



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



Doktora Tezi

**TİP 2 DİYABET GELİŞİMİNDE PANKREATİK BETA-HÜCRE
FONKSİYON KAYBININ ARAŞTIRILMASI**

Merve ERÇİN

Biyoloji Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji Programı

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Selda OKTAYOĞLU**

Ağustos, 2023

İSTANBUL

Bu çalışma, 2.08.2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji Programında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Prof. Dr. Selda OKTAYOĞLU(Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Betül YILMAZ
Marmara Üniversitesi
Tıp Fakültesi

Doç. Dr. Ayşe KARATUĞ-KAÇAR
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Doç. Dr. Birsen ELİBOL-YÜCESOY
Medeniyet Üniversite
Tıp Fakültesi

Dr. Öğr. Üyesi Serap SANCAR
İstanbul Üniversite
Fen Fakültesi

İntihal Programı Beyanı

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

Proje Destekleri

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin FDK-2019-35512 ve FBA-2022-38564 numaralı projeleri ile desteklenmiştir.

Tezden Üretilmiş Yayınların Künye Bilgileri

--

ÖNSÖZ

Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı başkanımız değerli hocam Prof. Dr. Şehnaz BOLKENT'e güler yüzü, hoşgörüsü ve iyi niyetiyle olduğu kadar korumacı yaklaşımından ve her türlü desteğinden ötürü çok teşekkür ederim.

Sevgili çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Selda GEZGİNCİ-OKTAYOĞLU için hiçbir teşekkür cümlesi ona olan minnet ve sevgimi anlatmaya yetmeyecektir. Sadece tez çalışmalarımda değil tüm emekleriyle akademik olarak yetişmeme katkı sağladığı, hayatımda olduğu, hocam olduğu, yanında yetiştirme ayrıcalığı ve şansını sağladığı için çok teşekkür ederim.

Değerli tez izleme komitesi üyelerim Prof. Dr. Betül KARADEMİR-YILMAZ ve güler yüzünü hiçbir zaman esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Serap SANCAR'a tez dönemim boyunca her türlü yardımı ve desteği sağladıkları için çok teşekkür ederim.

Manevi destekleriyle her zaman yanımda olan canım arkadaşlarım Dr. Öğr. Ü. Elif MERTOĞLU-KAMALI, Arş. Gör. Merve YILDIRIM, Arş. Gör. Öyküm GENÇ-AKAR ekip arkadaşım Ertan ÇELİK; arkadaşlarım Cansu ÖZAL-COŞKUN ve Sevgi BİNAY; yeni ekip arkadaşlarım sevgili pıtırıcıklar Sinem KARAKUŞ, Handan Mina DOĞU ve Elif GÜZEY'e çok teşekkür ederim.

Tüm Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerine ve öğrencilerine her zaman güler yüzlerini ve desteklerini esirgemedikleri için çok teşekkür ederim.

Real Time PCR, Nanodrop ve soğutmalı santrifüj cihazlarını kullandığımız Genel Biyoloji Anabilim Dalı hocalarım Prof. Dr. Nihal Ömür BULAN ve Dr. Öğr. Ü. Orkun YAYCILI'ya ve laboratuvarlarında immünofloresan mikroskobu, membran görüntüleme, Real Time PCR ve florimetre cihazlarını kullandığımız değerli Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü hocalarıma teşekkür ederim.

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

Ağustos 2023

Merve ERÇİN

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ.....	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİL LİSTESİ.....	viii
TABLO LİSTESİ.....	xi
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	xii
ÖZET.....	xiv
SUMMARY	xvii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL KISIMLAR	3
2.1 DİYABET	3
2.2 PANKREATİK GELİŞİM SÜRECİNDE BETA HÜCRE FARKLILAŞMASI.....	4
2.2.1 İnsülin (INS)	6
2.2.2 NeuroD1	6
2.2.3 PDX1	7
2.2.4 SLC2A2 (GLUT2)	7
2.2.5 NEUROG3	7
2.2.6 PTF1A	7
2.2.7 NKX6.1.....	8
2.2.8 OCT4 ve NANOG.....	8
2.2.9 Vimentin	8
2.2.10 Nestin.....	8
2.3 BETA HÜCRELERİNDE FONKSİYON KAYBI	9
2.4 BETA HÜCRE GERİ FARKLILAŞMASI.....	10
2.4.1 Beta Hücre Geri Farklılaşmasında Glukotoksisite ve Lipotoksisitenin Rolü	12
2.4.2 Beta Hücre Geri Farklılaşmasında Endoplazmik Retikulum Stresinin Rolü.....	12
2.4.3 Beta Hücre Geri Farklılaşmasında Mitokondrinin Rolü.....	15
2.4.3.1 Mitokondriyal Füzyon	17
2.4.3.2 Mitokondriyal Fisyon.....	17
2.4.3.3 Mitofaji	18
2.5 Beta Hücre Geri Farklılaşmasında İnflamasyonun Rolü.....	21

3. MALZEME VE YÖNTEM.....	23
3.1 HÜCRE KÜLTÜRÜ UYGULAMALARI.....	23
3.2 HÜCRE CANLILIK TESTİ.....	24
3.3 GERÇEK ZAMANLI GERİ ÇEVİRİM POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (QRT-PCR).....	25
3.3.1 RNA İzolasyonu.....	25
3.3.2 cDNA Eldesi	26
3.3.3 qPCR ile Gen Ekspresyon Analizi	26
3.4 AKIM SİTOMETRİK ANALİZLER	28
3.4.1 İnsülin İşaretlemesi ile Geri Farklılaşan Hücre Popülasyonunun Belirlenmesi	28
3.4.2 Akım Sitometrik Hücre Ayrımı (FACS) Yöntemi ile İnsülin ⁺ Hücre Popülasyonu ve İnsülin ⁻ Hücre Popülasyonunun İzole Edilmesi.....	29
3.4.3 Annexin V/PI İşaretlemesi ile Apoptotik ve Nekrotik Hücre Ölüm Oranlarının Belirlenmesi	29
3.4.4 JC-1 İşaretlemesi ile Mitokondriyal Membran Potansiyelinin ($\Delta\Psi_m$) Belirlenmesi	30
3.5 SİMPLE WESTERN	30
3.5.1 Mitokondriyal Fraksiyon ve Sitoplazmik Fraksiyon İzolasyonu.....	30
3.5.2 Simple Western Yöntemi.....	31
3.6 MİTOKONDRIYAL KİTLENİN BELİRLENMESİ.....	33
3.6.1 Florimetrik Ölçüm.....	33
3.6.2 Floresan Mikroskopik Analiz.....	34
3.7 LC-MS/MS (SIVI KROMATOĞRAFİSİ-KÜTLE SPEKTROMETRESİ)	34
3.8 İSTATİKSEL ANALİZ	35
4. BULGULAR.....	36
4.1 HÜCRE CANLILIK TESTİ BULGULARI	36
4.2 BETA HÜCRE GERİ FARKLILAŞMASI İLE İLGİLİ BULGULAR	37
4.2.1 24 Saatlik Deney Süresinin Sonunda <i>INS2</i> Gen Ekspresyonu Seviyeleri.....	37
4.2.2: Gen Ekspresyonu Düzeyinde Elde Edilen Bulgular	38
4.2.3 Protein Düzeyinde Elde Edilen Bulgular.....	41
4.3 BETA HÜCRE GERİ FARKLILAŞMASININ ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRESİ İLE İLİŞKİSİ	42
4.4 BETA HÜCRE GERİ FARKLILAŞMASININ MİTOKONDRIYAL FONKSİYON KAYBI İLE İLİŞKİSİ.....	44
4.4.1 Mitokondriyal Stres.....	44
4.4.2 Mitokondriyal Membran Potansiyeli ($\Delta\Psi_m$)	49

4.5 BETA HÜCRE GERİ FARKLILAŞMASININ MİTOKONDRIYAL FÜZYON İLE İLİŞKİSİ.....	51
4.6 BETA HÜCRE GERİ FARKLILAŞMASININ MİTOKONDRIYAL FİSYON İLE İLİŞKİSİ.....	52
4.7 BETA HÜCRE GERİ FARKLILAŞMASININ MİTOFAJİ İLE İLİŞKİSİ.....	54
4.8 MİTOKONDRIYAL KİTLEDEKİ DEĞİŞİM İLE İLGİLİ BULGULAR	56
4.9 BETA-HÜCRE ÖLÜMÜ BULGULARI.....	58
4.10 LC-MS/MS BULGULARI.....	60
4.10.1 PD Hastalarından Elde Edilen Serum Örneklerinde Tam Proteom Analizi	60
4.10.2 T2D Hastalarından Elde Edilen Serum Örneklerinde Tam Proteom Analizi	63
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	66
KAYNAKLAR.....	95
ÖZGEÇMİŞ	122

