

Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya
(sol yandaki gibi) olacak .



Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak



Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

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

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**“İNDÜKLENEREK ADACIK BENZERİ HÜCRE
KÜMELEŞMELERİ (AHK) OLUŞTURAN PANC1 HÜCRE
HATTINDA *SEKRETOGRANİN* (SCG2) GEN ANLATIMININ
GÖSTERİLMESİ”**

ASLIHAN KAYGUSUZ

**DANIŞMAN
DR. ÖĞR. ÜYESİ MEHVEŞ PODA**

**GENETİK ANABİLİM DALI
GENETİK**

İSTANBUL-2018

TEZ ONAYI**YÜKSEK LİSANS TEZİ ONAYI**

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Genetik Anabilim Dalı, Genetik Programında Yüksek Lisans öğrencisi Aslıhan KAYGUSUZ tarafından Dr. Öğr. Üyesi Mehveş PODA'nın danışmanlığında hazırlanan "**İndüklenerek Adacık Benzeri Hücre Kümeleşmeleri (Ahk) Oluşturan Panc1 Hücre Hattında Sekretogranin (SCG2) Gen Anlatımının Gösterilmesi**" başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 14.09.2018 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.


Prof. Dr. Nihan ÜNALTUNA
İ.Ü. Aziz Sancar DETAE
Genetik Anabilim Dalı

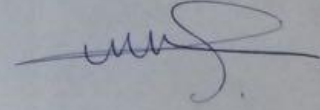

Dr. Öğr. Üyesi Mehveş PODA
İ.Ü. Aziz Sancar DETAE
Genetik Anabilim Dalı


Doç. Dr. Emel ERGÜL
Kocaeli Üni. Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

BEYAN**BEYAN**

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Aslıhan Kaygusuz



İTHAF

Bu Tezimi Anneme İthaf Ediyorum.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmamın gerçekleştirilmesinde, kıymetli zamanını ayırıp sabırla ve büyük bir ilgiyle bilgilerini benimle paylaşan, mesleki hayatımda da bana verdiği değerli bilgilerden faydalanacağım saygıdeğer danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Mehveş PODA'ya,

Gerek tezime yardımlarıyla, gerek mükemmel dostlukları, enerjileri ve destekleriyle bana yardımda bulunarak yol gösteren, gelecekteki hayatlarında hepsinin çok güzel yerlerde olmalarını dilediğim kıymetli arkadaşlarım; Uzm. Selin Demirer'e, Uzm. Muhammed Abdulvahid Kalkan'a, Uzm. İrem Yağmur Dikerler'e, Pınar Köseoğlu'na, Esra Kaynak'a, Melike Binnur Bahçekapılı'ya ve Tuğçe Sudutan'a,

Hayatımın son 12 yılı boyunca daima yanımda olan, aynı liseyi, aynı üniversiteyi, aynı laboratuvarı, hayatın güzelliklerini, çirkinliklerini paylaşabildiğim, beni her daim dostlukları ile destekleyen, yanlarında mutlu ve huzurlu hissettiğim güzel dostlarım Hilal Şentürk'e ve Gizem Şentürk'e,

Hayatımın her evresinde koşulsuz beni seven, kanatları altında iken kendimi güvende ve güçlü hissettiğim, benden umutlarını, güvenlerini, sevgilerini bir an eksik etmeyen, maddi manevi her daim yanımda olan, her daim bana sonsuz inanan, destekleyen canım annem ve babam başta olmak üzere tüm aileme,

Tezim sürecinse bana yardımcı olan, yeri geldiğinde bu stresi benimle yaşayan, fikir alışverişi yaptığım ve fikirlerine önem verdiğim sevgili yeğenim İremnur Bayram'a en içten teşekkürlerimi sunuyorum.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 27643

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	2
BEYAN.....	3
İTHAF.....	4
TEŞEKKÜR.....	5
İÇİNDEKİLER	6
TABLolar LİSTESİ.....	8
ŞEKİLLER LİSTESİ	9
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	10
ÖZET	11
ABSTRACT.....	13
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	14
2. GENEL BİLGİLER	16
2.1. PANKREAS	16
2.1.1. Langerhans Hücre Adacıkları	18
2.1.1.1. α (Alfa) Hücreleri.....	19
2.1.1.2. β (Beta) Hücreleri ve Diyabetle (DM) İlişkisi	19
2.1.1.3. Δ (Delta) Hücreleri.....	19
2.1.1.4. PP (Pankreatik Polipeptid) Hücreleri	20
2.1.1.5. γ (Gamma) Hücreleri.....	20
2.1.2. Pankreastan Salgılanan Hormonlar	21
2.1.2.1. İnsülin.....	21
2.1.2.2. Somatostatin.....	22
2.1.2.3. Glukagon	23
2.2. PANC-1 İnsan Hücre Hattı	23
2.3. Sekretogranin (SCG2).....	24
2.4. POU5F1 Geni (NM_000209):	26
2.5. PDX1 Geni(NM_000209):.....	27
2.6. KLF4 Geni (NM_001314052) :	27
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	28
3.1.1. Hücrelerin Çözülmesi:	29

3.1.1.1. Hücrelerin İnkübasyonu ve Pasajlanması:	30
3.1.1.2. PANC1 Hücrelerinin Dondurulması	31
3.2. Farklılaştırma protokolü.....	32
3.3. İmmünofloresan Mikroskopi	36
3.4. Jel Elektroforezi ve Görüntüleme:	40
3.5. Gen Ekspresyonundaki Rölatif Değişimin ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) Hesaplanması:.....	40
4. BULGULAR.....	44
4.1. Hücre Kültürü Çıktıları İmmün Floresan.....	44
4.1.1. Bazal Kültür ve Farklılaşma Protokolü Uygulanarak Elde Edilen Hücreler ...	44
4.1.2. SCG2 Proteini İçin İmmün Floresan Mikroskopi Bulguları	45
4.2. Gen Anlatım Düzeylerinin Tespiti ve İstatistiksel Değerlendirilmesi	46
4.2.1. PZR Ürünlerinin Boyutlarının Kontrolü	46
5.TARTIŞMA	52
KAYNAKLAR	56
HAM VERİLER	63
FORMLAR	64
ETİK KURUL KARARI	65
PATENT HAKKI İZNİ	66
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	67
ÖZGEÇMİŞ	68

TABLÖLER LİSTESİ

Tablo 1: Hücre kültür günü, kullanılan kültür medyumları ve RNA için örnek alma günü.....	34
Tablo 2: cDNA sentez protokolü.....	37
Tablo 3: Seçilen hedef genlerin isimleri, primer dizileri ve ampikon boyları...	39
Tablo 4: <i>SCG2</i> , <i>SST</i> , <i>GCG</i> , <i>POU5F1</i> , <i>PDX1</i> , <i>KLF4</i> , <i>PPIA</i> genleri için uygulanan reaksiyon karışımı.....	39
Tablo 5: <i>SCG2</i> , <i>SST</i> , <i>GCG</i> , <i>POU5F1</i> , <i>PDX1</i> , <i>KLF4</i> , <i>PPIA</i> genleri için uygulanan qPCR protokolü.....	40
Tablo 6: Kullanılan cihazlar ve markaları.....	41
Tablo 7: Kullanılan kimyasallar ve malzemeler.....	42
Tablo 8: Genlere göre ortalama $2^{-(ddCt)}$, G15/G0 oranları, standart sapma ve P değerleri.....	50

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: Pankreas organı.	16
Şekil 2: Pankreasın lokasyonu.	17
Şekil 3: Pankreas ve Langerhans adacıkları.	18
Şekil 4: Pankreas hücrelerinden delta ve beta hücreleri arasındaki hormonal iletişimler.	21
Şekil 5: İnsülin hormonunun yapısı.	22
Şekil 6: <i>Sekretogranin (SCG2)</i> gen yapısı ideogram görüntüsü.....	24
Şekil 7: PANC-1 hücrelerinin farklı kültür şartlarındaki invert mikroskop görüntüleri.....	43
Şekil 8: <i>SCG2</i> proteininin adacık benzeri hücre kümelerinde immün floresan boyama ile gösterilmesi (40X).....	44
Şekil 9: A) <i>SCG2</i> B) <i>PPIA</i> , <i>PDX1</i> genlerine ait amplikonların agaroz %2'lik jeldeki görüntüsü.....	46
Şekil 10: A) <i>SST</i> B) <i>GCG</i> genlerine ait amplikonların agaroz %2'lik jeldeki görüntüsü.....	47
Şekil 11: A) <i>KLF4</i> B) <i>POU5F1 (OCT3)</i> genlerine ait amplikonların agaroz %2'lik jeldeki görüntüsü.....	48
Şekil 12: A) <i>PDX1</i> B) <i>POU5F1</i> C) <i>SST</i> D) <i>GCG</i> E) <i>KLF4</i> F) <i>SCG2</i> genlerine ait değişim faktörleri $2^{-(ddCt)}$ metodu uygulanarak gösterilmiştir.....	49

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

SCG 2: Secretogranin 2

AHK: Adacık benzeri hücre kümeleşmeleri

LDCV: Büyük yoğun çekirdek kesecikleri (large dense core vesicles)

DM: Diabetes Mellitus

SST: Somatostatin

GCG: Glukagon

POU5F1: POU Class 5 Homeobox 1

OCT-4: Oktamer bağlayıcı transkripsiyon faktörü 4 (octamer-binding transcription factor 4)

EKH: Embriyonik kök hücreleri

PDX1: Pankreatik ve duodenal homeobox 1 (pancreatic and duodenal homeobox 1)

MODY: Maturity-onset diabetes of the young

LDCV: Large Dense Core Vesicles

SCG 2: Secretogranin 2

EAAT 2: Uyarıcı amino asit taşıyıcı (Excitatory amino acid transporter)

VGLUT 3: Veziküler glutamat taşıyıcı tip 3 (Vesicular glutamate transporter type 3)

PZR : Polimer Zincir Reaksiyonu

qPZR : Kantitatif Polimer Zincir Reaksiyonu

ÖZET

Kaygusuz A. İndüklenerek Adacık Benzeri Hücre Kümeleşmeleri (AHK) Oluşturan PANC1 Hücre Hattında *Sekretogranin (SCG2)* Gen Anlatımının Gösterilmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul. 2018.

Konu ve Amaç: Pankreas kaynaklı bir kanser hücre hattı olan PANC-1 hücreleri eksokrin kökenli olup, insüline çoğalarak tepki verirler. Bu hatta ait hücreler, kültür şartları özel biçimde düzenlendiğinde, pankreasa özgü bazı hormonları üretecek şekilde kümeleşirler. Bu tez kapsamında indüklenen PANC-1 hücrelerinde, vesiküler transport proteini kodlayan *SCG2* ekspresyonunda oluşan değişimin saptanması amaçlandı.

Üç boyutlu bir hücresel model olarak kullanılan adacık benzeri hücre kümelerinde (AHK), sekresyon proteini ekspresyonundaki değişime paralel olarak hormon üretiminde de değişim olabileceği öngörüsüyle, *sekreto granin (SCG2)* ile birlikte *somatostatin (SST)* ve *glukagon (GCG)* gen anlatımları da incelendi.

Metot: İndüklenmiş ve bazal koşuldaki hücrelerden elde edilen RNA materyallerinden cDNA sentezlendi ve *SCG2* geninin spesifik transkriptini çoğaltacak şekilde kRT-PZR yapıldı. Diğer yandan, *PDX1*, *POU5F1*, *KLF4*, *SST*, *GCG* genlerindeki ekspresyonlar kontrol amaçlı olarak deney modelimizde takip edildi ve array sonuçları valide edildi. Bu hücre tipinde ekspresyonunun daha stabil olması sebebiyle, “house-keeping” kontrol geni olarak *PPIA* kullanıldı.

Sonuç: Bu tez çalışmasıyla, önemli bir vesiküler transport proteini olan *SCG2*’nin gen anlatım düzeylerinde, AHK oluşumunu indükleyen farklılaşma protokolünün 0 ve 14’üncü günleri karşılaştırıldığında, yaklaşık 30,5 kat artış olduğu ($p=1.17 \times 10^{-5}$) saptandı. Diğer yandan *SCG2* kadar olmamakla birlikte *SST* ve *POU5F1* genlerinde de anlamlı değişim olduğu saptandı.

Anahtar Kelimeler : PANC 1 hücre hattı, adacık benzeri hücre kümeleşmeleri (AHK), pankreas, *SCG2*, Langerhans adacıkları

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 27643



ABSTRACT

Kaygusuz, A., Revealing *Secretogranine (SCG2)* Gene Expression in PANC1 Cell Line that Forms Islet Like Cell Aggregates (ISA) by Induction. İstanbul University, Institute of Medical Science, Genetic Department, Master Thesis. İstanbul, 2018

Subject and Aim: Pancreas tissue originated cancerous cell line PANC-1 is exocrine derived and shows proliferative response to insulin. This cell line can form aggregates under some specific conditions and it may produce some of the pancreatic hormones. Parallel to the hormonal expression, we aimed to investigate *secretogranine (SCG2)*, *somatostatin (SST)* and *glucagon (GCG)* gene expression profiles in these three dimensional islet-like cell aggregates (ICA), in order to test our prediction indicated as they can be used as a cellular model for screening of molecules related to secretion.

Method: Using the RNA from harvested cells under basal and induced conditions, the cDNA was synthesized and RT-qPCR was performed to detect *SCG2* specific amplification. In our experimental model, *PDX1*, *POU5F1*, *KLF4*, *SST* and *GCG* expressions were tracked as control genes, and array results were validated. As house-keeping control *PPIA* gene was used because of its preferable expression stability.

Result: In this thesis study; the gene expression levels of *SCG2* (an important vesicular transport protein), were found to be increased by 30.5 ($p=1.17 \times 10^{-5}$) fold when comparing the cells under basal conditions to nascent ICA formations (day 0 and day 14 differentiation protocol samples). Moreover, *SST* and *POU5F1* gene expressions were also significantly increased although not reaching significance levels as of *SCG2* gene.

Key Words: PANC 1 cell line, Islet Like Cell Aggregates (ICA), Pancreas, *SCG2*, Langerhans islets

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No. 27643

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Secretogranin 2 (SCG2), endokrin ve sinir sisteminde yaygın olarak gözlenen, asidik salgı proteinlerinden granin ailesinin bir üyesidir. Sekretuar hücreler için marker özelliği gösteren organellerden olan bu büyük ve yoğun merkezi keseciklerin (large dense core vesicles LDCV'ler) varlığı, SCG2 ile kontrol edilen sekretuar yolak mekanizmalarını karakterize etmek için kullanılmaktadır [1].

Diyabet ise, kronik bir endokrin hastalık olup, periferik insülin direnci ve/veya pankreas beta hücrelerinden yetersiz insülin üretimi veya salınımı nedeniyle yükselen kan şekeri değerleriyle karakterize bir hastalıktır. Tip 1, Tip 2, gestasyonel diyabet ve diğer spesifik tipler olmak üzere, dört ana tip diyabet formu mevcuttur. En yaygın fenotipi ise Tip 2 diyabettir. Fenotiplerin karışık yapısına paralel olarak, diyabet araştırmaları uzun süredir klinik, fizyolojik, epidemiyolojik, genetik ve immünolojik alanlarını içerecek şekilde multidisipliner çalışmalar olarak sürdürülmektedir. Hastalığın patofizyolojisi her ne kadar iyi bilinse de, oluşum mekanizmalarının tam aydınlatılmamış olması nedeniyle, nihai önleyici çözümler sağlanamamaktadır. Bu doğrultuda tedaviye katkı sağlamak amacıyla, diyabet oluşumu ve gelişimini tanımlamak için geniş çaplı araştırmalar devam etmektedir. Bu araştırmalarda insan deneklerinin kullanımı her zaman mümkün olmadığından, araştırmalar çeşitli diyabet ve organ modelleri kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Hayvan modelleri kullanılarak gerçekleştirilen araştırmaların insana uyarlanması sıklıkla mümkün olamamaktadır. Bu durum, insan hücreleri üzerinden oluşturulacak bir diyabet modelini çok değerli kılmaktadır.

