

**T.C.  
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**



**MYOD TRANSAKTİVATÖR BÖLGESİNİN BETA HÜCRESİ OLUŞUMU  
ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Pelin ÜNAL**

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ**

**ANABİLİM DALI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TEMMUZ 2018**

**ANTALYA**

**T.C.  
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**



**MYOD TRANSAKTİVATÖR BÖLGESİNİN BETA HÜCRESİ OLUŞUMU  
ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Pelin ÜNAL**

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ**

**ANABİLİM DALI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TEMMUZ 2018**

**ANTALYA**

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

**MYOD TRANSAKTİVATÖR BÖLGESİNİN BETA HÜCRESİ OLUŞUMU  
ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Pelin ÜNAL**

**TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ**

**ANABİLİM DALI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Bu tez Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından FBA-2016-  
1722 nolu proje ile desteklenmiştir.**

**TEMMUZ 2018**

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

**MYOD TRANSAKTİVATÖR BÖLGESİNİN BETA HÜCRESİ OLUŞUMU  
ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Pelin ÜNAL**

**TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ**

**ANABİLİM DALI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

Bu tez 27 /07 /2018 tarihinde jüri tarafından Oybirliği ile kabul edilmiştir.

**JÜRİ:** Dr. Öğr. Üyesi Ersin AKINCI (Danışman)

Prof. Dr. Nedim MUTLU

Dr. Öğr. Üyesi Erdal EROĞLU

## ÖZET

### MYOD TRANSAKTİVATÖR BÖLGESİNİN BETA HÜCRESİ OLUŞUMU ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Pelin ÜNAL

Yüksek Lisans Tezi, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Ersin AKINCI

Temmuz 2018; 49 sayfa

İnsülin, pankreastaki beta hücrelerinden salgılanan ve kanda bulunan glukozun hücre içine girmesini sağlayan bir hormondur. İnsülinin olmamasından dolayı meydana gelen metabolik değişiklikler oksidatif strese neden olur ve diyabet gibi hastalıklar oluşur. Beta hücresi programlama deneylerinde kullanılan üç ana gen, *Pdx1*, *Ngn3* ve *MafA*, beta hücre fonksiyonunun ve yapısının kazanılması için önemli transkripsiyon faktörlerdir. *MyoD*, iskelet miyogenezinden sorumlu bir transkripsiyon faktörüdür ve kas hücresi oluşumuna neden olan güçlü bir transaktivatör domainine (TAD) sahiptir. Bu çalışmada *MyoD* transaktivatör domaininin beta hücresi programlanması üzerindeki etkisi araştırılmıştır. *MyoD* transaktivatör domaini ( $m_3$ ) farklı kombinasyonlarla *Pdx1(P)*, *Ngn3(N)* ve *MafA(M)* genleri ile tek bir promoter altında 2A peptidi kullanılarak birleştirilmiştir. Birleştirilerek oluşturulan ( $m_3N$ )PM, ( $Nm_3$ )PM,  $N(m_3P)M$ ,  $N(Pm_3)M$  ve  $NPM$  yapıları adenovirüs aracılığıyla AR42J-B13 hücrelerine transfekte edilmiştir. Bütün hücrelerde insülin hormonu üretimi gözlenmiş fakat  $N(Pm_3)M$  adenovirüsü hücrelerde ölümlere ve hücre nükleus yapısının bozulmasına neden olmuştur.  $NPM$  yapısı hücrelerin %70'inde insülin üretimine neden olurken ( $m_3N$ )PM yapısı %86 oranı ile en iyi sonucu vermiştir. *MyoD* transaktivatör domaininin *Ngn3* geninin N-terminaline eklendiğinde daha yüksek oranda bir hücre programlamasına neden olduğu tespit edilmiştir. Beta hücresi programlanmasında *Pdx1*, *Ngn3* ve *MafA* genlerine ek olarak *MyoD* transaktivatör domaini kullanılması, düşük verimle farklılaşan hücre tiplerinin daha fazla oranda programlanmasına olanak sağlamıştır.

**ANAHTAR KELİMELER:** Beta Hücre Programlaması, Diyabet, İnsülin, *MafA*, *MyoD*, *Ngn3*, *Pdx1*, Transaktivatör Domain.

**JÜRİ:** Dr. Öğr. Üyesi Ersin AKINCI

Prof. Dr. Nedim MUTLU

Dr. Öğr. Üyesi Erdal EROĞLU

## ABSTRACT

### THE INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF MYOD TRANSACTIVATOR DOMAIN ON BETA CELL FORMATION

**Pelin ÜNAL**

**MSc Thesis in The Department of Agricultural Biotechnology**

**Supervisor: Asst. Prof. Dr. Ersin AKINCI**

**July 2018; 49 pages**

Insulin is a hormone secreted by the beta cells in the pancreas that allows glucose to enter the cells. Metabolic changes, which are caused by the lack of insulin, cause oxidative stress and diabetes. The main three genes used in beta cell programming experiments, *Pdx1*, *Ngn3* and *MafA*, are important transcription factors for the acquisition of beta cell function and structure. *MyoD* is a major transcription factor responsible for skeletal myogenesis and has a strong transactivator domain that causes muscle cell formation. In this study, the effect of *MyoD* transactivator domain on transdifferentiation was investigated. *MyoD* transactivator domain ( $m_3$ ) is combined with *Pdx1* (*P*), *Ngn3* (*N*) and *MafA* (*M*) genes in different combinations using 2A peptide under a single promoter. ( $m_3N$ )*PM*, (*Nm*<sub>3</sub>)*PM*, *N*( $m_3P$ )*M*, *N*(*Pm*<sub>3</sub>)*M* and *NPM* constructs were transferred to AR42J-B13 cells through adenoviruses. Insulin hormone production was observed in all cells, though adenovirus *N*(*Pm*<sub>3</sub>)*M* caused death in cells and cell structure deterioration. *NPM* construct stimulated 70% of the cells to produce insulin, while ( $m_3N$ )*PM* construct stimulated 86% of the cells to produce insulin. It was demonstrated that MyoD transactivator domain causes a higher cell programming rate when MyoD TAD domain is linked to N-terminus of *Ngn3* gene. The use of MyoD transactivator domain in addition to *Pdx1*, *Ngn3* and *MafA* genes in beta cell programming allowed for more programmed cell types to be programmed at low rates.

**KEYWORDS:** Beta Cell Programming, Diabetes, Insulin, *MafA*, *MyoD*, *Ngn3*, *Pdx1*, Transactivator Domain.

**COMMITTEE:** Asst. Prof. Dr. Ersin AKINCI

Prof. Dr. Nedim MUTLU

Asst. Prof. Dr. Erdal EROĞLU

## ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim boyunca beni maddi, manevi ve bilgi yönünden destekleyen, bu çalışmanın projelendirilmesinde ve yapılmasında büyük emeği geçen danışanım Dr. Öğr. Üyesi Ersin AKINCI'ya teşekkürlerimi sunarım.

Bu süre boyunca her zaman yanımda olan, maddi-manevi olarak her zaman beni destekleyen, beraber projeler yaptığım, her gün aynı laboratuvarı paylaştığım ekip arkadaşlarım doktora öğrencisi Mehmet YILDIZ'a ve yüksek lisans öğrencisi Gamze BADAĞUL'a çok teşekkür ederim. Çalışmalarımda yardım ettiği için yüksek lisans öğrencisi Adem KABA'ya, projede çalışırken yanımda olan ve destekleyen bütün arkadaşlarıma, bölümümüzde bana inanan bütün hocalarıma teşekkür ederim.

Son olarak, akademi dünyasına adım atmamda engel olmayıp her türlü imkanı sağlayan, benim kararlarıma saygı gösteren annem Fatma YILMAZ ve babam Nuri YILMAZ'a, teyzem İlhan TOSUN ve ailesine çok teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
AKADEMİK BEYAN .....	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	x
1. GİRİŞ .....	1
2. KAYNAK TARAMASI .....	1
3. MATERYAL VE METOT .....	3
3.1. Kullanılan Materyaller .....	3
3.2. Plazmit DNA'ların Hazırlanması .....	5
3.2.1. LB-katı ve LB-sıvı besiyerlerinin hazırlanması .....	5
3.2.2. <i>E.coli</i> dam <sup>-</sup> /dcm <sup>-</sup> kompetent hücresi.....	6
3.2.3. DNA'nın kompetent hücreye transformasyonu.....	6
3.2.4. Plazmit izolasyonu.....	6
3.2.5. Kesim enzim ürünlerinin jelden izolasyonu .....	7
3.2.6. Kesim enzim ürünlerinin filtre kullanılarak purifiye edilmesi .....	7
3.3. 2A Peptid dizisinin pX1 Plazmitine Aktarılması .....	7
3.3.1. pX1 plazmitinin <i>Sall</i> ve <i>NotI</i> kesim enzimleri ile kesilmesi .....	7
3.3.2. 2A-Peptid dizisinin <i>Sall</i> ve <i>NotI</i> kesim enzimleri ile kesilmesi.....	8
3.3.3. pX1 plazmiti ile 2A peptid dizisinin ligasyonu .....	8
3.4. <i>MyoD</i> TAD ( $m_3$ ) Eklenen <i>Pdx1</i> , <i>Ngn3</i> ve <i>MafA</i> Genlerinin 2A Peptid Dizisi ile Birleştirilmesi .....	8
3.4.1. Kesim enzimleri kullanılarak TF genlerinin plazmitten çıkarılması.....	8
3.4.2. TF genlerinin 2A peptid dizisi ile birleştirilmesi.....	9
3.5. 2A Peptid Dizisi ile Birleştirilen Yapıların pENTR-2B Plazmitine Aktarılması.....	11
3.5.1. pENTR-2B plazmitinin çoğaltılması .....	11
3.5.2. pENTR-2B plazmitinin <i>Sall</i> ve <i>NotI</i> kesim enzimleri ile kesilmesi.....	11



3.5.3. Birleştirilen TF genlerinin <i>SalI</i> ve <i>NotI</i> kesim enzimleri ile kesilmesi .....	12
3.5.4. pENTR-2B plazmiti ile yapıların ligasyonu .....	12
3.6. pENTR-2B ile pAd/CMV/V5-DEST Plazmitinin Rekombinasyonu ve <i>PacI</i> Enzimi ile Linerize Edilmesi .....	12
3.6.1. LR Clonase II enzimi ile rekombinasyon .....	12
3.6.2. <i>PacI</i> enzimi ile rekombinasyon ürünlerinin linerizasyonu .....	13
3.7. Adenovirüs pDNA'larının AD-293 Hücrelerine Transfeksiyonu, Adenovirüslerin Hücrelerden Purifikasyonu ve Titrelerinin Ölçülmesi .....	14
3.7.1. Hücrelerin çoğaltılması .....	14
3.7.2. Adenovirüs pDNA'ların transfeksiyonu .....	15
3.7.3. Adenovirüs pDNA'ların çoğaltılması ve adenovirüs purifikasyonu .....	15
3.7.4. Adenovirüslerin titrelerinin belirlenmesi .....	16
3.8. PDX1, NGN3 ve MAFA Proteinlerinin İmmünoboyama ile Tespiti .....	17
3.8.1. Anti-Pdx1, Anti-Ngn3 ve Anti-MafA antikoru ile immünoboyama .....	17
3.9. Adenovirüslerin Uygun MOI'larının Belirlenmesi .....	17
3.9.1. Anti-İnsülin antikoru ile immünoboyama .....	18
4. BULGULAR VE TARTIŞMA .....	19
5. SONUÇLAR .....	28
5. KAYNAKLAR .....	30
ÖZGEÇMİŞ	

## AKADEMİK BEYAN

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “MyoD Transaktivatör Bölgesinin Beta Hücreleri Oluşumu Üzerine Etkilerinin Araştırılması” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

27/ 07/ 2018

Pelin ÜNAL

## SİMGELER VE KISALTMALAR

### **Simgeler**

$\mu\text{L}$	: mikrolitre
bp	: baz çifti
dk	: dakika
g	: gram
kb	: kilobaz
M	: molar
mg	: miligram
mL	: mililitre
mM	: milimolar
ng	: nanogram
nm	: nanometre
$^{\circ}\text{C}$	: santigrat
rpm	: dakikadaki devir sayısı
sn	: saniye
V	: volt

### **Kısaltmalar**

Ad	: Adenovirüs
Amp	: Amfisilin
BSA	: Sığır Serum Albumin
DBD	: DNA Bağlanma Domaini
dH <sub>2</sub> O	: Distile Su
DM	: Diyabet Mellitus

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DNA : Deoksiribo Nükleik Asit

EDTA : Etilendiamin Tetra Asetik Asit

FBS : Fetal Bovin Serum

IPSC : İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücre

Kan : Kanamisin

LB : Luria-Bertani

*MafA* : *V-Maf Musculoaponeurotic Fibrosarcoma Oncogene Family, Protein A*

MOI : Enfeksiyon çokluğu

*MyoD* : *Myogenic Differentiation 1*

NEB : New England Biolabs

*Ngn3* : *Neurogenin 3*

O.D. : Optik Dansite

*Oct4* : *Octamer-Binding Transcription Factor 4*

ORF : Open Reading Frame

PBS : Phosphate Buffered Saline

PCR : Polimeraz Zincir Reaksiyonu

*Pdx1* : *Pancreatic and Duodenal Homeobox 1*

RNA : Ribo Nükleik Asit

S.O.C : Super Optimal Broth

TAD : Transkripsiyonel Aktivasyon Domaini

TAE : Tris-Asetik Asit-Edta

TF : Transkripsiyon Faktörü

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b>Şekil.1A.</b> Ad- <i>NPM</i> virüsünün sırasıyla Anti-Pdx1, Anti-Ngn3, Anti-MafA (yeşil) ve DAPI (mavi) immünoboyama sonuçları .....	21
<b>Şekil.1B.</b> Ad-( <i>m<sub>3</sub>N</i> ) <i>PM</i> virüsünün sırasıyla Anti-Pdx1, Anti-Ngn3, Anti-MafA (yeşil) ve DAPI (mavi) immünoboyama sonuçları .....	22
<b>Şekil.1C.</b> Ad-( <i>Nm<sub>3</sub></i> ) <i>PM</i> virüsünün sırasıyla Anti-Pdx1, Anti-Ngn3, Anti-MafA (yeşil) ve DAPI (mavi) immünoboyama sonuçları .....	23
<b>Şekil.1D.</b> Ad- <i>N(Pm<sub>3</sub>)M</i> virüsünün sırasıyla Anti-Pdx1, Anti-Ngn3, Anti-MafA (yeşil) ve DAPI (mavi) immünoboyama sonuçları .....	24
<b>Şekil.1E.</b> Ad- <i>N(m<sub>3</sub>P)M</i> virüsünün sırasıyla Anti-Pdx1, Anti-Ngn3, Anti-MafA (yeşil) ve DAPI (mavi) immünoboyama sonuçları .....	25
<b>Şekil.2A.</b> Farklı MOI'larda Ad- <i>NPM</i> virüslerinin AR42J-B13 hücrelerinde İnsülin üretme yüzdeleri.....	26
<b>Şekil.2B.</b> Farklı MOI'larda Ad-( <i>m<sub>3</sub>N</i> ) <i>PM</i> virüslerinin AR42J-B13 hücrelerinde İnsülin üretme yüzdeleri.....	26
<b>Şekil.2C.</b> Farklı MOI'larda Ad-( <i>Nm<sub>3</sub></i> ) <i>PM</i> virüslerinin AR42J-B13 hücrelerinde insülin üretme yüzdeleri .....	27
<b>Şekil.2D.</b> Farklı MOI'larda Ad- <i>N(m<sub>3</sub>P)M</i> virüslerinin AR42J-B13 hücrelerinde insülin üretme yüzdeleri .....	27
<b>Şekil.3.</b> Adenovirüslerin AR42J-B13 hücrelerinin nükleusları üzerindeki etkileri.....	28
<b>Şekil.4.</b> Ad-( <i>m<sub>3</sub>N</i> ) <i>PM</i> , Ad- <i>NPM</i> , Ad-( <i>Nm<sub>3</sub></i> ) <i>PM</i> ve Ad- <i>N(m<sub>3</sub>P)M</i> virüslerinin AR42J-B13 hücrelerinde Anti-İnsülin (yeşil) ve DAPI (mavi) antikorları ile immünoboyama sonucu .....	29

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge.1. Materyallerin Katalog Bilgileri.....	5
---	---

## 1.GİRİŞ

Pankreasta birbirinden hem morfolojik hem de fonksiyonel olarak farklı iki doku/bölge bulunur. Bunlardan biri olan ekzokrin pankreas, sindirim enzimlerini salgılayan hücreleri içerirken; endokrin pankreas ise besin metabolizmasını ve glukoz homeostazını düzenleyen hormonları salgılayan hücreleri içerir (Pan ve Wright 2011). Endokrin pankreas beş farklı endokrin hücre tipinden oluşur ve bu hücreler Langerhans adacığı olarak bir arada bulunurlar. Endokrin hücreleri; glukagon salgılayan alfa hücrelerini, somatostatin salgılayan D-hücrelerini, ghrelin salgılayan epsilon hücrelerini, pankreatik polipeptid üreten PP-hücrelerini ve insülin salgılayan beta hücrelerini tanımlar (Shih 2013). Özellikle insülin ve glukagon hormonlarının önemi fazladır. Bu iki hormon birlikte karbonhidrat mekanizmasında görev alırlar. İnsülin, polipeptid yapıda bir hormon olup hücre yüzeyinde ilgili reseptörüne bağlanarak kanda bulunan glukozun hücre içine girmesini sağlar. Ayrıca yağ ve protein metabolizmaları üzerinde de etkilidir. İnsülin eksikliğinden dolayı meydana gelen metabolik değişiklikler oksidatif strese neden olur ve diyabet oluşur (Ünal 2012). Pankreasın yapısını bilmek; diyabet, pankreatit ve pankreatik adenokarsinoma gibi pankreatik hastalıkların tedavisinde kök hücre uygulamalarına, hücre farklılaştırma ve gen terapilerine olanak sağlamaktadır.