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 1.1: Tez çalışmasının hipotezi.....	2
Şekil 2.1: Pankreas gelişiminin farklı aşamalarında eksprese edilen transkripsiyonel regülatörler (Aigha ve Abdelalim, 2020'den alınmıştır ve literatürdeki bilgilere göre modifiye edilmiştir).....	6
Şekil 2.2: β -hücre kaybında rol alan uzun yıllardır kabul gören hücre ölümü ile ilgili ve yeni öne sürülen dediferensiyasyon ile ilgili hipotezler (Dor ve Glaser, 2013).	10
Şekil 2.3: Tip 2 Diyabet gelişiminde β -hücre popülasyonundaki değişim gösterilmiştir (Amo-Shiinoki ve diğ., 2021).	11
Şekil 2.4: (A) Katlanmamış protein birikimine cevaben gelişen UPR ve (B) uzun süreli veya şiddetli ER stresi altındaki hücrelerde UPR yolları şematize edilmiştir (Pereira, 2013).	14
Şekil 2.5: Mitokondriyal fisyon ve füzyonda görev alan moleküllerin etkileşimini gösteren şema (van der Blik ve diğ., 2013'ten uyarlanmıştır)..	16
Şekil 2.6: Mitokondriyal fisyon, füzyon ve mitofaji ilişkisi ve bu süreçlerde rol alan moleküller gösterilmiştir (Literatürdeki bilgiler özetlenerek oluşturulmuştur.).....	19
Şekil 2.7: Kök hücre ve farklılaşmış hücre arasındaki mitokondriyal fonksiyon ve morfoloji farkları şematize edilmiştir (Fu ve diğ., 2019).	20
Şekil 3.1: İki popülasyonun ayrımında kullanılan plotlar ve kapılar verilmiştir. P2: İnsülin ⁺ hücre popülasyonu kapısı, P3: İnsülin ⁻ hücre popülasyonu kapısı.....	29
Şekil 3.2: Mitokondriyal fraksiyonun izolasyonu için kullanılan kitinin aşamaları.	31
Şekil 3.3: Simple Western kuyuların hazırlanışı.....	33
Şekil 4.1: (A) 24 saat süre ile %5 ve %10 serum örneği uygulamasının INS1E hücrelerinin canlılığı üzerine etkileri, (B) 24 saat süre ile %5 BSA'lı medyum ve %1-%5 konsantrasyonda uygulanan serum örneklerinin INS1E hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkileri *** $p<0,001$ FM'ye göre, # $p<0,05$ ve ### $p<0,001$ %5 BSA'ya göre. FM: Tam medyum, SS: Sağlıklı insanlardan elde edilen serum örneği. (C) 48 saat uygulanan deney şartlarının INS1E hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkileri. *** $p<0,001$ FM'ye göre, # $p<0,05$ ve ### $p<0,001$ %5 BSA'ya göre, *** $p<0,001$ SS'e göre. FM: Tam medyum, SS: Sağlıklı insanlardan elde edilen serum örneği.	37

Şekil 4.2.1: 24. saatte <i>INS2</i> gen ekspresyon seviyelerine ait grafik verilmiştir.	38
Şekil 4.2.2: β -hücre geri farklılaşmasının gen ekspresyon düzeyinde belirlenmesi. (A) Olgun β -hücre genlerinin ekspresyon seviyelerindeki değişikliği gösteren grafik, (B) Pre-endokrin hücre gen ekspresyon seviyelerindeki değişikliği gösteren grafik, (C) Pankreatik multipotent hücre genlerinin ekspresyon seviyelerindeki değişikliği gösteren grafik, (D) Kök hücre genlerinin ekspresyon seviyelerindeki değişikliği gösteren grafik verilmiştir. * $p<0,05$, ** $p<0,01$ ve *** $p<0,001$ SS kontrol grubuna göre.....	40
Şekil 4.2.3: (A) Simple Western yöntemiyle belirlenen insülin protein seviyeleri, insülin bantları ve bu bantların yoğunluklarını gösteren grafik verilmiştir. (B) Akım sitometrik insülin fluoresans yoğunluğunu (%) gösteren histogram plot ve analiz sonuçlarını yansıtan grafik verilmiştir. * $p<0,05$ ve *** $p<0,001$ SS kontrol grubuna göre.....	42
Şekil 4.3: İnsülin ⁺ ve insülin ⁻ hücre popülasyonlarında GRP78 (A) ve CHOP (B) protein seviyelerini gösteren bantlar ve bu bantların yoğunluklarını gösteren grafikler verilmiştir. * $p<0,05$, ** $p<0,01$ insülin ⁺ SS'ye göre. ### $p<0,001$ insülin ⁻ SS'ye göre. + $p<0,05$, +++ $p<0,05$ insülin ⁺ hücre popülasyonuna göre.....	44
Şekil 4.4.1: (A) İnsülin ⁺ ve insülin ⁻ hücre popülasyonlarında HSP60 protein bantları ve bu bantların yoğunluklarını gösteren, (B) Serum örneklerinde HSP60 protein bantları ve bu bantların yoğunluklarını gösteren grafik verilmiştir. *** $p<0,001$ insülin ⁺ SS'ye göre. ### $p<0,001$ insülin ⁻ SS'ye göre. + $p<0,05$, +++ $p<0,001$ insülin ⁺ hücre popülasyonuna göre, *** $p<0,001$ SS'e göre..	46
Şekil 4.4.1: (C) İnsülin ⁺ ve insülin ⁻ hücre popülasyonlarında UCP2 protein bantları ve bu bantların yoğunluklarını gösteren grafik verilmiştir. * $p<0,05$, *** $p<0,001$ insülin ⁺ SS'ye göre. # $p<0,05$, ## $p<0,001$ insülin ⁻ SS'ye göre. ++ $p<0,01$, +++ $p<0,001$ insülin ⁺ hücre popülasyonuna göre... ..	47
Şekil 4.4.1: (D) Hücrelerin WST-1 indirgenme seviyelerini gösteren grafik solda, protein seviyelerini gösteren grafik sağda verilmiştir. ** $p<0,01$ ve *** $p<0,001$ SS grubuna göre..	48
Şekil 4.4.1: (E) Serum örneklerinde IL1 β protein bantlarını ve bu bantların yoğunluklarını gösteren grafik verilmiştir. *** $p<0,001$ SS'e göre.	48
Şekil 4.4.2: (A) İnsülin ⁺ ve insülin ⁻ hücre popülasyonlarının mitokondriyal membran potansiyeli ($\Delta\Psi_m$) plotları ve FL2/FL1 oranlarını gösteren grafikler, (B) Hücrelerin DCFDA ⁺ seviyelerini gösteren grafik verilmiştir. * $p<0,05$ ve ** $p<0,01$ SS'ye göre. +++ $p<0,001$ insülin ⁺ hücre popülasyonuna göre..	50
Şekil 4.5: İnsülin ⁺ ve insülin ⁻ hücre popülasyonlarında Mfn2 (A) ve OPA1 (B) protein seviyelerini gösteren bantlar ve bu bantların yoğunluklarını gösteren grafikler verilmiştir. ** $p<0,01$ ve *** $p<0,001$ insülin ⁺ SS'ye göre. # $p<0,05$, ## $p<0,01$, ### $p<0,001$ insülin ⁻ SS'ye göre. + $p<0,05$, +++ $p<0,001$ insülin ⁺ hücre popülasyonuna göre.....	52

