr Rev*, 20, 68–100.
- Kam, Y., Quaranta, V., 2009, Kaderin-bound beta-katenin feeds into the Wnt pathway upon adherens junctions dissociation: evidence for an intersection between beta-katenin pools, *PloS One*, 4, 4580.
- Kapeller, R., Moriarty, A., Strauss, A., Stubdal, H., Theriault, K., Siebert, E., Chickering, T., Morgenstern, J.P., Tartaglia, L.A., Lillie, J., 1999, Tyrosine phosphorylation of tub and its association with Src homology 2 domain-containing proteins implicate tub in intracellular signaling by insulin, *J Biol Chem*, 274, 24980–24986.
- Karaoz, E., Ayhan, S., Gacar, G., Aksoy, A., Duruksu, G., Okcu, A., Cetinalp Demircan, P., Eker Sariboyaci, A., Kaymaz, F., Kasap, M., 2010, Isolation and characterization of stem cells from pancreatic islet: pluripotency, differentiation potential and ultrastructural characteristics, *Cytotherapy*, 12, 288–302.
- Kawauchi, S., Takahashi, S., Nakajima, O., Ogino, H., Morita, M., Nishizawa, M., Yasuda, K., Yamamoto, M., 1999, Regulation of lens fiber cell differentiation by transcription factor c-Maf, *J Biol Chem*, 274, 19254–19260.
- Kellerer, M., Lammers, R., Fritsche, A., Strack, V., Machicao, F., Borboni, P., Ullrich, A., Häring, H.U., 2001, Insulin inhibits leptin receptor signalling in HEK293 cells at the level of janus kinase-2: a potential mechanism for hyperinsulinaemia-associated leptin resistance, *Diabetologia*, 44, 1125–32.
- Kieffer, T.J., Habener, J.F., 2000, The adipoinular axis: effects of leptin on pancreatic beta-cells, *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 278, 1–14.
- Kieffer, T.J., Heller, R.S., Leech, C.A., Holz, G.G., Habener, J.F., 1997 Leptin suppression of insulin secretion by the activation of ATP-sensitive K⁺ channels in pancreatic beta-cells, *Diabetes*, 46, 1087–1093.
- Kitamura, T., Nakae, J., Kitamura, Y., Kido, Y., Biggs, W.H.3rd, Wright, C.V., White, M.F., Arden, K.C., Accili, D., 2002, The forkhead transcription factor Foxo1 links insulin signalling to Pdx1 regulation of pancreatic β -cell growth, *Journal of Clinical Investigation*, 110, 1839–1847.
- Könner, A.C., Brüning, J.C., 2012, Selective insulin and leptin resistance in metabolic disorders, *Cell Metab*, 16, 144–152.
- Könner, A.C., Klöckener, T., Brüning, J.C., 2009, Control of energy homeostasis by insulin and leptin: targeting the arcuate nucleus and beyond, *Physiol Behav*, 97, 632–638.
- Kubo, A., Shinozaki, K., Shannon, J.M., Kouskoff, V., Kennedy, M., Woo, S., Fehling, H.J. & Keller, G., 2004, Development of definitive endoderm from embryonic stem cells in culture, *Development*, 131, 1651–1662.

- Kulkarni, R.N., Winnay, J.N., Daniels, M., Brüning, J.C., Flier, S.N., Hanahan, D., Kahn, C.R., 1999, Altered function of insulin receptor substrate-1-deficient mouse islets and cultured β -cell lines, *J Clin Invest*, 104, 69–75.
- Kumar, M., Melton, D., 2003, Pancreas specification: a budding question. *Curr Opin Genet Dev*, 13, 401–407.
- Kushner, J.,A., Simpson, L., Wartschow, L.,M., Guo, S., Rankin, M.,M., Parsons, R., White, M.,F., 2005, Phosphatase and tensin homolog regulation of islet growth and glucose homeostasis, *J Biol Chem*, 280, 39388-39393.