Gelişim sürecinde aynı genoma sahip olan hücreler pluripotent durumdan spesifik genlerin aktivasyonu ile farklılaşırlar. Günümüzde bu spesifik faktörlerin tanımlanması ile bir hücre pluripotent hücre ya da başka bir hücre tipine dönüştürülebilir. Özellikle yetişkin somatik hücreleri medikal olarak önemli olan kardiyomyosit, nöron, pankreatik beta gibi hücre tiplerine dönüştürülebilir. Yetişkin farklılaşmış hücreler ayrıca kararlı yapıda oldukları için bir daha farklılaşmamaları beklenir ve transplantasyon için kullanılabilirler (Zhou ve Melton 2008). Diyabet mellitus (DM), global bir hastalıktır. Beta hücre popülasyonunun kaybından dolayı insülin hormonunun üretilmemesi ve dolayısıyla kanda ki glukoz miktarının fazla olmasıdır (Bluestone 2010). Bir diyabet hastasında oluşan beta hücre popülasyonu kaybı, hücre farklılaştırması yapılarak yerine konulabilir (Weir 2013).

Pankreas gelişimi boyunca, farklı gelişim evrelerinde, çeşitli transkripsiyon faktörleri spesifik olarak eksprese olur. Farelerde yapılan gen inaktivasyon deneyleri *Pdx1* (*pancreatic and duodenal homeobox 1*) geninin pankreas gelişimi ve beta hücresi düzenlenmesinde önemini göstermiştir. *Pdx1* geninin yokluğunda pankreas gelişimi gözlenmemiştir (Ahlgren 1998). Buna ek olarak Zhou ve ekibinin yaptıkları farklılaştırma deneyleri de bu bilgiyi güçlendirmiştir. Pankreasta eksprese olan 30 adet transkripsiyon faktörünün pankreas oluşumuna etkisini inceleyerek, *Pdx1* genine ek olarak *Ngn3* ve *MafA* genlerinin de beta hücresi farklılaşmasında ana transkripsiyonel faktörler olduğunu keşfetmişlerdir. Asınar hücrelerine belirtilen üç ana faktörü verdiklerinde beta hücrelerine farklılaşma olmuştur (Zhou 2008). Her bir faktör farklılaştırma deneylerinde kullanıldıklarında pankreasın diğer endokrin hücrelerine

farklılaşma gerçekleşmiştir. Asinar hücrelerine NGN3 faktörü verildiğinde epsilon-benzeri hücreler oluşurken, NGN3 ve MAFA faktörleri verildiğinde alfa-benzeri hücreler oluşmuştur (Li 2014). Bu nedenle PDX1, NGN3 ve MAFA transkripsiyonel faktörlerinin birlikte kullanılması beta hücresi farklılaşması için önemlidir.

*Pdx1*, bütün pankreatik hücre tiplerinin oluşmasında ve beta hücre adacığının aktivitesinin düzenlenmesinde ana transkripsiyonel faktördür. İlk olarak gelişmekte olan primordiumdan salgılanır ve organ şeklinin oluşmasında kritik rolü vardır (Offield 1996). *Pdx1* geninde oluşturulan bir nokta mutasyon, genin ifade edilememesine ve bu durumda pankreas agenezine neden olmuştur (Stoffers 1997). Yapılan bu çalışma pankreas oluşumunda *Pdx1* geninin önemini göstermiştir. *Ngn3* (*Neurogenin 3*) geni pankreasta hormon salgılayan endokrin hücrelerinin özelleşmesi için gerekli olan önemli bir transkripsiyon faktörüdür. Ayrıca yetişkin asinar hücrelerinde de aktif olarak eksprese edilir (Shamblott 2016). *Ngn3*, 9.5 embriyonik gününde (E9.5) aktif olurken 13.5 embriyonik gününde (E13.5) azalmaya başlar ve doğumdan sonra aktivitesine rastlanmaz (Gradwohl 2000). Farelerde oluşturulan *Ngn3* delesyonununun dolaylı hormon salgılayan hücrelerin oluşmaması ile endokrin hücrelerinin gelişmesi için önemli olduğu doğrulanmıştır (Treff 2006). *MafA* (*v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family, protein A*) geni ise *Ngn3* geni gibi embriyonik dönemde aktif değildir. Yetişkin beta hücresinde eksprese edilen bir insülin geninin transkripsiyon faktörüdür. MAFA transaktivatör proteini insülin promoter bölgesine bağlanarak kanda bulunan glukoz seviyesine göre insülin ekspresyonunu kontrol eder. *MafA* geninin aktif olmadığı durumlarda diyabet oluşumu gözlenmiştir (Zhang 2005). Yapılan çalışmalar *MafA* geninin beta hücresi olgunlaşmasında da etkili olduğunu göstermiştir (Nishimura 2014). *MafA* pankreasta sadece beta hücresinde aktiftir ve beta hücresi belirteci olarak kullanılır. Beta hücresi olmayan bir hücrede *MafA* aktif edildiğinde insülin üretiminin tetiklendiği görülmüştür (Matsuoka 2004). Ayrıca alfa hücrelerinde *Pdx1*'in aşırı ekspresyonu tek başına bir beta hücresi programlanması gösterememişken, *MafA* ile beraber beta hücresi programlaması gözlenmiştir (Matsuoka 2017).



## 2. KAYNAK TARAMASI

Beta hücresi programlama deneylerinde kullanılan *Pdx1*, *Ngn3* ve *MafA* genleri, beta hücre fonksiyonunun ve yapısının kazanılması için önemli transkripsiyon faktörleridir. *Pdx1*, *Ngn3* ve *MafA* (PNM) genleri, yapılan çalışmalarda tek bir promoter altında 2A peptidi kullanılarak birleştirilmiştir.

2A peptidleri, 18-22 aminoasit uzunluğunda bulunan küçük peptidlerdir. İlk olarak Pikornavirüs'lerde bulunan ve sonrasında diğer virüs ve parazitlerde de keşfedilen 2A peptid sekanslarının karboksil terminallerinde yüksek korunmuş iki aminoasit vardır. Bu son iki aminoasit olan glisin ve prolin arasında doğal bir kesim olur. Ayrıca 2A peptidlerinin karboksil terminalleri korunmuş olmasına karşın amino terminalleri farklılıklar gösterir. Amino terminallerinin farklı olması tek bir vektörde farklı 2A peptidlerinin kullanılmasına olanak sağlar ve homolog rekombinasyon ihtimalini azaltır (Donnelly 2001). Yakın zamanda yapılan çalışmalarda 2A peptidinin 80S ribozomda translasyon olduktan sonra kesim olduğunu göstermişlerdir. Böylelikle bütün ökaryotik sistemlerde bu sistemin çalıştığını fakat 70S ribozom içeren prokaryotlarda çalışmadığını belirtmişlerdir (Szymczak-Workman 2012). Translasyondan sonra rekombinat proteinin karboksil terminalinde kalan peptid kısmı, Western Blot yönteminde ve immünohistokimyasal boyamalarda antikörlerin kullanılmasına olanak sağlamaktadır. Rekombinat proteinin de boyutunu büyüttüğü için yabancı proteinden ayırmakta mümkün olmaktadır (Fang 2005). Proteinlerin amino terminalinde kalan prolin aminoasitinin ise hiçbir yan etkisinin olmadığı belirtilmiştir (de Felipe 2002). 2A peptidleri alındıkları virüse göre adlandırılmışlardır. En çok kullanılan 2A peptidi FMDV (foot-and-mouth disease virus)'den alınan F2A peptididir. F2A peptidinden ayrı olarak; ERAV (equine rhinitis A virus)'den alınan E2A, PTV (porcine teschovirus-1)'den alınan P2A ve TaV (Thosea asigna virus)'den alınan T2A peptidleri kullanılmaktadır (Kim 2011). Yapılan bir çalışmada T2A peptidinin diğerlerine oranla kendini kesme verimliliğinin daha fazla olduğu gösterilmiştir (Donnelly 2001). Başka bir benzer çalışmada ise T2A ve E2A peptidlerinin yüksek verimlilikte olduğu gözlenmiştir (Szymczak 2004).

PNM genleri, polisistronik olarak *in vivo* ve *in vitro* ortamlarda farklılaştırma deneyleri için kullanılmıştır. Diyabet oluşturularak beta hücresi kaybı meydana getirilen farelerde PNM genlerini taşıyan vektör, beta hücresi karakteri gösteren ve insülin üreten hücre yapısını oluşturmuştur (Banga 2012). B13 hücre hattı, *in vitro* ortamda PNM kullanılarak ekzokrin formatından uzaklaşarak beta hücresi gibi insülin üreten endokrin bir hücreye programlanmıştır (Akıncı 2012). Ayrıca PNM adenovirüs olan bir vektör ile farelere verildiğinde asinar hücrelerinin, 10 gün boyunca beta hücresi formatını kaybetmediklerini (Cavelti-Weder 2014) ve 13 ay sonra moleküler olarak beta hücresine benzeyen hücre topluluğu oluşturduklarını göstermişlerdir (Li 2014). Fakat yapılan çalışmalarda farklılaşan hücre veriminin az olduğu belirtilmektedir. Hirai ve

arkadaşlarına göre (2010), heterkromatin yapısından dolayı, dışarıdan eklenen transaktivatör faktörlerinin hedef DNA sekansına ulaşamamaları bunun temel nedenidir.

Transaktivatör faktörleri en az iki domain içerirler; DNA'ya bağlanma domaini (DBD) ve transkripsiyonel aktivasyon domaini (TAD). DBD, transaktivatör faktörünü DNA'ya yönlendirir ve spesifik olarak bir diziye bağlanır. Doğru diziye bağlandıktan sonra TAD, bir iskelet görevi görerek birçok transkripsiyon faktörün bağlanmasını ve transkripsiyonun başlamasını sağlar. Bu nedenle farklılaştırma deneylerinde daha güçlü bir şekilde transkripsiyon sağlayan MYOD, FOXA, VP16 gibi faktörlerin transkripsiyonel aktivasyon domainleri kullanılmıştır (Hirai 2010).

*MyoD*, iskelet miyogenezinden sorumlu bir ana transaktivatör faktörüdür. Kas hücresi olmayan hücrelerde, kendisini ve hedef genlerini aktive ederek, kas hücresi oluşumuna neden olan güçlü bir TAD domainine sahiptir. *MyoD* geni, başka bir faktör eklenmeden, bir epitelyal hücreyi kas hücresine dönüştürebilir (Choi 1990). Bu sonuçlar MYOD transaktivatör faktörünün heterokromatin yapısında bulunan baskılanmış genleri güçlü bir şekilde aktive edebildiğini göstermiştir. Diğer transaktivatör faktörlerinin hedef genlerdeki etkisini arttırmak için *MyoD* TAD ( $m_3$ ), kullanılacak faktöre eklenerek denemeler yapılmıştır. *Oct4* ile yapılan programlama deneylerinde *MyoD* TAD eklendiğinde hedef genler dört kat daha fazla eksprese olmuştur (Hirai 2011). Ayrıca indüklenmiş pluripotent kök hücre (induced pluripotent stem cell, iPSC) teknolojisi için kullanılan Yamanaka faktörlerine *MyoD* TAD eklendiğinde oluşan iPSC koloni sayısında ciddi bir artış gözlenmiştir (Katayama 2016).

### 3. MATERYAL VE METOT

#### 3.1. Kullanılan Materyaller

Bu tez çalışmasında kullanılan materyaller ve katalog bilgileri Çizelge.1’de verilmiştir.

**Çizelge.1.** Materyallerin Katalog Bilgileri

Agar Bacteriological	Oxoid, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA	Kat.no:LP0011
Sodium Chloride	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri	Kat.no:31434
Yeast Extract	VWR Life Science AMRESCO, Radnor, Pensilvanya	Kat.no:VWRVJ85 0-500G
Tryptone	VWR Life Science AMRESCO, Radnor, Pensilvanya	Kat.no:VWRVJ85 9-500G
Ampicillin	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri	Kat.no:A5354
Kanamycin	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA	Kat.no:15160054
GeneJET Plasmid Miniprep Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA	Kat.no:K0503
GeneJET Gel Extraction Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA	Kat.no:K0691
GeneJET PCR Purification Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA	Kat.no:K0701
GelStar™ Nucleic Acid Gel Stain	Lonza, Basel	Kat.no:50535
GeneRuler 1 kb DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA	Kat.no:SM0311
Trizma® base	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri	Kat.no:T1503
EDTA disodium salt dihydrate	Merck Millipore, Burlington, MA	Kat.no:108418
Asetik asit	Merck Millipore, Burlington, MA	Kat.no:109088
Fast Digest <i>Sall</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA	Kat.no:FD0644

Çizelge.1'in devamı

Fast Digest <i>NotI</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA	Kat.no:FD0593
Fast Digest <i>BamHI</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA	Kat.no:FD0054
Fast Digest <i>Clal</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA	Kat.no:FD0143
Fast Digest <i>SpeI</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA	Kat.no:FD1254
Antarctic Phosphatase	NEB, Ipswich, MA	Kat.no:M0289S
T4 DNA Ligase	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA	Kat.no:EL0011
CloneJET PCR Cloning Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA	Kat.no:K1231
Fast Digest <i>PacI</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA	Kat.no:FD2204
DMEM, high glucose	Biological Industries, Beit Haemek, IL	Kat.no:01-055-1A
Antibiotic-Antimycotic	Biowest, Nuaille, FR	Kat.no:L0010-020
Fetal Bovine serum	Biological Industries, Beit Haemek, IL	Kat.no:04-007-1A
L-glutamin	Gibco, AU	Kat.no:25030-024
AD-293 cell line	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA	Kat.no:51-0036
Lipofectamine® 2000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA	Kat.no:12604-021
Opti-MEM	Gibco, AU	Kat.no:31985-062
Anti-İnsülin	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX	Kat.no:2D11H5
Anti-Pdx 1	Abcam, Cambridge, UK	Kat.no:ab47267
Anti-Ngn3	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX	Kat.no:sc37442
Anti-MafA	Abcam, Cambridge, UK	Kat.no:ab26405
Goat Anti-Rabbit IgG, DyLight 488	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA	Kat.no:35552
Goat Anti-Mouse IgG, DyLight 488	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA	Kat.no:35502
AR42J-B13 cell line	AddexBio, San Diego, CA	Kat.no:C0018004

Çizelge.1'in devamı

TrypLE	Gibco, AU	Kat.no:12604-021
<i>E.coli</i> dam <sup>-</sup> /dcm <sup>-</sup> Competent Cells	NEB, Ipswich, MA	Kat.no:C2925H
pENTR-2B	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA	Kat.no:A10463
One Shot ccdB Survival 2 T1R Competent Cells	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA	Kat.no:A10460
Gateway LR Clonase II Enzyme mix	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA	Kat.no:11791100
Proteinase K	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA	Kat.no:11791100
Tween 20	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri	Kat.no:P9416
Triton X-100	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri	Kat.no:X100
1X PBS	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri	Kat.no:003002
BSA (Albumin)	GenDEPOT, Houston, TX	Kat.no:A0100-010
Formalin Solution	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri	Kat.no:HT501128
Hoechst 33342 Solution (20mM)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA	Kat.no:62249

### 3.2. Plazmit DNA'ların Hazırlanması

#### 3.2.1. LB-katı ve LB-sıvı besiyerlerinin hazırlanması

LB-katı besiyeri hazırlamak için 3.75g agar, 2.5g NaCl, 2.5g tripton ve 1.25g maya ekstratı bir şişeye alınıp, son hacim distile su ile 250 mL'ye tamamlanmıştır. LB-sıvı besiyeri hazırlamak için 2.5g NaCl, 2.5g tripton ve 1.25g maya ekstratı bir şişeye alınıp distile su ile son hacim 250mL'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan çözeltiler 121°C'de 20 dk otoklavlanmıştır. Otoklavlandıktan sonra besiyeri 55°C'ye soğuduğunda 250µL 100mg/mL Amp antibiyotiği eklenmiş Amp'li besiyeri hazırlanmıştır. Ayrıca 250µL 50mg/mL Kan antibiyotiği eklenmiş Kan'li besiyeri hazırlanmıştır. Hazırlanan katı ve sıvı besiyerleri +4°C'ye kaldırılmıştır.