Şekil 4.6: İnsülin ⁺ ve insülin ⁻ hücre popülasyonlarında DRP1 (A) ve Fis1 (B) protein seviyelerini gösteren bantlar ve bu bantların yoğunluklarını gösteren grafikler verilmiştir. ***p<0,001 insülin ⁺ SS'ye göre. #p<0,05 insülin ⁻ SS'ye göre. +++p<0,001 insülin ⁺ hücre popülasyonuna göre.	54
Şekil 4.7: İnsülin ⁺ ve insülin ⁻ hücre popülasyonlarında Pink1 (A) ve Parkin (B) protein seviyelerini gösteren bantlar ve bu bantların yoğunluklarını gösteren grafikler verilmiştir. **p<0,01, ***p<0,001 insülin ⁺ SS'ye göre. #p<0,05, ###p<0,001 insülin ⁻ SS'ye göre. +p<0,05, ++p<0,01, +++p<0,001 insülin ⁺ hücre popülasyonuna göre.	56
Şekil 4.8: (A) Mitokondriyal kitledeki değişimi gösteren grafik (floresan yoğunluk), (B) Mitokondri yapılarının floresan mikroskoptaki görüntüleri (X40) verilmiştir.....	57
Şekil 4.9: (A) İnsülin ⁺ ve insülin ⁻ hücre popülasyonlarında aktif kaspaz-3 protein seviyelerini gösteren bantlar ve bu bantların yoğunluklarını gösteren grafik, (B) Annexin/PI işaretlemesi sonrası apoptotik (Annexin V ⁺ /PI ⁺) hücre yüzdeleri (solda) ile nekrotik (PI ⁺) hücre yüzdeleri (sağda) ve bu sonuçlara ait plotlar verilmiştir. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 insülin ⁺ SS'ye göre. #p<0,05 insülin ⁻ SS'ye göre. +++p<0,001 insülin ⁺ hücre popülasyonuna göre. B şekli için *p<0,05, **p<0,01 PD'ye göre, #p<0,05 T2D'ye göre.....	59
Şekil 4.10.1: (A) Tanımlanan proteinlerin volkan grafiği, (B) Isı haritası grafiği, (C) String sonuçlarına göre proteinlerin birbirleri ile etkileşimlerini gösteren şekil, (D) Analize alınan proteinlerin ana moleküler yolağını gösteren grafik, (E) Analize alınan proteinlerin diğer moleküllerle etkileşimini gösteren moleküler yolak verilmiştir.	62
Şekil 4.10.2: (A) Tanımlanan proteinlerin volkan grafiği, (B) Isı haritası grafiği, (C) String sonuçlarına göre proteinlerin birbirleri ile etkileşimlerini gösteren şekil, (D) Analize alınan proteinlerin ana moleküler yolağını gösteren grafik, (E) Analize alınan proteinlerin diğer moleküllerle etkileşimini gösteren moleküler yolak verilmiştir.	65
Şekil 5.1: (A) PD grubunun sonuçları, (B) T2D grubunun sonuçları, (C) IL1β grubunun sonuçları verilmiştir.	93

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 3.1: INS1E hücrelerine uygulanan serum örneklerinin HbA1c değerleri ile donörlerin cinsiyet, yaş, boy, kilo ve vücut kütle endeksi bilgileri. Ortalama değerler verilmiştir (n=3).	24
Tablo 3.2: cDNA çevrimi için uygulanan basamaklar.....	26
Tablo 3.3: qRT-PCR çalışmaları için kullanılan primer dizileri.	27
Tablo 3.4: qRT-PCR basamakları.....	28
Tablo 3.5: Simple Western yöntemi için kullanılan antikorlar ve sulandırma oranları.....	32
Tablo 4.1: LC-MS/MS ile tanımlanan proteinlerin güven oranı (%), p-değeri, katlı artış ve peptid sayıları verilmiştir. Analize alınan proteinler kalın yazı ile belirtilmiştir.	60
Tablo 4.2: LC-MS/MS ile tanımlanan proteinlerin güven oranı (%), p-değeri, katlı artış ve peptid sayıları verilmiştir. Analize alınan proteinler kalın yazıyla belirtilmiştir.	63

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
%	: Yüzde
AU	: Arbitrary Unit
dL	: Desilitre
mg	:Miligram
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
ng	: Nanogram
°C	: Santigrat Derece
α	: Alfa
β	: Beta
Δ	: Delta
$\Delta\Psi_m$	: Mitokondriyal Membran Potansiyeli
ε	: Epsilon
μL	: Mikrolitre

Kısaltmalar	Açıklama
ATF6	: Aktive Edici Transkripsiyon Faktörü 6
ATP	:Adenozin Trifosfat
BSA	: Sığır Serum Albumin
CHOP	: C/EBP Homolog Protein
DCFDA	: Diklorofloresin Diasetat
DMSO	: Dimetilsülfoksid
DRP1	: Dinamin İlişkili Protein 1
E	: Embriyonik gün
ELISA	: Enzim Bağlı İmmünosorbent Tekniği
ER	: Endoplazmik Retikulum
ERAD	: Endoplazmik Retikulum Homeostazı ile İlişkili Protein Bozulması
FBS	: Fetal Sığır Serumumu
FITC	: Floresans İzotiosiyanat
Fis1	: Fisyon 1 Proteini

FM	: Tam Medyum
Glut	: Glikoz Taşıyıcısı
HRP	: Yaban Turbu Peroksidazı
HSP60	: Isı Şok Proteini 60
IL1β	: İnterlökin 1 β
IMM	: Mitokondri İç Membranı
Ins	: İnsülin geni
IRE1/XBP	: İnositol-Gerektiren 1/X-box Bağlanma Proteini 1
LDH	: Laktat Dehidrogenaz
MafA	: Musculo Fibrosarkoma Onkogen Ailesi Protein A, B
Mfn2	: Mitofusin 2
MMP	: Mitokondriyal Membran Potansiyeli
mRNA	: Haberci RNA
NeuroD	: Nöral Farklılaşma 1
NEUROG3	: Nörogenin 3
Nkx	: NK homeobox
OCT4	: Oktomer Transkripsiyon Faktörü 4
OMM	: Mitokondri Dış Membranı
OPA1	:Optik Atrofi 1
OXPHOS	: Oksidatif Fosforilasyon
Pax	: Paired Box
PD	: Pre-Diyabet
PDX1	: Pankreas-Duodenum Transkripsiyon
PE	: Fikoeritrin
PERK	: Protein Kinaz-RNA Benzeri ER Kinaz
Pink1	: PTEN ile Uyarılan Kinaz 1
PTF1A	: Pankreasla İlişkili Transkripsiyon Faktörü 1A
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
SS	: Sağlıklı İnsan Serumı
T2D	: Tip 2 Diyabet
UPR^{ER}	: Katlanmamış Protein Cevabı
UPR^{mt}	: Mitokondriyal Katlanmamış Protein Cevabı

ÖZET

DOKTORA TEZİ

TİP 2 DİYABET GELİŞİMİNDE PANKREATİK BETA-HÜCRE FONKSİYON KAYBININ ARAŞTIRILMASI

Merve ERÇİN

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Selda OKTAYOĞLU

Tip 2 diyabet (T2D)'in erken evresi olarak bilinen pre-diyabet (PD), esas olarak hiperinsülinemiye neden olan pankreatik β -hücre kitlesindeki artışla ilişkili olarak insülin direncinin ortaya çıkması ile karakterize edilen metabolik bir bozukluktur. Genel yaklaşıma göre, hastalık sürecinin ilerleyen aşamalarında pankreatik β -hücreleri apoptoz ile ölürlere ve β -hücre kitlesindeki bu kayıp hipoinsülinemi gelişmesine neden olur. Son yıllarda birikmekte olan kanıtlar T2D gelişimi esnasında β -hücre kitlesinin azalmasında β -hücrelerinin geri farklılaşarak, diğer bir ifadeyle dediferensiyasyon olarak, fonksiyonlarını kaybetmesinin önemli bir etken olduğu görüşünü ortaya çıkarmıştır. Ancak, dediferensiyasyonun gerçekleşmesinden sorumlu olan moleküler mekanizmalar tam olarak aydınlatılamamıştır. Mevcut doktora tez çalışmamızda β -hücre karakterinin ve fonksiyonunun kaybında rol alan dediferensiyasyon mekanizmalarının endoplazmik retikulum (ER) stresi, mitokondri stresi ve mitokondri dinamikleri ile ilgili moleküllere odaklanarak aydınlatılmasına katkı verilmesi amaçlanmıştır.

Çalışmamızda, sıçan INS1E β -hücrelerine sağlıklı, PD ve T2D hastalarından elde edilen serum örnekleri ve geri farklılaşmanın pozitif kontrolü olarak IL1 β uygulandı. Bu uygulamaları takiben hücreler üzerinde toksik etki yapmayan serum konsantrasyonları ve uygulama süresi MTT canlılık testi ile belirlendi. Hücrelere uygulanan serum örneklerinin dediferensiyasyona sebep olup olmadığı β -hücre fonksiyonu ve tanımlanmasında önemli olan transkripsiyon faktörleri ile kök hücre ve progenitör hücre belirteci olan transkripsiyon faktörlerinin gen ekspresyon seviyelerinin qRT-PCR yöntemi ile ölçülmesi yoluyla araştırıldı. Ayrıca, β -hücre

belirteci olgun insülin üreten hücre popülasyonu ve insülin üretmeyen progenitör hücre popülasyonu akım sitometri yöntemi ile belirlendikten sonra bu iki popülasyon akım sitometrik hücre ayrımı yöntemi ile izole edildi. β -hücre dediferensiyasyonun moleküler mekanizmasında ER-mitokondriyal eksenin rolünün araştırılabilmesi için insülin pozitif ve insülin negatif hücre popülasyonlarında CHOP, GRP78, HSP60, OPA1, DRP1, Fis1, PINK1 ve PARKIN proteinlerinin seviyelerindeki değişimler Simple Western tekniği ile gösterildi. Mitokondriyal membran potansiyeli JC1 boyası kullanılarak akım sitometri ile ölçüldü. Ayrıca, hücrelerde apoptotik ölümün belirlenebilmesi için aktif kaspaz-3 seviyelerindeki değişimler Simple Western tekniği ile belirlendikten sonra AnnexinV/PI işaretlemesini takiben akım sitometri ile apoptotik ve nekrotik hücre popülasyonları belirlendi. Son olarak, PD ve T2D hastalarının serum örneklerinde bulunan β -hücre geri farklılaşmasını veya fonksiyon kaybını veya ölümünü uyartabilecek proteinlerin belirlenebilmesi için LC-MS/MS analizi yapıldı.