- Kurtovic, S., Ng, T.T., Gupta, A., Arumugaswami, V., Chaiboonma, K.L., Aminzadeh, M.A., Makkar, R., Dafoe, D.C., Talavera-Adame, D., 2015, Leptin enhances endothelial cell differentiation and angiogenesis in murine embryonic stem cells, *Microvasc Res*, 97, 65-74.
- Kyrou, I., Randeva, H.,S., Weickert, M.,O., 2014, Clinical Problems Caused by Obesity, Endotext [Internet], South Dartmouth (MA), MDText.com, Inc., 2000-.
- Lam, N.T., Cheung, A.T., Riedel, M.J., Light, P.E., Cheeseman, C.I., Kieffer, T.J., 2004, Leptin reduces glucose transport and cellular ATP levels in INS-1 beta-cells, *J Mol Endocrinol*, 32, 415–424.
- Lawrence, M.C., McKern, N.M., and Ward, C.W., 2007, Insulin receptor structure and its implications for the IGF-1 receptor, *Curr Opin Struct Biol*, 6, 699-705.
- Leahy, J.L., Hirsch, I.B., Peterson, K.A., Schneider, D., 2010, Targeting β -cell function early in the course of therapy for type 2 diabetes mellitus, *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 54, 3410-3417.
- Lee, J., Pilch, P.F., 1994, The insulin receptor: structure, function, and signaling, *Am J Physiol*, 266, C319-34.
- Li, Y., Cao, X., Li, L.X., Brubaker, P.L., Edlund, H., Drucker, D.J., 2005, Beta-Cell Pdx1 expression is essential for the glucoregulatory, proliferative, and cytoprotective actions of glucagon-like peptide-1, *Diabetes*, 54, 482–491.
- Li, Z., Ceccarini, G., Eisenstein, M., Tan, K., Friedman, J.M., 2013, Phenotypic effects of an induced mutation of the ObRa isoform of the leptin receptor, *Mol Metab*, 2, 364–375.
- Lilly, M.A., Davis, M.F., Fabie, J.E., Terhune, E.B., Gallicano, G.I., 2016, Current stem cell based therapies in diabetes, *Am J Stem Cells*, 5, 87-98.
- Liu, X., Ren, S., Qu, X., Ge, C., Cheng, K., Zhao, R.C., 2015, Mesenchymal stem cells inhibit Th17 cells differentiation via IFN- γ -mediated SOCS3 activation, *Immunol Res*, 61, 219-229.
- Lubis, A.R., Widia, F., Soegondo, S., Setiawati, A., 2008, The role of SOCS-3 protein in leptin resistance and obesity, *Acta Med Indones*, 40, 89-95.

- Lunt, S.Y., Vander Heiden, M.G., 2011, Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation, *Annu Rev Cell Dev Biol*, 27, 441–64.
- Maffei, M., Halaas, J., Ravussin, E., Pratley, R.E., Lee, G.H., Zhang, Y., Fei, H., Kim, S., Lallone, R., Ranganathan, S., ve diğ., 1995, Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects, *Nat Med*, 1, 1155–1161.
- Mathis, D., Vence, L., Benoist, C., 2001, B-cell death during progression to diabetes, *Nature*, 414, 792–798.
- Mihaylova, M.M., Shaw, R.J., 2011, The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism, *Nat Cell Biol*, 13, 1016–1023.
- Millman, J.R., Xie, C., Van Dervort, A., Gürtler, M., Pagliuca, F.W., Melton, D.A., 2016, Generation of stem cell-derived β -cells from patients with type 1 diabetes, *Nat Commun*, 7, 11463.
- Morioka, T., Asilmaz, E., Hu, J., Dishinger, J.F., Kurpad, A.J., Elias, C.F., Li, H., Elmquist, J.K., Kennedy, R.T., Kulkarni, R.N., 2007, Disruption of leptin receptor expression in the pancreas directly effects β -cell growth and function in mice, *Journal of Clinical Investigation*, 117, 2860–2868.