### 3.2.2. *E.coli* dam<sup>-</sup>/dcm<sup>-</sup> kompetent hücresi

*Escherichia Coli* (*E.coli*) dam<sup>-</sup>/dcm<sup>-</sup> kompetent hücresi, buz üzerinde eritilerek içinden 25µL alınarak antibiyotik içermeyen 5mL LB-sıvı besiyerine eklenmiştir. Bir gece boyunca 37°C'de 225rpm çalkalamalı etüvde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra bakteri süspansiyonundan 500µL alınarak 50mL antibiyotiksiz LB-sıvı besiyerine aktarılmıştır. 37°C'de 225rpm çalkalamalı etüvde 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. Her yarım saatte süspansiyondan 1mL alınarak, spektrofotometrede 600nm absorpsiyonda, O.D. ölçümü alınmış ve. O.D. değeri 0.4-0.6 değer aralığında yakalandığında buz üzerine alınarak 10 dk bekletilmiştir. 5000rpm'de 4 dk boyunca +4°C'de santrifüj yapılmıştır. Süpernatant atılıp pelet üzerine 5mL 0.1M CaCl<sub>2</sub> eklenmiş ve pipetaj yapılmıştır. Buz üzerinde 15 dk inkübasyona bırakılmıştır. 5000g'de +4°C'de 4 dk boyunca santrifüj yapılarak süpernatant tekrar uzaklaştırılmıştır. Pelet üzerine 2.5mL %15'lik gliserol içinde hazırlanmış 0.1M CaCl<sub>2</sub> eklenip pipetaj yapılmıştır. Hazırlanan *E.coli* dam<sup>-</sup>/dcm<sup>-</sup> kompetent hücreleri 300µL olacak şekilde ependorflara bölüştürülerek -80°C'ye kaldırılmıştır.

### 3.2.3. DNA'nın kompetent hücreye transformasyonu

-80°C'den alınan dam<sup>-</sup>/dcm<sup>-</sup> kompetent hücre buz üzerinde eritilmiştir. Çoğaltılacak plazmit DNA, kompetent hücre üzerlerine eklenmiş ve pipetaj yapılmıştır. 30 dk buz üzerinde bekletilmiştir. 42°C sıcak su banyosunda 40-50 sn bekletilip hemen ardından buz üzerine alınarak 2 dk soğuması beklenmiştir. Üzerine 250µL SOC besiyeri eklenip pipetaj yapılmıştır. 1 saat boyunca 37°C'de 225rpm çalkalamalı etüvde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra, uygun antibiyotikli LB-katı besiyeri ortamına yayma ekimi yapılmıştır. 1 gece 37°C'de etüvde inkübasyona bırakılmıştır. Oluşan koloniler tek tek seçilerek 1 gece boyunca 37°C'de 225rpm çalkalamalı etüv ortamında 5mL LB-sıvı besiyeri içerisinde çoğaltılmıştır.

### 3.2.4. Plazmit izolasyonu

LB-sıvı besiyerinde çoğaltılan bakterilerden GeneJET Plazmid Miniprep Kit kullanılarak plazmit izolasyonu yapılmıştır. Bakteri süspansiyonu 4000rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırılıp pelet üzerine 250µL Resuspension Buffer eklenip pipetaj yapılmıştır. Ardından yeni bir ependorfa aktarılmış ve 250µL Lysis Buffer eklenip 8 defa alt üst edilmiştir. 350µL Neutralization Buffer eklenip tekrar 8 defa alt üst edilmiştir. 12000rpm'de 5 dk santrifüj yapılmıştır. Oluşan üst faz filtrelerden 12000rpm'de 1 dk santrifüj yapılarak geçirilmiştir. Filtrelere 500µL Wash Buffer eklenip 12000rpm'de 45 sn santrifüj yapılmıştır. Bu işlem bir kere daha tekrarlanmıştır. Filtre yeni ependorfa aktarılıp en son 50µL Elution Buffer eklenip oda sıcaklığında 2 dk inkübasyona bırakılmıştır. 12000rpm'de 2 dk santrifüj yapıp elde edilen 50µL plazmit DNA -20°C'ye kaldırılmıştır.

### 3.2.5. Kesim enzim ürünlerinin jelden izolasyonu

50X TAE tamponu hazırlamak için 60.5g Tris (Trizma® base), 4.65g EDTA ve 14.3mL asetik asit bir şişeye alınıp 250mL'ye distile su ile tamamlanmıştır. 0.5X TAE tamponu, 50X TAE tamponundan dilüe edilerek kullanılmıştır.

8g agaroz 100mL 0.5X TAE tamponuna eklenip çözündürülmüştür ve 10µL GelStar™ Nucleic Acid Gel Stain eklenerek hazırlanmış ve %0.8'lik agaroz jel hazırlanmıştır.

Kesim enzimleri ile kurulan reaksiyondan elde edilen ürün, belirteç olarak 1 kb DNA Ladder kullanılarak %0.8'lik agaroz jelde 50V'da 3 saat yürütülmüştür. Glite 900 BW Jel Görüntüleme aleti (Biocenter, Wien, Avusturya) ile mavi ışık altında görüntüleme yapılmıştır. Kesim sonrası beklenen bant büyüklüğüne göre ürün jelden kesilerek ependorfa aktarılmıştır. GeneJET Gel Extraction Kit içerisinde, kesilen bant üzerine, 500µL Binding Solution eklenmiştir. 60°C sıcak su banyosunda 10 dk bekletilerek agarın erimesi sağlanmıştır. Filtre üzerine aktararak 12000rpm'de 1 dk santrifüj yapılmıştır. Filtre üzerine 700µL Wash Buffer eklenerek 1 dk 12000rpm'de santrifüj yapılmıştır. Yeni bir ependorfa alınan filtreye 50µL Elution Buffer eklenip oda sıcaklığında 2 dk bekletilmiştir. 2 dk 12000rpm'de santrifüj yapıldıktan sonra 50µL ürün -20°C'ye kaldırılmıştır.

### 3.2.6. Kesim enzim ürünlerinin filtre kullanılarak purifiye edilmesi

Kesim enzimleri kurulan reaksiyondan sonra kesim ürünü GeneJET PCR Purification Kit kullanılarak purifiye edilmiştir. 20µL kesim ürününe 20µL Binding Solution eklenip filtreye aktarılmıştır. Filtre oda sıcaklığında 2 dk inkübe edildikten sonra 12000rpm'de 30 sn santrifüj edilmiştir. Filtrenin üzerine 700µL Wash Buffer eklenip 30 sn 12000rpm'de santrifüj edilmiştir. Yeni bir alt tüpe aktarılan filtreye 50µL Elution Buffer eklenerek oda sıcaklığında 2 dk bekletilmiştir. 2 dk 12000rpm'de santrifüj yapıldıktan sonra 50µL ürün -20°C'ye kaldırılmıştır.

## 3.3. 2A Peptid dizisinin pX1 Plazmitine Aktarılması

### 3.3.1. pX1 plazmitinin *Sall* ve *NotI* kesim enzimleri ile kesilmesi

pX1 plazmiti Monica Hollstein'dan hediye alınmıştır (Addgene plasmid # 46848). pX1 plazmitinden 1µg alınıp bir reaksiyon tüpüne aktarılmıştır. 1µL Fast Digest *Sall* enzimi ve 1µL Fast Digest *NotI* enzimi eklenmiştir. 2µL 10X Fast Digestion Buffer eklenip son hacim distile su ile 20µL'ye tamamlanmıştır. Bu reaksiyon 37°C'de 2 saat, 80°C'de 20 dk inkübasyona bırakılmıştır. Kesim ürünü 20µL üzerine 1µL Antarctic Phosphatase, 2.5µL 10X Antarctic Phosphatase Buffer eklenip son hacim distile su ile 25µL'ye tamamlanmıştır. Bu reaksiyon 37°C'de 30 dk ardından 65°C'de 5 dk inkübe edilmiştir. Reaksiyondan sonra ürün GeneJET PCR Purification Kit filtresi kullanılarak purifiye edilmiştir. 50µL ürün -20°C'ye kaldırılmıştır.

### 3.3.2. 2A-Peptid dizisinin *Sall* ve *NotI* kesim enzimleri ile kesilmesi

2A peptid gen dizisi pIDTSMART-AMP plazmitine klonlanmış şekilde IDT(Integrated DNA Technologies) firmasından satın alınmıştır. 2A peptid gen dizisini taşıyan plazmitten 1µg alınıp bir reaksiyon tüpüne aktarılmıştır. 1µL Fast Digest *Sall* enzimi ve 1µL Fast Digest *NotI* enzimi eklenmiştir. 2µL 10X Fast Digestion Buffer eklenip son hacim distile su ile 20µL'ye tamamlanmıştır. Bu reaksiyon 37°C'de 2 saat, 80°C'de 20 dk inkübasyona bırakılmıştır. Kesim ürünü %0.8'lik agaroz jelde 50V'da 3 saat yürütülmüştür. Kesim sonrası beklenen 215 bp'lik ürün jelden kesilerek ependorfa aktarılmıştır. GeneJET Gel Extraction Kit kullanılarak purifiye edilen 50µL ürün -20°C'ye kaldırılmıştır.

### 3.3.3. pX1 plazmiti ile 2A peptid dizisinin ligasyonu

*Sall-NotI* kesimi ve purifiye edilen pX1 plazmitinden 4.5µL alınarak bir reaksiyon tüpüne alınmıştır. Purifiye edilen 2A peptid dizisinden 4.5µL alınıp aynı reaksiyon tüpüne eklenmiştir. 10µL 2X Reaction Buffer ve 1µL T4 DNA Ligase (CloneJET PCR Cloning Kit) eklenip son hacim 20µL olan ürün 15 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Ligasyon ürününün tamamının dam<sup>-</sup>/dcm<sup>-</sup> kompetent hücreye transformasyonu yapılmış ve Amp<sup>r</sup>li besiyerinde çoğaltılmıştır. Çoğalan bakteri kolonilerden 5'er adet koloni seçilerek pDNA izolasyonları yapılmıştır. Plazmitler 5'GTAAAACGACGGCCAGT'3 ve 5'CAGGAAACAGCTATGAC'3 primerleri ile sekanslanmıştır.

## 3.4. *MyoD* TAD ( $m_3$ ) Eklenen *Pdx1*, *Ngn3* ve *MafA* Genlerinin 2A Peptid Dizisi ile Birleştirilmesi

### 3.4.1. Kesim enzimleri kullanılarak TF genlerinin plazmitten çıkarılması

*MyoD* TAD ile birleştirilen fare *Pdx1*, *Ngn3* ORF'ler (*Pdx1-MyoD* TAD, *MyoD* TAD-*Pdx1*, *Ngn3-MyoD* TAD, *MyoD* TAD-*Ngn3*) ve *Pdx1*, *Ngn3*, *MafA* ORF'leri sentezlendirilip pUC57 plazmitine klonlanmış şekilde GenScript firmasından satın alınmıştır. Sentezi yaptırılan gen dizilerinden sadece *MafA* ORF'si dur kodonu içermektedir.

Fare *Pdx1-MyoD* TAD ( $Pm_3$ ) gen dizisini taşıyan plazmitten 5µL (1µg) alınıp, 1µL Fast Digest *BamHI* kesim enzimi, 2µL 10X Fast Digestion Buffer ve 12µL distile su eklenerek 37°C'de 2 saat, 80°C'de 20 dk inkübasyona bırakılmıştır. Kesim ürünü 1044 bp, jelden izolasyon yapılarak purifiye edilmiştir. Fare *MyoD* TAD-*Pdx1* ( $m_3P$ ) gen dizisini taşıyan plazmitten 5µL (1µg) alınıp, 1µL Fast Digest *BamHI* kesim enzimi, 2µL 10X Fast Digestion Buffer ve 12µL distile su eklenerek 37°C'de 2 saat, 80°C'de 20 dk inkübasyona bırakılmıştır. Kesim ürünü 1044 bp, jelden izolasyon yapılarak purifiye edilmiştir. Fare *Pdx1* ( $P$ ) gen dizisini taşıyan plazmitten 5µL (1µg) alınıp, 1µL Fast Digest *BamHI* kesim enzimi, 2µL 10X Fast Digestion Buffer ve 12µL distile su eklenerek 37°C'de 2 saat, 80°C'de 20 dk inkübasyona bırakılmıştır. Kesim ürünü 858



bp, jelden izolasyon yapılarak purifiye edilmiştir. Fare *Ngn3-MyoD* TAD (*Nm<sub>3</sub>*) gen dizisini taşıyan plazmitten 5µL (1µg) alınıp 1µL Fast Digest *Sall* kesim enzimi, 1µL Fast Digest *BcuI* kesim enzimi, 2µL 10X Fast Digestion Buffer ve 11µL distile su eklenmiştir. 37°C'de 2 saat, 80°C'de 20 dk inkübasyona bırakılmıştır. Kesim ürünü 843 bp, jelden izolasyon yapılarak purifiye edilmiştir. Fare *MyoD* TAD-*Ngn3* (*m<sub>3</sub>N*) gen dizisini taşıyan plazmitten 5µL (1µg) alınıp 1µL Fast Digest *Sall* kesim enzimi, 1µL Fast Digest *BcuI* kesim enzimi, 2µL 10X Fast Digestion Buffer ve 11µL distile su eklenmiştir. 37°C'de 2 saat, 80°C'de 20 dk inkübasyona bırakılmıştır. Kesim ürünü 843 bp, jelden izolasyon yapılarak purifiye edilmiştir. Fare *Ngn3* (*N*) gen dizisini taşıyan plazmitten 5µL (1µg) alınıp, 1µL Fast Digest *Sall* kesim enzimi, 1µL Fast Digest *BcuI* (*SpeI*) kesim enzimi, 2µL 10X Fast Digestion Buffer ve 11µL distile su eklenerek 37°C'de 2 saat, 80°C'de 20 dk inkübasyona bırakılmıştır. Kesim ürünü 657 bp, jelden izolasyon yapılarak purifiye edilmiştir. Fare *MafA* (*M*) gen dizisini taşıyan plazmitten 5µL (1µg) alınıp, 1µL Fast Digest *Bsu15I* (*Clal*) kesim enzimi, 2µL 10X Fast Digestion ve 12µL distile su eklenerek 37°C'de 2 saat, 80°C'de 20 dk inkübasyona bırakılmıştır. Kesim ürünü 1086 bp, jelden izolasyon yapılarak purifiye edilmiştir.

#### 3.4.2. TF genlerinin 2A peptid dizisi ile birleştirilmesi

2A peptid dizisini içeren pX1 plazmitinden 5µL (1µg) bir reaksiyon tüpüne aktarıldıktan sonra 1µL Fast Digest *BamHI* kesim enzimi, 2µL 10X Fast Digestion Buffer ve 12µL distile su eklenerek 37°C'de 2 saat, 80°C'de 20 dk inkübasyona bırakılmıştır. Kesim ürünü 20µL üzerine 1µL Antarctic Phosphatase, 2.5µL 10X Antarctic Phosphatase Buffer eklenip son hacim distile su ile 25µL'ye tamamlanmıştır. Bu reaksiyon 37°C'de 30 dk, 65°C'de 5 dk inkübasyona bırakılmıştır. Oluşan ürün filtre kullanılarak purifiye edilmiştir ve 50µL ürün -20°C'ye kaldırılmıştır.

Filtre kullanılarak izole edilen 2A peptid dizisi kesim ürününden 3µL, jelden izole edilen *Pm<sub>3</sub>* kesim ürününden 6µL bir reaksiyon tüpüne alınmıştır. 10µL 2X Reaction Buffer ve 1µL T4 DNA Ligase (CloneJET PCR Cloning Kit) eklenip son hacim 20µL olan ürün 15 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Ligasyon ürününün tamamı dam<sup>-</sup>/dcm<sup>-</sup> kompetent hücreye transformasyon yapılmış ve Amp<sup>'</sup>li besiyerinde çoğaltılmıştır. Çoğalan kolonilerden 5'er adet seçilerek pDNA izolasyonları yapılmıştır. Aynı işlemler *m<sub>3</sub>P* ile 2A peptid dizisi ve ayrıca *P* ile 2A peptid dizisi için tekrarlanmıştır. İzole edilen plazmitler 5'AGTGCCACGAACCTTCTCTCTG'3 ve 5'CAGGAAACAGCTATGAC'3 primerleri ile sekanslanmıştır. Sekanslama sonucuna göre doğru ligasyon olan örnekler seçilmiştir.

Birleştirilip izole edilen 2A peptid dizisi ile *m<sub>3</sub>P* (*2A+m<sub>3</sub>P*) yapısından 5µL (1µg) bir tüpe alınmış ve üzerine 1µL Fast Digest *Sall* kesim enzimi, 1µL Fast Digest *BcuI* (*SpeI*) kesim enzimi, 2µL 10X Fast Digestion Buffer ve 11µL distile su eklenmiştir. 37°C'de 2 saat, 80°C'de 20 dk inkübasyona bırakılmıştır. Kesim ürünü 20µL üzerine 1µL Antarctic Phosphatase, 2.5µL 10X Antarctic Phosphatase Buffer

eklenip son hacim distile su ile 25 $\mu$ L'ye tamamlanmıştır. Bu reaksiyon 37°C'de 30 dk, 65°C'de 5 dk inkübasyona bırakılmıştır. Oluşan ürün filtre kullanılarak purifiye edilmiştir ve 50 $\mu$ L ürün -20°C'ye kaldırılmıştır. Bu kesim reaksiyonu 2A+P<sub>m3</sub> ve 2A+P yapıları içinde aynı miktarda kurulmuştur.