Bu çerçevede, bir deneysel model oluşturulması amacıyla PANC-1 hücre hattına ait bir indüksiyon modeli geliştirilmesi planlanmıştır. Bu indüksiyon protokolü ile PANC-1 hücrelerinin adacık benzeri hücre kümeleri oluşturabildiği gösterilmiştir [2]. Bu kapsamda, 2014 yılında destek gören “Tip 1 Diyabet'in Rejeneratif Tedavisi: Pankreatik Beta-Hücre Proliferasyonuna Yönelik Yeni Teknoloji Geliştirilmesi” başlıklı TÜBİTAK-INTENC (113S029) projesinin iş paketlerinden biri de PANC-1 hücre hattına ait farklılaşma protokolünün optimize edilmesi olmuştur. İndüksiyonla adacık benzeri hücre kümelerinin oluşturulduğu bu protokolde, hücrelerin morfolojik değişimine paralel olarak gen ekspresyon düzeylerinde global değişimler saptanmıştır

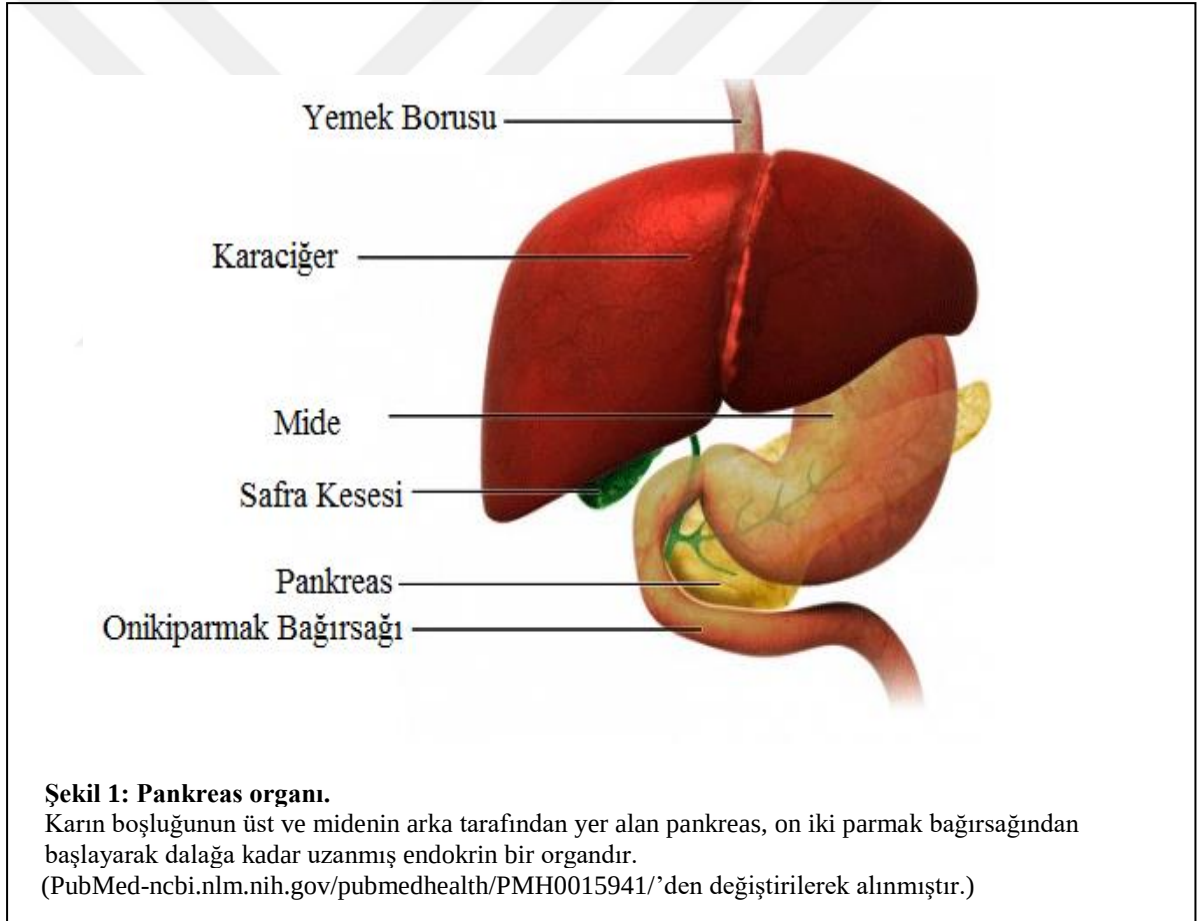
[3]. Tüm genom ekspresyon arrayi yapılmasıyla ekspresyon değişimi gösterdiği saptanan genlerden biri de *SCG2* geni olmuştur. Bu bulgu, daha önce literatürde yayınlanmamış zgn bir bilgi olmaktadır. Array platformunda elde edilen verilerin başka yöntemlerle konfirme edilmesi gerektiğinden, yaptığımız bu tez çalışmasında, ek olarak kantitatif PZR ve immuno floresan mikroskop yöntemleri kullanılarak verifiye edilmesi amaçlanmıştır. Böylelikle, bu tez çalışması kapsamında elde edilen veriler ile oluşturulmuş adacık benzeri hücre kümelerinde (AHK) *SCG2* gen ekspresyonunun değişimi ilk defa verifiye edilmiş olacaktır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. PANKREAS

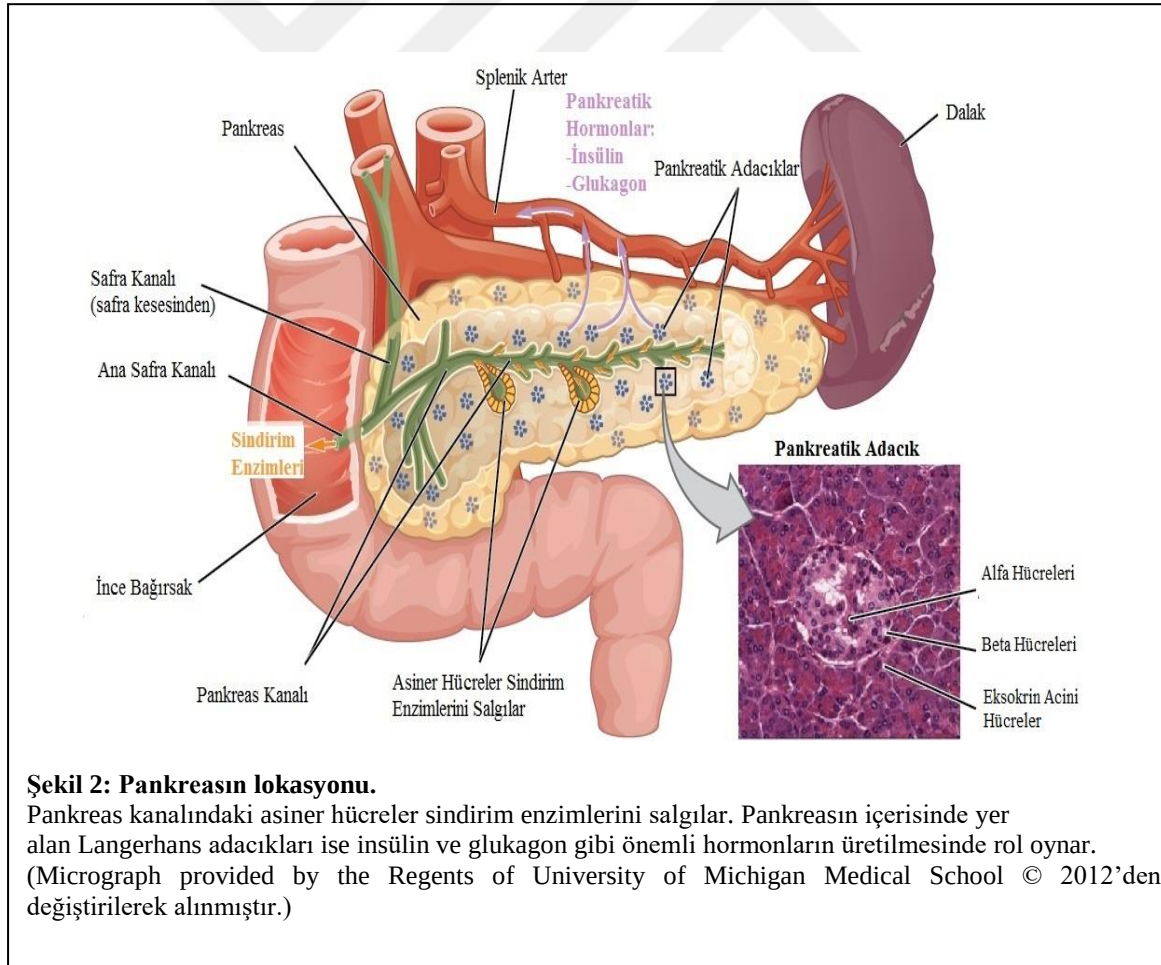
Pankreas insanda yaklaşık 15-20 cm uzunluğunda ve 80-90 gram ağırlığında, karın boşluğunda karaciğer mide ve ince bağırsak ile komşu olan bir organdır. Baş kısmı geniş olup, uç kısma doğru inceler [4]. Şekil 1’de pankreas organı gösterilmektedir.



Pankreas, endokrin ve ekzokrin bölmeleri olan bir organ olup, endokrin bölümü pankreas kitlesinin yalnızca %2’sini oluşturmaktadır. %83’ü ekzokrin bölümünden, %10’u ekstraselüler matriksden, %5’i ise kanallar ve damarlardan oluşur [5]. Ekzokrin bölümden enzimler depolanır ve salınır. Pankreas Langerhans adacıkları endokrin

özelliktir ve farklı tiplerde hücreler içerir. Endokrin hücrelerden oluşan bölüm sırasıyla, glukagon, insülin, somatostatin ve pankreatik polipeptit üreten α , β ve δ hücrelerinden oluşur. Tüm bu hücre tiplerinin sağlıklı çalışır durumda ve belli oranlarda olmasının yanında, birbirleriyle iletişimi sayesinde adacıkların tam fonksiyonel durumda oluşu sağlanır. İnsülin salgısı beta hücrelerinden; somatostatin salgısı delta hücrelerinden; glukagon salgısı ise alfa hücrelerinden gerçekleşir. Adacıklarda, özellikle β hücrelerinin hasarlanması durumunda ise, adacık fonksiyonları bozulur ve pankreas vücudun taleplerini karşılayacak yeterli insülini üretemez hale gelir. Bu durum, kişide diyabet bulgularının gelişmeye başlamasıyla sonuçlanır [5,6].

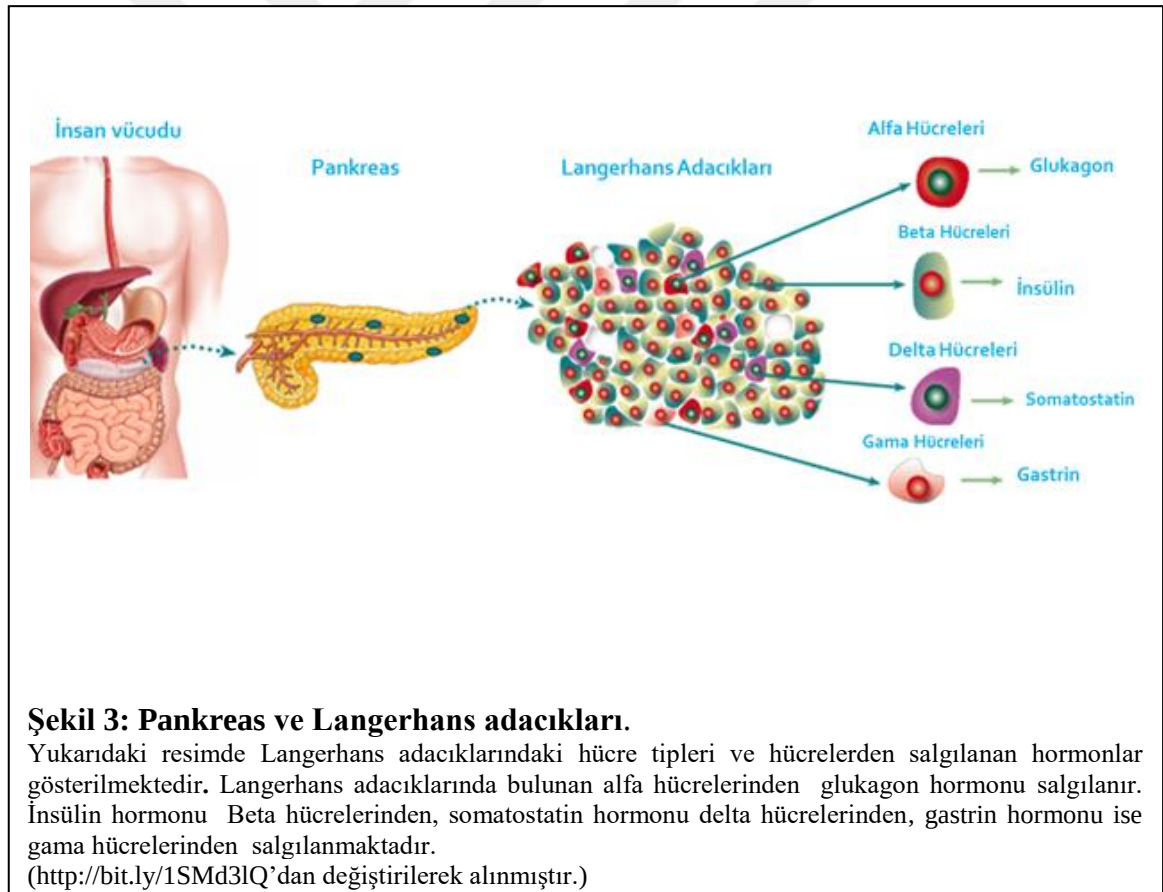
Pankreas kanseri türlerinin %90'ını ekzokrin hücre kaynakları oluşturmakta olup, hem endokrin hem de ekzokrin hücrelerinden köken almış olan farklı kanser tiplerini de içerir [7]. Şekil 2’de pankreas organının lokasyonu gösterilmektedir.



2.1.1. Langerhans Hücre Adacıkları

İnsan pankreasının yaklaşık % 1'i adacıklar hücrelerinden oluşur ve sayıları ortalama bir milyon civarında olan bu adacıklar, pankreasın endokrin özellik gösteren kuyruk kısmına lokalize olmaktadır [8,9].

Her bir pankreas adacığı yaklaşık 100-200 µm çapındadır ve ortalama 1000 kadar hücre içerir. Adacıklar, endokrin özellik göstermektedir ve üzerlerindeki adezyon molekülleri sayesinde birbirlerine bağlanmaktadır [10]. Langerhans hücre adacıkları 5 farklı hücre tipinden oluşmaktadır. Bunlar; Alfa , Beta, Delta, PP (pankreatik polipeptid), Gamma hücreleri olarak adlandırılır [11]. Şekil 3'de pankreas, Langerhans adacıkları, hücre tipleri ve hücrelerden salgılanan hormonlar gösterilmektedir.



2.1.1.1. α (Alfa) Hücreleri

Bir Langerhans adacığının hücre kütesinin içeriği yaklaşık %15-20'si alfa hücrelerinden meydana gelmektedir ve bunlar genelde adacığın dış kabuk yüzeye yakın alanda yerleşim gösterirler. Hiperglisemik etkiye sahip olan glukagon hormonunu salgılayarak, düşük kan şekerini düzenlerler. Sitoplazmaları 250nm çapında sekresyon granülleri içermektedir. Bu granül yapıları, elektron yoğun bir merkez ile, dışa doğru giderek yoğunluğu azalan yapılar biçimindedir [12,13].

2.1.1.2. β (Beta) Hücreleri ve Diyabetle (DM) İlişkisi

Langerhans adacığının % 70'i adacığın merkezine yerleşmiş olan Beta hücreleri tarafından oluşmaktadır. Beta hücreleri insülin hormonunu salgılamakta olup, kan şeker düzeyini düzenlemede görev alırlar. Bu hücrelerin sitoplazmalarındaki sekresyon granülleri yaklaşık 300 nm çapındadır ve çinko içermektedir [14].

Beta hücrelerinin sayıca azalması durumunda insülin üretiminde yetersizlik meydana gelir ve çeşitli klinik formlar alabilen diabetes mellitus (DM) gelişir. Bu durum beta hücreleri disfonksiyonu kaynaklı oluşan hiperglisemi, poliüri ve glikozüri sonucu ortaya çıkar [15-18]. Tip 1 diabet (T1D), β hücrelerinin idiyopatik veya otoimmün yıkımı sonucu oluşur [19-22], tip 2 diabet (T2D) ise, insülin direncinde azalmış β hücre kompanzasyonu neden olur [23,24].

2.1.1.3. Δ (Delta) Hücreleri

Delta hücreleri Langerhans adacıklarının % 5-10'unu oluştururlar. Genellikle adacığın periferinde ya da adacık içerisinde dağınık şekilde bulunurlar. Bu hücreler parakrin etkiye sahip olup, diğer hücrelerden hormon salgılamasını baskılayarak, endokrin etkisi ile de safra kesesi kaslarının da kasılmasını sağlayan somatostatin hormonu salgılamaktadır. Sitoplazmalarında 350nm çapında ve diğer adacık hücrelerinden homojen ve az yoğun granüller içermektedirler [25,26].