- Muoio, D.M., Newgard, C.B., 2008, Mechanisms of disease: Molecular and metabolic mechanisms of insulin resistance and beta-cell failure in type 2 diabetes, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9, 193–205.
- Muroyama, Y., Kondoh, H., Takada, S., 2004, Wnt proteins promote neuronal differentiation in neural stem cell culture, *Biochemistry Biophysics Research Communication*, 313, 915–921.
- Myers, M.G., Jr., White, M.F., 1996, İnsülin signal transduction and the IRS proteins, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol*, 36, 615–658.
- Myers, M.G., Jr., Leibel, R.L., Seeley, R.J., Schwartz, M.W., 2010, Obesity and leptin resistance: distinguishing cause from effect, *Trends Endocrinol Metab*, 11, 643–651.
- Nakae, J., Biggs, W.H.3rd., Kitamura, T., Cavanee, W.K., Wright, C.V., Arden, K.C., Accili, D., 2002, Regulation of insulin action and pancreatic β -cell function by mutated alleles of the gene encoding forkhead transcription factor Foxo1, *Nature Genetics*, 32, 245–253.
- Nandi, A., Kitamura, Y., Kahn, R.C., Acilci, D., 2004, Mouse Models of İnsülin Resistance, *Physiological Reviews*, 84, 623–647.
- Naya, F.J., Huang, H.P., Qiu, Y., Mutoh, H., DeMayo, F.J., Leiter, A.B., Tsai, M.J., 1997, Diabetes, defective pancreatic morphogenesis, and abnormal enteroendocrine differentiation in BETA2/neuroD-deficient mice, *Genes Dev*, 11, 2323–2334.

- NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC), 2016, Worldwide trends in diabetes since 1980: a pooled analysis of 751 population-based studies with 4.4 million participants, *Lancet*, 387, 1513-1530.
- Nemoto, T., Miyazaki, S., Kanai, T., Maruta, T., Satoh, S., Yoshikawa, N., Yanagita, T., Wada, A., 2010, Nav1.7-Ca²⁺ influx-induced increased phosphorylations of extracellular signal-regulated kinase (ERK) and p38 attenuate tau phosphorylation via glycogen synthase kinase-3 β : priming of Nav1.7 gating by ERK and p38, *Eur J Pharmacol*, 3, 20-28.
- Nguyen, K.T., Tajmir, P., Lin, C.H., Liadis, N., Zhu, X.D., Eweida, M., Tolasa-Karaman, G., Cai, F., Wang, R., Kitamura, T., Belsham, D.D., Wheeler, M.B., Suzuki, A., Mak, T.W., Woo, M., 2006, Essential role of Pten in body size determination and pancreatic beta-cell homeostasis in vivo, *Mol Cell Biol*, 26, 4511-4518.
- Ning, K., Miller, L.C., Laislaw, H.A., Burgess, L.A., Perera, N.M., Downes, C.P., Leslie, N.R., Ashford, M.L. 2006. "A novel leptin signalling pathway via PTEN inhibition in hypothalamic cell lines and pancreatic β -cells", *EMBO Journal*, 25, 2377-2387.
- Nishimura, W., Kondo, T., Salameh, T., El Khattabi, I., Dodge, R., Bonner-Weir, S., Sharma, A., 2006, A switch from MafB to MafA expression accompanies differentiation to pancreatic beta-cells, *Dev Biol*, 293, 526-39.
- Ochi, H., Sakagami, K., Ishii, A., Morita, N., Nishiuchi, M., Ogino, H., Yasuda, K., 2004, Temporal expression of L-Maf and RaxL in developing chicken retina are arranged into mosaic pattern, *Gene Expr Patterns*, 4, 489-494.
- Offield, M.F., Jetton, T.L., Labosky, P.A., Ray, M., Stein, R.W., Magnuson, M.A., Hogan, B.L., Wright, C.V. 1996. "PDX-1 is required for pancreatic outgrowth and differentiation of the rostral duodenum", *Development*, 122, 983-995.