*Sall* ve *BcuI* kesim enzimleri ile kesilen ve purifiye edilen 2A+m<sub>3</sub>P yapısından 3 $\mu$ L alınarak bir reaksiyon tüpüne eklenmiştir. İçerisine kesilip jelden purifiye edilen *N* dizisinden 6 $\mu$ L, 10 $\mu$ L 2X Reaction Buffer ve 1 $\mu$ L T4 DNA Ligase (CloneJET PCR Cloning Kit, Thermo Fisher Scientific) eklenip son hacim 20 $\mu$ L olan ürün 15 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Ligasyon ürününün tamamı dam<sup>-</sup>/dcm<sup>-</sup> kompetent hücreye transformasyon yapılmış ve Amp'li besiyerinde çoğaltılmıştır. Bu ligasyon reaksiyonu 2A+P<sub>m3</sub> ile *N* yapıları ve 2A+P ile *N* yapıları arasında da aynı miktarlar kullanılarak kurulmuş ve 5'er adet pDNA izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen plazmitler 5'GTAAAACGACGGCCAGT'3 ve 5'CACGGGTCCTTG TAGAGCTG'3 primerleri ile sekanslanmıştır ve sekans sonucuna göre doğru olan örnekler ile çalışılmaya devam edilmiştir.

Ligasyonu yapılan 5 $\mu$ L (1 $\mu$ g) 2A+m<sub>3</sub>P ve *N* yapısı (2A+m<sub>3</sub>P+N), 1 $\mu$ L Fast Digest *BsuI* (*Clal*) kesim enzimi, 2 $\mu$ L 10X Fast Digestion Buffer ve 12 $\mu$ L distile su eklenerek 37°C'de 2 saat, 80°C'de 20 dk inkübasyona bırakılmıştır. Kesim ürünü 20 $\mu$ L üzerine 1 $\mu$ L Antarctic Phosphatase, 2.5 $\mu$ L 10X Antarctic Phosphatase Buffer eklenip son hacim distile su ile 25 $\mu$ L'ye tamamlanmıştır. Bu reaksiyon 37°C'de 30 dk, 65°C'de 5 dk inkübasyona bırakılmıştır. Oluşan ürün filtre kullanılarak purifiye edilmiştir ve 50 $\mu$ L ürün -20°C'ye kaldırılmıştır.

Purifiye edilen kesilmiş 2A+m<sub>3</sub>P+N yapısından 3 $\mu$ L alınarak 6 $\mu$ L jelden kesilerek izole edilen *M* dizisi ile birleştirilmiştir. 10 $\mu$ L 2X Reaction Buffer ve 1 $\mu$ L T4 DNA Ligase (CloneJET PCR Cloning Kit) eklenip son hacim 20 $\mu$ L olan ürün 15 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Ligasyon ürününün tamamı dam<sup>-</sup>/dcm<sup>-</sup> kompetent hücreye transformasyon yapılmış ve Amp'li besiyerinde çoğaltılmıştır. Çoğalan kolonilerden 5'er adet seçilerek pDNA izolasyonları yapılmıştır. Yapılan ligasyon işlemi aynı miktarlarda kullanılan 2A+P<sub>m3</sub>+N ile *M* dizisi arasında ve 2A+P+N ile *M* dizisi arasında da yapılmıştır. Kompetent hücreden izole edilen ligasyon ürünleri her birinden 5'er adet olmak üzere pDNA'lar; 2A+m<sub>3</sub>P+N+M (*N*-m<sub>3</sub>P-M), 2A+P<sub>m3</sub>+N+M (*N*-P<sub>m3</sub>-M), 2A+P+N+M (*N*-P-M) -20°C'ye kaldırılmıştır. İzole edilen plazmitlerin doğrulanması için 5'GGCAGAGGAAGTCTTCTAACATGC'3 ve 5'CAGGAAACAGCTATGAC'3 primerleri kullanılarak sekanslanma yapılmıştır.

*Sall* ve *BcuI* kesim enzimleri ile kesilen ve purifiye edilen 2A+P yapısından 3 $\mu$ L alınarak bir reaksiyon tüpüne eklenmiştir. İçerisine kesilip jelden purifiye edilen *Nm3* dizisinden 6 $\mu$ L, 10 $\mu$ L 2X Reaction Buffer ve 1 $\mu$ L T4 DNA Ligase (CloneJET PCR Cloning Kit) eklenip son hacim 20 $\mu$ L olan ürün 15 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Ligasyon ürününün tamamı dam<sup>-</sup>/dcm<sup>-</sup> kompetent hücreye transformasyon

yapılmış ve Amp'li besiyerinde çoğaltılmıştır. Çoğalan kolonilerden 5'er adet seçilerek pDNA izolasyonları yapılmıştır. Bu ligasyon reaksiyonu ve pDNA izolasyonu 2A+P ile  $m_3N$  yapıları arasında da aynı miktarlar kullanılarak kurulmuştur. Ligasyon ürünleri 5'GTAAAACGACGGCCAGT'3 ve 5'CACGGGTCCTTG TAGAGCTG'3 primerleri ile sekanslanmıştır.

Ligasyonu yapılan 5µL (1µg) 2A+P ve  $Nm_3$  yapısı (2A+P+ $Nm_3$ ), 1µL Fast Digest *Bsu15I* (*Clal*) kesim enzimi, 2µL 10X Fast Digestion Buffer ve 12µL distile su eklenerek 37°C'de 2 saat, 80°C'de 20 dk inkübasyona bırakılmıştır. Kesim ürünü 20µL üzerine 1µL Antarctic Phosphatase, 2.5µL 10X Antarctic Phosphatase Buffer eklenip son hacim distile su ile 25µL'ye tamamlanmıştır. Bu reaksiyon 37°C'de 30 dk, 65°C'de 5 dk inkübasyona bırakılmıştır. Oluşan ürün filtre kullanılarak purifiye edilmiştir ve 50µL ürün -20°C'ye kaldırılmıştır.

Purifiye edilen kesilmiş 2A+P+ $Nm_3$  yapısından 3µL alınarak 6µL jelden kesilerek izole edilen *M* dizisi ile birleştirilmiştir. 10µL 2X Reaction Buffer ve 1µL T4 DNA Ligase (CloneJET PCR Cloning Kit) eklenip son hacim 20µL olan ürün 15 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Ligasyon ürününün tamamı dam<sup>-</sup>/dcm<sup>-</sup> kompetent hücreye transformasyon yapılmış ve Amp'li besiyerinde çoğaltılmıştır. Çoğalan bakteri kolonilerinden 5'er adet seçilerek pDNA izolasyonları yapılmıştır. Yapılan ligasyon işlemi aynı miktarlarda kullanılan 2A+P+ $m_3N$  ile *M* dizisi arasında da yapılmıştır. Kompetent hücreden izole edilen ligasyon ürünleri pDNA'lar, her birinden 5'er adet olmak üzere, 2A+P+ $m_3N$ +*M* ( $m_3N$ -P-*M*) ve 2A+P+ $Nm_3$ +*M* ( $Nm_3$ -P-*M*) -20°C'ye kaldırılmıştır. İzole edilen plazmitlerin doğrulanması için 5'GGCAGAGGAAGTCTTCTAACATGC'3 ve 5'CAGGAAACAGCTATGAC'3 primerleri kullanılarak sekanslanma yapılmıştır.

### 3.5. 2A Peptid Dizisi ile Birleştirilen Yapıların pENTR-2B Plazmitine Aktarılması

#### 3.5.1. pENTR-2B plazmitinin çoğaltılması

pENTR-2B plazmitinden 1µL alınarak 50µL One Shot™ ccdB Survival™ 2 T1R kompetent hücrelerine transformasyonu yapılmıştır. Kan'li besiyerlerine ekim yapılarak plazmit izolasyonu yapılmıştır.

#### 3.5.2. pENTR-2B plazmitinin *Sall* ve *NotI* kesim enzimleri ile kesilmesi

One Shot™ ccdB Survival™ 2 T1R kompetent hücrelerinden izole edilen pENTR-2B plazmitinden 1µg alınıp bir reaksiyon tüpüne aktarılmıştır. 1µL Fast Digest *Sall* enzimi ve 1µL Fast Digest *NotI* enzimi eklenmiştir. 2µL 10X Fast Digestion Buffer eklenip son hacim distile su ile 20µL'ye tamamlanmıştır. Bu reaksiyon 37°C'de 2 saat, 80°C'de 20 dk inkübasyona bırakılmıştır. Kesim ürünü 20µL üzerine 1µL Antarctic Phosphatase, 2.5µL 10X Antarctic Phosphatase Buffer eklenip son hacim distile su ile 25µL'ye tamamlanmıştır. Bu reaksiyon 37°C'de 30 dk, 65°C'de 5 dk inkübasyona

bırakılmıştır. Ürünün tamamı %0.8'lik agaroz jelde 50V'da 3 saat yürütülmüş ve jelden izolasyon yapılarak izole edilmiştir. 50µL ürün -20°C'ye kaldırılmıştır.

### 3.5.3. Birleştirilen TF genlerinin *Sall* ve *NotI* kesim enzimleri ile kesilmesi

*N(m<sub>3</sub>P)M* (2981 bp), *N(Pm<sub>3</sub>)M* (2981 bp), *(m<sub>3</sub>N)PM* (2981 bp), *(Nm<sub>3</sub>)PM* (2981 bp) ve *NPM* (2795 bp) yapıları pX1 plazmitinden *Sall* ve *NotI* enzimleri kullanılarak çıkarılmıştır. Plazmitten 5µL bir tüpe aktarılıp üzerine 1µL Fast Digest *Sall* enzimi ve 1µL Fast Digest *NotI* enzimi eklenmiştir. 2µL 10X Fast Digestion Buffer eklenip son hacim distile su ile 20µL'ye tamamlanmıştır. Bu reaksiyon 37°C'de 2 saat, 80°C'de 20 dk inkübasyona bırakılmıştır. %0.8'lik agaroz jelde 50V'da 3 saat yürütülen örnekler jelden izolasyon yapılarak izole edilmiştir. 50µL ürünler -20°C'ye kaldırılmıştır.

### 3.5.4. pENTR-2B plazmiti ile yapıların ligasyonu

*Sall* ve *NotI* kesim enzimleri ile kesilip purifiye edilen pENTR-2B plazmitinden 6µL, *N(m<sub>3</sub>P)M* yapısından 4µL, 2µL 10X T4 DNA Ligase Buffer ve 1µL T4 DNA Ligase eklenip son hacim 20µL olan ürün 15 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Ligasyon ürününün tamamı dam<sup>-</sup>/dcm<sup>-</sup> kompetent hücreye transformasyon yapılmış ve Kan'li besiyerinde çoğaltılmıştır. Plazmit izolasyonu yapıp oluşan 5'er adet 50µL ürün -20°C'ye kaldırılmıştır.

Yapılan bu ligasyon işlemi aynı miktarlar kullanılarak pENTR-2B ile *N-Pm<sub>3</sub>-M* arasında, pENTR-2B ile *(m<sub>3</sub>N)PM* arasında, pENTR-2B ile *(Nm<sub>3</sub>)PM* arasında, pENTR-2B ile *NPM* arasında da gerçekleştirilmiştir. Ligasyon sonrası oluşan her bir yapının kontrolü için 5'er adet pDNA sekanslamaya gönderilmiştir. Bütün plazmitlerin 5'AAGCAGAAGGCCATCCTGACG'3, 5'GTAACATCAGAGATTTTGAGACAC'3 primerleri ile dizilemesi yapılmıştır.

## 3.6. pENTR-2B ile pAd/CMV/V5-DEST Plazmitinin Rekombinasyonu ve *PacI* Enzimi ile Linerize Edilmesi

### 3.6.1. LR Clonase II enzimi ile rekombinasyon

Sekanslama sonuçlarına göre pENTR-2B plazmitine doğru yerleşen yapılar seçilmiştir. pENTR-2B+NPM (210 ng/µL) 0.5µL, pDEST (150 ng/µL) 1µL, 1X TE buffer (pH:8.0) 5.5µL ve Gateway™ LR Clonase™ II Enzyme mix 3µL bir ependorf tüpünde birleştirilerek 25°C'de 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra 1µL Proteinaz K eklenip 37°C'de 15 dk bekletilmiştir. Rekombinasyon ürününün tamamının kompetent hücreye transformasyonu yapılmış ve Amp'li besiyerinde çoğaltılmıştır. İki gün 37 °C etüvde inkübasyondan sonra açığa çıkan bütün koloniler Amp'li sıvı besiyerinde çoğaltılmış ve plazmit izolasyonları yapılmıştır.

pENTR-2B+(Nm<sub>3</sub>)PM (155 ng/µL) 1µL, pDEST (150 ng/µL) 1µL, 1X TE buffer (pH:8.0) 5µL ve Gateway™ LR Clonase™ II Enzyme mix 3µL bir ependorf

tüpünde birleştirilerek 25°C'de 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra 1µL Proteinaz K eklenip 37°C'de 15 dk bekletilmiştir. Rekombinasyon ürününün tamamı kompetent hücreye transformasyonu yapılmış ve Amp'li besiyerinde çoğaltılmıştır. İki gün 37 °C etüvde inkübasyondan sonra açığa çıkan bütün koloniler Amp'li sıvı besiyerinde çoğaltılmış ve plazmit izolasyonları yapılmıştır.

pENTR-2B+(*m<sub>3</sub>N*)*PM* (235 ng/µL) 0.5µL, pDEST (150 ng/µL) 1µL, 1X TE buffer (pH:8.0) 5.5µL ve Gateway™ LR Clonase™ II Enzyme mix 3µL bir ependorf tüpünde birleştirilerek 25°C'de 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra 1 µL Proteinaz K eklenip 37°C'de 15 dk bekletilmiştir. Rekombinasyon ürününün tamamı kompetent hücreye transformasyonu yapılmış ve Amp'li besiyerinde çoğaltılmıştır. İki gün 37 °C etüvde inkübasyondan sonra açığa çıkan bütün koloniler Amp'li sıvı besiyerinde çoğaltılmış ve plazmit izolasyonları yapılmıştır.

pENTR-2B+N(*Pm<sub>3</sub>*)*M* (340 ng/µL) 0.5µL, pDEST (150 ng/µL) 1µL, 1X TE buffer (pH:8.0) 5.5µL ve Gateway™ LR Clonase™ II Enzyme mix 3µL bir ependorf tüpünde birleştirilerek 25°C'de 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra 1µL Proteinaz K eklenip 37°C'de 15 dk bekletilmiştir. Rekombinasyon ürününün tamamı kompetent hücreye transformasyonu yapılmış ve Amp'li besiyerinde çoğaltılmıştır. İki gün 37 °C etüvde inkübasyondan sonra açığa çıkan bütün koloniler Amp'li sıvı besiyerinde çoğaltılmış ve plazmit izolasyonları yapılmıştır.

pENTR-2B+N(*m<sub>3</sub>P*)*M* (149 ng/µL) 1µL, pDEST (150 ng/µL) 1µL, 1X TE buffer (pH:8.0) 5 µL ve Gateway™ LR Clonase™ II Enzyme mix 3µL bir ependorf tüpünde birleştirilerek 25°C'de 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra 1µL Proteinaz K eklenip 37°C'de 15 dk bekletilmiştir. Rekombinasyon ürününün tamamı kompetent hücreye transformasyonu yapılmış ve Amp'li besiyerinde çoğaltılmıştır. İki gün 37 °C etüvde inkübasyondan sonra açığa çıkan bütün koloniler Amp'li sıvı besiyerinde çoğaltılmış ve plazmit izolasyonları yapılmıştır.

pDEST plazmiti ile birleştirilerek izole edilen yapıların kontrolü için 4 farklı primer kullanılarak dizileme yapılmıştır; 5'TAATACGACTCACTATAGGG'3, 5'ACCGAGGAGAGGGTTAGGGAT'3, 5'GACTTTGACCGTTTACGTGGAGAC'3, 5'CCTTAAGCCACGCCACACATTTC'3.