Sonuç olarak, PD hastalarından elde edilen serum örneklerinde yüksek seviyede bulunan α 1-asit glikoprotein ve komplement C3 proteini aracılığıyla uyarıldığını düşündüğümüz geri farklılaşma mekanizmasında etkin olmayan ER katlanmamış protein cevabı (UPR^{ER})'nın rol oynayabileceğini, geri farklılaşan hücrelerde UPR^{ER} 'nin etkin olduğunu ve mitokondrilerdeki OPA1 aracılı iç zar füzyonunun kök hücre karakterinin kazanılması ve devam ettirilmesinde önemli olduğunu düşünüyoruz. Aynı gruptaki geri farklılaşmayan β -hücrelerinde ise OPA1 kaybına bağlı olarak mitokondriyal zar geçirgenliğinin artması ve apoptotik moleküllerin sitoplazmaya geçerek kaspaz-3'ü aktive etmesi yoluyla düşük oranda da olsa apoptozun gerçekleştiğini düşünüyoruz. T2D hastalarından elde edilen serum örneklerinde yüksek seviyede bulunan Vitronektin proteini aracılığıyla uyarıldığını düşündüğümüz β -hücre fonksiyon kaybının en önemli göstergesi olan insülin üretmemenin yüksek UPR^{ER} ile ilişkili olabileceğini, insülin üretmeyen hücrelerde GRP78 aracılığıyla ER-mitokondri bağlantısının kurulması yoluyla iki organel arasında sinyal moleküllerinin geçişi sonucunda mitokondriyal füzyonun artması ve kaspaz-3 aracılığıyla apoptozun gerçekleştiğini düşünüyoruz. Aynı gruptaki insülin⁺ β -hücrelerinde ise hem OPA1 aracılı iç zar füzyonunun artması hem de mitofajinin gerçekleşmesi yoluyla mitokondrilerin fonksiyonunu yitirdiği ve bu yolla hücrelerin nekroptoz benzeri bir yol ile ölüme gidebileceğini düşünüyoruz. IL1 β uygulanan β -hücrelerinde dikkat çeken nokta insülin proteini üretmeyen bir popülasyonun mevcut olmasına karşın bu grupta *INS2* gen ekspresyonunun artmış olması dolayısıyla ne tam bir geri farklılaşma ne de tam bir fonksiyon kaybının gerçekleşmemiş olduğunun belirlenmesidir. İnsülin⁺ β -hücrelerinde yüksek UPR^{ER} ile ilişkili olabileceğini düşündüğümüz mitokondriyal hasarın ön planda olduğu görülmektedir. ER-mitokondri bağlantısının kurulması yoluyla iki organel arasında sinyal moleküllerinin geçişi sonucunda gelişebilecek olan mitokondriyal strese bağlı mitokondriyal füzyon ve OPA1 kaybına bağlı olarak mitokondriyal zar geçirgenliğinin artması ve apoptotik moleküllerin sitoplazmaya geçerek kaspaz-3'ü aktive etmesi yoluyla apoptozun gerçekleştiğini düşünüyoruz. IL1 β uygulanan hücreler arasında yer alan insülin üretmeyen hücrelerde ER stresinin ön planda olduğu, OPA1 kaybindan dolayı mitokondriyal zar geçirgenliğinin artması ve apoptotik moleküllerin sitoplazmaya geçerek kaspaz-3'ü aktive etmesi yoluyla apoptozun meydana geldiğini düşünüyoruz.

T2D gelişimi birbirini izleyen çok sayıda basamakta meydana gelmektedir. Bu basamaklar arasında klinik olarak tanımlanabilen iki basamağın PD ve T2D olduğu söylenebilir. Dediferensiyasyonun hangi basamakta ve nasıl meydana geldiği bilinmemektedir. Mevcut çalışmada ilk defa sıçan β -hücre hattı INS1E hücrelerine sağlıklı, PD ve T2D hastalarından elde edilen serum örnekleri uygulanarak hastalığın bu iki evresinde seruma salınan sinyal moleküllerinin yönlendirici etkisiyle dediferensiyasyonun meydana gelip gelmediği ve ilişkili

moleküler mekanizmalar araştırılmıştır. Ayrıca, mitokondriyal homeostazı sağlayan fisyon, füzyon ve mitofaji mekanizmalarının β -hücre dediferensiyasyonu sürecindeki rolü ilk kez gösterilmiştir. Mevcut çalışma bu süreçte rol alan anahtar moleküllerin hedeflenmesi yoluyla yeni T2D tedavi stratejilerinin geliştirilebilmesi için yapılmış olan öncül bir araştırma niteliğindedir.

Ağustos 2023, 143 sayfa.

Anahtar kelimeler: Beta hücreleri, dediferensiyasyon, endoplazmik retikulum stresi, mitokondriyal stres, mitokondriyal fisyon, mitokondriyal füzyon, mitofaji, pre-diyabet, Tip 2 diyabet.



SUMMARY

Ph.D. THESIS

THE INVESTIGATION OF PANCREATIC BETA-CELL DYSFUNCTION IN TYPE 2 DIABETES DEVELOPMENT

Merve ERÇİN

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

Department of Biology

Supervisor : Prof. Dr. Selda OKTAYOĞLU

Pre-diabetes (PD), which is known as the early stage of type 2 diabetes (T2D), is a metabolic disorder characterized by the onset of insulin resistance, primarily resulting in hyperinsulinemia due to an increase in pancreatic β -cell mass. According to the general approach, as the disease progresses, pancreatic β -cells undergo apoptosis, leading to a loss of β -cell mass and the development of hypoinsulinemia. Recent evidence suggests that dedifferentiation of β -cells, or in other words, the loss of their function, plays a significant role in the reduction of β -cell mass during the development of T2D. However, the molecular mechanisms responsible for dedifferentiation have not been fully elucidated. The aim of our current doctoral thesis is to contribute to the understanding of the dedifferentiation mechanisms involved in the loss of β -cell characteristics and function by focusing on molecules related to ER stress, mitochondrial stress, and mitochondrial dynamics.

In our study, serum samples obtained from healthy individuals, PD patients, and T2D patients and IL1 β as a positive control of dedifferentiation were applied to rat INS1E β -cells. The serum concentrations and application durations that did not exert toxic effects on the cells were determined by MTT viability assay. The potential of the applied serum samples to induce dedifferentiation in β -cells and their impact on the gene expression levels of transcription factors important for β -cell function and characterization, as well as transcription factors indicative of stem cells and progenitor cells, were demonstrated through qRT-PCR.

Additionally, after the β cell marker mature insulin-producing cell population and the non-insulin-producing progenitor cell population were determined by flow cytometry, these two populations were isolated by flow cytometric cell sorting method. Changes in the levels of proteins such as CHOP, GRP78, HSP60, OPA1, DRP1, Fis1, PINK1, and PARKIN, which may play a role in the molecular mechanism of β -cell dedifferentiation in the ER-mitochondrial axis, were shown using the Simple Western technique. Mitochondrial membrane potential was measured by flow cytometry using JC1. Additionally, in order to determine apoptotic death in cells, changes in active caspase-3 levels were determined by Simple Western technique, and apoptotic and necrotic cell populations were measured by flow cytometry following AnnexinV/PI labeling. Lastly, LC-MS/MS analysis was performed to identify proteins present in serum samples from PD and T2D patients that could stimulate β -cell dedifferentiation, functional loss, or death.