- Okamoto, H., Hribal, M.L., Lin, H.V., Bennet, W.R., Ward, A., Accili, D., 2006, Role of the forkhead protein Foxo1 in β -cell compensation to insulin resistance, *Journal of Clinical Investigation*, 116, 775-782.
- Ouyang, M., Lu, S., Kim, T., Chen, C.E., Seong, J., Leckband, D.E., Wang, F., Reynolds, A.B., Schwartz, M.A., Wang, Y., 2013, N-cadherin regulates spatially polarized signals through distinct p120^{cas} and β -catenin-dependent signalling pathways, *Nat Commun*, 4, 1589.
- Owerbach, D., Bell, I.G., Rutter, W.J., Shows, T.B., 1980, The insulin gene is located on chromosome 11 in humans, *Nature*, 5768, 82-84.
- Pagliuca, F.W., Melton, D.A., 2013, How to make a functional β -cell. *Development*, 140, 2472-2483.
- Pellegrini, S., Ungaro, F., Mercalli, A., Melzi, R., Sebastiani, G., Dotta, F., Broccoli, V., Piemonti, L., Sordi, V., 2015, Human induced pluripotent stem cells differentiate into insulin-producing cells able to engraft in vivo, *Acta Diabetol*, 52, 1025-1035.
- Prada, P.O., Quaresma, P.G., Caricilli, A.M., Santos, A.C., Guadagnini, D., Morari, J., Weissmann, L., Ropelle, E.R., Carvalheira, J.B., Velloso, L.A., Saad, M.J., 2013, Tub

has a key role in insulin and leptin signaling and action in vivo in hypothalamic nuclei, *Diabetes*, 62, 137-148.

- Prada, P.O., Zecchin, H.G., Gasparetti, A.L., ve diğ. 2005, Western diet modulates insulin signaling, c-Jun N-terminal kinase activity, and insulin receptor substrate-1 ser307 phosphorylation in a tissue-specific fashion, *Endocrinology*, 146,1576–1587.
- Price, M.,1993, Members of the Dlx- and Nkx2-gene families are regionally expressed in the developing forebrain, *J Neurobiol*, 24 , 1385–1399.
- Renström, F., Burén, J., Svensson, M., Eriksson, J.W., 2007, Insulin resistance induced by high glucose and high insulin precedes insulin receptor substrate 1 protein depletion in human adipocytes, *Metabolism*, 56, 190-198.
- Roberts, D.J., Johnson, R.L., Burke, A.C., Nelson, C.E., Morgan, B.A., Tabin, C., 1995, Sonic hedgehog is an endodermal signal inducing Bmp-4 and Hox genes during induction and regionalization of the chick hindgut, *Development*. 121, 3163–3174.
- Roberts, D.J., Smith, D.M., Goff, D.J., Tabin, C.J., 1998, Epithelial-mesenchymal signaling during the regionalization of the chick gut, *Development*. 125, 2791–2801.
- Rossi, D.J., Jamieson, C.H., Weissman, I.L., 2008, Stems cells and the pathways to aging and cancer, *Cell*, 132, 681–696.
- Rudnick, A., Ling, T.Y., Odagiri, H., Rutter, W.J., German, M.S., 1994, Pancreatic beta cells express a diverse set of homeobox genes, *Proc Natl Acad Sci USA*, 91 , 12203–12207.
- Rutter, G.A., 2001, Nutrient-secretion coupling in the pancreatic islet beta-cell: recent advances, *Mol Aspects Med*, 6, 247-84.
- Sachithanandan, N., Fam, B.C., Fynch, S., Dzamko, N., Watt, M.J., Wormald, S., Honeyman, J., Galic, S., Proietto, J., Andrikopoulos, S., ve diğ., 2010, Liver-specific suppressor of cytokine signaling-3 deletion in mice enhances hepatic insulin sensitivity and lipogenesis resulting in fatty liver and obesity, *Hepatology*, 52, 1632–1642.