### 3.6.2. *PacI* enzimi ile rekombinasyon ürünlerinin linerizasyonu

Dizileme sonuçlarına göre doğru rekombinasyon olan plazmitler seçilmiştir. pDEST+NPM (171 ng/ µL) 29µL, *PacI* 1µL, 10X FD Buffer 3.5µL ve dH<sub>2</sub>O 1.5µL bir ependorf tüpünde birleştirilmiştir. Kesim reaksiyonu 37°C'de 2 saat ve 80°C'de 20 dk inkübe edilmiştir. 35µL kesim ürünü GeneJET PCR Purification Kit kullanılarak purifiye edilmiştir. Purifikasyon ürünü 29ng/µL olarak ölçülmüştür.

pDEST+(*Nm<sub>3</sub>*)*PM* (202 ng/ µL) 97µL, *PacI* 4µL, 10X FD Buffer 3.5µL ve dH<sub>2</sub>O 7µL bir ependorf tüpünde birleştirilmiştir. Kesim reaksiyonu 37°C'de 2 saat ve

80°C’de 20 dk inkübe edilmiştir. 120µL kesim ürünü üzerine 2µL Antarctic Phosphatase, 13µL 10X Antarctic Phosphatase Buffer eklenmiş, bu reaksiyon 37°C’de 30 dk ardından 65°C’de 5 dk inkübe edilmiştir. 135µL ürün GeneJET PCR Purification Kit kullanılarak purifiye edilmiştir. Purifikasyon ürünü 121ng/µL olarak ölçülmüştür.

pDEST+(*m<sub>3</sub>N*)PM (140 ng/ µL) 95µL, *PacI* 3µL, 10X FD Buffer 11µL ve dH<sub>2</sub>O 1µL bir ependorf tüpünde birleştirilmiştir. Kesim reaksiyonu 37°C’de 2 saat ve 80°C’de 20 dk inkübe edilmiştir. 110µL kesim ürünü üzerine 2µL Antarctic Phosphatase, 13µL 10X Antarctic Phosphatase Buffer ve 5µL dH<sub>2</sub>O eklenmiş, bu reaksiyon 37°C’de 30 dk ardından 65°C’de 5 dk inkübe edilmiştir. 130µL ürün GeneJET PCR Purification Kit kullanılarak purifiye edilmiştir. Purifikasyon ürünü 120ng/µL olarak ölçülmüştür.

pDEST+N(*Pm<sub>3</sub>*)M (137 ng/ µL) 95µL, *PacI* 3µL, 10X FD Buffer 11µL ve dH<sub>2</sub>O 1µL bir ependorf tüpünde birleştirilmiştir. Kesim reaksiyonu 37°C’de 2 saat ve 80°C’de 20 dk inkübe edilmiştir. 110µL kesim ürünü üzerine 2µL Antarctic Phosphatase, 13µL 10X Antarctic Phosphatase Buffer ve 5µL dH<sub>2</sub>O eklenmiş, bu reaksiyon 37°C’de 30 dk ardından 65°C’de 5 dk inkübe edilmiştir. 130µL ürün GeneJET PCR Purification Kit kullanılarak purifiye edilmiştir. Purifikasyon ürünü 84ng/µL olarak ölçülmüştür.

pDEST+N(*m<sub>3</sub>P*)M (137 ng/ µL) 97µL, *PacI* 2µL, 10X FD Buffer 9µL ve dH<sub>2</sub>O 6µL bir ependorf tüpünde birleştirilmiştir. Kesim reaksiyonu 37°C’de 2 saat ve 80°C’de 20 dk inkübe edilmiştir. 90µL kesim ürünü üzerine 2µL Antarctic Phosphatase, 10µL 10X Antarctic Phosphatase Buffer eklenmiş, bu reaksiyon 37°C’de 30 dk ardından 65°C’de 5 dk inkübe edilmiştir. 102µL ürün GeneJET PCR Purification Kit kullanılarak purifiye edilmiştir. Purifikasyon ürünü 91ng/µL olarak ölçülmüştür.

### **3.7. Adenovirüs pDNA’larının AD-293 Hücrelerine Transfeksiyonu, Adenovirüslerin Hücrelerden Purifikasyonu ve Titrelerinin Ölçülmesi**

#### **3.7.1. Hücrelerin çoğaltılması**

Hücre kültür ortamı; 1X DMEM (high glucose), %10 FBS, 1X Anti-Anti, 1X NEAA, 1X L-glutamin konsantrasyonlarında hazırlanmıştır. AD-293 hücreleri sıvı azot tankından çıkarılarak 37°C sıcak su banyosunda içerisinde küçük buz tanesi kalana kadar çözdürülmüştür. Hücre kültür ortamı ısıtılarak çözdürülen 1mL hücre üzerine eklenerek 15mL’ye tamamlanmıştır. 300rpm’de 5 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırılıp hücre peleti üzerine 12mL hücre kültür ortamı eklenip 75cm<sup>2</sup>’lik flaska ekim yapılmıştır.

Hücreler %90 yoğunluğa ulaştıktan sonra tripsin (TripLe®) enzimi ile pasajlama yapılmıştır. Pasajlama işlemi için önce kültür üzerindeki ortam uzaklaştırılıp ardından PBS ile bir defa yıkama yapılmıştır. 3mL tripsin eklenip 37°C’de 5 dk inkübasyona bırakılmıştır. Hücreler tripsin ile beraber bir falkona alınmış ve hücre kültür ortamı ile 15mL’ye tamamlanmıştır. 300rpm’de 5 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırılıp hücre peleti üzerine yeterli miktarda hücre kültür ortamı eklenip hücre

sayımı yapılmıştır. Hücre sayımından sonra 6-kuyucuklu plakanın bir kuyucuğuna  $3 \times 10^5$  hücre ekimi yapılmıştır.

### 3.7.2. Adenovirüs pDNA'ların transfeksiyonu

6-kuyucuklu plakanın kuyucuğuna ekilen  $3 \times 10^5$  AD-293 hücresine Lipofectamine® 2000 aracılığıyla adenovirüs DNA'ları transfekte edilmiştir.

Purifiye edilip konsantrasyonları ölçülen DNA'lardan birinden  $2 \mu\text{g}$  alınarak Opti-MEM ile  $250 \mu\text{L}$ 'ye tamamlanmış ve pipetaj yapılmıştır. 5 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Aynı bir ependorfta  $5 \mu\text{L}$  Lipofectamine® 2000 ve  $245 \mu\text{L}$  Opti-MEM birleştirilip pipetaj yapılmış ve 5 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. İki ayrı mix birleştirilerek 20 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra AD-293 hücrelerinin kültür ortamlarına eklenmiştir. Bu işlem diğer 4 purifiye edilmiş adenovirüs pDNA'ları için de yapılmıştır. Transfeksiyondan 24 saat sonra hücre kültür ortamı değişimi yapılmıştır. Transfeksiyondan 48 saat sonra hücrelerin tamamı tripsin enzimi ile  $75 \text{cm}^2$ 'lik flaska geçirilmiştir. Bu işlemden sonra hücrelerde sitotoksik etki görülene kadar hücre kültür ortamı değiştirilmiştir. Sitotoksik etkinin hücrelerin %90'unda gözlenmesi ile hücreler kültür ortamıyla beraber bir falkona alınmıştır. Falkona alınan hücreler, 2 defa sıvı azotta dondurulup  $37^\circ\text{C}$  sıcak su banyosunda eritilmiştir.  $+4^\circ\text{C}$ 'de 3000rpm'de 15 dk santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant  $-80^\circ\text{C}$ 'ye kaldırılmıştır. Viral stok oluşturulmuştur.

### 3.7.3. Adenovirüs pDNA'ların çoğaltılması ve adenovirüs purifikasyonu

4 adet  $75 \text{cm}^2$  flaska ekimi yapılmış ve %85-90 yoğunluğa ulaşan AD-293 hücrelerine viral stoktan 4 farklı konsantrasyon eklenip 48'inci saatinde %85-90 sitotoksik etki gösteren uygun konsantrasyon belirlenmiştir.

Ad- ( $m_3N$ )PM için en uygun konsantrasyon  $25 \mu\text{L}$ , Ad-  $N(Pm_3)M$  için  $50 \mu\text{L}$ , Ad- ( $Nm_3$ )PM için  $50 \mu\text{L}$ , Ad-  $N(m_3P)M$  için  $10 \mu\text{L}$  ve Ad-  $NPM$  için  $10 \mu\text{L}$  olmuştur.

Bir adenovirüsü çoğaltmak için, 4 adet  $75 \text{cm}^2$  flaska ekimi yapılmış ve %85-90 yoğunluğa ulaşan AD-293 hücrelerine viral stoktan uygun konsantrasyon eklenmiştir. Hücre kültür ortamı değiştirilmeden 48'inci saatinde hücreler kültür ortamları ile birlikte falkonlara alınmıştır. 3 defa sıvı azot ve sıcak su banyosu kullanılarak dondur-çözdür yöntemi ile hücrelerin parçalanması sağlanmıştır. 3000rpm'de 10 dk santrifüj yapılarak elde edilen süpernatantlardan, ViraBind™ Adenovirus Purification Kit (Cell Biolabs, Inc.) kullanılarak adenovirüs purifikasyonu yapılmıştır. Süpernatant  $0.45 \mu\text{m}$  steril filtre kullanılarak hücre debrilerinden arındırılmıştır. Elde edilen süpernatant önceden 5mL 1X Wash buffer ile yıkanmış filtreden basınç uygulamadan geçirilmiştir. Filtreye 2 defa 10mL 1X Wash buffer eklenip basınç uygulamadan yıkama yapılmıştır. 2mL 1X Elution buffer eklenip adenovirüs filtreden elüye edilmiştir. Elüsyon ürününe  $200 \mu\text{L}$  gliserol eklenip  $10 \mu\text{L}$  olacak şekilde  $-80^\circ\text{C}$ 'ye kaldırılmıştır.

### 3.7.4. Adenovirüslerin titrelerinin belirlenmesi

AD-293 hücre hattından  $2.2 \times 10^5$  hücre, 24 kuyucuklu plakanın 6 kuyucuğunun her birine ekilmiştir. Ekim yapıldıktan 3 saat sonra 5 adet kuyucuğa purifiye edilen adenovirüsten  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  dilüsyon oranlarında hücre kültür ortamlarına eklenmiştir.

Adenovirüs transfeksiyonundan 48 saat sonra hücre kültür ortamı uzaklaştırılıp PBS ile bir kez yıkanıp 5 dk kurumaya bırakılmıştır. 1mL soğuk %100 metanol eklendikten sonra  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de 15 dk bekletilmiştir. Metanol uzaklaştırılıp 2 defa  $750\mu\text{L}$  %1 BSA içeren 1X PBS ile yıkama yapılmıştır. %1 BSA içeren 1X PBS içinde 1:500 oranında dilüee edilen Mouse anti-hexon antikorundan her bir kuyucuğa  $250\mu\text{L}$  eklenip 1 saat  $37^{\circ}\text{C}$ 'de inkübasyona bırakılmıştır. Ardından 2 defa  $750\mu\text{L}$  %1 BSA içeren 1X PBS ile yıkama yapılmıştır. %1 BSA içeren 1X PBS içinde 1:1000 oranında dilüe edilen HRP-conjugated Goat anti-mouse antikorundan kuyucuğa  $250\mu\text{L}$  eklenip 1 saat  $37^{\circ}\text{C}$ 'de inkübasyona bırakılmıştır. Ardından 2 defa  $750\mu\text{L}$  %1 BSA içeren 1X PBS ile yıkama yapılmıştır. 10X DAB substratından Peroxide buffer kullanılarak 1X DAB hazırlanıp oda sıcaklığına getirilmiştir.  $250\mu\text{L}$  1X DAB substratından eklenip 15-20 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. PBS eklendikten sonra saymaya uygun en iyi konsantrasyon belirlenmiştir. Koyu kahverengi renge dönen hücreler 20X objektifte 10 alan seçilerek sayılmış ve boyanan hücrelerin ortalaması alınmıştır.

$$IFU(\text{Infectious units}) = \frac{\text{Boyanan hücrelerin ortalaması} \times 314 \text{ alan}}{0.05 \text{ mL} \times \text{Sayım yapılan dilüsyon miktarı}} \quad (3.1)$$

Ad-( $Nm_3$ )PM için boyanan hücrelerin ortalaması 68.8 ve titresi  $4.32 \times 10^9$  IFU/mL

Ad-( $m_3N$ )PM için boyanan hücrelerin ortalaması 71.1 ve titresi  $4.46 \times 10^9$  IFU/mL

Ad-N( $Pm_3$ )M için boyanan hücrelerin ortalaması 114 ve titresi  $7.16 \times 10^9$  IFU/mL

Ad-N( $m_3P$ )M için boyanan hücrelerin ortalaması 70.7 ve titresi  $4.44 \times 10^{10}$  IFU/mL

Ad- NPM için boyanan hücrelerin ortalaması 42.8 ve titresi  $2.68 \times 10^9$  IFU/mL



### 3.8. PDX1, NGN3 ve MAFA Proteinlerinin İmmünoboyama ile Tespiti

Her bir adenovirüs için 3 farklı antikor boyaması yapmak için 15 adet 6 kuyucuklu plakanın her bir kuyucuğuna AD-293 hücre hattından  $9 \times 10^4$  adet hücre ekimi yapılmıştır. Adenovirüsler 5, 25, 100, 200 ve 300 MOI değerlerinde hesaplanıp hücre kültür ortamlarına eklenmiştir.

$$\text{Virüs miktarı (mL)} = \frac{\text{Hücre Sayısı} \times \text{MOI (Multiplicity of infection)}}{\text{Virüs Titresi}} \quad (3.2)$$

Virüs eklendikten 24 saat sonra hücre kültür ortamından adenovirüsler uzaklaştırılmıştır. 72'inci saatinde hücreler antikorlar ile immünoboyama yapılmıştır.

#### 3.8.1. Anti-Pdx1, Anti-Ngn3 ve Anti-MafA antikorları ile immünoboyama

Hücre kültür ortamı uzaklaştırılıp hücreler 1X PBS ile 3 defa yıkanmıştır. 0.5mL Formalin eklenip 20 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. 1X PBS ile 2 defa 5'er dk inkübasyonla hücreler yıkanmıştır. PBS-TritonX (%0.2'lik) 0.5mL ile 15 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra PBS-Tween (%0.1'lik) ile 3 defa 5'er dk inkübasyonlarla yıkama yapılmıştır. PBS-Tween (%0.1) ile %5'lik ve %1'lik BSA çözeltisi hazırlanmıştır. Yıkamadan sonra PBS-Tween-BSA (%5) 0.5mL eklenip 2 saat oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Çözelti uzaklaştırılıp 150µL PBS-Tween-BSA (%1) ile 1:2000 oranında dilüe edilen Anti-Pdx1 antikoruna, 1:100 oranında dilüe edilen Anti-Ngn3 antikoruna ve 1:100 oranında Anti-MafA antikoruna kuyucuklara eklenmiştir. +4°C'de bir gece boyunca inkübe edilmiştir. 1° antikorlar uzaklaştırılıp PBS-Tween ile 3 defa 5'er dk inkübasyonlarla yıkama yapılmıştır. Anti-Pdx1 antikoruna ve Anti-MafA antikoruna eklenen kuyucuklara 150µL PBS-Tween-BSA (%1) ile 1:400 oranında dilüe edilen Goat anti-rabbit 2° antikoruna eklenmiştir. Anti-Ngn3 antikoruna eklenen kuyucuklara ise 150µL PBS-Tween-BSA (%1) ile 1:400 oranında dilüe edilen Goat anti-mouse 2° antikoruna eklenmiştir. 1 saat oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Ardından 2° antikorlar uzaklaştırılıp PBS-Tween ile 3 defa 5'er dk inkübasyonlarla yıkama yapılmıştır. 150µL PBS-Tween-BSA (%1) ile 1:400 oranında dilüe edilen Hoechst boyası kuyucuklara eklenmiştir ve 20 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir. 1X PBS ile 2 defa 5'er dk inkübasyonlarla yıkama yapıp görüntüleme yapılmıştır. 20X objektifte boyanan hücrelerin çekimi yapılmıştır.

### 3.9. Adenovirüslerin Uygun MOI'larının Belirlenmesi

Sıçan asinar hücre hattı olan AR42J-B13 hücreleri, hücre kültür ortamında çoğaltılmıştır. 24 kuyucuklu plakanın her kuyucuğuna AR42J-B13 hücre hattından  $10^5$  adet hücre ekimi yapılmıştır. Adenovirüslerin her biri 35 MOI'den 165 MOI'ya kadar farklı MOI değerlerinde miktarları hesaplanıp gece boyu 37°C'de bekletilen hücrelerin

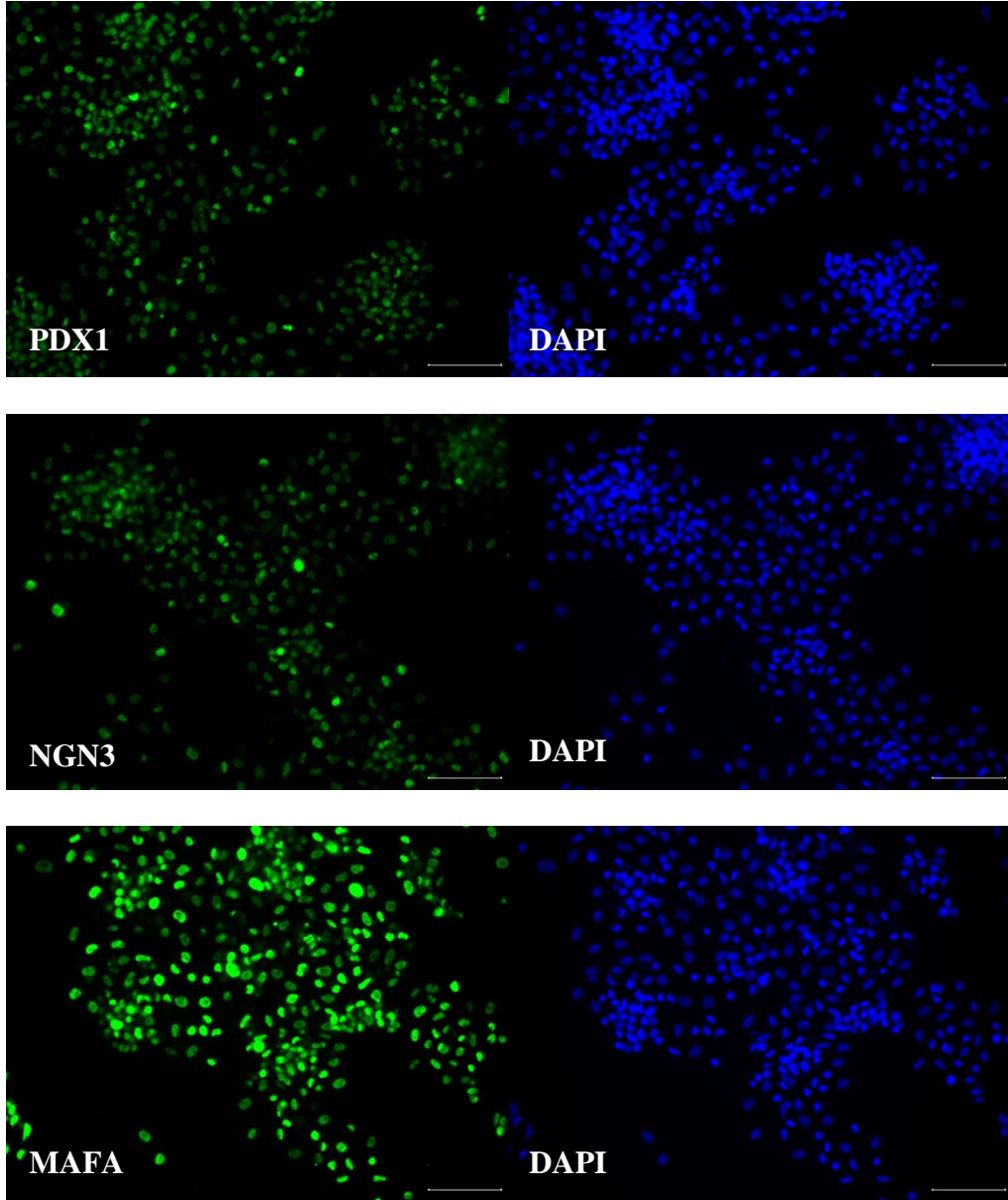
kültür ortamlarına eklenmiştir. Adenovirüsler eklendikten 24 saat sonra hücre kültür ortamından uzaklaştırılmıştır ve 72'inci saatinde hücreler immünoboyama yapılmıştır.