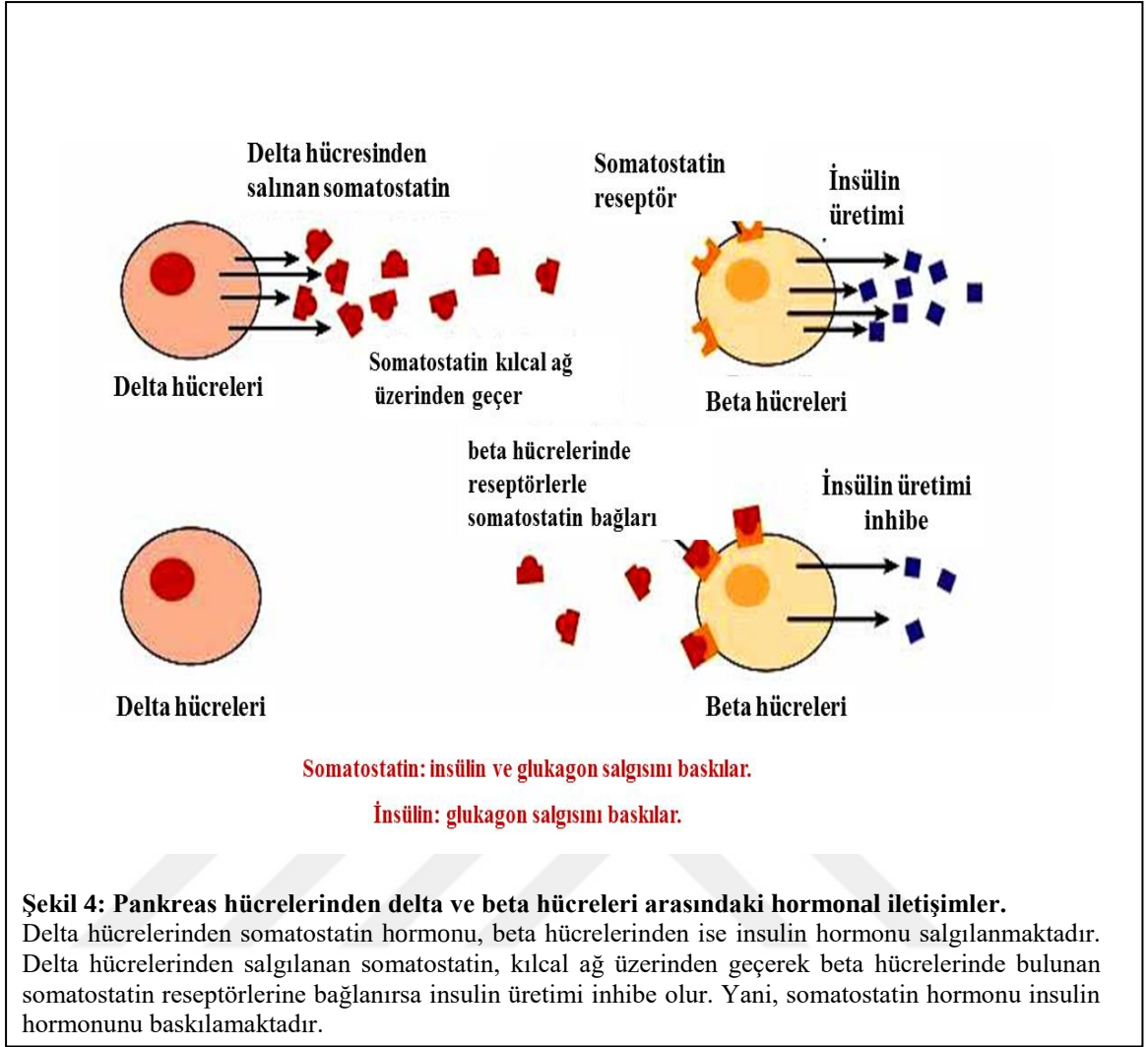
2.1.1.4. PP (Pankreatik Polipeptid) Hücreleri

Langerhans adacığının % 1'ini pankreatik polipeptid hücreler oluşturur. PP hücreleri adacık içinde dağınık halde bulunmakta olup, pankreasın ekzokrin salgısını baskılayarak pankreatik polipeptid salgılar [27,28].

2.1.1.5. γ (Gamma) Hücreleri

Gamma hücreleri Langerhans hücre adacıklarının % 1'ini oluştururlar. Adacık içinde homojen dağılım gösterirler. Gamma hücreleri midedeki paryetal hücrelerinden hidroklorik asit (HCl) üretimini uyaran gastrin hormonunu salgılar [29].

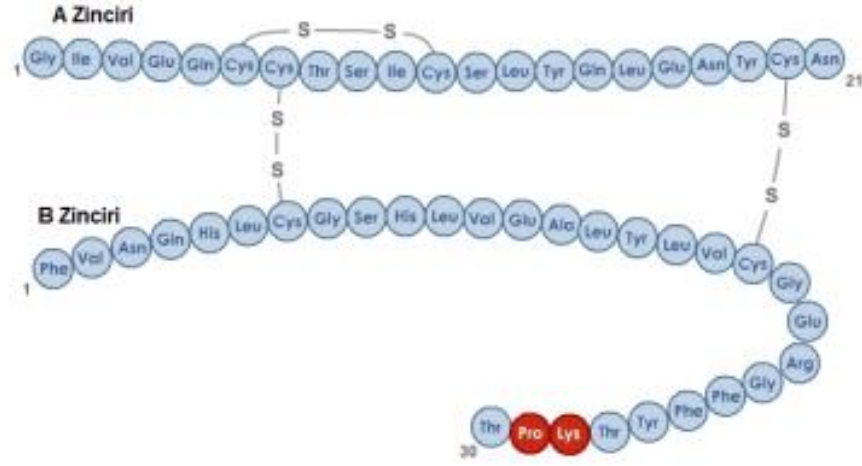
Şekil 3'de gösterildiği gibi pankreas adacığını oluşturan tüm hücreler arasında iletişim bulunmaktadır. A ve β hücreleri arasındaki bağlantı, desmozomlar, neksuslar ve sıkı bağlantı birimleri aracılığı ile sağlanmaktadır. Hücreler arasında ki bu işlevsel birliktelikler hücrelerin salgısının diğer hücreler tarafından denetlenmesini sağlar [30,31]. Şekil 4'de pankreas hücrelerinden delta ve beta hücreleri arasındaki iletişimler gösterilmektedir.



2.1.2. Pankreastan Salgılanan Hormonlar

2.1.2.1. İnsülin

İnsülin pankreastaki β -hücrelerinden salgılanan, protein, karbonhidrat ve lipid metabolizması düzenlenmesi görevine sahip olan bir hormondur. Şekil 4'te gösterilen insülin hormonu sülfür bağları ile bağlanmış iki adet polipeptid zincirinden oluşmaktadır [32]. Şekil 5'de insülin hormonu gösterilmektedir.



Şekil 5: İnsülin hormonunun yapısı.

İnsülin hormonu, birbirine disülfür bağları ile bağlanan, 2 aminoasit zincirinden (A ve B) oluşan; uzun zincirinde 30, kısa zincirinde 21 aminoasit bulunan, 6000 Dalton ağırlığında peptit yapılı bir moleküldür.

[<http://scop.mrc-lmb.cam.ac.uk/scop/data/scop.b.h.b.b.c.html>'den değiştirilerek alındı.]

İnsülin salınımı ekzojen ve endojen maddeler tarafından uyarılır. Endojen maddeler gastrointestinal hormonlar, glukagon, prolaktin, cinsiyet hormonu ve glukokortikoidler, ekzojen maddeler ise aminoasitler ve glikozdan oluşmaktadır [33]. Öğünlerden sonra meydana gelen kandaki glikoz düzeylerinde artış ile paralel bir şekilde artan ve kana verilen insülin, karaciğerdeki glikoz sentezini baskılar ve glikozun kas ve yağ hücrelerine girişini artırıp kan glikoz homeokinezisinin sağlar [32].

Metabolik problemler, sitokinlerin sentezlenmesindeki değişiklikler ve obezitenin olduğu durumda, insülin kaynaklı dokulara insülin girişi azalır. İnsülin direnci olarak adlandırılan bu rahatsızlıkta vücut dolaşan insüline karşı gerekli yanıtı veremez ve Tip 2 diabetes mellitus meydana gelir [34].

2.1.2.2. Somatostatin

Somatostatin (SST), endokrin pankreasın bağırsak, beyin ve δ hücrelerinde üretilen bir tür peptit hormonudur [35]. Adacık δ hücrelerinden SST sekresyonu amino asitler ve glikoz ile uyarılabilir. Bu hormon aynı zamanda endokrin hormonların

üzerinde bir anti-salgılayıcı etki gösterir. Hipofiz bezinden büyüme hormonu salgılanmasının inhibisyonu, SST'nin iyi bilinen bir fizyolojik işlevidir. Somatostatin hormonunun, kandaki glikoz düzenleyici hormonlar üzerinde yani, pankreatik adacıklarda β -hücrelerinden insülin, α -hücrelerinden glukagon da dahil olmak üzere, önemli ölçüde hormon baskılayıcı etkisi vardır [36,37].

SST, özellikle diyabet olmak üzere birçok kronik metabolik hastalıkta hayati bir hormon haline gelmiştir. Dışardan somatostatin alımı, insülin hormonunu inhibe etmektedir. Somatostatin alımının, insüline bağımlı diyabetiklerde bazı metabolik aberasyonları iyileştirdiğini bildirilmektedir, bu da bu hormonun glikoz metabolizmasını iyileştirmek ve diyabetik hastaların yaşam kalitesini arttırmak için terapötik bir hedef olarak potansiyel rolünü göstermektedir [38,39].

2.1.2.3. Glukagon

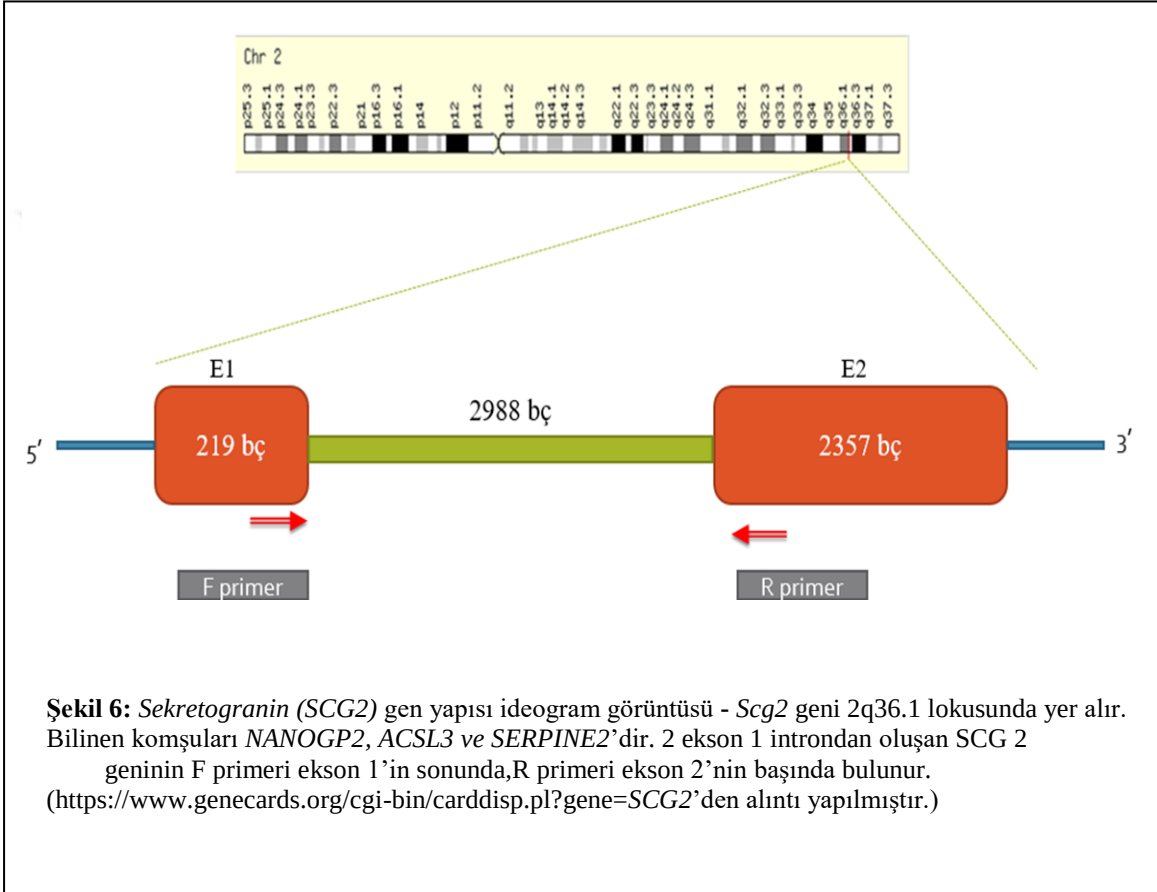
Langerhans adacıklarında çoğu β -hücresinde ve α ve δ -hücrelerinde, 29 aminoasitten oluşan glukagon hormonu salgılanmaktadır. Glukagon, adacık içinde hormon salgılanmasının bir parakrin regülatörü olarak işlev görür ve kandaki glukoz düzeyini yükseltir [40].

2.2. PANC-1 İnsan Hücre Hattı

Pankreas kaynaklı bir kanser hücre hattı olan PANC-1 hücreleri eksokrin kökenli olup, insüline çoğalarak tepki verir. Bu hücre hattı, kültür şartları özel biçimde düzenlendiğinde, pankreasa özgü bazı hormonları üretecek şekilde kümeleşirler. [3]

2.3. Sekretogranin (SCG2)

İnsanda, *SCG2* (secretogranin) geni 2q36.1 lokusunda yer alır ve 617 amino asitten oluşan, 70.9 kD ağırlığında bir proteini kodlar [41]. Şekil 7'de sekretogranin (*SCG2*) gen yapısı ideogram görüntüsü gösterilmektedir.



SCG2 ilk olarak anterior hipofiz hücrelerinde karakterize edilmiştir. Bu protein, nöroendokrin salgı proteinlerini kodlayan kromogranin/secretogranin ailesinin bir üyesidir. Bununla birlikte, memeli beyinde, hipofiz bezlerinde, gonadlarda, böbreküstü bezlerinde, bağırsakta, midede ve pankreasta görülmüştür [42]. *SCG2*, endokrin ve nöral hücrelerin sekretuar granüllerinde yerleşik olması sayesinde, bir hücrenin

salgılayıcı karaktere sahip olup olmadığı hakkında bilgi verici marker olma potansiyeline sahip görünmektedir [43].

Önce endoplazmik retikulumda sentezlenen SCG preproteini, daha sonra golgi cisimciğinde glikosilasyon, fosforilasyon ve sulfasyon şeklinde modifikasyonlara uğrar. Bu değişimlerden sonra ise, golgiden salgı granüllerine taşınan preprotein, en sonunda proteolitik olarak kırılır [44]. Böylelikle kırılan preprotein, ikiye bölünmüş olur ve spesifik hücre tiplerinde kemotaktik etkiler gösteren *secretoneurin* (SN) ile EM66 oluşur [45]. Araştırmalar, SN'in hücreler arası kalsiyumdaki artışı uyardığını ve L β T2 hücrelerinde hem cAMP üretimini hem de ERK-bağımlı yolağı aktive ettiğini göstermiştir.

Beyindeki sekretogranin 2'nin proteolitik olarak işlenmesi, sekretonurin adını verdiğimiz bir 33-amino asit peptidinin oluşmasına neden olurken, proteolitik işlemle granin asidik salgılanma proteini ile ise SCG 2'den 66-amino asitli, EM66 peptidi oluşmaktadır [46].

Pankreas adacık hücrelerinin asli görevi insülin sekresyonudur ve bunu, hücre içi habercilerin yardımıyla yerine getirebilir. Adacık hücrelerinde, glutamatın insülin sekresyonunu düzenleyen bir hücre içi haberci gibi davrandığı bilinmektedir. Üretiminden sonra salgının gerçekleşebilmesi için, insülinin salgı granüllerine paketlenmesi ve hücre dışı zarına doğru yönlendirilmesi gerekmektedir. Salgı granüllerinde, SCG2'nin, glutamat, uyarıcı amino asit taşıyıcı 2 (EAAT2) ve veziküler glutamat taşıyıcı tip 3 (VGLUT3) ile birlikte işlev gördüğü bildirilmiştir. Yani, EAAT2 ve VGLUT, insülin sekresyonunu düzenlemekte, nöronlara glutamat salma yeteneğini ile de veziküler bir glutamaterjik taşıyıcı görevi görmektedir. Ayrıca bu işleve ek olarak, presinaptik düzeyde striatal kolinerjik nörotransmisyonu arttırmaktadır. Veziküler transportta görevli olan SCG2'nin işlevi çoğunlukla MEK/ERK yolağı üzerinden gerçekleşir. Bu yolak aktive olduğunda, SCG2 düzeyi de yükselmekte ve veziküler transport hızlanmaktadır [47].