As a result, we believe that the ineffective unfolded protein response of the endoplasmic reticulum (UPRER) may play a role in the dedifferentiation mechanism induced through α 1-acid glycoprotein and complement C3 proteins, found at high levels in serum samples from pre-diabetic patients. We also suggest that UPRER is active in dedifferentiated cells, and OPA1-mediated inner mitochondrial membrane fusion is essential for acquiring and maintaining stem cell characteristics. In the same group of dedifferentiated β -cells, we believe that there is a low level of apoptosis due to increased mitochondrial permeability caused by OPA1 loss, leading to some extent of apoptosis through the activation of caspase-3. Regarding serum samples from type 2 diabetic patients with high levels of Vitronectin protein, we propose that the most crucial indicator of β -cell function loss, the inability to produce insulin, may be associated with high UPRER. In insulin-non-producing cells, we suggest that the ER-mitochondrial interaction is established through GRP78, leading to increased mitochondrial fusion and apoptosis via the transfer of signaling molecules between the two organelles and activation of caspase-3. In insulin-producing β -cells from the same group, we propose that both increased OPA1-mediated inner mitochondrial fusion and mitophagy occur, resulting in the loss of mitochondrial function and potentially leading the cells towards a form of cell death similar to necroptosis. A noteworthy observation in IL1 β -treated β -cells is the existence of a population of cells that cannot produce insulin, yet INS2 gene expression is increased in this group, indicating that neither complete dedifferentiation nor complete loss of function has occurred. In insulin-producing β -cells, which are believed to be associated with high UPRER, mitochondrial damage appears to be prominent. We propose that ER-mitochondrial interaction leads to mitochondrial stress, causing mitochondrial fission due to a transfer of signaling molecules and OPA1 loss, resulting in increased mitochondrial permeability and activation of caspase-3-induced apoptosis. Among the IL1 β -treated cells, insulin-non-producing cells show a predominance of ER stress, OPA1 loss, and apoptosis through the activation of caspase-3 as the main mechanism of cell death.

It should be noted that the development of T2D occurs through a series of consecutive steps, with PD and T2D being the two clinically identifiable stages. The occurrence and mechanisms of dedifferentiation in these stages are not fully understood. The current study focuses on investigating the effect of signaling molecules released into the serum during these two stages on dedifferentiation and the associated molecular mechanisms using rat β -cell line INS1E. Additionally, the role of mitochondrial dynamics, including fission, fusion, and mitophagy mechanisms responsible for maintaining mitochondrial homeostasis, in the process of β -cell dedifferentiation has been demonstrated for the first time. This research serves as a preliminary

study aimed at developing new treatment strategies for T2D by targeting key molecules involved in this process.

August 2023, 143 pages.

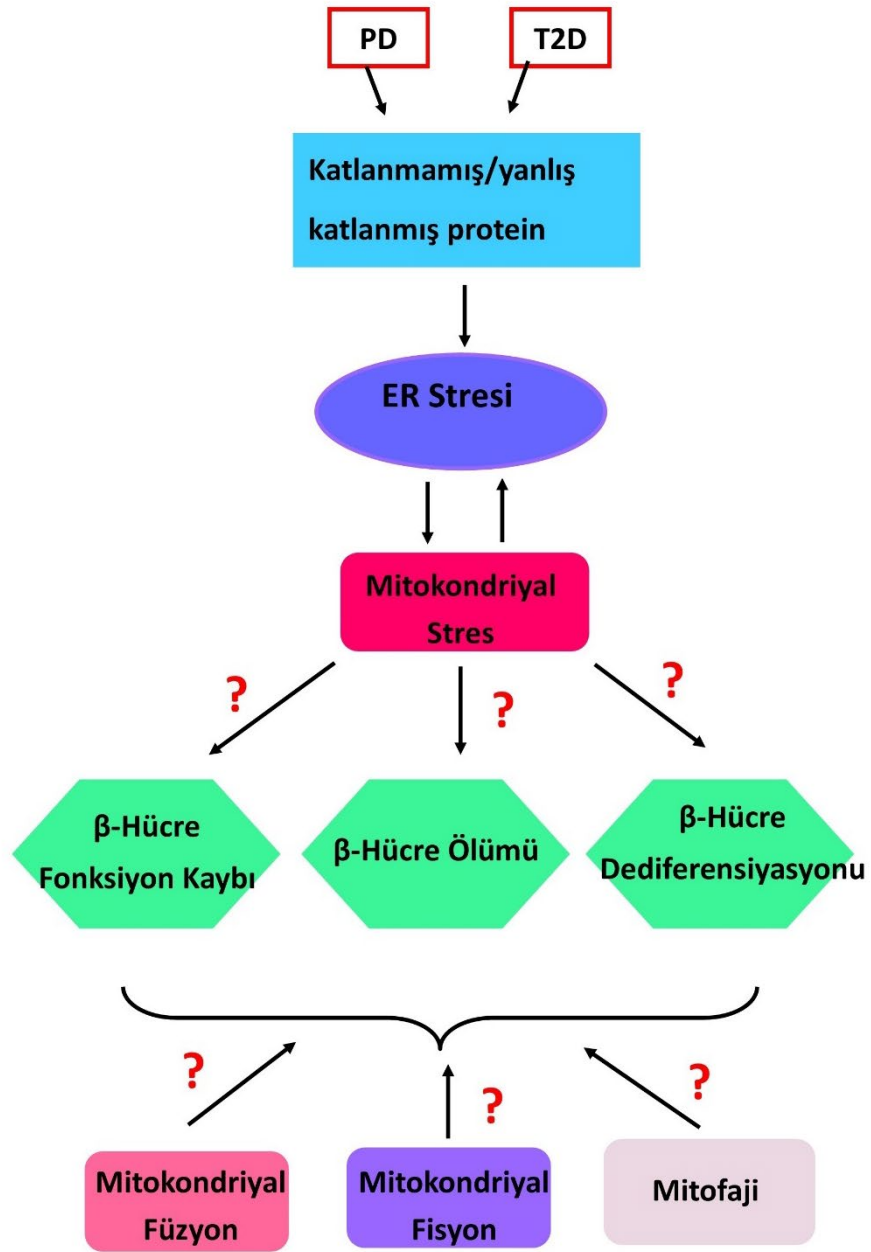
Keywords: Beta cells, dedifferentiation, endoplasmic reticulum stress, mitochondrial stress, mitochondrial fission, mitochondrial fusion, mitophagy, pre-diabetes, type 2 diabetes.



1. GİRİŞ

Diyabet, dünya çapında en sık rastlanan metabolik hastalıklardan biridir ve diyabetik bireylerin sayısı katlanarak artmaktadır. T2D gelişiminin birbirini izleyen ve β -hücre kitlesi, fenotipi ve fonksiyonunda meydana gelen önemli değişikliklerle karakterize edilen çok basamaklı bir süreçle geliştiği belirlenmiştir. T2D patogenezinin ileri aşamaları β -hücre yetmezliği ile doğrudan ilişkilidir. Ancak bu durumun azalmış β -hücre sayısından veya insülin üretimi fonksiyonunun kaybından mı kaynaklandığı belirsizliğini korumaktadır. Olgun β -hücre kimliğinin ve fonksiyonunun kaybı olarak tanımlanan pankreatik β -hücre geri farklılaşması, diyabet hastalığında önemli bir araştırma konusu olarak ortaya çıkmıştır. β -hücresine özgü genlerin ekspresyonunun baskılanması ve değişen hücresel morfoloji ile karakterize edilen bu süreç, glikoz homeostazının ve insülin üretiminin korunmasında zorluklara neden olmaktadır. β -hücre geri farklılaşmasının altında yatan mekanizmaları anlamak, diyabetik koşullarda β -hücre sağ kalımı ve fonksiyonunu geliştirmeye yönelik yeni terapötik stratejiler geliştirmek için çok önemlidir. Ayrıca geri farklılaşmanın diyabet gelişiminin hangi basamağında meydana geldiğinin belirlenmesi ile diyabetin ilerlemesinin önüne geçilebilir. Alternatif olarak, olgunlaşmamış β -hücrelerinin proliferasyonunu tetiklemek ve ardından β -hücre kimliğini geri kazanmak için bir olgunlaşma aşaması terapötik bir seçenek olabilir.

Bu doktora tez çalışmasının hedefi sıçan pankreatik β -hücre hattı INS1E hücrelerine sağlıklı, PD'li ve T2D'li bireylerden elde edilen serum örneklerinin uygulanması ile T2D gelişim evrelerinde görülen β -hücre kaybının asıl nedeninin β -hücrelerinin geri farklılaşması veya fonksiyon kaybı veya ölümü olduğunun belirlenmesinden sonra bu süreçte rol alabileceğini öngördüğümüz ER stresi ve mitokondriyal stres ilişkisinin etkisi ile mitokondriyal fisyon, füzyon ve mitofajinin rolünün gösterilmesidir. Ayrıca, dediferensiyasyonu uyaran serum örneği ve kontrol serum örneğinde yapılan LC-MS/MS analiziyle diyabet gelişimini uyaran yeni moleküllerin tespit edilmesi hedeflenmiştir. Böylece geri farklılaşmanın T2D gelişiminin hangi basamağında gerçekleştiği belirlenerek bu mekanizmada rol alan moleküllerin keşfedilmesi ile geliştirilecek olan yeni teröpatik yaklaşımlar vasıtasıyla T2D gelişiminin önüne geçilmesi amaçlanmaktadır. Tez çalışmasının hipotezi **Şekil 1.1:**'de şematize edilmiştir.