- Sahu, A., 2011, Intracellular Leptin-Signaling Pathways in Hypothalamic Neurons: The Emerging Role of Phosphatidylinositol-3 Kinase-Phosphodiesterase-3B-cAMP Pathway, *Neuroendocrinology*, 93, 201-210.
- Saltiel, A.R., Kahn, C.R., 2001, Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism, *Nature*, 414, 799–806.
- Sander, M., Neubuser, A., Kalamaras, J., Ee, H.C., Martin, G.R., German, M.S., 1997, Genetic analysis reveals that PAX6 is required for normal transcription of pancreatic hormone genes and islet development, *Genes Dev*,11 , 1662–1673.
- Sander, M., Sussel, L., Connors, J., Scheel, D., Kalamaras, J., Dela Cruz, F., Schwitzgebel, V., Hayes-Jordan, A., German, M., 2000, Homeobox gene Nkx6.1 lies downstream of Nkx2.2 in the major pathway of beta-cell formation in the pancreas, *Development*, 127, 5533–5540

- Santagata, S., Boggon, T.J., Baird, C.L., ve diğ., 2001, G-protein signaling through tubby proteins, *Science*, 292, 2041–2050.
- Santos-Silva, J.C., Carvalho, C.P., de Oliveira, R.B., Boscherio, A.C., Collares-Buzato, C.B., 2012, Cell-to-cell contact dependence and junctional protein content are correlated with in vivo maturation of pancreatic beta cells, *Can J Physiol Pharmacol*, 90, 837-850.
- Sart, S., Agathos, S.,N., Li, Y., 2013, Process Engineering of Stem Cell Metabolism for Large Scale Expansion and Differentiation in Bioreactors, *Biochem Engineering J*, 84, 74-82.
- Schäffer, L., Brand, C.L., Hansen, B.F., Ribel, U., Shaw, A.C., Slaaby, R., Sturis, J., 2008, A novel high-affinity peptide antagonist to the insulin receptor, *Biochem Biophys Res Commun*, 376, 380-383.
- Seměnov, M.V., Zhang, X., He, X., 2008, DKK1 antagonizes Wnt signaling without promotion of LRP6 internalization and degradation, *J Biol Chem*, 283, 21427-32.
- Seufert, J., 2004, Leptin effects on pancreatic β -cell gene expression and function, *Diabetes*, 53, 152-158.
- Seufert, J., Kieffer, T.J., Leech, C.A., Holz, G.G., Moritz, W., Ricordi, C., Habener, J.F., 1999, Leptin suppression of insulin secretion and gene expression in human pancreatic islets: implications for the development of adipogenic diabetes mellitus, *J Clin Endocrinol Metab*, 84, 670–676.
- Seuring, T., Archangelidi, O., Suhrcke, M., 2015, The economic costs of type 2 diabetes: a global systematic review, *Pharmacoeconomics*, 33, 811–831.
- Shi, Q., Luo, S., Jia, H., Feng, L., Lu, X., Zuhou, L., Cai, J., 2013, Wnt/ β -katenin signaling may be involved with the maturation, but not the differentiation, of insulin-producing cells, *Biomedicine and pharmacotherapy*, 67, 745-750.
- Shyh-Chang, N., Daley, G. Q., Cantley, L. C., 2013, Stem cell metabolism in tissue development and aging, *Development*, 140, 2535–2547.
- Smith, S.B., Gasa, R., Watada, H., Wang, J., Griffen, S.C., German, M.S., 2003, Neurogenin3 and hepatic nuclear factor 1 cooperate in activating pancreatic expression of Pax4, *J Biol Chem*, 278, 38254–38259
- Smith, A.,G., 2001, Embryo-derived stem cells: of mice and men, *Annu Rev Cell Dev Biol*, 17, 435-462.