Rodentlerde yapılan araştırmalarda, sekretogranin 2'nin peptit hormonlarının ve nöropeptidlerin salgı veziküllerine paketlenmesinde rol oynadığı bildirilmiştir. Pankreasta yapılan transplantasyon deneylerinde bu genin ekspresyon düzeylerinin

yükselmesi halinde, transplantların red ihtimalinin azaldığı gösterilmiştir [48]. Bunun yanında, genel olarak bu proteinin doku yenilenmesi ile ilişkili olabileceği farklı dokularda yapılan çeşitli deneylerde gösterilmiştir. Ayrıca, SCG gen anlatımının beyinde JAK/STAT yolağı üzerinden beyin hücrelerinin plastisitesini ve korunmasını sağladığı görülmüştür. Bu açıdan bakıldığında, proteinin hücre yenilenmesinde önemli rol oynadığı söylenebilir [49,50].

Görevleri:

-SCG2, salgı kesecikleri henüz olmayan hücrelerde salgı granül benzeri yapıların oluşumunu tetikler, bu da salgı keseciklerinin üretilmesinde SCG2'nin önemli bir rolü olduğunu gösterir ve peptit hormonları ile nöropeptitlerin salgı keseciklerine ambalajlanması ve ayrıştırılması işlevini yerine getirir [51].

-Yapılan çeşitli deneyler, granüllerin kan basıncının otonomik kontrolü yoluyla hipertansiyon patogenezinde rol oynadığını göstermektedir. SCG2'den türetilen sekretonürin peptidi, vasküler düz kas hücrelerinin göçünü ve proliferasyonunu stimüle eder [52] ve vasküler gelişime doğrudan bir bağlantı sağlayan, anjiyogenez ve vaskülojenezi desteklemek için bir endotelial sitokin olarak hareket eder [53,54].

2.4. POU5F1 Geni (NM_000209):

Oct-3 veya *Oct-4* olarak bilinen *POU5F1* geni, murin *Oct-4* geni tarafından kodlanan, maternal olarak ifade edilen oktamere bağlayıcı, embriyonik kök hücrelerde transkripsiyon faktöründe rol oynayan bir proteindir [55]. Embriyonik kök hücreleri (EKH) ve germ hücrelerinde pluripotans ile diğer hücrelerde proliferasyon ve rejenerasyon potansiyeli ile ilişkilidir [56]. Omurgalı gelişiminin ilk aşamalarında, *POU5F1*, pluripotansın en önemli düzenleyicisi olarak rol oynamaktadır [57]. Yapılmış çalışmalarda, *POU5F1*'in normal kök hücrede rejenerasyon sürecinin sürdürülmesinde temel bir rol oynadığını göstermiştir [55,56].

Son zamanlarda, insan amniyotik sıvısından izole edilen hücrelerde, *POU5F1* gösterilmiştir [57]. Buna ek olarak, *POU5F1*'in kanser ile ilişkisini ortaya koymak amacı ile daha önce yapılan pek çok araştırmada, insan kanser hücrelerinde *POUF1* ekspresyonu bildirilmiştir.

Tai ve arkadaşları, *POUF1* ekspresyonunun yetişkin bir insanda; böbrek, göğüs epitelyal, pankreatik, mezenkimal, karaciğer ve mide kök hücrelerinde bulunabileceğini ortaya çıkarmışlardır [58].

2.5. PDX1 Geni(NM_000209):

Pankreatik duodenal homeobox 1 (*PDX1*) bağırsak gelişiminin ilk aşamalarında pankreas oluşumunda görev alan ve adacık gelişimi ile birlikte, β -hücre fonksiyonunda sağkalıma katkıda bulunan önemli bir transkripsiyon faktörüdür [59,60].

PDX-1, sağlıklı bireylerde glikoz seviyesini ve insülin sekresyonunu teşvik etmek için gerekli olmakla beraber, *PDX-1*'de meydana gelen mutasyonlar tip 2 diyabeti için risk faktörü oluşturmaktadır. *PDX-1*'in genetik veya fonksiyonel mekanizmalar ile düzensizliğinin otozomal erken başlangıçlı (MODY= Maturity-Onset Diabetes of the Young) ve yaygın tip 2 diyabetlerde ortak bir unsur olabileceğini öne sürülmektedir [61].

PDX-1'in, herhangi bir sorun nedeni ile bozulması, insülin sekresyonunu azaltarak glukoz intoleransı ve diyabetle sonuçlanan progresif β -hücre kaybına neden olmaktadır [62].

2.6. KLF4 Geni (NM_001314052) :

Bir çinko-parmak (zinc-finger) transkripsiyon faktörüdür ve *KLF4* mRNA ekspresyonu esas olarak deri ve akciğerler ve gastrointestinal kanaldaki organlarda postmitotik, terminal diferansiye epitelyal hücrelerde bulunur [63,64]. Yani diferensiyasyonun daha ileri aşamalarında gözlenirler.

KLF4 pankreas kanseri dahil çeşitli kanserli hastalarda potansiyel bir tümör baskılayıcı olup, pankreatik tümörlerde *KLF4* ve LDHA (laktat dehidrogenaz A) yolağı pankreas tümörlerinde aerobik glikolizi etmekte olduğu gösterilmiştir [65].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

PANC-1 hücre hattı hücreleri kültürü hem bazal şartlarda hem de Adacık Benzeri Hücre Kümeleşmeleri (AHK) oluşumu indüklenerek kültüre edildi. AHK oluşumu esnasında oluşan değişimlerin izlenmesi amacıyla 0. gün ile 14. gün gen ekspresyonları qPZR ile karşılaştırıldı ve hedef genlerdeki (*SCG2*, *PPIA*, *PDX1*, *POU5F1*, *KLF4*) $\Delta\Delta Ct$ değerlerindeki değişimler değerlendirildi.

Materyal: PANC-1 hücre hattı hücreleri

1. Bazal hücre kültüründen elde edilen hücreler
2. Farklılaştırma protokolünden elde edilen hücreler

Metot: qPZR ile differeransiyal ekspresyonun gösterilmesi

3. Bazal hücre kültürü
4. Farklılaştırma protokolü
5. RNA izolasyonu
6. cDNA eldesi
7. qPZR

METOT

3.1. Bazal hücre kültürü

Normal Kültür Şartları:

- Taze medyum bir gün evvelden hazırlandı ve +4°C’de saklandı.
- Medyum kullanılmadan önce buzdolabından çıkarıldı ve 37°C su banyosunda tutularak ısısı eşitlendi.
- Tüpler kurulandı ve pipetler ve şişe %70’lik alkolle silindi.

Taze ATCC PANC1 Hücre Hattı T75 Flask İçinde Kültürü:

- ATCC 30-2002 bazal medyumun içinde yüksek düzeyde glukoz ve glutamin bulunur.
- Kültür için hazırlanan karışım:
 - 5 ml ısı inaktiflenmiş FCS

- 250µl penisilin streptomisin
- Bazal medyum ATCC 30-2002 ile 50 ml'ye tamamlandı.

3.1.1. Hücrelerin Çözülmesi:

Kullanılan Malzemeler ve Solüsyonlar: Bazal Medyum, sıcak su tankı, T-25cm² flask (polistren), konik tüpler ve pilastik pipetler

Bazal Medyum:

50 ml falkon tüpe;

- 45 ml DMEM (4 Mm L-glutamin, 4500 mg/L glukoz, 1mM sodyum pirüvat ve 1500 mg/L sodyum bikarbonat)
- 5 ml ısı inaktiflenmiş FBS/FCS (Gibco)
- 200 µl penisilin streptomisin

Metot: Hazırlanmış olan Bazal Medyum 37°C'deki su banyosuna konuldu. T25 flaskları üzerine tarih, pasaj numarası ve hücre hattı ismi yazılarak işaretlendi. Sıvı azottan alınan donuk hücreler 37°C deki su tankına, içine su girmemesine dikkat edilerek konuldu. Bu noktada kontaminasyon olmamasına çok dikkat edildi.

Arada çok hafifçe hücreler karıştırıldı. Hücrelerin çözülmesinin ardından hücreler su banyosundan çıkarılan tüpler silinerek kurutuldu ve %70'lik alkolle silindi hücreler *laminer flow*'da götürülerek burada kapakları açıldı ve önceden ısıtılmış konik tüp içindeki olan 9ml Bazal Medyuma 1ml hücre eklendi. Bu hücreler daha sonra flask içine alındı (flaskın 37°C olmasına dikkat edildi).

FBS İnaktivasyonu:

Bu prosedür uygulanmadan önce, FBS su banyosunda 56°C'ye ısıtılarak hücre kültüründe kullanılmaya hazır hale getirildi.

Metot:

1. FBS -80°C'den çıkartıldı ve +4°C'de, buzdolabında çözülmesi için gece boyu bırakıldı.

Serumun tam çözülmesi 37°C’de su banyosunda sağlandı. Su banyosundaki su hizasının serum düzeyinden yukarıda olmasına dikkat edildi. Şişe ters–düz edilerek karıştırıldı.

2. Serum tam çözüldükten sonra 15 dakika daha inkübe edildi.
3. Su banyosunun ısısı 56°C’ye ayarlandı. (Banyonun ısısının en fazla 35 dakika içerisinde yükselmesi gerekmektedir.) Bu arada her 10 dakikada bir şişe ters–düz edilerek karıştırıldı.
4. Su banyosu 56°C’ye ulaştığında, serum 30 dakika inkübe edildi. Her 10 dakikada bir şişe ters–düz edilerek karıştırıldı.
5. Su banyosundan çıkarılan serum, 30 dakika oda ısısında tutularak oda ısısına gelmesi beklendi ve su banyosu yeniden 37°C’ye ayarlandı.
6. Konik tüplere 50ml’lik alikotlar alındı. Hemen kullanılacak olanlar 4°C’de, uzun zaman sonra kullanılması planlananlar ise -20°C’de buzdolabında stoklandı.

3.1.1.1. Hücrelerin İnkübasyonu ve Pasajlanması:

Kullanılan Hücre Hattı: Yaptığımız çalışmada, PANC-1 hücre serisi (American Type Culture Collection, Manassas, VA) aşağıda verilen Bazal Medyum kullanılarak 6-10 pasajları arasında çoğaltıldı.

Malzemeler ve Solüsyonlar: DMEM (American Type Culture Collection, Manassas, VA; Cat no:30-2002, Herndon, VA, veya BioSera), ısıl olarak inaktif hale getirilmiş FBS (Gibco) (10%) ve antibiyotik (Penisilin-Streptomisin) içinde kültür edilmiştir. %0,25 tripsin EDTA, PBS. T-75 cm² polister flask, plastic pipet

Hücrelerin çoğaldığı mikroskop altında gözlendikten sonra 5ml serolojik pipetle üzerindeki medyum alınır ve hücreler PBS yıkandı ve atıldı. Hücrelerin üzerine yaklaşık 3ml %0,25 tripsin EDTA eklendi. Hücreler 3 dk 37°C deki inkübatörde tutuldu. İnvert mikroskopta hücrelerin yerlerinden kalktığı izlendikten sonra hücrelerin üzerine 3ml Bazal Medyum eklendi. Hücreler iyice süspanse edildikten sonra bir falkona alındı. 1200 rpmde hücreler 5 dk (oda ısısında) santrifüj edildi. Pelletin üzerindeki sıvı döküldü ve 10ml Bazal Medyum eklenerek süspanse edildi. Bu süspansiyondan 1ml hücre ayrılarak hücre sayımında kullanıldı.

Yeni hücre ekimi ise 3X10⁴ canlı hücre / cm² olacak şekilde yapıldı. (yani T-75 flasklarına yaklaşık 4 milyon kadar hücre ekilmesi gerekli olmuştur)

-PANC1 Bazal Medyum:

50 ml falkon tüpe;

- 45 ml DMEM (4 Mm L-glutamin, 4500 mg/L glukoz, 1mM sodyum pirüvat ve 1500 mg/L sodyum bikarbonat)
- 5 ml ısı inaktifleştirici FBS/FCS (Gibco)
- 200 µl penisilin streptomisin

3.1.1.2. PANC1 Hücrelerinin Dondurulması

Kullanılan Malzemeler ve Solüsyonlar:

-Bazal Medyum:

50 ml falkon tüpe;

- 45 ml DMEM (4 Mm L-glutamin, 4500 mg/L glukoz, 1mM sodyum pirüvat ve 1500 mg/L sodyum bikarbonat)
- 5 ml ısı inaktifleştirici FBS/FCS (Gibco)
- 200 µl penisilin streptomisin

-Dondurucu Medyum:

50 ml falkon tüpe;

- 47,5 ml PANC1 Bazal Medyum
- 2,5 ml DMSO (ışık görmeyecek şekilde)

Metot:

1. Flasklarda üst faz döküldü.
2. 10 ml 1X PBS (Ca ve Mg'suz) flaska eklenip yıkandı ve tekrar döküldü.
3. 5 ml tripsin (%0.25) eklenir, 5 dakikada 37°C'de inkübe edildi. Mikroskopta hücrelerin kopmuş olduğu gözlemlendi.
4. 5 ml PANC1 tamamlayıcı medyum tripsinli flaska eklendi, pipetaj yapıldı ve daha sonra 50 ml'lik falkon tüpe hücreleri içeren tüm solüsyon alındı. 1500 rpm'de 5 dakika oda sıcaklığında santrifüj edildi.
5. Üst faz döküldü. 4,5 ml'lik PANC1 tamamlayıcı solüsyon ile süspanse edildi.
6. 500µl hücre sayımı için cihaza yüklendi. Geri kalan 4 ml solüsyondaki hücre 1500 rpm'de 5 dakika oda sıcaklığında santrifüj edildi.

7. Hücre sayımına uygun olarak toplamda 2×10^6 hücre/ml olacak şekilde dondurucu medyum eklendi ve kriyotüplere konuldu. (kriyotüpler hücre ismi, pasaj numarası, dondurma tarihi ve hücre miktarını içerecek şekilde etiketlendi ve üzerine selobant geçildi.)
8. Kriyotüplerdeki hücreler önce içinde izopropanol bulunan dondurma çemberine konuldu. Bir gece -80°C 'de bekletildi. Ertesi gün sıvı azot sistemine alındı.

3.2. Farklılaştırma protokolü

Aşağıda verilmekte olan hücre farklılaştırma protokolü PANC-1 hücreleri bazal medyumda çoğaltıldıktan sonra uygulanmıştır. Bazal medyumda yapışarak çoğalan hücreler tripsin ile kaldırılarak, hasat edildi. Farklılaştırma protokolü için özellikle serumsuz medyum kullanmak gerektiği için bazal medyumda bulunan serum, hücrelerin 1X PBS ile yıkanması ile uzaklaştırıldı. Protokolün uygulanması esnasında örneklem günleri 0, 1, 4, 10 ve 14 olduğundan, her bir gün için 3'er kuyucuk ekildi. Ekim yapılırken hücreler sayıldı ve deney şartları, 4ml medyumda 2 milyon hücre olacak şekilde hazırlandı. Medyum yapısı 0'ıncı, 4'üncü ve 10'uncu günlerde farklı olacak biçimde uygulandı.

Gün 0-3:

Hücrelerin Ekimi: Hazırlanan medyum 6 delikli bir plağın, her kuyucuğuna 2 ml olarak eklendi ve 2 milyon hücre ekildi.

Medyum Hazırlama (50 ml): BSA konsantrasyonu % 1 olacak şekilde (wt/v) 500 mg tartıldı ve üzerine 20 ml DMEM/F12 (Gibco 31331- DMEM/F-12 (Ham) (1: 1) 1X) ilave edildi ve su banyosuna (37°C 'de, 30-45 dakika) çözünmek üzere bırakıldı. Daha sonra 250 μl antibiyotik ve 0,5 ml ITS (insulin-transferrin-selenium, 100X olarak kullanılır) eklendi (GibcoCatalog 51500-056-100X). Daha sonra DMEM/F12 ile 50 ml'ye kadar tamamlandı. En son olarak pH'ı kontrol edildikten sonra 0.22 μm şırınga filtresi kullanılarak steril edildi.