Şekil 1.1: Tez çalışmasının hipotezi.

2. GENEL KISIMLAR

2.1 DİYABET

Diyabet, insülin eksikliği veya etkisindeki yetersizlikten kaynaklanan bozulmuş glikoz metabolizması ile karakterize kronik bir hastalıktır. Diyabetin görülme ve ilerleme oranları küresel olarak keskin bir şekilde artmaktadır. Pek çok farklı diyabet türü olmakla birlikte, iki ana diyabet tipi, tip 1 diyabet (T1D) ve tip 2 diyabet (T2D)'tir. T1D, endokrin pankreastaki Langerhans adacıklarında bulunan insülin üreten β -hücrelerinin seçici otoimmün yıkımı ile karakterize edilirken, daha yaygın tip olan T2D, periferik dokulardaki insülin direnci ve β -hücre fonksiyon kaybından kaynaklanır (Eizirik ve diğ., 2020; PrayGod ve diğ., 2021). Uluslararası Diyabet Federasyonu'nun 2021 istatistiklerine göre, dünya çapında diyabetli yetişkin nüfus tahmini 537 milyondur ve bu sayının önümüzdeki 25 yılda artarak 2045 yılına kadar yaklaşık 783 milyon kişiye ulaşacağı tahmin edilmektedir (IDF Diyabet Atlası 10. baskı www.diabetesatlas.org).

Diyabet vakalarının büyük çoğunluğunu oluşturan T2D, dünyadaki en büyük sağlık sorunlarından biridir (Zimmet, 2017). Ancak, hastalığın patogenezi muamma olmaya devam etmektedir. 1960'lardaki öncü çalışma, T2D'nin, β -hücrelerinin glikoza yanıt olarak uygun miktarlarda insülin salamadığında geliştiğini göstermiştir (Bagdade ve diğ., 1967). Daha sonraki bulgular, T2D'yi, insülin direnci ve pankreatik β -hücre fonksiyonunun ilerleyici kaybı veya her ikisi ile karakterize edilen bir metabolik sendrom olarak tanımlamaktadır (Elsayed ve diğ., 2021). Şu anda, bozulmuş insülin sekresyonu, T2D'de ana suçlu patojenik faktör olarak ortaya çıkmakta ve buna bağlı olarak T2D'nin tedavisi ve yönetimine ilişkin araştırma yaklaşımları geliştirilmektedir (Ashcroft ve Rorsman, 2012).

Diyabet gelişiminin birbirini izleyen 5 basamakta meydana geldiği belirlenmiştir. Her bir basamak β -hücre kitlesi, fenotipi ve fonksiyonunda meydana gelen önemli değişikliklerle karakterize edilir. İlk aşama kompenzasyon olarak adlandırılan basamaktır. Bu aşamada normal glikoz seviyelerinin korunabilmesi için insülin sekresyonu β -hücre kitlesinin artmasına bağlı olarak artar ve bu insülin direncinin bir göstergesidir (Butler ve diğ., 2003). İkinci aşama adaptasyondur ve açlık glikoz seviyeleri 5-6,5 mmol/L (89-116 mg/dL) değerlerine yükselir ki bu kararlı bir β -hücre adaptasyonunun göstergesidir. Bu evrede β -hücre kitlesi sınırdadır. Üçüncü aşama değişkenlik gösteren erken dekompenzasyondur ve kararlı olan 2. aşamanın

bitmesi ile kan glikoz seviyelerinde bir artış görülür. Bu aşamadan sonra 4. basamakta yükselmiş olan glikoz seviyeleri daha karardır (dekompenzasyon) ve β -hücre kitlesinde bir azalma başlamıştır. Son aşama olan 5. basamak ise ileri derecede dekompenzasyon, β -hücre kitlesindeki sert düşüşten kaynaklı olarak β -hücre yetmezliği ve ketoz gelişimi ile karakterizedir (Weir ve Bonner-Weir, 2004). Diyabet gelişiminde ilk aşama olan kompenzasyon basamağında görülen β -hücre kitlesindeki artma ve diyabetin ilerleyen aşamalarında görülen β -hücre kitlesindeki azalmada rol alan mekanizmaların anlaşılabilmesi için embriyonik pankreas gelişimine benzer yollarla gerçekleşen β -hücre farklılaşması ve diğer hücresel dinamiklerin, bu süreçte rol alan hücresel ve moleküler mekanizmaların aydınlatılması gerekmektedir.

2.2 PANKREATİK GELİŞİM SÜRECİNDE BETA HÜCRE FARKLILAŞMASI

Pankreas hem sindirimde hem de metabolizmada rol alan retroperitoneal bir bezdir. Pankreatik doku büyük ölçüde ana ve yardımcı pankreatik kanalları oluşturmak için birleşen kanallar sistemine sindirim pro-enzimlerini salgılayan asinar hücrelerden oluşur. Ekzokrin sekresyonların çoğu, proteoliz ve lipoliz yoluyla sindirime yardımcı oldukları büyük duodenal papilla seviyesinde duodenumun ikinci kısmına salgılanır (Ehrhardt ve Gomez, 2022).

Pankreasın endokrin kısmını oluşturan Langerhans adacıkları yetişkin insanlarda dört ana endokrin hücre tipi olan α -hücreleri, β -hücreleri, δ -hücreleri ve γ -hücreleri veya pankreatik polipeptit hücrelerine ilaveten daha az sayıda bulunan beşinci hücre tipi, Epsilon (ϵ) veya Ghrelin hücrelerini içerir (Wierup ve diğ., 2002); bu hücreler sırasıyla insülin, glukagon, somatostatin, pankreatik polipeptid ve ghrelin olmak üzere farklı hormonlar salgılar. Farklı adacık hücre tipleri eksprese ettikleri hormonların yanı sıra, bu hücrelere özgü transkripsiyon faktörleri ile ayırt edilebilir (Dassaye ve diğ., 2016).

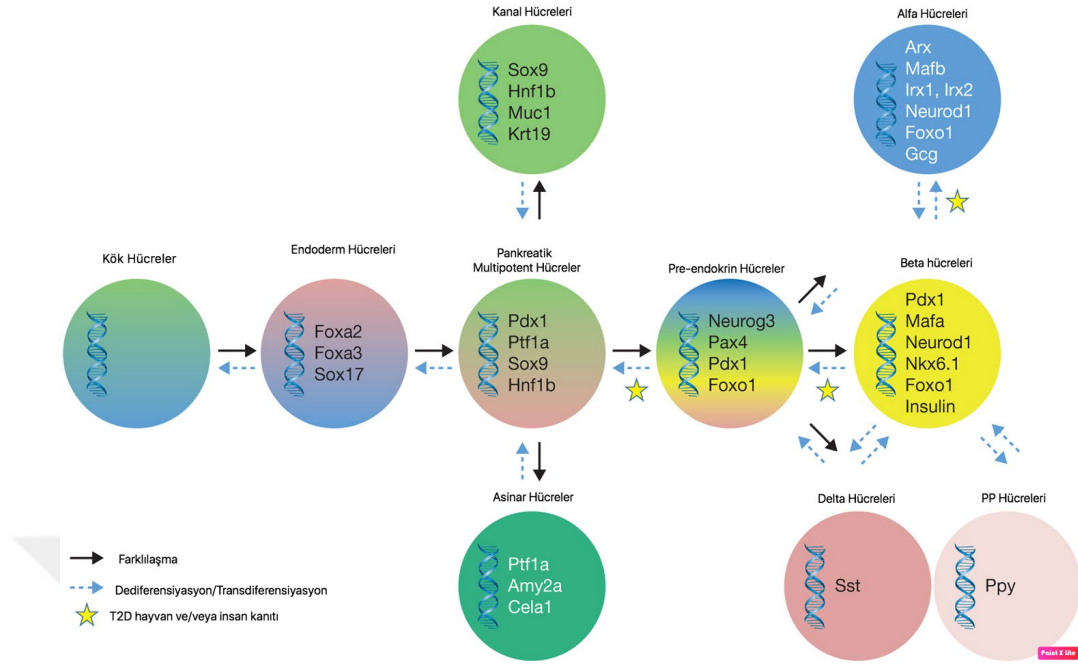
Pankreas gelişimi sürecinde β -hücre farklılaşması temel olarak 4 basamakta meydana gelir (Dominguez-Bendala, 2009); 1- Kesin endoderm/bağırsak epitelinin oluşumu, 2- Pankreatik farklılaşma, 3- Endokrin özgülleşme, 4- β -hücre farklılaşması. Embriyonik gelişimin gastrulasyon aşamasını takiben endoderm, mezoderm ve ektoderm olmak üzere üç germ tabakası oluşur. İlkel bağırsak endodermden gelişir ve aldığı sinyallere bağlı olarak karaciğer, pankreas ve bağırsağı oluşturur. Kesin endodermin ön parçasından kökenlenen ön bağırsak pankreas, karaciğer ve akciğeri oluşturur. Bağırsak endodermi ve onu çevreleyen mezoderm arasındaki etkileşim birincil olarak Sonic Hedgehog (Shh) sinyalizasyonu aracılığı ile olur. Shh

bağırsak epitelinde yüksek oranda üretilirken, *PTF1A/PDX1* regülasyonu baskılanır ve bu bölgede embriyonik gelişimin 8. gününde (E8) pankreas oluşur (Roberts ve diğ., 1995; 1998).