### 3.9.1. Anti-İnsülin antikoruna ile immünoboyama

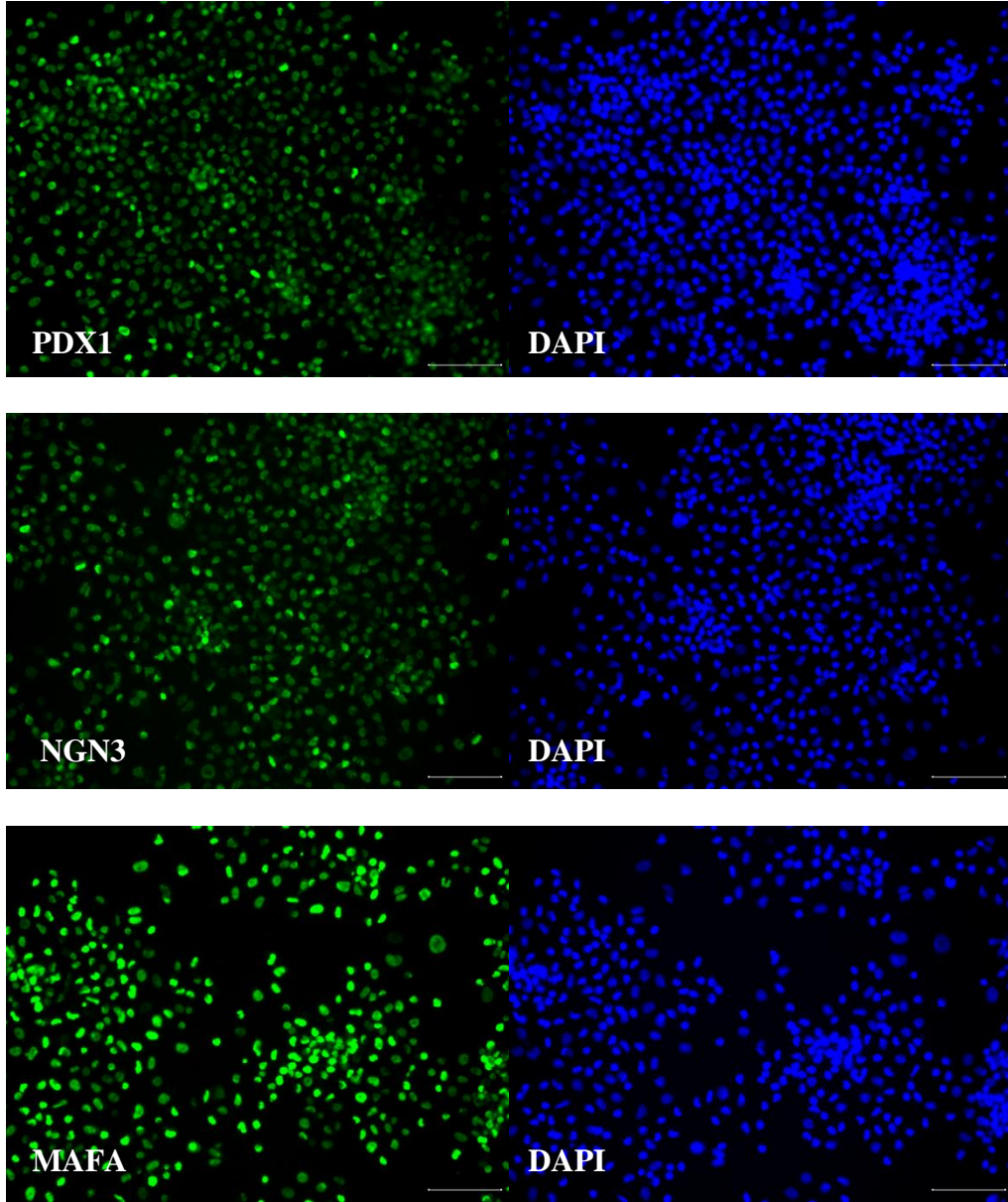
Hücre kültür ortamı uzaklaştırılıp hücreler 1X PBS ile 3 defa yıkanmıştır. 0.5mL Formalin eklenip 20 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. 1X PBS ile 2 defa 5'er dk inkübasyonla hücreler yıkanmıştır. PBS-TritonX (%0.2'lik) 0.5mL ile 15 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra PBS-Tween (%0.1'lik) ile 3 defa 5'er dk inkübasyonlarla yıkama yapılmıştır. PBS-Tween (%0.1) ile %5'lik ve %1'lik BSA çözeltisi hazırlanmıştır. Yıkamadan sonra PBS-Tween-BSA (%5) 0.5mL eklenip 2 saat oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Çözelti uzaklaştırılıp 150µL PBS-Tween-BSA (%1) ile 1:300 oranında dilüe edilen Anti-İnsülin antikoruna kuyucuklara eklenmiştir. +4°C'de bir gece boyunca inkübe edilmiştir. 1° antikoruna uzaklaştırılıp PBS-Tween ile 3 defa 5'er dk inkübasyonlarla yıkama yapılmıştır. 150µL PBS-Tween-BSA (%1) ile 1:400 oranında dilüe edilen Goat anti-mouse IgG antikoruna kuyucuklara eklenmiştir. 1 saat oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Ardından PBS-Tween ile 3 defa 5'er dk inkübasyonlarla yıkama yapılmıştır. 150µL PBS-Tween-BSA (%1) ile 1:400 oranında dilüe edilen Hoechst boyası kuyucuklara eklenmiştir ve 20 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir. 1X PBS ile 2 defa 5'er dk inkübasyonlarla yıkama yapıp görüntüleme yapılmıştır. Anti-İnsülin ile boyanan hücreler 20X objektifte 10 farklı alan çekimi yapılarak insülin pozitif hücre sayımı yapılmıştır.

#### 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

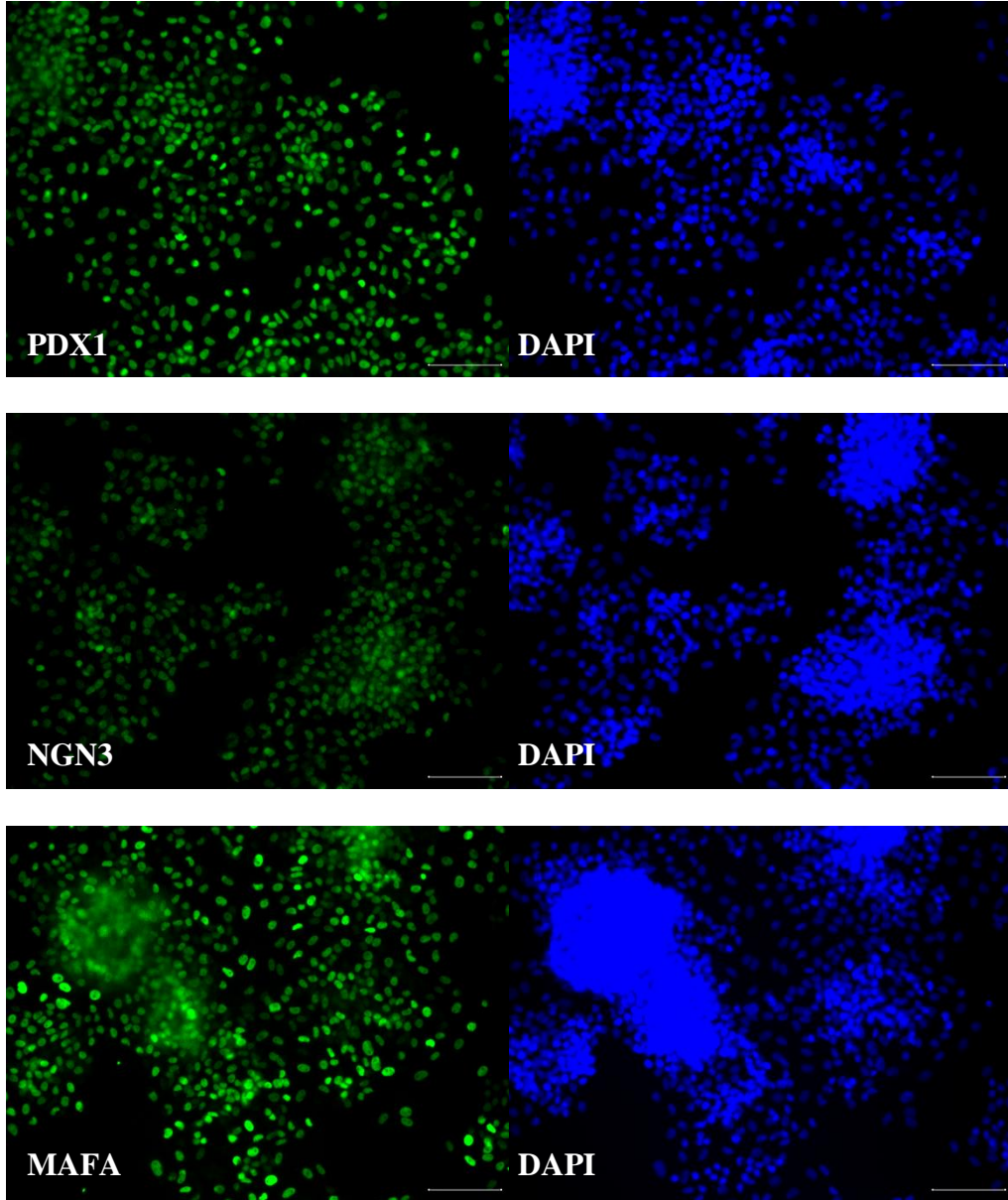
200 MOI adenovirüs verilen AR42J-B13 hücrelerinin Anti-Pdx1, Anti-Ngn3, Anti-MafA antikorları ile boyanması bütün yapıların %90-95 oranında eksprese olduğunu göstermiştir. *MyoD* TAD eklenen ve eklenmeyen bütün yapılarda *Pdx1*, *Ngn3* ve *MafA* ifadesi gerçekleşmiş ve ekzogenik proteinlerin çekirdeğe lokalize olduğu gösterilmiştir (Şekil 1).



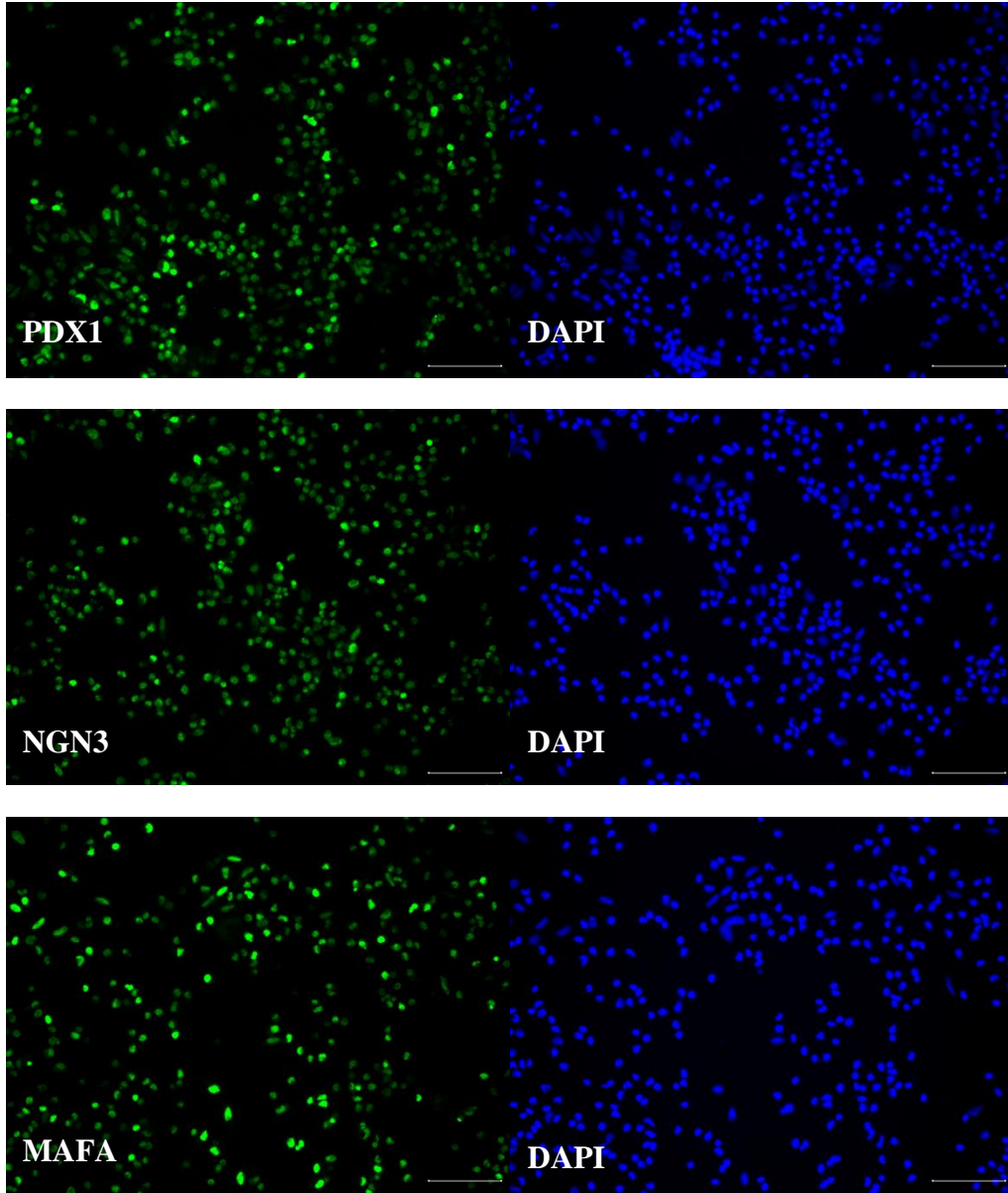
**Şekil.1A.** Ad-*NPM* virüsünün sırasıyla Anti-Pdx1, Anti-Ngn3, Anti-MafA (yeşil) ve DAPI (mavi) immünoboyama sonuçları. Cetvel 100µm'dir.