Medyumun Değiştirilmesi: Ortam 1 ve 3 üncü günlerde değiştirildi (0. günle aynı medyum). Kültür kabı yuvarlak şekilde hareket ettirilerek hücrelerin ortada toplanması sağlandı. Eskiye medyumun toplanması, kuyucuğun tek bir köşesinden yapıldı (1 ml Eppendorf pipet ile) ve daha sonra kuyucuğun kurumamasına dikkat edilerek taze medyum 1 ve 3'üncü günlerde taze medyum ilave edildi.

Örnek Alma: Bu medyumu kullandığımız günlerde, RNA eldesi amacı 0, 1, 3'üncü günlerde örnek alındı. kontrolü için kuyuların birinden hücreler kaydedildi.

Gün 4-9:

Medyum Hazırlama (50 ml): BSA konsantrasyonu % 1 olacak şekilde (wt/v) 500 mg tartıldı ve üzerine 20 ml DMEM/F12 (Gibco 31331- DMEM/F-12 (Ham) (1: 1) 1X) ilave edildi ve su banyosuna (37°C'de, 30-45 dakika) çözünmek üzere bırakıldı. Daha sonra 250 µl antibiyotik ve 0,5 ml ITS (insulin-transferrin-selenium, 100X olarak kullanılır) eklendi (GibcoCatalog 51500-056-100X). Medyuma, 0,3 mM olacak şekilde Taurin (Sigma katalog # T-8691) (0,5M Taurin çözeltisinden 50ml medyum için 30µl alındı) eklendi. Daha sonra, DMEM/F12 ile 50 ml'ye kadar tamamlandı. En son olarak pH'ı kontrol edildikten sonra 0.22µm şırınga filtresi kullanılarak steril edildi.

Medyumun Değiştirilmesi: Medyum 6. ve 8. günlerde tekrar değiştirilerek tazelendi.

Gün 10-14:

Medyum Hazırlama (50 ml): BSA konsantrasyonu % 1,5 olacak şekilde 750 mg tartıldı ve üzerine (wt/v) 20 ml DMEM/F12 (Gibco 31331- DMEM/F-12 (Ham) (1: 1) 1X) ilave edildi ve su banyosuna (37°C'de, 30-45 dakika) çözünmek üzere bırakıldı. Daha sonra 250 µl antibiyotik ve 0,5 ml ITS (insulin-transferrin-selenium, 100X olarak kullanılır) eklendi (GibcoCatalog 51500-056-100X). Medyuma, 3 mM olacak şekilde Taurin (Stok 0,5M Taurin çözeltisinden 50ml medyum için 300µl alındı) eklendi.

Nikotinamid (Stok 1M'dan) 50µl, GLP1/Eksendrin (Stok 200Um'dan) 25 µl, NEAA (Stok 100X'den) 500µl olacak şekilde eklendi. Daha sonra, DMEM/F12 ile 50 ml'ye

kadar tamamlandı. En son olarak pH'ı kontrol edildikten sonra 0.22µm şırınga filtresi kullanılarak steril edildi.

Medyum 12'nci günde tekrar değiştirilerek tazelendi.

Gün 14:

Bugün tüm örneklerin toplandığı gündür. RNA izolasyonu için toplanacak hücrelerin üzerindeki tüm medyum alındıktan sonra hücreler 2 kere 1X PBS ile yıkandı. Daha sonra kullanılacak olan RNA izolasyon kitinin (Qiagen) solüsyonu ile karıştırılarak homojenizasyonları yapıldı.

Hücre Medyumunun Değiştirilme Günleri

Tablo 1: hücre kültür günü, kullanılan kültür medyumları ve RNA için örnek alma günü

Hücre Kültür Günü:	Kullanılan Kültür Medyumu	RNA İçin Örnek Alma Günü
0	0'ıncı Gün Medyumu	Örnek alındı
1	0'ıncı Gün Medyumu	Örnek alındı
3	0'ıncı Gün Medyumu	
4	4'üncü Gün Medyumu	Örnek alındı
6	4'üncü Gün Medyumu	
8	4'üncü Gün Medyumu	
10	10'uncu Gün Medyumu	Örnek alındı
12	10'uncu Gün Medyumu	
14	Toplama günü	Örnek alındı

Filtre ile Steril Edilen Stok Çözeltiler:

Taurine (1M): Mwt: 125,15gr

Steril ve distile su içinde 1ml M çözelti olarak hazırlandı. 1ml için 125.15mg tartıldı, çözünmesi için 37°C su banyosunda bekletildi.

Nikotinamid (1M): Mwt: 122,12 gr.

Steril ve distile su içinde 1ml M çözelti olarak hazırlandı. 1ml için 122,12 mg tartıldı, çözünmesi için 37°C su banyosunda bekletildi.

BSA (% 1): Ortamda% 1 olması için 0.5 gr tartıldı. 50 ml falcon içinde DMEM/F12 ile 50ml'ye tamamlandı.

Reaktifler:

1. Gibco 31331- DMEM / F-12 (Ham) (1: 1) 1X
3. BSA (ICN Biomedicals inc. Katalog # 152401, lot 3506F) (toz)
4. ITS (Gibco # 51500-056-100X)
5. Taurin (Sigma katalog # T-8691; FW 125.1)
6. GLP-1 veya Eksendin 4
7. Nikotinamid
8. Temel olmayan amino asit / NEAA (Biochrome (100 X-Katalog No:K 0293?
9. % 0.25 tripsin (GIBCO, cat. No. 27250-018)
10. Antibiyotikler: penisilin streptomisin (10,000U / ml-Life teknolojileri-Cat No: 15140-122)

3.3. İmmüno Floresan Mikroskopi

(1.GÜN)

Lam üzerine fikse edilmiş hücreler -80°C 'den çıkarıldı. Çıkarılan hücrelere fan ile kurutma işlemi yapıldı.(Çünkü sıcaklık değişimi sulandırabiliyor bu antikorların hücreye bağlanmasını zorlaştıran bir durum.)

Lamlar hücre topluluklarına dikkat edilerek işaretlendi.

Lamlara numara verildi.

1 LAM	DAPI 0.5	SCG2 1/100
2 LAM	Glukagon 1/50	SCG2 1/500

1. Şale'nin içine PBS konuldu ve lamlar içerisine yerleştirildi (Bu şekilde PBS ile hücreler durulandı) Lamlar buradan alındı
2. %0.4 paraformaldehit PBS konulmuş şalenin içerisine lamlar yerleştirildi ve 15 dk bekletildi (Sabitleme işlemi)
3. Farklı bir şaleye Glisinli PBS konuldu ve onun içerisine lamlar yerleştirildi 5 dk beklendi. Dökme işlemi sırasında lamları oynatmamaya dikkat edildi.(Bu işlem üç kez tekrarlandı) Lamların üzerine çözelti eklenirken yavaş ve arkadan eklendi
4. Hücreleri permeabilize etmek için % 0.1 Triton X-100 PBS ile 2 dk muamele edildi.(Şale içerisinde)
5. PBS ile 5 dk boyunca 3 kez yıkama yapıldı
6. 30 dk boyunca %1 Goat Serum PBS pH:7.5 içerisinde bloke edildi
7. 98µl Bloc tampon (%1 Goat Serum PBS) + 2µl antikor (birincil) hazırlandı ve hücrelere uygulanarak overnight inkübe edildi.(Kapak kapatıldı karanlıkta bekletildi)

(2.GÜN)

8. Lamlar kutudan çıkarıldı ve PBS içeren şale'nin içerisine alındı yıkama işlemi gerçekleştirildi 5 dk süre tutuldu bu işlem 3 kez tekrarlandı (pH:7.5)
9. Sekonder antikor ile hücreler muamele edildi ve oda sıcaklığında 60 dk inkübe edildi
10. Lamlar kutudan çıkarıldı ve PBS (pH:7.5) içeren şalenin içerisine yerleştirildi yıkama işlemi yapıldı 10 ar dakika 3 kez işlem tekrarlandı.(Primer antikorlar için 5dk bir yıkama işlemi uygulanmıştı şimdi ise 10dk uygulandı buradaki amaç bağlanmayanları iyi temizleyip sonuçları doğru görebilmek.)

11. 50µl DAPI (0,5 mg/ml) (DNA boyası) tüm hücrelere eklendi 1,5 dk inkübe edildi
 12. Lamlar PBS (pH:7.5) ile yıkandı
 13. Son olarak immunoSelect Antifading Mounting Medium-DAPI 1 damla damlatıldı tüm hücrelere (Bu aşamada baloncuk oluşturmamak çok önemli) L amın üzerine lameli 45⁰ lik açıyla hava kabarcığı oluşturmada kapatıldı.
- Örnekler Floresan mikroskobu yardımıyla gözlemlendi. Normal ışıktaki hücreleri bulunup 4x sonra 20x ve 40x 'e ayarlandı daha sonra farklı dalga boylarındaki ışıklar kullanılarak hücreler görüntülendi ve ışıma sonuçlarına göre antikorlar hakkında yorum yapıldı.

3.4 Ekspresyon Analizleri

Total RNA İzolasyonu:

Bazal ve AHK protokolü uygulanmış deney şartlarından en az 3 kopya olacak şekilde örnek alınarak hücre lizatları hazırlandı. Total RNA eldesi için RNeasy Mini Kit (Qiagen, Inc., Hilden, Germany) kullanıldı ve üreticinin öngördüğü protokol uygulandı. RNA konsantrasyonu NanoDrop spektrofotometre cihazı ile saptandı ve %2 agaroz jel elektroforezi ile kalite kontrolü yapıldı.

cDNA Sentezi:

cDNA sentezi için her bir tüpte aşağıdaki karışımlar hazırlanmıştır.

Tablo 2: Sentez protokolü

DNase tepkimesi	Hacim
RNA (250 ng/µl)	4 µl
Rxn Buffer (10x)	1 µl
DNase 1	1 µl
H ₂ O	4 µl
Toplam	20 µl

65°C'de inkübe edildikten sonra 2 µl EDTA eklendi. Reaksiyon hacmi 22 µl olacak şekilde gerçekleştirildi.

cDNA Sentezi	Hacim
Oligo dT (50µM)	2µl
RNA (treated)	22µl
dNTP karışımı (10µM)	2µl
Toplam	26µl

65°C’de inkübasyon sonrası 1 dakika buzda bekletildi ve üzerine aşağıdakiler eklendi:

cDNA Sentezi	Hacim
First Strand Buffer (5x)	8µl
DTT (0.1 M)	2µl
Reverse transkriptaz	4µl
Toplam	14µl

Sentezde her bir tüp için toplam hacim 26 µl+ 14 µl= 40 µl olarak elde edilmiştir.

Dikkatlice pipetaj yapıldıktan sonra, ilk olarak 50°C’de 50 dakika inkübe edildi. Daha sonra 70°C’de 15 dakika tepkime sonrası inaktive edildi. (Reaksiyon BIORAD-PZR cihazında gerçekleştirildi ve Superscript III cDNA sentez kiti kullanıldı.)

kRT PZR:

Spesifik genlerin kRT-PZR reaksiyonu 4800 Light Cycler (Roche) cihazında (ilk döngü: 50°C’de 2dk, ilk denaturasyon 95°C’de 15dk, 40 döngü 95°C’de 15sn. ve 65°C’de 1 dk.). SYBR Green Master Mix (Bioline GmbH-Sensi Fast™ SYBR No-ROX One-Step Kit, Cat No: BIO72005) kullanılarak gerçekleştirildi.

Seçilmiş genlerdeki ifade düzeyleri arasındaki fark, $2^{-\Delta\Delta C_t}$ metoduyla qBASE programında hesaplandı. GCG, SST, PDX1, KLF4 ve OCT4 genlerinin transkriplerindeki rölatif değişimin hesaplanabilmesi için, bazal şartlarda kültür edilen örnekler, 24 saat ve 336 saat AHK örnekleri karşılaştırıldı. Deneyler, her bir şart için 3 biyolojik kopyanın ikişer teknik tekrarı olacak şekilde uygulanmıştır.

Seçilmiş Hedef Genler, Primer Dizileri ve Amplikon Boyutları:

Tablo 3: Seçilen hedef genlerin isimleri, primer dizileri ve amplikon boyutları

İsim	Dizi	Boyut	Yer
SCG2_F	GCGGCTCCCTATAAGCAGAG	95 bç	Ekson 1 sonu
SCG2_R	AGCCATGTTTGAAAGATTTCCTCTT		Ekson 2 başı
SST_F	CTGCGCTGTCCATCGTCC	113 bç	Ekson 1 sonu
SST_R	CAGTTCCTGCTTCCCCGC		Ekson 2'den 1'e
GCG_F	ACATTGCCAAACGTCACGATG	140bç	Ekson 4 sonu
GCG_R	TGGGAAATCTCGCCTTCCTC		Ekson 5'ten 4'e
POU5F1_F	GCCCGAAAGAGAAAGCGAAC	142 bç	Ekson 1 sonu
POU5F1_R	CTCGGACCACATCCTTCTCG		Ekson 2 başı
PDX1_F	GGAAAACCCGCTCTCTCAGG	143 bç	Ekson 2 başı
PDX1_R	AGCCACAAACAACGCCAATC		Ekson 2 sonu
KLF4_F	ACCCACACAGGTGAGAAACC	139 bç	Ekson 2'den 3'e
KLF4_R	ATGCTCGGTCGCATTTTTGG		Ekson 3 sonu
PPIA_F	GCCGAGGAAAACCGTGTACT	109 bç	
PPIA_R	TGTCTGCAAACAGCTCAAAGG		

Eş zamanlı PZR: Syber Green qPZR reaksiyonu

Tablo 4: SCG2, SST, GCG, POU5F1, PDX1, KLF4, PPIA genleri için uygulanan reaksiyon karışımı

Tepkime Bileşenleri	Hacim
---------------------	-------

SYBR Green qPZR Master Mix (2x)	5µl
cDNA (100ng)	1µl
Nükleaz içermeyen dH ₂ O	3,2µl
Forward primer (10 µm)	0,4µl
Reverse primer (10 µm)	0,4µl
Toplam	10µl

(SensiFAST SYBR No Rox kit – *Bioline* kullanılmıştır.)

Tablo 5: SCG2, SST, GCG, POU5F1, PDX1, KLF4, PPIA genleri için uygulanan qPZR protokolü

Döngü	Sıcaklık (°C)	Zaman
1	95°C	2 dakika
40	95°C	15 saniye
40	60°C	30 saniye

SCG2, SST, GCG, POU5F1, PDX1, KLF4 genlerinin ifade düzeyleri, eş zamanlı PZR’da elde edilen $2^{-\Delta\Delta C_t}$ değerleri üzerinden yorumlandı. *PPIA* housekeeping gen ifade düzeyine göre normalizasyon yapıldı.

3.4. Jel Elektroforezi ve Görüntüleme:

Uygulanan metodlar sonucunda elde edilen ürün, agaroz jelde (%4) yürütülmüştür ve ürün boyları 50 bp’lik DNA marker referans olarak hesaplanmıştır. Böylelikle doğru ürün boyunun elde edildiği gösterilmiştir. Ürün boyları yukarıda görülen, 3 numaralı tabloda verilmiştir.

3.5. Gen Ekspresyonundaki Rölatif Değişimin ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) Hesaplanması:

Floresan değerlerinin eşik değerini geçtiği noktaya eşik döngüsü (C_t) olarak adlandırılır. C_t değeri, floresan miktarındaki artışı fark oluşmaya başladığında, PZR ürününün log-lineer fazda eksponensiyel olarak artmaya başladığı zamanı ifade eder.