Pankreatik hücrelerin özgülleşmesi belirli transkripsiyon faktörleri tarafından yönlendirilir. *Foxa2* endoderm ve öncül bağırsak tübünün oluşumunda önemli rol oynar. Ayrıca *Foxa2*, posterior ön bağırsağın pankreatik endoderm hücrelerine dönüşümünde *NeuroD1* ve *Pax6* ile karakterize olan pankreatik endokrin progenitör hücrelerin oluşumundan sorumlu olan *neurogenin3* (*NEUROG3*) ekspresyonunu aktive eder. *NEUROG3*'ün ekspresyonu, ilk trimesterin sonunda doruğa ulaşır ve yaklaşık 35. Gebelik haftasında kaybolur. İnsan fetal pankreasının erken gelişim döneminde (E8-11) *NEUROG3* ve *PDX1*; *NEUROG3* ve *insülin*, *NEUROG3* ve *glukagon*'u birlikte eksprese eden hücreler gözlenmiştir (Lyttle ve diğ., 2008). Farelere kıyasla insanlardaki birçok endokrin hücre poli-hormonaldır ve mono-hormonal hücrelerin büyük çoğunluğu gelişimin sonraki basamaklarına kadar görülmez (Jennings ve diğ., 2015). Özellikle pankreatik endokrin hücrelerle bu aşamada ilişkili diğer transkripsiyonel regülatörler; *Pax6*, *Nkx2.2*, *NKX6.1* ve *Pax4*'tür (Jennings ve diğ., 2015). Ayrıca, yetişkin insan pankreasında β -hücre kimliğinin korunması *PDX1*, *FOXO1*, *MafA*, *NKX6.1* gibi önemli transkripsiyon faktörleri ile ilişkilidir (Talchai ve diğ., 2012). Endokrin progenitör hücrelerinden glukagon üreten α -hücrelerine veya β -hücrelerine giden iki ana yol arasındaki karar, transkripsiyon faktörleri *Arx* ve *Pax4* arasındaki denge ile belirlenir. Son olarak, insülin biyosentezi ve glikoz ile düzenlenen insülin salınımı ile ilgili moleküllerin ekspresyonu ile karakterize edilen olgun β -hücre fenotipini oluşturmak için transkripsiyon faktörü *MafA* gereklidir (Efrat, 2019) (**Şekil 2.1:**).

Erişkin dönemde β -hücrelerinin temel fonksiyonu olan insülin üretimi ve salınmasında meydana gelen bozuklukların ilerlemesi ile β -hücre kitlesinde azalma görülür. Bu azalmaya β -hücre dediferensiyasyonunun katkı verdiği bilinmektedir (Nordmann ve diğ., 2017).

β -hücre farklılaşmasında rol alan belirteç genler aşağıda açıklanmıştır.



Şekil 2.1: Pankreas gelişiminin farklı aşamalarında eksprese edilen transkripsiyonel regülatörler (Bensellam ve diğ., 2018).

2.2.1 İnsülin (INS)

β -hücreleri, memelilerde insülin sentezi yapabilen temel hücre tipidir. Glikoz, insülin sekresyonunu uyarır ve aynı zamanda esas olarak translasyonel kontrol yoluyla, proinsülin biyosentezini artırır (Boland ve diğ., 2018). İnsülin geni promotöründe A elementi, GG kutusu, C1, güçlendirici çekirdeği ve negatif düzenleyici elementin yer aldığı Z bölgesi gibi yanıt elementleri vardır. İnsülin geninin promotör bölgesi içindeki bu düzenleyici elemanlar, genin transkripsiyonunu ya artırır ya da baskılar. Pankreas-duodenal homeobox-1 protein 1 (*PDX1*), çift kutu protein 4 ve 6 (*Pax4*, *Pax6*) dahil olmak üzere birçok transkripsiyon faktörü bu bölgelere bağlanır (Fu ve diğ., 2013). İnsülin geni β -hücre kimliğini belirleyen temel gendir (Mostofa ve diğ., 2020).

2.2.2 NeuroD1

Pankreas gelişiminde *NeuroD1*, *PDX1* ile birlikte insülin transkripsiyonunu düzenler (Jung ve diğ., 2018; Miyachi ve diğ., 1999). *PDX1*, *NeuroD1* ile doğrudan etkileşime girer ve insülin promotörü üzerinde bir transkripsiyonel aktivasyon kompleksi oluşturur (Glick ve diğ., 2000).

2.2.3 PDX1

Bilinen bir insülin promotör faktörü olan *PDX1*, pankreatik gelişim ve adacık soyu farklılaşmasının erken aşamalarında yaygın olarak ifade edilir (Zhu ve diğ., 2017). *PDX1*, *NEUROG3*, *Pax4*, *NeuroD1* ve *NKX6.1* gibi diğer transkripsiyon faktörleri, pankreatik β -hücre gelişimine katılır (Kaneto ve Matsuoka, 2015). β -hücrelerinde glukotoksisite kaynaklı metabolik stres, transkripsiyon faktörleri *PDX1*, *MafA*, *NKX6.1* ve *Pax6*'nın ifadesini azaltır (Henseleit ve diğ., 2005). *PDX1* aynı zamanda ko-aktivatörü p300 ile bağlanarak insülin gen ekspresyonunu artırır (Ritz-Laser ve diğ., 2003). Olgun β -hücrelerinde, *PDX1*'in tükenmesi veya azalmasının glikoz intoleransını indüklemesi *PDX1*'in β -hücre fonksiyonunun sürdürülmesindeki kritik rolünü göstermektedir (Holland ve diğ., 2002).

2.2.4 SLC2A2 (GLUT2)

Glut2 yoluyla glikoz alımı, insülin salgılama yolundaki ilk adımdır (Thrones, 2014). β -hücresi olgunlaşma belirteçleri arasında bulunan ve β -hücrelerinin glikoz metabolizmasında doğrudan rolü olan *SLC2A2* geni adacık hücrelerine glikoz taşınması için gerekli olan GLUT2'yi kodlar. *SLC2A2* tarafından kodlanan bu glikoz taşıyıcısı, β -hücresi kaderinin ve olgun fonksiyonunun temel düzenleyicisidir (Arda ve diğ., 2013).

2.2.5 NEUROG3

NEUROG3, merkezi sinir sistemi ve embriyonik pankreas gelişiminde yer alan temel sarmal-döngü-sarmal transkripsiyon faktörü ailesinin bir üyesidir. Endokrin progenitor hücre belirteci olan *NEUROG3*, Notch sinyalinin baskılanmasıyla artar (Jensen ve diğ., 2000). *NEUROG3*⁺ hücrelerin ada kaynaklı hücrelerin tümünü verebildiği gözlenmiştir (Dominguez-Bendala, 2009).

2.2.6 PTF1A

Bir DNA bağlayıcı, temel sarmal halka sarmal dizisine özgü transkripsiyon faktörü *PTF1A* (Conrad ve diğ., 2014), pankreas progenitör hücrelerinin oluşumunu kolaylaştırarak pankreas soyunun belirlenmesinde hayati bir rol oynar (Kawaguchi ve diğ., 2002). *PTF1A*, esas olarak pankreasın hem dorsal hem de ventral tomurcuklarında ve daha sonra asinar hücrelerde gelişimin erken aşamasında ifade edilir (Duque ve diğ., 2021).