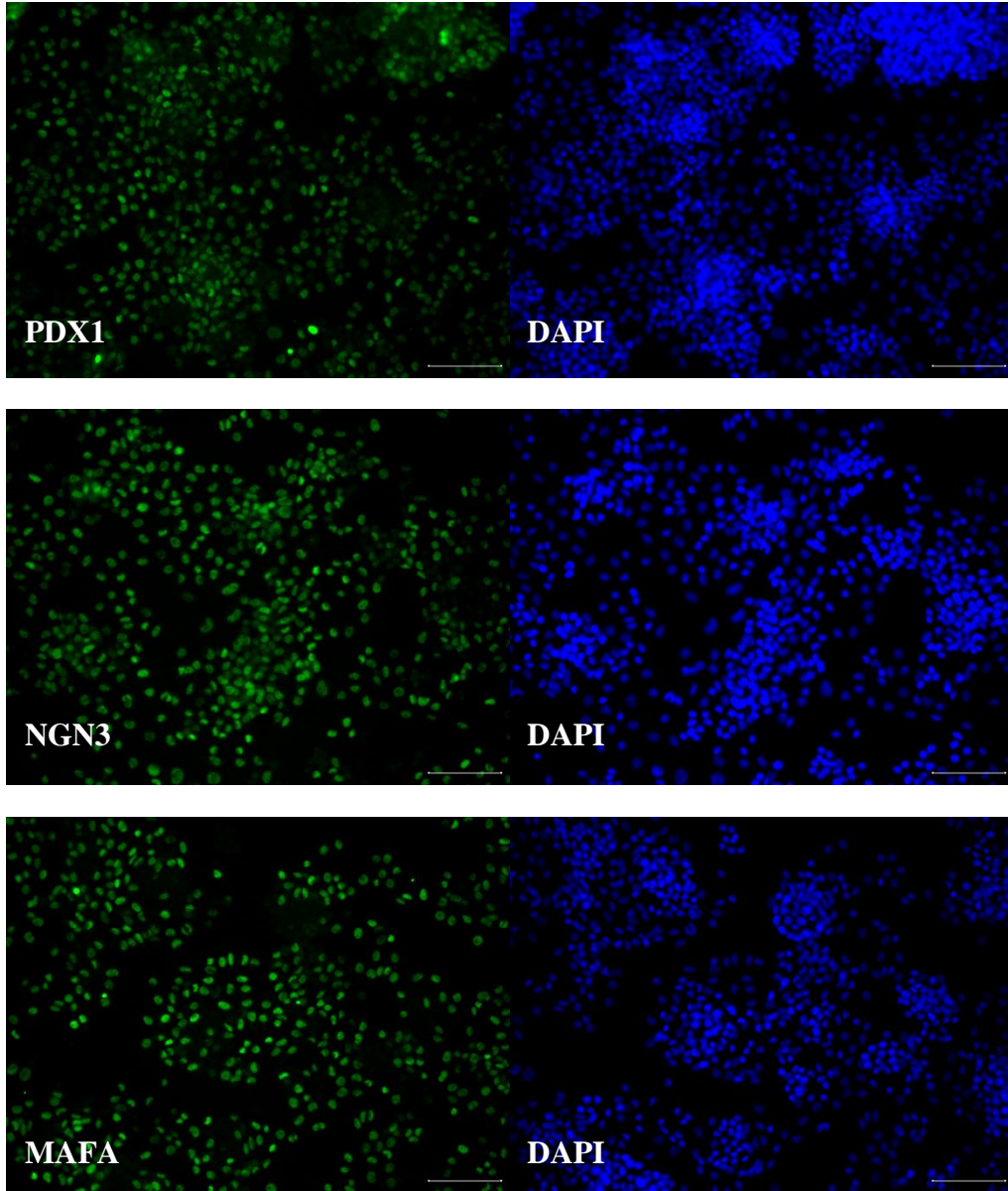
**Şekil.1B.** Ad-(*m<sub>3</sub>N*)PM virüsünün sırasıyla Anti-Pdx1, Anti-Ngn3, Anti-MafA (yeşil) ve DAPI (mavi) immünoboyama sonuçları. Cetvel 100µm'dir.



**Şekil.1C.** Ad-(*Nm<sub>3</sub>*)PM virüsünün sırasıyla Anti-Pdx1, Anti-Ngn3, Anti-MafA (yeşil) ve DAPI (mavi) immünoboyama sonuçları. Cetvel 100µm'dir.

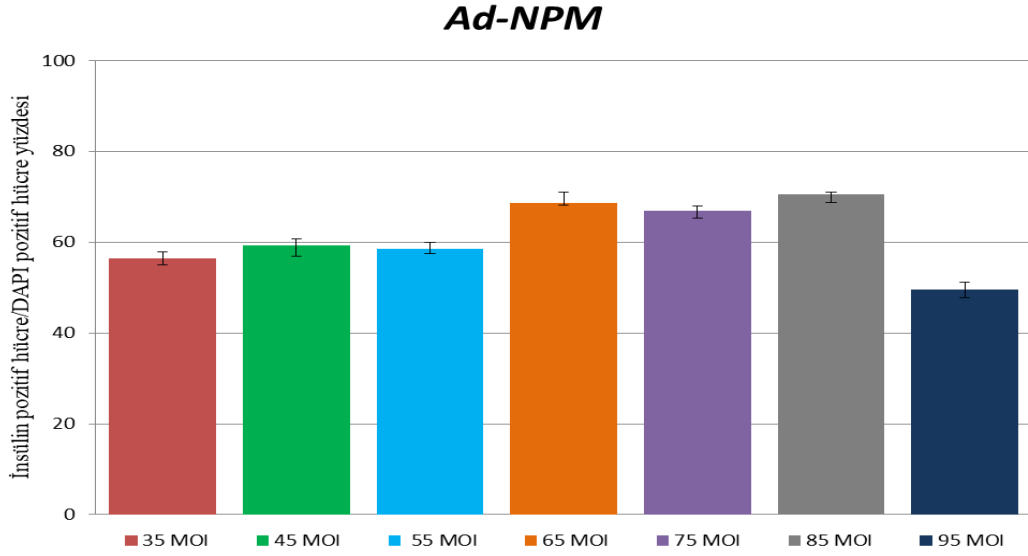


**Şekil.1D.** Ad-*N(Pm<sub>3</sub>)M* virüsünün sırasıyla Anti-Pdx1, Anti-Ngn3, Anti-MafA (yeşil) ve DAPI (mavi) immünoboyama sonuçları. Cetvel 100µm'dir.



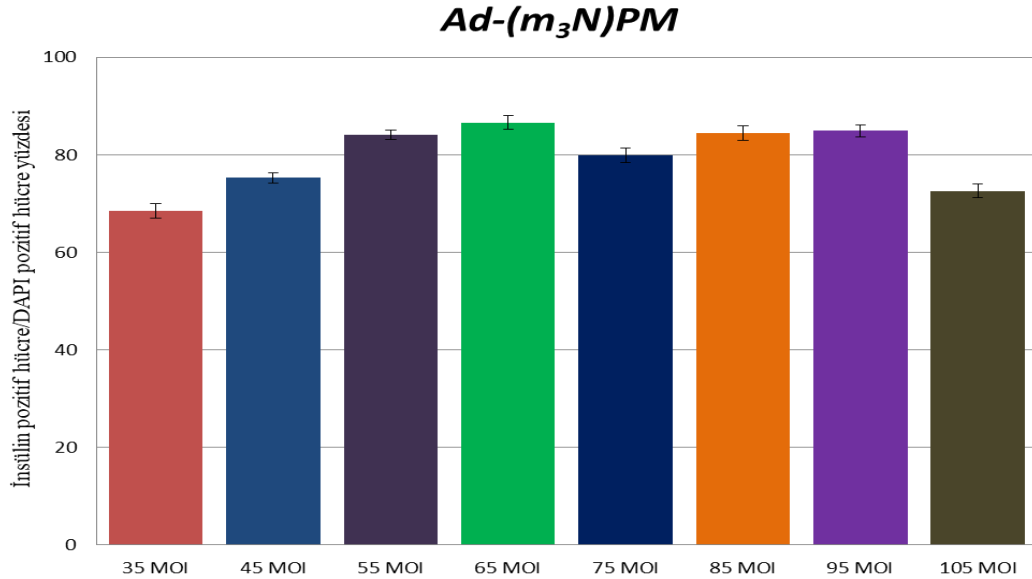
**Şekil.1E.** Ad-*N(m<sub>3</sub>P)M* virüsünün sırasıyla Anti-Pdx1, Anti-Ngn3, Anti-MafA (yeşil) ve DAPI (mavi) immünoboyama sonuçları. Cetvel 100µm'dir.

İnsülin pozitif hücre sayısının DAPI pozitif hücre sayısı oranına göre oluşturulan grafikte Ad-*NPM* için en uygun MOI'm %70 insülin üretme oranıyla 85 MOI olduğu gösterilmiştir (Şekil 2A).



**Şekil.2A.** Farklı MOI'larda Ad-*NPM* virüslerinin AR42J-B13 hücrelerinde İnsülin üretme yüzdeleri

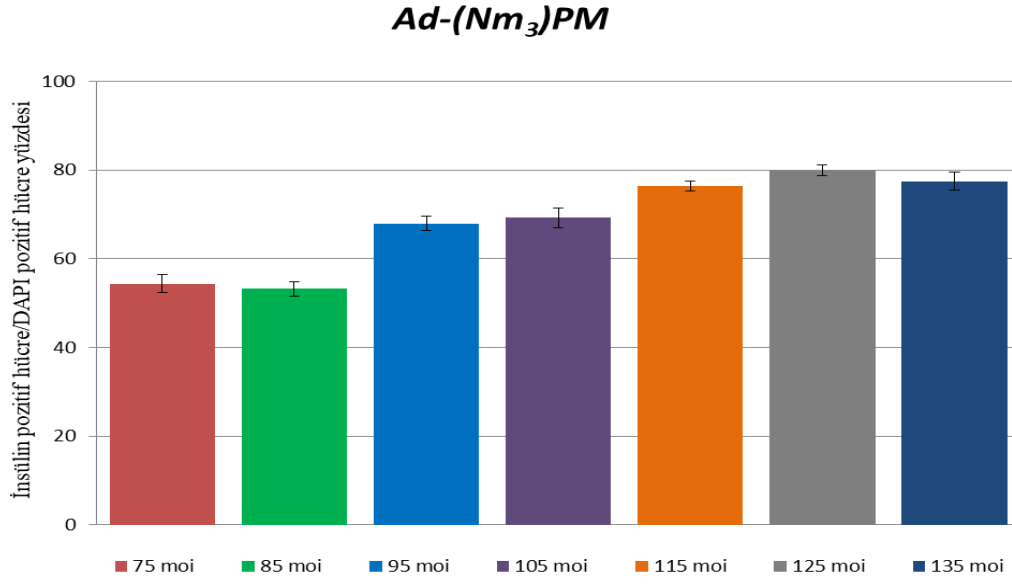
Ad-(*m<sub>3</sub>N*)*PM* için Anti-İnsülin ve DAPI boyamalarının sayılması sonucu ise en uygun %86 insülin üretme oranı ile 65 MOI'dır (Şekil 2B).



**Şekil.2B.** Farklı MOI'larda Ad-(*m<sub>3</sub>N*)*PM* virüslerinin AR42J-B13 hücrelerinde insülin üretme yüzdeleri

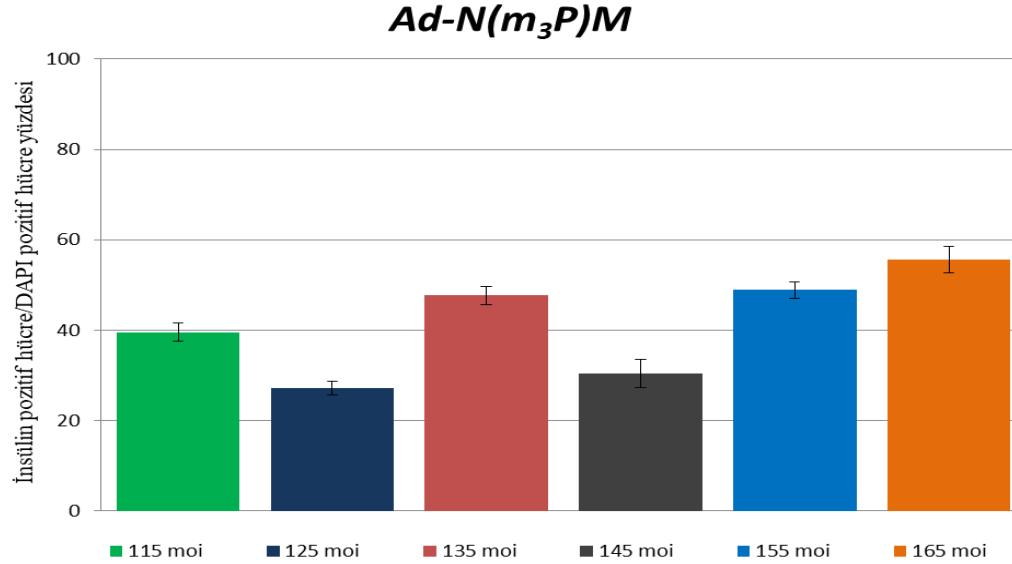


Ad-(Nm<sub>3</sub>)PM için Anti-İnsülin ve DAPI boyamalarının sayılması sonucu ise en uygun %79 insülin üretme yüzdesi ile 125 MOI'dır (Şekil 2C).



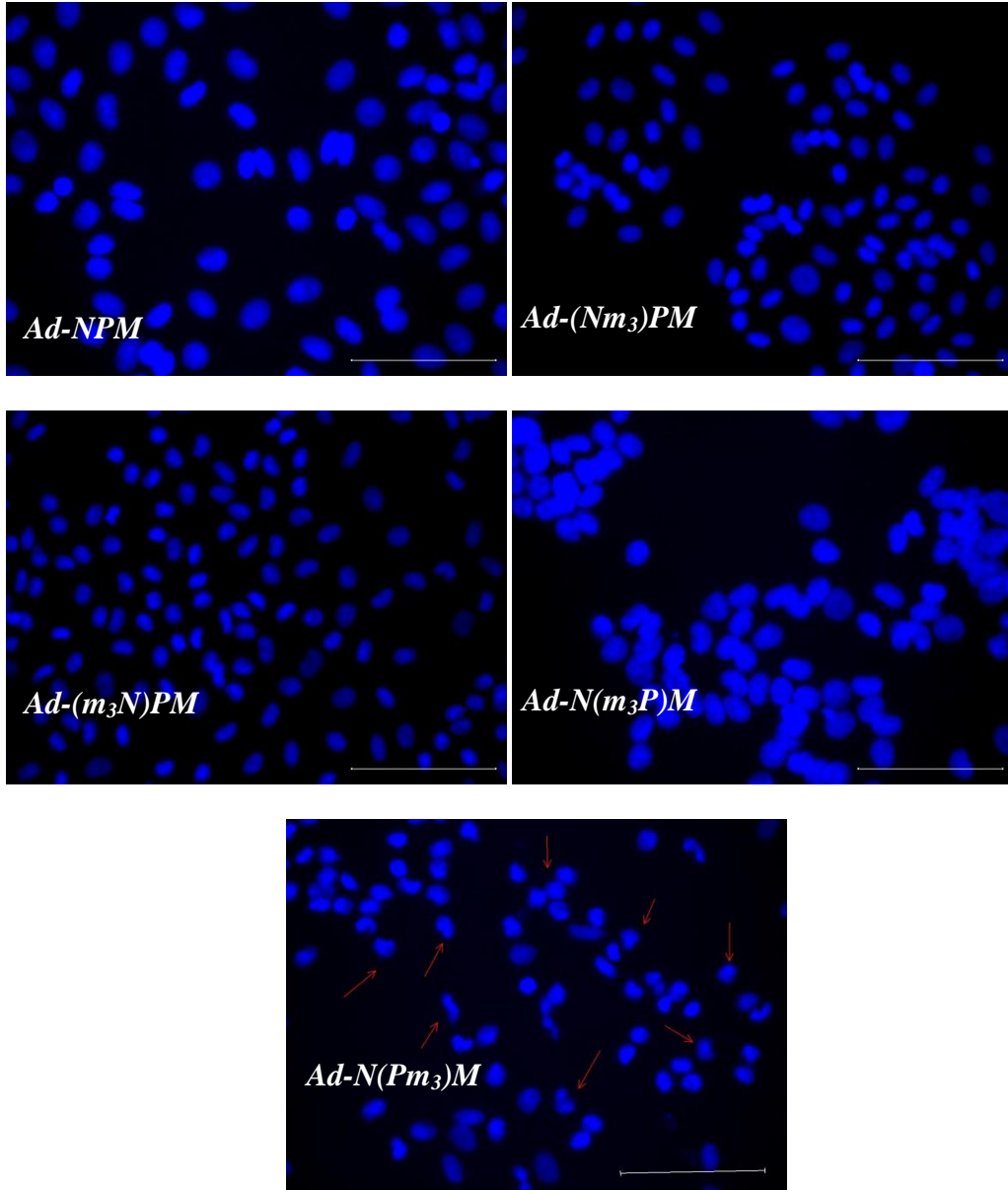
**Şekil.2C.** Farklı MOI'larda Ad-(Nm<sub>3</sub>)PM virüslerinin AR42J-B13 hücrelerinde insülin üretme yüzdeleri

Ad-N(m<sub>3</sub>P)M için Anti-İnsülin ve DAPI boyamalarının sayılması sonucu ise en uygun %55 insülin üretme yüzdesi ile 165 MOI'dır (Şekil 2D).