Gen ekspresyonundaki rölatif değişim (değişim katsayısı) ise aşağıdaki gibi hesaplandı. Her örnek için C_t değeri saptandı ve Delta C_t değeri aşağıdaki formüle göre hesaplandı. Çoklu çalışılan her örnekten elde edilen iki değer için de bu işlem yapıldı ve ortalaması alındı.

$$\Delta \text{ (Delta) Ct} = \text{Ct (Hedef Gen)} - \text{Ct (Referans Gen)}$$

Çoklu çalışan örneklerden $\Delta\Delta\text{Ct}$ değeri aşağıdaki gibi hesaplandı ve ortalaması alındı.

$$\Delta\Delta \text{ (Delta Delta) Ct} = \text{Çalışılan genin ortalama } \Delta\text{Ct değeri} - \text{Referans genin } \Delta\text{Ct değeri}$$

$$\text{Rölatif Değişim Faktörü (F)} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$$



Kullanılan Cihazlar, Kimyasallar ve Malzemeler:

Tablo 6: kullanılan cihazlar ve markaları

Kullanılan Cihazlar	Markaları
Işık Mikroskobu	Olympus CKX41
Jel Görüntüleyici	UVP Imaging System
Jel Dökümantasyonu	UVP GelIDoc-It
Hassas Terazı	KERN, EMB 200-2
Nanodrop Spektrofotometre	Thermo Scientific (ND-1000)
PZR	Bio-rad T100 Thermal Cycler
Santrifüj Makinesi	Beckman Coulter Microfuge
Masaüstü Santrifüj Makinesi	Beckman Coulter Microfuge
Vorteks	Kermanlar
Light Cycler	Roche
İnkübatör	Hibrigene Techne
Steril Kabin	Thermo Scientific, HERA
Pipetler	Eppendorf
Buzdolabı (+4°C, -20°C)	Bosch, Uğur
Derin Dondurucu (-80°C)	Heraeus Sepatech

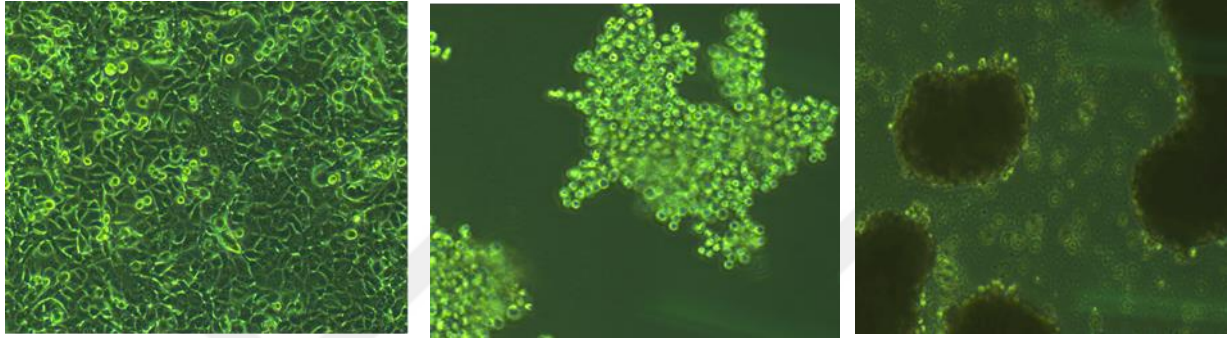
Tablo 7: Kullanılan kimyasallar ve malzemeler

Kullanılan Malzemeler:
Hücre kültürü medyumları: -DMEM: Yüksek glukozlu, L-Glutamin ve Sodyum Piruvat içeren - DMEM - F12 ile sabit Glutamin ile 15 mM Hepes - Fetal Bovine Serum (South America) - Tripsin %0.25 - HBSS'de EDTA Kalsiyumsuz, Magnezyumsuz, Fenol Kırmızısı - Dulbecco's Fosfat Buffered Saline Kalsiyumsuz, Magnezyumsuz Moleküler Testler için: - Agaroz LE, Mol. Bio. Grade - qPZR GreenMaster with UNG - Total RNA Saflaştırma Kiti - SCRIPT cDNA Sentez Kiti - GD 50bç DNA Ladder RTU (Kullanıma Hazır) - SCG2 antikoru

4. BULGULAR

4.1. Hücre Kültürü Çıktıları İmmün Floresan

4.1.1. Bazal Kültür ve Farklılaşma Protokolü Uygulanarak Elde Edilen Hücreler

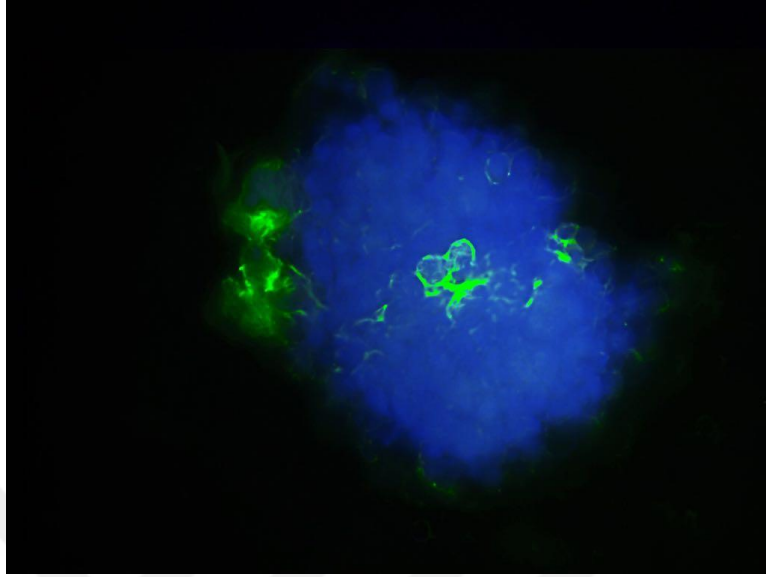


Şekil 7: PANC-1 hücrelerinin farklı kültür şartlarındaki invert mikroskop görüntüleri.

A) Bazal şartlarda büyüyen hücreler (4X büyütme). B) Farklılaşma protokolünün 0. günü (10X büyütme)
C) Farklılaşma protokolü 14. günü (10X büyütme)

Bazal şartlarda yapılan kültür esnasında hücrelerin yapışarak büyüdüğü ve hızla çoğalarak flask tabanını kapladıkları gözlemlenmiştir. Daha sonra hasat edilen hücreler farklılaşma protokolüne tabi tutulduklarında yüzen hücreler (süspansiyon kültürü) halinde kültür edilebilmiştir. Farklılaşma protokolü, hücrelerin birbirine yapışarak kümeleşmesine yardımcı olmuş, gittikçe büyüyen ve yoğunlaşan adacık benzeri kümeleşmeler oluşmasına sebep vermiştir. Bu protokol 14 gün boyunca sürdürülmüş ve hücre kümeleşmelerinin özellikle orta/iç bölümde gittikçe yoğunlaştığı gözlemlenmiştir. Hücre morfolojilerinde bazal kültür şartlarına nazaran belirgin olarak değişimlerin olduğu invert mikroskop kullanılarak gözlemlenmiştir. Bu değişimlere paralel olarak gen ekspresyonlarında da değişimler olduğu daha evvel yapılan array çalışmalarında saptanmıştır. Bazal şartlarda çoğalan hücreler, farklılaşma protokolünün 0. ve 14. günlerinde hücreler hasat edilerek RNA izolasyonları yapılmış ve daha sonra kantitatif RT-PZR'da kullanılmak amacıyla saklanmıştır.

4.1.2. SCG2 Proteinini İçin İmmün Floresan Mikroskopi Bulguları



Şekil 8: SCG2 proteininin adacık benzeri hücre kümelerinde immün floresan boyama ile gösterilmesi (40X).

14. günde hasat edilen AHK'larda SCG2 proteinine ait sinyaller yeşil olarak görülmektedir. Mavi ile görülen sinyaller ise DAPI ile DNA boyamasına aittir.

SCG2 genine ait ekspresyonun varlığı ve yükselişi array analizlerinde saptandıktan sonra bu genin ekspresyonunun yükselişini valide etmeyi planlamıştık ancak öncelikle proteinin gerçekten üretildiğinin gösterilmesi gerekmektedir. Bu sebeple, immün floresan analizlerin yapılması planlanmıştı. Bunun için SCG2'ye spesifik bir primer antikor (poliklonal antirabbit; orb44128) ve bununla birlikte bir sekonder antikor (goat antirabbit IgG FITC boyalı) kullanılarak immün floresan sinyaller elde edildi. Şekil 8'de görülen yeşil sinyaller bu spesifik boyanmaya aittir. Hücrelerin canlılığının kontrol edilebilmesi amacı ile ise hücre çekirdeğinin boyanabilmesi amacı ile DAPI boyası tercih edildi.

İmmün floresan boyamasından elde edilen SCG2 spesifik sinyalleri AHK oluşumlarının merkezinden ziyade daha çok perifer hücre gruplarında görülmektedir. SCG2 sinyalleri ile DAPI boyaması AHK oluşumlarında üst üste çakışmamaktadır. Bu veri proteinin çekirdekte bulunmadığını göstermektedir. SCG2 sinyalinin sitoplazma yerleşimli olduğu ve bazı hücrelerde sitoplazmadan hücre yüzeyine doğru dağılım gösterdiği ve hücre yüzeyinde tomurcuk benzeri birikimlerin oluştuğu dikkat çekmektedir.

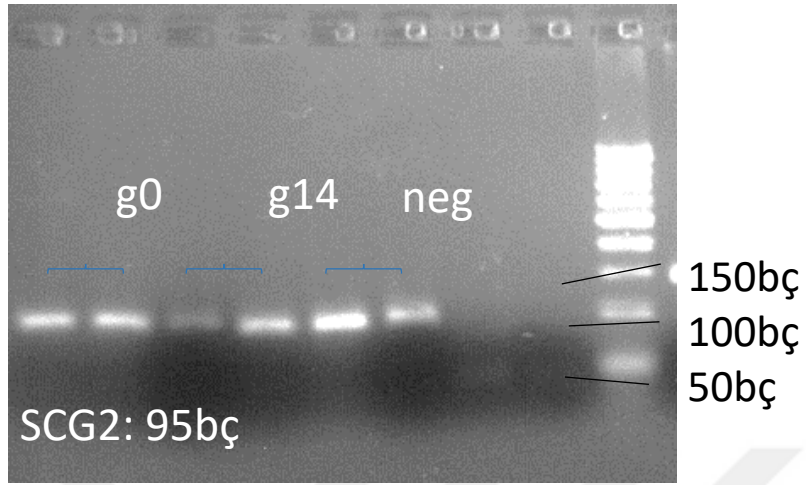
4.2. Gen Anlatım Düzeylerinin Tespiti ve İstatistiksel Değerlendirilmesi

4.2.1. PZR Ürünlerinin Boyutlarının Kontrolü

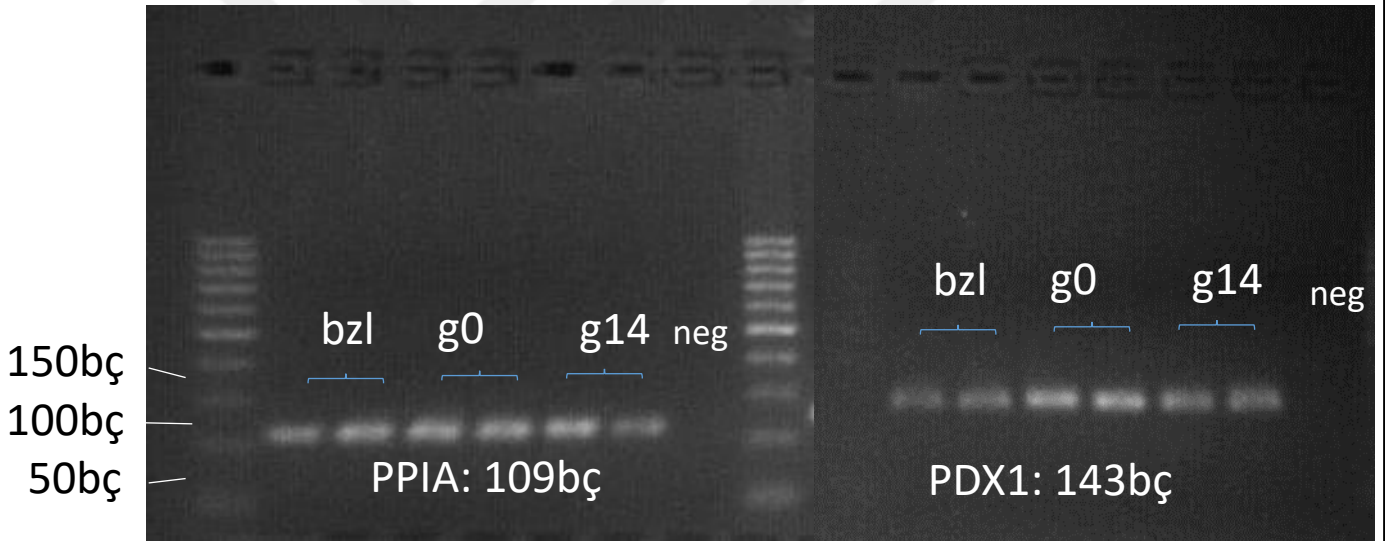
Hasat edilmiş tüm deney günlerine ait RNA örneklerinden cDNA elde edildikten sonra ROCHE light cycle 480 cihazında KRT-PZR SYBR Green I Protokolü uygulandı. Buradaki spesifik PZR ürünlerine ait fragman boylarının doğruluğu %2'lik agaroz jelde kontrol edilmiştir.

RT-PZR ile çoğaltılması beklenen *SCG2*, *PPIA*, *PDX1*, *POU5F1 (OCT3)*, *KLF4*, *SST*, *GCG* genlerine ait fragman boyutları kontrol edildikten sonra, deneylere ait Ct değerlerinin kullanılabilirliği değerlendirilmiştir. Şekil-9'da *SCG2*, *PPIA*, *PDX1* genlerinin, Şekil-10'da *SST*, *GCG* genlerinin, Şekil-11'de *KLF4*, *POU5F1 (OCT3)* genlerinin ampikon boyları verilmektedir.

Metodlar bölümünde, Tablo 3'de listelendiği şekliyle incelenen her gene ait beklenen ampikon boyları verilmiştir. Agaroz jel sonuçlarında, *GCG* geni haricinde çalışılan diğer tüm genlerin bu beklenen boylarla uyumlu olduğu gözlemlenmiştir. Bu verilere dayanılarak kantitatif RT-PZR esnasında çoğalan ampikon boylarının hedeflediğimiz dizilere ait olduğu saptanmıştır. Bu genlerden *PPIA* geni, housekeeping özelliği sebebi ile daha sonra yapılan istatistik çalışmalarda referans gen olarak kullanılmıştır. Bu sebeple *PPIA* genine ait amplifikasyon her KRT-PZR deney düzeneğinde tekrarlı olarak yapılmıştır.

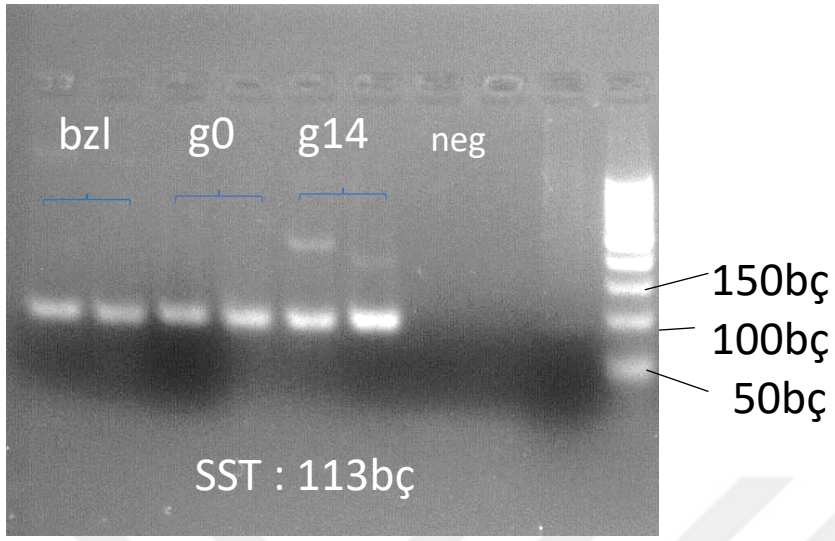


A)

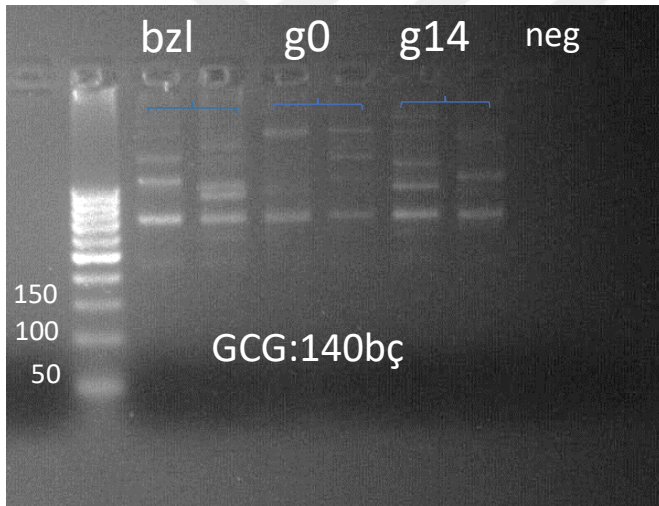


B)

ŞEKİL 9. A) SCG2 B) PPIA, PDX1 genlerine ait amplikonların agaroz %2'lik jeldeki görüntüsü. Genlere ait amplikon boylarının doğrulukları agaroz jelde yürütülerek saptanmıştır, böylelikle ürünlerin spesifikliğı kontrol edilmiştir. Bazal şartlarda 0 ve 14'üncü günlerde elde edilen amplikon boyları şekilde görülmektedir.