- Sosa-Pineda, B., 2004, The gene Pax4 is an essential regulator of pancreatic beta-cell development, *Mol Cells*, 18 , 289–294.
- Stanger, B.Z., Stiles, B., Lauwers, G.Y., Bardeesy, N., Mendoza, M., Wang, Y., Greenwood, A., Cheng, K.H., McLaughlin, M., Brown, D., Depinho, R.A., Wu, H., Melton, D.A., Dor, Y., 2005, Pten constrains centroacinar cell expansion and malignant transformation in the pancreas, *Cancer cell*, 8, 185–195.

- Steiner, D.F., et al., 1996, The role of prohormone convertases in insulin biosynthesis: evidence for inherited defects in their action in man and experimental animals, *Diabetes Metab*, 2, 94-104.
- Stiles, B.L., Kuralwalla-Martinez, C., Guo, W., ve diğ., 2006., Selective deletion of Pten in pancreatic β cells leads to increased islet mass and resistance to STZ-induced diabetes, *Molecular and Cellular Biology*, 26, 2772–2781.
- St-Onge, L., Sosa-Pineda, B., Chowdhury, K., Mansouri, A., Gruss, P., 1997, Pax6 is required for differentiation of glucagon-producing alpha-cells in mouse pancreas, *Nature* . 387 , 406–409.
- Su, H., Jiang, L., Carter-Su, C., Rui, L., 2012, Glucose enhances leptin signaling through modulation of AMPK activity, *PLoS One*, 31636.
- Suda, T., Takubo, K., Semenza, G. L., 2011, Metabolic regulation of hematopoietic stem cells in the hypoxic niche. *Cell Stem Cell*, 9, 298–310.
- Sun, J., Khalid, S., Rozakis-Adcock, M., Fantus, I.G., Jin, T., 2009, P-21-activated protein kinase-1 functions as a linker between insulin and Wnt signaling pathways in the intestine, *Oncogene*, 28, 3132-3144.
- Sussel, L., Kalamaras, J., Hartigan-O'Connor, D.J., Meneses, J.J., Pedersen, R.A., Rubenstein, J.L., German, M.S., 1998, Mice lacking the homeodomain transcription factor Nkx2.2 have diabetes due to arrested differentiation of pancreatic beta cells, *Development*, 125, 2213–2221
- Taniguchi, C.M., Emanuelli, B., Kahn, C.R., 2006, Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7, 85-96.
- Teo, J.L., Ma, H., Nguyen, C., Lam, C., Kahn, M., 2005, Proceedings of the National Academy of Science, USA, 102, 12171-12176.
- Turque, N., Plaza, S., Radvanyi, F., Carriere, C., Saule, S., 1994, Pax-QNR/Pax-6, a paired box and homeobox-containing gene expressed in neurons, is also expressed in pancreatic endocrine cells, *Mol Endocrinol*, 8 , 929–938.
- Tuttle, R.L., Gill, N.S., Pugh, W., Lee, J.P., Koeberlein, B., Furth, E.E., Polonsky, K.S., Naji, A., Birnbaum, M.J., 2001, Regulation of pancreatic β -cell growth and survival by the serine/threonine protein kinase Akt1/PKBa, *Nature Medicine*, 7, 1133-1137.
- Ueki, K., Kondo, T, Kahn, C.R., 2004, Suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS-1) and SOCS-3 cause insulin resistance through inhibition of tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins by discrete mechanisms, *Mol Cell Biol* 24, 5434–5446.
- Um, S., Choi, J.R., Lee, J.H., Zhang, Q., Seo, B., 2011, Effect of leptin on differentiation of human dental stem cells, *Oral Diseases*, 17, 662-669.

- Um, S.H., Frigerio, F., Watanabe, M., Picard, F., Joaquin, M., Sticker, M., Fumagalli, S., Allegrini, P.R., Kozma, S.C., Auwerx, J. ve diğ., 2004, Absence of S6K1 protects against age- and diet-induced obesity while enhancing insulin sensitivity, *Nature*, 431, 200–205.