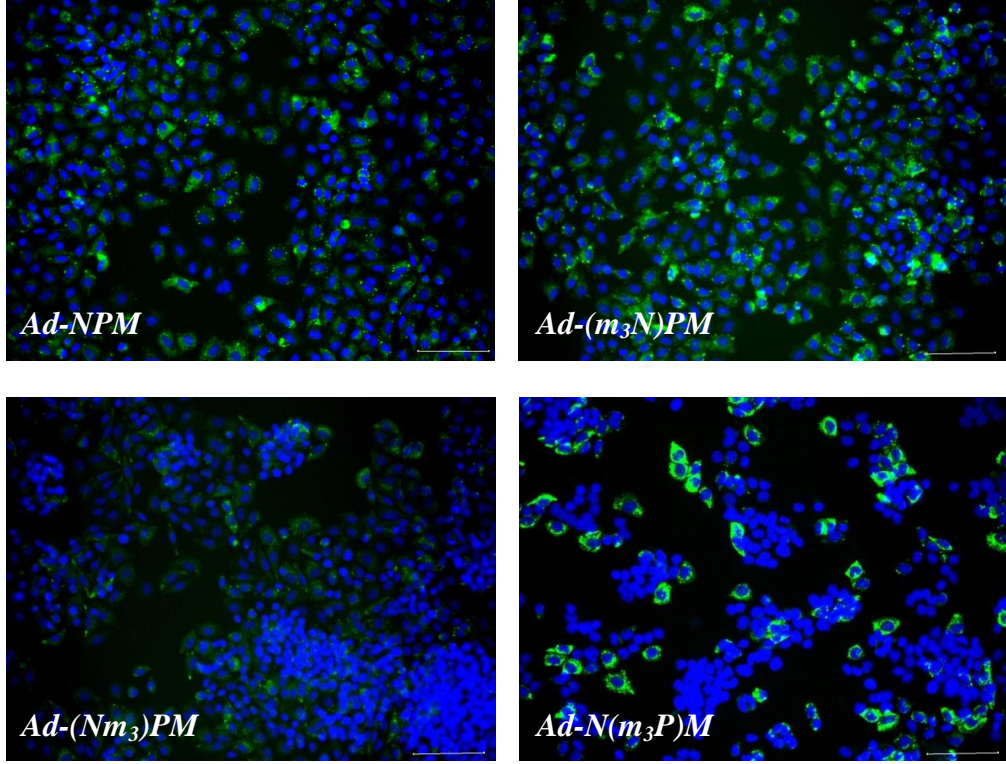
**Şekil.2D.** Farklı MOI'larda Ad-N(m<sub>3</sub>P)M virüslerinin AR42J-B13 hücrelerinde insülin üretme yüzdeleri

Ad- $N(Pm_3)M$  virüsü hücre kültürüne eklendiği zaman hücrelerin apoptoza girdikleri gözlenmiştir. İmmünoboyama yöntemi ile hücrelerin nükleusları boyanmış ve 40X objektifte çekimleri yapılmıştır (Şekil.3).  $N(Pm_3)M$  yapısı nükleusların bozulmasına ve hücrelerin ölümüne neden olduğu gözlenmiştir.  $NPM$  ve  $N(m_3P)M$  yapıları normal hücre morfolojisini değiştirmemişlerdir. Fakat  $MyoD$  TAD ( $m_3$ )'ün  $Ngn3$  genine rekombine edilen ( $m_3N$ ) $PM$  ve ( $Nm_3$ ) $PM$  yapıları hücrelerin hem nükleuslarının hem de sitoplazmalarının küçülmesine neden olmuşlardır.



**Şekil.3.** Adenovirüslerin AR42J-B13 hücrelerinin nükleusları üzerindeki etkileri. Cetvel 100 $\mu$ m'dir.

Ad-( $m_3N$ )PM, Ad-NPM, Ad-(Nm<sub>3</sub>)PM ve Ad-N( $m_3P$ )M virüslerinin en iyi insülin üretme yüzdesi veren MOI'larda transfekte edildiği AR42J-B13 hücrelerinin Anti-İnsülin (yeşil) ve DAPI (mavi) antikorumları ile immünoboyama sonucu Şekil.4'de gösterilmiştir. DAPI ve Anti-İnsülin boyamaları birleştirilerek insülinin sitoplazmada bulunduğu gösterilmiştir. İnsülin hormonunun ( $m_3N$ )PM yapısını taşıyan hücrelerde daha yüksek verimde üretildiği diğer hücrelerle karşılaştırıldığında gözlenmiştir.



**Şekil.4.** Ad-( $m_3N$ )PM, Ad-NPM, Ad-(Nm<sub>3</sub>)PM ve Ad-N( $m_3P$ )M virüslerinin AR42J-B13 hücrelerinde Anti-İnsülin (yeşil) ve DAPI (mavi) antikorumları ile immünoboyama sonucu. Cetvel 100µm'dir.

## 5. SONUÇLAR

Oluşturulan adenovirüsler hücre içine etkili bir şekilde girebilmiştir ve her bir transkripsiyon faktörünün nükleusta olduğu gösterilmiştir. *Pdx1*, *Ngn3* ve *MafA* genleri ile yapılan önceki çalışmalarda araştırmacılar hücrelerin düşük verimde beta hücresine programlandıklarını belirtmişlerdir. Bunun nedeninin bu üç ana genin farklı plazmitlerle verilmesi olduğu düşünülmüştür. 2A peptidi kullanılarak *Pdx1*, *Ngn3* ve *MafA* genleri tek bir plazmitte birleştirilmiştir. Birleştirilen genler farklı hücre tiplerine transfekte edildiklerinde en iyi farklılaşma oranı asinar hücrelerinde gözlenmiştir. Fakat bu beta hücresine farklılaşma oranı nicel ve nitel olarak düşük verimde gerçekleşmiştir. Bunun nedeni farklılaşmış bir hücrede kromozom yapısının heterokromatin olmasından kaynaklı olabilir. Dışarıdan eklenen transaktivasyon faktörlerinin hedef DNA sekansına ulaşamaları etkili bir şekilde beta hücresi programlanmasını engel olabilir. Bu yüzden daha güçlü olan *MyoD* transkripsiyon faktörü seçilmiştir. *MyoD* geni tek başına bir hücreye transfekte edildiğinde kas hücresi programlanmasına neden olmaktadır. DNA'ya güçlü bir şekilde bağlanıp heterokromatin yapısının açılmasını sağlamaktadır.

*MyoD* transkripsiyon faktörünün transaktivasyon domaini belirlenerek fare *Pdx1* ve *Ngn3* genlerinin her iki terminaline de eklenmiştir. Fare *MafA* genine eklenememesi, *MafA* geninin fazla oranda sitozin nükleotidi tekrarları içermesinden kaynaklanmıştır. *MafA* geni 1053 bp olup sitozin nükleotidi tekrarlarından dolayı PCR yöntemi ile kopyalanamamıştır. Birleştirilen 3 gen ve *MyoD* TAD adenovirüs genomuna aktarılmıştır. Adenovirüs olarak çoğaltılan yapılar sıçan asinar hücre hattı olan AR42J-B13 hücrelerine transfekte edilerek karşılaştırmaları yapılmıştır. Fare *PNM* genleri ile sıçan *PNM* genleri (*Pdx1*-%90, *Ngn3*-%91, *MafA*-%97) yüksek oranda benzerlik göstermektedir. Önceki çalışmalarda sıçan AR42J-B13 hücre hattının yüksek verimde beta hücresine farklılaştığı gösterilmiştir. Bu yüzden bu hücre hattı seçilmiştir.

Adenovirüsler hücrelere verildikten 3 gün sonra fikslenerek immünoboyama yöntemi ile insülin proteinin üretilip üretilmediği kontrol edilmiş ve karşılaştırma yapmak için insülin üreten hücreler sayılmıştır. Özellikle Ad-*N(Pm<sub>3</sub>)M* virüsü hücrelerin kültür ortamlarına aktarıldıkları zaman hücrelerde strese neden olmuştur. Hücre kültür ortamına eklendikten itibaren nükleus yapılarının bozulmaya başladığı ve 3'üncü günün sonunda da bozulmanın devam ettiği tespit edilmiştir. Bu nedenle Ad-*N(Pm<sub>3</sub>)M* virüsü eklenen hücre kültürlerinde insülin proteini için antikorla boyandıktan sonra sayım ve istatistiksel hesaplama yapılamamıştır. Ad-*N(m<sub>3</sub>P)M* virüsü ise %55 oranında insülin üretimine neden olduğu gözlenmiştir. *Pdx1* ORF'sinin N ve C terminaline *MyoD* TAD eklenmesi beta hücresi farklılaşması üzerinde negatif etki yaratmıştır.

Rekombinant *Pdx1* proteini hücrelerde toksik etki yaratmış olabilir. *MyoD* TAD, PDX1 proteinin yanlış katlanmasına ve protein fonksiyonunun bozulmasına neden olmuş olabilir. Yanlış katlanan protein nükleusta birikerek hücrenin nükleus yapısını etkilemiş olabilir.

Ad-*NPM* için farklı MOI'larda sayım yapıldığında en iyi insülin üretiminin %70 olduğu tespit edilmiştir. Ad-*(Nm<sub>3</sub>)PM* için en iyi insülin oranı %79 iken Ad-*(m<sub>3</sub>N)PM* için ise en iyi insülin oranı %86 bulunmuştur. *MyoD* transaktivasyon domaininin etkisi ile insülin üretimi artmıştır. Ayrıca *(Nm<sub>3</sub>)PM* ve *(m<sub>3</sub>N)PM* yapıları hücrelerin boyutlarının küçülmesine neden olmuşlardır. Beta hücrelerinin nükleus ve sitoplazma boyutları diğer hücelere oranla küçüktür. Bu sonuçlar *MyoD* TAD'ın hücrelerin beta hücre karakteri kazanmasında daha etkili olabileceğini göstermiştir.

Yapılan tez çalışmasında nicel olarak beta hücresi farklılaşması gösterilmiştir. Bu çalışmaya ek olarak hücrelerin beta hücresi karakterini ne kadar sürdürdükleri tespit edilmelidir. Ortamda bulunan glukoz miktarına göre insülin üretimini kontrol edip etmediğine bakılmalıdır. Programlanan hücrelerin *in vivo* ortamda tümör oluşturma kapasitesi ve beta hücresi varlığını sürdürebilirliği tespit edilmelidir. Her bir yapının adenovirüs aracılığıyla deney hayvanlarına transfekte edilerek *in vivo* ortamda karşılaştırılmaları yapılmalıdır.

## 5. KAYNAKLAR

- Ahlgren, U., Jonsson, J., Jonsson, L., Simu, K. and Edlund, H. 1998. Beta-Cell-specific inactivation of the mouse *Ipfl/Pdx1* gene results in loss of the beta-cell phenotype and maturity onset diabetes. *Genes Dev.*, 12:1763–1768.
- Akıncı, E., Banga, A., Greder, L.V., Dutton, J.R. and Slack, J.M.W. 2012. Reprogramming of pancreatic exocrine cells towards a beta ( $\beta$ ) cell character using *Pdx1*, *Ngn3* and *MafA*. *Biochem. J.*, 442:539–550.
- Banga, A., Akıncı, E., Greder, L.V., Dutton, J.R. and Slack, J.M.W. 2012. In vivo reprogramming of *Sox9*<sup>+</sup> cells in the liver to insulin-secreting ducts. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 109:15336-15341.
- Bluestone, J.A., Herold, K. and Eisenbarth, G. 2010. Genetics, pathogenesis and clinical interventions in type 1 diabetes. *Nature*, 464:1293–1300.
- Cavelti-Weder, C., Li, W., Weir, G.C. and Zhou, Q. 2014. Direct lineage conversion of pancreatic exocrine to endocrine beta cells in vivo with defined factors. *Methods Mol. Biol.*, 1150:247–262.
- Choi, J., Costa, M.L., Mermelstein, C.S. et al. 1990. *MyoD* converts primary dermal fibroblasts, chondroblasts, smooth muscle, and retinal pigmented epithelial cells into striated mononucleated myoblasts and multinucleated myotubes. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87:7988–7992.
- de Felipe, F.P. 2002. Polycistronic viral vectors. *Curr. Gene Ther.*, 2:355–378.
- Donnelly, M.L.L., Hughes, L.E., Luke, G., Mendoza, H., Dam, E., Gani, D. and Ryan, M.D. 2001. The 'cleavage' activities of foot-and-mouth disease virus 2A site-directed mutants and naturally occurring '2A-like' sequences. *J. Gen. Virol.*, 82:1027-41.
- Fang, J., Qian, J.J., Yi, S., Harding, T.C., Tu, G.H., Vanroey, M. and Jooss, K. 2005. Stable antibody expression at therapeutic levels using the 2A peptide. *Nat. Biotechnol.*, 23:584–590.
- Gradwohl, G., Dierich, A., Lemeur, M. and Guillemot, F. 2000. *Neurogenin3* is required for the development of the four endocrine cell lineages of the pancreas. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1607–1611.

- Hirai, H., Tani, T. and Kikyo, N. 2010. Structure and functions of powerful transactivators: VP16, MYOD and FOXA. *Int. J. Dev. Biol.*, 54:1589–159.
- Hirai, H., Tani, T., Katoku-Kikyo, N., Kellner, S., Karian, P., Firpo, M. and Kikyo, N. 2011. Radical Acceleration of Nuclear Reprogramming by Chromatin Remodeling with the Transactivation Domain of *MyoD*. *Stem Cells*, 29:1349–1361.
- Katayama, M., Hirayama, T., Horie, K., Kiyono, T., Donai, K., Takeda, S., Nishimori, K. and Fukuda, T. 2016. Induced Pluripotent Stem Cells With Six Reprogramming Factors From Prairie Vole, Which Is an Animal Model for Social Behaviors. *Cell Transplant*, 25(5):783-96.
- Kim, J.H., Lee, S.R., Li, L.H., Park, H.J., Park, J.H., Lee, K.Y., Kim, M.K., Shin, B.A. and Choi, S.Y. 2011. High cleavage efficiency of a 2A peptide derived from porcine teschovirus-1 in human cell lines, zebrafish and mice. *Plos One*, 6:18556.
- Li, W., Cavelti-Weder, C. et al. 2014. Long-term persistence and development of induced pancreatic beta cells generated by lineage conversion of acinar cells. *Nat. Biotechnol.*, 32(12):1223-30.
- Li, W., Nakanishi, M., Zumsteg, A., Shear, M., Wright, C., Melton, D.A. and Zhou, Q. 2014. In vivo reprogramming of pancreatic acinar cells to three islet endocrine subtypes. *eLife*, 3:e01846.
- Matsuoka, T.A., Artner, I., Henderson, E., Means, A., Sander, M. and Stein, R. 2004. The *MafA* transcription factor appears to be responsible for tissue-specific expression of insulin. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 101:2930-3.
- Matsuoka, T.A., Kawashima, S. et al. 2017. *MafA* Enables *Pdx1* to Effectively Convert Pancreatic Islet Progenitors and Committed Islet  $\alpha$ -Cells Into  $\beta$ -Cells In Vivo. *Diabetes*, 66:1293-1300.
- Nishimura, W., Takahashi, S. and Yasuda, K. 2014. *MafA* is critical for maintenance of the mature beta cell phenotype in mice. *Diabetologia*, 58:566-74.
- Offield, M.F. et al. 1996. *Pdx-1* is required for pancreatic outgrowth and differentiation of the rostral duodenum. *Development*, 122:983–995.
- Pan, F.C. and Wright, C. 2011. Pancreas Organogenesis: From Bud to Plexus to Gland. *Developmental Dynamics*, 240:530–565.

- Shamblott, M.J., O’driscoll, M.L., Gomez, D.L. and Mcguire, D.L. 2016. *Neurogenin 3* is regulated by neurotrophic tyrosine kinase receptor type 2 (TRKB) signaling in the adult human exocrine pancreas. *Cell Communication and Signaling*, 14:23.
- Shih, H. P., Wang, A., and Sander, M. 2013. Pancreas Organogenesis: From Lineage Determination to Morphogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 29:19.1–19.25.
- Stoffers, D.A., Zinkin, N.T., Stanojevic, V., Clarke, W.L. and Habener, J.F. 1997. Pancreatic agenesis attributable to a single nucleotide deletion in the human *IPF1* gene coding sequence. *Nature Genetics*, 15:106–110.
- Szymczak, A.L., Workman, C.J., Wang, Y., Vignali, K.M., Dilioglou, S., Vanin, E.F. and Vignali, D.A. 2004. Correction of multi-gene deficiency in vivo using a single ‘selfcleaving’ 2A peptide-based retroviral vector. *Natl. Biotechnol.*, 22:589-94.
- Szymczak-Workman, A.L., Vignali, K.M. Ve Vignali, D.A. 2012. Design and construction of 2A peptide-linked multicistronic vectors. *Cold Spring Harb. Protoc.*, (2):199-204.
- Treff, N.R., Vincent, R.K., Budde, M.L., Browning, V.L., Magliocca, J.F., Kapur, V. and Odorico, J.S. 2006. Differentiation of embryonic stem cells conditionally expressing *neurogenin 3*. *Stem Cells*, 2529–2537.
- Ünal, D., Kara, A., Aksak, S., Altunkaynak, B.Z. and Yıldırım, S. 2012. Insulin hormone: Mechanism and effects on the body and relationship with central nervous system. *Dicle Med. J.* 39:310-315.
- Weir, G.C. and Bonner-Weir, S. 2013. Islet  $\beta$  cell mass in diabetes and how it relates to function, birth, and death. *Ann. NY. Acad. Sci.*, 1281:92–105.
- Zhang, C., Moriguchi, T. et al. 2005. *MafA* is a key regulator of glucose-stimulated insulin secretion. *Mol. Cell. Biol.*, 25:4969-76.
- Zhou, Q. and Melton, D.A. 2008. Extreme Makeover: Converting One Cell into Another. *Cell Stem Cell*, 3:382.
- Zhou, Q., Brown, J., Kanarek, A., Rajagopal, J. and Melton, D.A. 2008. In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to beta-cells. *Nature*, 455:627–632.



## ÖZGEÇMİŞ

**PELİN ÜNAL**

[ppelinunal@gmail.com](mailto:ppelinunal@gmail.com)



## ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi
2014 - Devam Ediyor	Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Antalya
Lisans	Cumhuriyet Üniversitesi
2010-2014	Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Sivas

### Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

Akıncı, E., Yıldız, M., Ünal, P., Badakul, G. 2017. In vitro transcription and validation of human pancreatic transcription factors' mRNAs. *Turkish Journal Of Biology*. 41: 708-718.

### Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler

In vitro synthesis of redesigned pancreatic mRNAs: A current approach for gene delivery. 2016. European Biotechnology Congress, Riga, Latvia. VOL.231, pp.S25.

Crispr/dCas9 and gene activation. 2017. European Biotechnology Congress, Dubrovnik, Croatia. VOL.256, pp.S42.