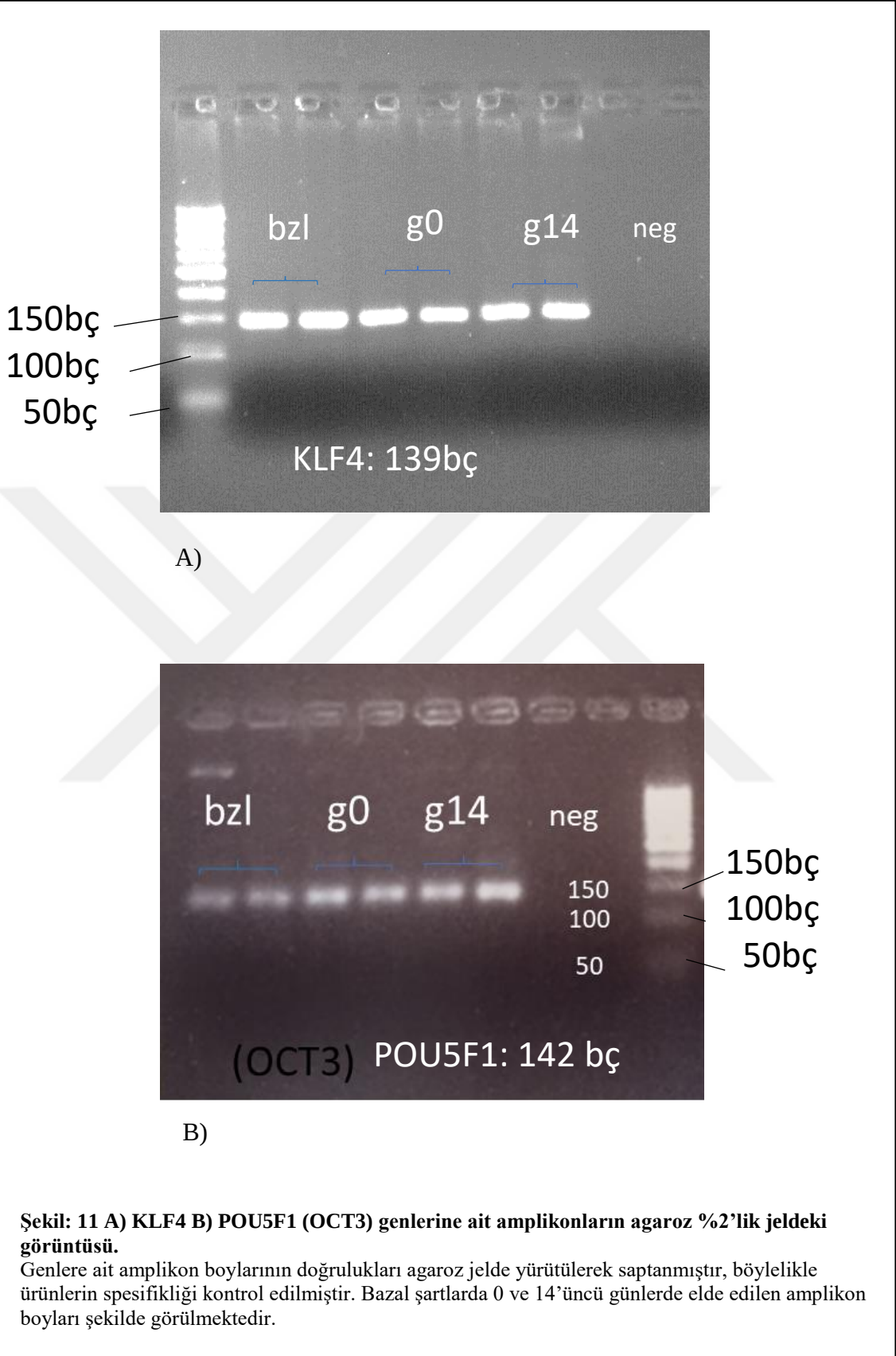
A)



B)

Şekil10 A) SST B) GCG genlerine ait amplikonların agaroz %2'lik jeldeki görüntüsü.

Genlere ait amplikon boylarının doğrulukları agaroz jelde yürütülerek saptanmıştır, böylelikle ürünlerin spesifikliği kontrol edilmiştir. Bazal şartlarda 0 ve 14'üncü günlerde elde edilen amplikon boyları şekilde görülmektedir.



A)

PDX1_G14

PDX1_G0

PDX1_BZL

B)

POUF5F1_G14

POUF5F1_G0

POUF5F1_BZL

C)

SST_G14

SST_G0

SST_BZL

D)

GCG_G14

GCG_G0

GCG_BZL

E)

KLF4_G14

KLF4_G0

KLF4_BZL

F)

SCG2_G14

SCG2_G0

SCG2_BZL

0.1

1

10

100

1000

Değişim Faktörü: Ortalama $2^{-(ddCt)}$:

Şekil 12: A) *PDX1* B) *POUF5F1* C) *SST* D) *GCG* E) *KLF4* F) *SCG2* genlerine ait değişim faktörleri $2^{-(ddCt)}$ metodu uygulanarak gösterilmiştir.

Tablo 8: Genlere göre ortalama $2^{-(ddCt)}$, G14/G0 oranları, standart sapma ve P değerleri.

Genler	Ortalama $2^{-(ddCt)}$:	Değişim Faktörü: G14/G0	Standart sapma	P Değeri
SCG2_BZL	1.04	30.41	0.145	$*1.17 \times 10^{-5}$
SCG2_G0	10.67		3.680	
SCG2_G14	324.51		125.06	
KLF4_BZL	0.99	1.35	0.036	1.52×10^{-1}
KLF4_G0	1.41		0.429	
KLF4_G14	1.90		0.880	
GCG_BZL	1.01	1.64	0.153	2.08×10^{-1}
GCG_G0	1.46		0.252	
GCG_G14	2.40		0.707	
SST_BZL	1.15	7.37	0.570	$*1.44 \times 10^{-3}$
SST_G0	8.74		3.171	
SST_G14	64.40		13.510	
POU5F1_BZL	1.16	3.26	0.690	$*3.23 \times 10^{-2}$
POU5F1_G0	1.79		1.465	
POU5F1_G14	5.84		4.268	
PDX1_BZL	1.01	1.14	0.168	1.95×10^{-1}
PDX1_G0	0.96		0.453	
PDX1_G14	1.1		0.340	

Tablo 8’de verilen genlerde bazal, gün 0 ve gün 14 örneklerine ait ifade değerleri gösterilmiştir. Deneylerden elde edilen Ct değerlerinden, ddCt değerlerinin hesaplanabilmesi amacı ile, referans bir değerin seçilmesi gerekmektedir. Bu ortalama değer bazal şartlardaki hücrelerden, her deney için tekrarlı şekilde amplifiye edilen *PPIA* genine ait Ct değerleri kullanılarak hesaplanmıştır. Yani, normalizasyon amacı ile kalibratör olarak bazal şartlardaki *PPIA* genine ait değerler kullanılmıştır. Şekil 11’de $2^{-(ddCt)}$ değerlerine ait veriler görselleştirilerek grafik halinde verilmiştir. Tablo 8’de değerler nümerik olarak verilmekte ve bunlara ait standart sapma sonuçları gösterilmektedir.

Değişimin anlamlandırılması amacı ile ANOVA hesaplaması yapılmıştır ve *PPIA* genine ait P değeri, $p < 0.05$ çıktığından değişim, anlamlı olarak kabul edilmiştir. Bunun yanı sıra P değeri 0.05’den küçük olan *SCG2* genine ait $2^{-(ddCt)}$ değerleri Gün 14/Gün 0 olarak oranlandığında 30.41 kat artış gözlemlenmiştir. *SST* geninde ise bu oran 7.37 kat olarak ve *POU5F1* geninde 3.26 kat artış görülmektedir. *PDX1* geninde ise 1.14, *GCG* geninde 1.64, *KLF4* geninde 1.35 kat artış görülmekte olup, değişim bu son üç gende anlamlı düzeyde bulunmamıştır.

5.TARTIŞMA

PANC1 hücre hattının farklılaştırılması literatürde ilk defa Hardikar ve arkadaşları (2003) [2] tarafından gerçekleştirilmiştir. Burada geliştirilmiş olan protokol laboratuvarımızca optimize edilerek uygulanmıştır. Bu protokolün uygulanması esnasında yapışarak büyüyen hücrelerden, süspansiyonda kümeleşmeler oluşturularak gelişen hücre topluluklarına dönüştükleri gözlemlenmiştir. TÜBİTAK INTENC 113S029 numaralı REGTHERDIM başlıklı projede yapılan array analizlerinde pek çok gende bu morfolojik değişikliklere paralel olarak anlamlı ekspresyon değişiklikleri olduğu gözlemlenmiştir. Ancak tüm bu genlerin ekspresyonlarındaki değişimlerin, hem gen ekspresyonu düzeyinde (diğer başka bir metodla) tekrar gösterilmesi ve protein düzeyindeki çalışmaların yapılması gerekmektedir. Bu hedef doğrultusunda seçilen *SCG2* geni de, bahsi geçen array çalışması sonucunda değişim göstermiş olan genlerden biridir.

Bu doğrultuda öncelikle farklılaşma protokolü uygulanan hücreler 14'üncü günün sonunda hasat edilerek protein düzeyindeki *SCG2* geninin varlığının gösterilebilmesi amacıyla immün floresan metodlarla gösterilmiştir. Bu farklılaşma protokolü ile ilişkili olarak *SCG2* proteini ilk defa bu çalışmada irdelenmiştir. Immüno floresan mikroskop görüntüsünde kümeleşme oluşturan adacık benzeri yapıcıkları sinyallerin, adacığın dış kısmında yoğunluk gösterdiği görülmektedir. Sinyallerin genel olarak dış kabuk bölgesinde yoğunlaşmış olması glukagon ve somatostatin eksprese eden alfa ve delta adacık hücrelerine benzer bir yerleşim gösterdiğine dair bir bulgudur. Bu da *SCG2* geninin oluşturmuş olduğumuz AHK oluşumlarının tümünde homojen olarak görülmediğine dair bir veridir. *GCG* ve *SST*'nin spesifik olarak *SCG2* proteini ile kolokelize olup olmadığının gösterilmesi henüz mümkün olmamıştır.

Bu tez kapsamında *SCG2* genindeki ekspresyon değişiminin array verilerine paralel olarak gösterilebilmesi amacı ile ikinci bir metod olarak KRT-PZR SYBR Green metodu kullanılmıştır. Yapılan SYBR Green reaksiyonu sonucunda elde edilen fragmanlar %2'lik jelde kontrol edilmiştir. RT-PZR ile çoğaltılması beklenen *SCG2*, *PPIA*, *PDX1*, *POU5F1 (OCT3)*, *KLF4*, *SST*, *GCG* genlerine ait fragman boyutları kontrol edildikten sonra, deneylere ait Ct değerlerinin kullanılabilirliği değerlendirilmiştir. Agaroz jel sonuçlarında, *GCG* geni haricinde çalışılan diğer tüm genlerin bu beklenen boylarla uyumlu olduğu gözlemlenmiştir. Dolayısıyla istatistik

çalışması yapılmış olmakla birlikte aslında bu gene ait primerlerin yeniden dizayn edilerek tekrar analiz edilmesi gerektiğini düşünmekteyiz.

Bu metodla ekspresyondaki değişimler ikinci bir yöntem kullanılarak gösterilmiş olmaktadır. Elde ettiğimiz verilere göre farklılaşma protokolünün uygulanmaya başladığı ilk günün sonunda elde edilmiş olan RNA örnekleri, protokolün son hasat gününden elde edilen RNA örnekleri ile karşılaştırılmış bulunmaktadır. Bu karşılaştırma sonucunda ilk gün ile son gün arasında morfolojik değişimlere paralel olarak *SCG2* gen ekspresyonunda 30.41 kat artış olduğu ilk defa bu tez vasıtası ile gösterilmiş olmaktadır. Yani, daha önce yapılmış çalışmalardan elde edilen bilgilere göre ilk olarak endoplazmik retikulumdan sentezlenen *SCG* preproteini, daha sonra golgi cisimciğinde glikosilasyon, fosforilasyon ve sulfasyon şeklinde modifikasyonlara uğrar ve golgiden salgı granüllerine taşındıktan sonra, proteolitik olarak kırılan preprotein, salgı vesikülünde yoğun olarak bulunur [44,47]. Yapmış olduğumuz immün floresan çalışması sonucunda *SCG2* içeren salgı granüllerinin AHK oluşumlarının dış kısımlarında yoğunlaştığını göstermiştir. Ancak kullanmış olduğumuz mikroskop yazılımı kantifikasyona imkan vermediği için bu metodla herhangi bir sayısal değerlendirmenin elde edilmesi mümkün olmamıştır. Yani, elde edilen bu veri kantitatif olmaktan ziyade kalitatif bir veridir. Glukagon ve somatostatin antikorlarıyla birlikte *SCG2* proteininin kolokalize olduğunun gösterilmesi, ilerideki çalışmaların konusu olacaktır.

SCG2 gen ekspresyon düzeylerindeki değişimlerin verifiye edilmesi amacıyla tez kapsamında KRT-PZR metodu kullanılmıştır. Bu gen haricinde kontrol amaçlı olarak *SST* ve *GCG* hormon gen ekspresyonu ile birlikte gelişim genleri olan *PDX1*, *POU5F1* (*OCT3*) ve *KLF4* genleri de incelenmiştir. Hedef gen olarak seçilmiş olan *SCG2* gen ekspresyonunun farklılaşma protokolünün ilk başladığı günden itibaren yükseldiği ve sonunda 30.41 kat arttığı ($p=1.17 \times 10^{-5}$) gösterilmiştir. Buna paralel olarak *SST* gen ekspresyonunda 7.37 kat arttığı ($p=1.44 \times 10^{-3}$) gözlemlenmiştir. En yüksek değişim katsayılarının bu iki gende anlamlı şekilde saptanmasının, *SCG2* ve *SST* genlerinin AHK oluşumlarının dış kabuk yüzeyinde yoğun olarak lokalize olması ile bir ilişkisi olabileceğini düşündürmektedir. Ancak, bu hücreler tek tek seçilerek bir RNA ekspresyon analizi yapılabilmiş olsaydı, bu hipotezi daha kuvvetle kanıtlamak mümkün olabilirdi.

Somatostatin hormonunun, kandaki glikoz düzenleyici hormonlar üzerinde yani, pankreatik adacıklarda β -hücrelerinden insülin, α -hücrelerinden glukagon da dahil olmak üzere, önemli ölçüde hormon baskılayıcı etkisi olduğu bilinmektedir [36,37]. Buna paralel olarak bu deney düzeneğinde diğer hormonların da incelenmesi ve özellikle insülin ve glukagon hormonlarının ekspresyonlarının ne şekilde etkilendiğinin gösterilmesi gerekmektedir. İnsülin ve glukagon değişiminde yükselme görülüyor oluşunun somatostatinin yüksek olması ile bir ilişkisinin olup olmadığı bu deney düzeneğinde irdelenmelidir.

Deney düzeneğimizde ayrıca, anlamlı değişim gösteren diğer bir gen de *POU5F1* geni olmuştur. Bu gende protokolün başlangıcı ile sonu arasında ekspresyon düzeyinde 3.26 kat artış ($p=3.23 \times 10^{-2}$) olduğu gözlemlenmiştir. Bu değişimdeki anlamlılığın daha düşük olduğu gözlemlenmektedir. Omurgalı gelişiminin ilk aşamalarında, *POU5F1*, pluripotansın önemli düzenleyicisi olarak rol oynadığı [57], ve normal kök hücrede rejenerasyon sürecinin sürdürülmesinde temel bir rol oynadığını göstermiştir [55,56]. Bu bağlamda, ekspresyondaki hafif ancak anlamlı artışın hücre rejenerasyonunun deney düzeneğimizde hızlandığına dair bir bulgu olabilir.

Bir çinko-parmak (zinc-finger) transkripsiyon faktörüdür ve *KLF4* mRNA ekspresyonu esas olarak deri ve akciğerler ve gastrointestinal kanaldaki organlarda postmitotik, terminal diferansiye epitelyal hücrelerde bulunduğu bildirilmiştir [63,64]. Yani difereansiyasyonun daha ileri aşamalarında gözlenirler. Deney düzeneğimizde bu genin ekspresyonunda belirgin bir değişiklik gelişmediği gözlenmiştir.