- van Vliet-Ostaptchouk, J.V., Onland-Moret, N.C., Shiri-Sverdlov, R., van Gorp, P.J., Custers, A., Peeters, P.H., Wijmenga, C., Hofker, M.H., van der Schouw, Y.T., 2008, Polymorphisms of the TUB gene are associated with body composition and eating behavior in middle-aged women, *PLoS One*, 3, 1405.
- Vikram, A, Jena, G., 2010, S961, an insulin receptor antagonist causes hyperinsulinemia, insulin-resistance and depletion of energy stores in rats, *Biochem Biophys Res Commun*, 398, 260-265.
- Walther, C., Guenet, J.,L., Simon, D., Deutsch, U., Jostes, B., Goulding, M.,D., Plachov, D., Balling, R., Gruss, P., 1991, Pax: a murine multigene family of paired box-containing genes, *Genomics*, 11, 424-434.
- Wanet, A., Arnould, T., Najimi, M., Renard, P., Connecting Mitochondria, Metabolism, and Stem Cell Fate, *Stem Cells Dev*, 24, 1957-71.
- Wang, J., Elghazi, L., Parker, S.E., Kizilocak, H., Asano, M., Sussel, L., Sosa-Pineda, B., 2004, The concerted activities of Pax4 and Nkx2.2 are essential to initiate pancreatic beta-cell differentiation, *Dev Biol*, 266, 178–189
- Wang, L., Liu, Y., Yan Lu S, Nguyen, K.T., Schroer, S.A., Suzuki, A., Mak, T.W., Gaisano, H., Woo, M., 2010, Deletion of PTEN in pancreatic β -cells protects against deficient β -cell mass and function in Mouse models of type 2 diabetes, *Diabetes*, 59, 3117-3126.
- Wang, Y., Seburn, K., Bechtel, L., Lee, B.Y., Szatkiewicz, J.P., Nishina, P.M., Naggert, J.K., 2006, Defective carbohydrate metabolism in mice homozygous for the tubby mutation, *Physiol Genomics*, 27, 131-40.
- Weir, G.C., Bonner-Weir, S., 2004, Five Stages of Evolving Beta-Cell Dysfunction During Progression to Diabetes, *Diabetes*, 53, 16–210.
- Weir, G.C., Laybutt, D.R., Kaneto, H., Bonner-Weir, S., Sharma, A., 2001, β -cell adaptation and decompensation during the progression of diabetes, *Diabetes*, 50, S154-S159.
- Weissman, I. L., Anderson, D.,J., Gage, F., 2001, Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. *Annu, Rev. Cell Dev. Biol*, 17, 387–403
- Wijesekara, N., Konrad, D., Eweida, M., Jefferies, C., Liadis, N., Giacca, A., Crackower, M., Suzuki, A., Mak, T.W., Kahn, C.R., Klip, A., Woo, M., 2005, Muscle-specific Pten deletion protects against insulin resistance and diabetes, *Molecular and Cell Biology*, 25, 1135-1145.

- Yue, R., Zhou, B., O., Shimada, I., S., Zhao, Z., Morrison, S., J., 2016, Leptin Receptor Promotes Adipogenesis and Reduces Osteogenesis by Regulating Mesenchymal Stromal Cells in Adult Bone Marrow, *Cell Stem Cell*, 18, 782-796.
- Zhang, E.E., Chapeau, E., Hagihara, K., Feng, G-S., 2004, Neuronal Shp2 tyrosine phosphatase controls energy balance and metabolism, *PNAS*, 101, 16064–16069.
- Zhao, Y., Tian, W., Peng, W., 2014, Anti-proliferation and Insulin Resistance Alleviation of Hepatocellular Carcinoma Cells HepG2 in Vitro by Chinese Propolis, *Journal of Food and Nutrition Research*, 2, 228-235.