Pankreatik duodenal homeobox 1 (*PDX1*) bağırsak gelişiminin ilk aşamalarında pankreas oluşumunda görev alır ve adacık gelişimi ile birlikte, β -hücre fonksiyonunda sağkalıma katkıda bulunan önemli bir transkripsiyon faktörüdür [59,60]. Bu genle ilişkili olarak da ekspresyonun sabit kaldığı gözlenmiştir. Eğer bu genin ekspresyonunda bir düşüş görülüyor olsaydı, deney düzeneğimizin başarısız yönde ilerlediğine dair bir veri elde edilmiş olacaktı.

Elde edilen tüm bu veriler birlikte değerlendirildiğinde, indüklenerek oluşturulan adacık benzeri oluşumların (AHK) hormonal değişimlerin ve bunlarla ilişkili diğer yollara ait genlerin/proteinlerin irdelenebileceği değerli bir deneysel düzenek olduğu gözlenmiştir. Bu deneysel modelde elde edilen *SCG2* gen ekspresyonunun artışının (30.41

kat) da sekrekseyon gran  lleri ilişkli yolakların ve biyolojisinin incelenmesi i in faydalı model olacaktır.



KAYNAKLAR

1. Zhan X, Li F, Chu Q, Pang H. Effects of PQ's cytotoxicity on secretory vesicles in astroglia: Expression alternation of secretogranin II and its potential interaction with intracellular factors. *Biochem Biophys Res Commun* 2018; 497(2): 675-682.
2. Hardikar AA, Marcus-Samuels B, Geras-Raaka E, Raaka BM, Gershengorn MC. Human pancreatic precursor cells secrete FGF2 to stimulate clustering into hormone-expressing islet-like cell aggregates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(12): 7117-7122.
3. Poda M, G. Hasanoğlu, F.Y. Ekici, F.N. Tuncer. Adacık Benzeri Hücre Kümeleşmesinde Gen Anlatım Değişimleri, Differential Expression In SST Gene In Induced Panc-1 Cells Forming Islet-Like Cell Aggregates (ICA). *Deneysel Tıp Dergisi* 2017; 87-92.
4. Meszoely IM, A.L. M, C.R. S, S.D. L. Developmental Aspects of Early Pancreatic Cancer. *Cancer Journal* 2001 7(4): 242-250.
5. Beattie GM, Itkin-Ansari P, Cirulli V, Leibowitz G, Lopez AD, Bossie S, ve ark. Sustained proliferation of PDX-1+ cells derived from human islets. *Diabetes* 1999; 48(5): 1013-1019.
6. Russ HA, Bar Y, Ravassard P, Efrat S. In vitro proliferation of cells derived from adult human beta-cells revealed by cell-lineage tracing. *Diabetes* 2008; 57(6): 1575–1583.
7. Vujasinovic M, Valente R, Del Chiaro M, Permert J, Lohr JM. Pancreatic Exocrine Insufficiency in Pancreatic Cancer. *Nutrients* 2017; 9(3).
8. Collin M, Milne P. Langerhans cell origin and regulation. *Curr Opin Hematol* 2016; 23(1): 28-35.
9. Bungay PJ, Owen RA, Coutts IC, Griffin M. A role for transglutaminase in glucose-stimulated insulin release from the pancreatic beta-cell. *Biochem J* 1986; 235(1): 269-278.

10. Metz SA, Rabaglia ME, Stock JB, Kowluru A. Modulation of insulin secretion from normal rat islets by inhibitors of the post-translational modifications of GTP-binding proteins. *Biochem J* 1993; 295 (Pt 1): 31-40.
11. Gartner PL, Hiatt JL. Text Book of Histology. Baltimore: W.B. Saunders Company; 1997.
12. Webb GC, Akbar MS, Zhao C, Swift HH, Steiner DF. Glucagon replacement via micro-osmotic pump corrects hypoglycemia and alpha-cell hyperplasia in prohormone convertase 2 knockout mice. *Diabetes* 2002; 51(2): 398-405.
13. Rouille Y, Martin S, Steiner DF. Differential processing of proglucagon by the subtilisin-like prohormone convertases PC2 and PC3 to generate either glucagon or glucagon-like peptide. *J Biol Chem* 1995; 270(44): 26488-26496.
14. Da Silva Xavier G. The Cells of the Islets of Langerhans. *J Clin Med* 2018; 7(3).
15. Kayama Y, Raaz U, Jagger A, Adam M, Schellinger IN, Sakamoto M, et al. Diabetic Cardiovascular Disease Induced by Oxidative Stress. *Int J Mol Sci* 2015; 16(10): 25234-25263.
16. Schwartz SS, Epstein S, Corkey BE, Grant SFA, Gavin III JR, Aguilar RB, et al. A Unified Pathophysiological Construct of Diabetes and its Complications. *Trends Endocrinol Metab* 2017; 28(9): 645-655.
17. Antosik K, Borowiec M. Genetic Factors of Diabetes. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2016; 64(Suppl 1): 157-160.
18. Sebastiani G, Nigi L, Grieco GE, Mancarella F, Ventriglia G, Dotta F. Circulating microRNAs and diabetes mellitus: a novel tool for disease prediction, diagnosis, and staging? *J Endocrinol Invest* 2017; 40(6): 591-610.
19. Rhodes CJ. Type 2 diabetes-a matter of beta-cell life and death? *Science* 2005; 307(5708): 380-384.
20. Meier JJ, Bhushan A, Butler AE, Rizza RA, Butler PC. Sustained beta cell apoptosis in patients with long-standing type 1 diabetes: indirect evidence for islet regeneration? *Diabetologia* 2005; 48(11): 2221-2228.

21. Mirza AH, Kaur S, Pociot F. Long non-coding RNAs as novel players in beta cell function and type 1 diabetes. *Hum Genomics* 2017; 11(1): 17.
22. Grant SF, Hakonarson H. Genome-wide association studies in type 1 diabetes. *Curr. Diabetes Rep* 2009; 9: 157–163.
23. Butler AE, Janson J, Bonner-Weir S, Ritzel R, Rizza RA, Butler PC. Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes* 2003; 52(1): 102-110.
24. Rahier J, Guiot Y, Goebbels RM, Sempoux C, Henquin JC. Pancreatic beta-cell mass in European subjects with type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab* 2008; 10 Suppl 4: 32-42.
25. Orci L, Unger RH. Functional subdivision of islets of Langerhans and possible role of D cells. *Lancet* 1975; 2(7947): 1243-1244.
26. Ludvigsen E, Olsson R, Stridsberg M, Janson ET, Sandler S. Expression and distribution of somatostatin receptor subtypes in the pancreatic islets of mice and rats. *J Histochem Cytochem* 2004; 52(3): 391-400.
27. Leeson TS, Leeson CR. *Text/Atlas of Histoloji*. 1 ed. Philadelphia W. Saunders Company; 1988
28. Bloom W, Fawcett DW. *A Text Book of Histology*. 11 ed. Philadelphia: W.B.Saunders Company; 1996.
29. Foulis AK, McGill M, Farquharson MA. Insulinitis in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus in man—macrophages, lymphocytes, and interferon-gamma containing cells. *J Pathol* 1991; 165: 97-103.
30. Brunnicardi FC, Stagner J, Bonner-Weir S, Wayland H, Kleinman R, Livingston E, ve ark. Microcirculation of the islets of Langerhans. Long Beach Veterans Administration Regional Medical Education Center Symposium. *Diabetes* 1996; 45(4): 385-392.
31. Maclean N, Ogilvie RF. Quantitative estimation of the pancreatic islet tissue in diabetic subjects. *Diabetes* 1955; 4(5): 367-376.
32. Czech MP, Tencerova M, Pedersen DJ, Aouadi M. Insulin signalling mechanisms for triacylglycerol storage. *Diabetologia* 2013; 56(5): 949-964.

33. G rlek A, Kayaalp SO.  ns lin, oral ve Diğer Antidiabetik  lalar ve Glukagon. Rasyonel Tedavi Y n nden Tıbbi Farmakoloji.  stanbul: Pelikan Tıp Teknik Yayıncılık; 2005:1039-1052.
34. Lee B, Shao J. Adiponectin and energy homeostasis. *Rev Endocr Metab Disord* 2014; 15(2): 149-156.
35. De Martino MC, Hofland LJ, Lamberts SW. Somatostatin and somatostatin receptors: from basic concepts to clinical applications. *Prog Brain Res* 2010; 182: 255-280.
36. Si MW, Yang MK, Fu XD. Effect of hypothalamic-pituitary-adrenal axis alterations on glucose and lipid metabolism in diabetic rats. *Genet Mol Res* 2015; 14(3): 9562-9570.
37. Alberti KG, Christensen NJ, Christensen SE, Hansen AP, Iversen J, Lundbaek K, ve ark. Inhibition of insulin secretion by somatostatin. *Lancet* 1973; 2(7841): 1299-1301.
38. Christensen SE, Hansen AP, Orskov H, Lundbaek K. Twenty-four hour somatostatin infusions in normals, juvenile diabetics and maturity-onset diabetics. *Metabolism* 1978; 28: 1427-1431.
39. Hadjidakis DJ, Halvatsiotis PG, Ioannou YJ, Mavrokefalos PJ, Raptis SA. The effects of the somatostatin analogue SMS 201-995 on carbohydrate homeostasis of insulin-dependent diabetics as assessed by the artificial endocrine pancreas. *Diabetes Res Clin Pract* 1988; 5(2): 91-98.
40. Kieffer TJ, Habener JF. The glucagon-like peptides. *Endocr Rev* 1999; 20(6): 876-913.
41. Gerdes HH, Rosa P, Phillips E, Baeuerle PA, Frank R, Argos P, ve ark. The primary structure of human secretogranin II, a widespread tyrosine-sulfated secretory granule protein that exhibits low pH- and calcium-induced aggregation. *J Biol Chem* 1989; 264(20): 12009-12015.
42. Berard AR, Severini A, Coombs KM. Differential Reovirus-Specific and Herpesvirus-Specific Activator Protein 1 Activation of Secretogranin II Leads to Altered Virus Secretion. *J Virol* 2015; 89(23): 11954-11964.

43. Yon L, Guillemot J, Montero-Hadjadje M, Grumolato L, Leprince J, Lefebvre H, ve ark. Identification of the secretogranin II-derived peptide EM66 in pheochromocytomas as a potential marker for discriminating benign versus malignant tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88(6): 2579-2585.
44. Fischer-Colbrie R, Hagn C, Schober M. Chromogranins A, B, and C: widespread constituents of secretory vesicles. *Ann N Y Acad Sci* 1987; 493: 120-134.
45. Anouar Y, Desmoucelles C, Yon L, Leprince J, Breault L, Gallo-Payet N, ve ark. Identification of a novel secretogranin II-derived peptide (SgII(187-252)) in adult and fetal human adrenal glands using antibodies raised against the human recombinant peptide. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83(8): 2944-2951.
46. Guillemot J, Thouennon E, Guerin M, Vallet-Erdtmann V, Ravni A, Montero-Hadjadje M, ve ark. Differential expression and processing of secretogranin II in relation to the status of pheochromocytoma: implications for the production of the tumoral marker EM66. *J Mol Endocrinol* 2012; 48(2): 115-127.
47. Fremeau RT, Jr., Voglmaier S, Seal RP, Edwards RH. VGLUTs define subsets of excitatory neurons and suggest novel roles for glutamate. *Trends Neurosci* 2004; 27(2): 98-103.
48. Choi SE, Noh JR, Seo J, Yang KJ, Kook MC, Lee CH. Gene expression profiling of allogeneic islet grafts in an experimental mouse model before rejection or tolerance phenotypes arise. *Transplant Proc* 2013; 45(2): 597-604.
49. Jung KH, Chu K, Lee ST, Kim SJ, Sinn DI, Kim SU, ve ark. Granulocyte colony-stimulating factor stimulates neurogenesis via vascular endothelial growth factor with STAT activation. *Brain Res* 2006; 1073-1074: 190-201.
50. Meijing W, Wenjun Z, Paul C, Troy M, Kirstan KM, Xin YF, ve ark. STAT3 mediates bone marrow mesenchymal stem cell VEGF production. *J. Mol. Cell. Cardiol* 2007; 42(5): 1009-1015.
51. Beuret N, Stettler H, Renold A, Rutishauser J, Spiess M. Expression of regulated secretory proteins is sufficient to generate granule-like structures in constitutively secreting cells. *J Biol Chem* 2004; 279(19): 20242-20249.

52. Wiedermann CJ. Secretoneurin: a functional neuropeptide in health and disease. *Peptides* 2000; 21(8): 1289-1298.
53. Kirchmair R, Egger M, Walter DH, Eisterer W, Niederwanger A. Secretoneurin, an angiogenic neuropeptide, induces postnatal vasculogenesis. *Circulation* 2004; 110: 1121–1127.
54. Kirchmair R, Gander R, Egger M, Hanley A, Silver M, Ritsch A, ve ark. The neuropeptide secretoneurin acts as a direct angiogenic cytokine in vitro and in vivo. *Circulation* 2004; 109(6): 777-783.
55. Scholer HR, Dressler GR, Balling R, Rohdewohld H, Gruss P. Oct-4: a germline-specific transcription factor mapping to the mouse t-complex. *EMBO J* 1990; 9(7): 2185-2195.
56. Niwa H, Miyazaki J, Smith AG. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet* 2000; 24(4): 372-376.
57. Prusa AR, Marton E, Rosner M, Bernaschek G, Hengstschlager M. Oct-4-expressing cells in human amniotic fluid: a new source for stem cell research? *Hum Reprod* 2003; 18(7): 1489-1493.
58. Tai MH, Chang CC, Kiupel M, Webster JD, Olson LK, Trosko JE. Oct4 expression in adult human stem cells: evidence in support of the stem cell theory of carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2005; 26(2): 495-502.
59. Jonsson J, Carlsson L, Edlund T, Edlund H. Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice. *Nature* 1994; 371(6498): 606-609.
60. Offield MF, Jetton TL, Labosky PA, Ray M, Stein RW, Magnuson MA, ve ark. PDX-1 is required for pancreatic outgrowth and differentiation of the rostral duodenum. *Development* 1996; 122(3): 983-995.
61. Fujimoto K, Polonsky KS. Pdx1 and other factors that regulate pancreatic beta-cell survival. *Diabetes Obes Metab* 2009; 11 Suppl 4: 30-37.
62. Kushner JA, Ye J, Schubert M, Burks DJ, Dow MA, Flint CL, ve ark. Pdx1 restores beta cell function in Irs2 knockout mice. *J Clin Invest* 2002; 109(9): 1193-1201.

63. Segre JA, Bauer C, Fuchs E. Klf4 is a transcription factor required for establishing the barrier function of the skin. *Nat Genet* 1999; 22(4): 356-360.

64. Shields JM, Christy RJ, Yang VW. Identification and characterization of a gene encoding a gut-enriched Kruppel-like factor expressed during growth arrest. *J Biol Chem* 1996; 271(33): 20009-20017.

65. Shi M, Cui J, Du J, Wei D, Jia Z, Zhang J, et al. A novel KLF4/LDHA signaling pathway regulates aerobic glycolysis in and progression of pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 2014; 20(16): 4370-4380.



HAM VERİLER

FORMLAR

ETİK KURUL KARARI

PATENT HAKKI İZNİ

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

İNDÜKLENEREK ADACIK BENZERİ HÜCRE KÜMELEŞMELERİ (AHK) OLUŞTURAN PANC1 HÜCRE HATTINDA SEKRETOGRANİN (SCG2) GEN ANLATIMININ GÖSTERİLMESİ

ORJİNALLIK RAPORU

% 1	% 1	% 0	% 0
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	bilimderyasi.com İnternet Kaynağı	<% 1
2	Graß, Nina. "Der Einfluss inhibitorischer Aminosäuren auf die Proenkephalin-Genexpression in dissoziierten neocorticalen Neuronen", Universität Freiburg, 2006. Yayın	<% 1
3	Submitted to Afyon Kocatepe University Öğrenci Ödevi	<% 1
4	opentextbc.ca İnternet Kaynağı	<% 1
5	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	<% 1

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Aslıhan	Soyadı	Kaygusuz
Doğ.Yeri	İstanbul	Doğ.Tar.	08.12.1993
Uyruğu	TC vatandaşı	TC Kim No	40456043084
Email	aslihankaygusuz@hotmail.com	Tel	05424055660

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.	İstanbul Üniversitesi	2018
Lisans	Fatih Üniversitesi	2015
Lise	Bakırköy Ataköy lisesi	2011

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.			-
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜD S Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	iyi	orta	iyi		

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı			
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Özel İlgi Alanları (Hobileri):