2.2.7 NKX6.1

Erken ve geç pankreas β -hücre kimliğinin kazanılmasında rol alan anahtar transkripsiyon faktörlerinden biri, gelişim sırasında sinir sisteminde de eksprese edilen ve motor nöron özgünleşmesinde önemli bir rol oynayan homeobox proteini *NKX6.1*'dir (NKX6.1) (Al-Khawaga ve diğ., 2018; Gonzalez-Garza ve diğ., 2013). *NKX6.1*, pankreas gelişiminin erken evrelerinde ve ayrıca pankreas gelişimi sırasında çeşitli işlevlerde yer aldığı yetişkin β -hücrelerinde eksprese edilir. *NKX6.1* ve *PTF1A*, pankreatik progenitörlerin çoğunda birlikte ifade edilir. E12.5 döneminde *NKX6.1* ve *PTF1A* yollarını ayırırlar, *NKX6.1* endokrin soyuna yol açan gelişmekte olan pankreasın gövde alanında sınırlandırılırken, *PTF1A* tamamen uç alanından kaynaklanan ekzokrin kadere bağlı hale gelir (Zhou ve diğ., 2007). Olgun β -hücrelerinin, *PDX1* ve *NKX6.1*'i birlikte eksprese eden, hormon eksprese etmeyen, pankreatik progenitör hücrelerden kaynaklandığı ileri sürülmektedir (Pang ve diğ., 1994).

2.2.8 OCT4 ve NANOG

OCT4 ve *NANOG* gibi pluripotensi genleri, hücrelerin pluripotensini koruyarak farklılaşmayla ilişkili genleri baskılayan çekirdek düzenleyici ağı oluşturur (Boyer ve diğ., 2005). *OCT4* ve *NANOG*'un gen ifadesi, pluripotent hücrelerle sınırlandırılmıştır ve farklılaşma durumunda aşağı regüle olurlar (Nichols ve diğ., 1998). Birçok çalışma, mezenkimal kök hücrelerin de *OCT4* veya *NANOG*'u ifade ettiğini göstermektedir (Greco ve diğ., 2007).

2.2.9 Vimentin

Genetik hücre soyu izleme yöntemi kullanılarak, yetişkin insan adacıklarından kültürlenmiş β -hücrelerinin, β -hücresi ve epitelyal fenotip kaybıyla hızlı bir geri farklılaşmaya uğradığı ve buna paralel olarak *Vimentin* gibi mezenkimal belirteçleri kodlayan transkript düzeylerinde belirgin bir artış olduğu gösterilmiştir (Russ ve diğ., 2009).

2.2.10 Nestin

Nestin, nöronal ve hematopoietik kök hücrelerin önemli bir yüzey belirtecidir (Lendahl ve diğ., 1990). Önceki çalışmalar ayrıca, adacıklardaki *Nestin* eksprese eden hücreleri potansiyel pankreatik progenitör hücreler olarak tanımlamaktadır (Zulewski ve diğ., 2001). Ayrıca kemik iliğinden elde edilen mezenkimal kök hücreler ve pankreatik mezenkimal kök hücreler

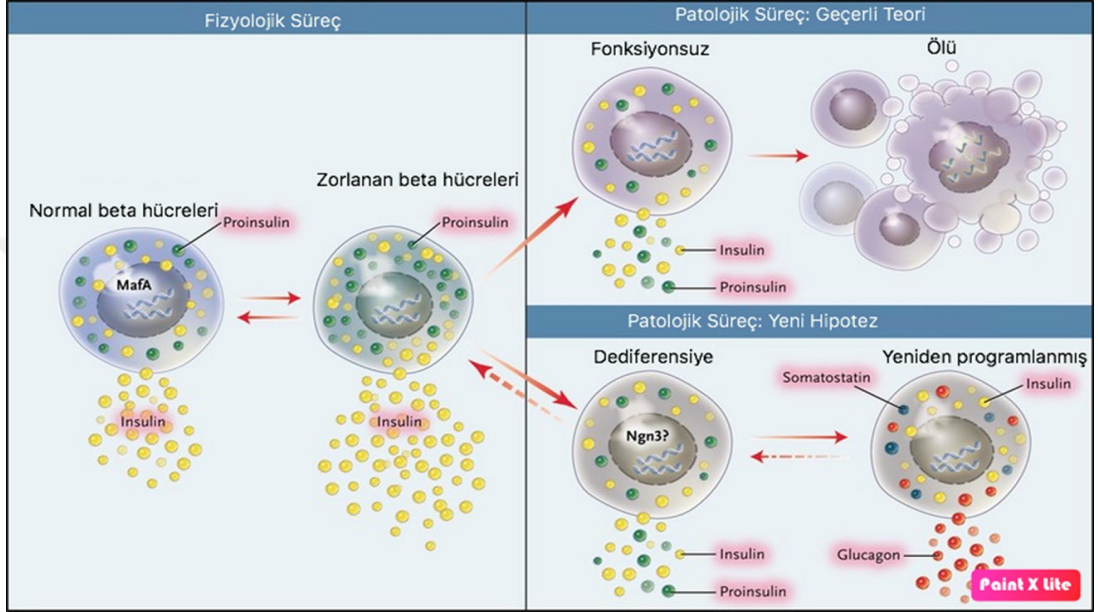
arasındaki farkın pankreatik mezenkimal kök hücrelerin yüksek oranda *Vimentin* ile birlikte yüksek oranda *Nestin* eksprese ediyor oldukları belirlenmiştir (Cooper ve diğ., 2020).

2.3 BETA HÜCRELERİNDE FONKSİYON KAYBI

β -hücreleri plazma glikoz konsantrasyonuna yanıt olarak nispeten dar bir fizyolojik aralıkta tutulması gereken insülin salınımını düzenler. Ancak diyabet hastalarında β -hücreleri glikoza yanıt olarak artan insülin talebini karşılayamaz (Fu ve diğ., 2013). T2D patogenezi genellikle düşük seviyeli insülin direnci ile başlar ve kanda yükselen glikoz seviyelerine yanıt olarak β -hücrelerinden insülin salınımında artış görülür, böylece normal kan glikoz seviyeleri korunur. Hastalığın ilerleyen aşamalarında β -hücre fonksiyonu ve kitlesi sürekli olarak azalır, bu da yetersiz insülin salınımını daha da kötüleştirir. Sonuç olarak bu durum β -hücrelerinin yüksek kan glikoz seviyelerini regüle etmede başarısız olmasına ve diyabetin ortaya çıkmasına yol açar (Wysham ve Shubbrook, 2020). β -hücrelerinin insülin salma yeteneği azalır ve T2D'nin başlamasından önce önemli seviyede bir β -hücre kitlesi kaybı yaşanır (Remedi ve Emfinger, 2016). Genellikle T2D hastalarında β -hücrelerinin kimlikleri ve kitlesi kaybolur ve hatta bu hücreler adacık hücrelerinin diğer hücre tiplerinin özelliklerini kazanabilir (Swisa ve diğ., 2017). T2D hastalarında β -hücrelerinin dediferansiye olup α ve δ benzeri hücrelere dönüştüğü bildirilmiştir (Cinti ve diğ., 2016). Glukolipotoksisite benzeri diyabetik stres altındaki β -hücrelerinin, normal β -hücre fonksiyonlarını düzenleyen *GLUT2*, *PDX1*, *FOXO1* ve *MafA* gibi β -hücrelerine özgü genlerin ifadelerinin azalması yoluyla olgunlaşmış, farklılaşmış durumlarından dediferansiye duruma geçtikleri gösterilmiştir (Liu ve diğ., 2020).

Pankreatik β -hücreleri de dahil olmak üzere bir organizmanın tüm hücreleri, farklılaşma olarak adlandırılan karmaşık bir hücresel süreç yoluyla embriyonik kök hücrelerden kaynaklanır (Keller, 2005). β -hücre farklılaşması, belirli transkripsiyon faktörlerinin ve aşağı akış gen kümelerinin zamana bağlı olarak koordineli ve sıkı bir şekilde kontrol edilen aktivasyonunu veya baskılanmasını içerir. Bu karmaşık sinyalleşme olayları, belirli morfolojik ve işlevsel hücresel özelliklerin aşamalı olarak edinilmesiyle, kesin endoderm hücrelerinden olgun insülin salgılayan β -hücrelerine geçişi yönlendirir (Stanger ve Hebrok 2013). Hücresel farklılaşma tek yönlü değildir. Artan kanıtlar, belirli koşullar altında, olgun β -hücrelerinin farklılaşmış fenotiplerini ve hücresel kimliklerini çeşitli derecelerde kaybedebileceğini ve daha az farklılaşmış ve hatta öncül benzeri bir duruma gerileyebileceğini göstermektedir. Geri farklılaşma olarak adlandırılan bu kavram, diyabetin patogenezinde yer almaktadır (Weir ve

diğ., 2013). Son yıllarda hayvan modellerinde ve insanlarda yapılan birçok *in vivo* çalışmada, hücre ölümüne ek olarak (Butler ve diğ., 2003, Jurgens ve diğ., 2011), geri farklılaşmanın (Cinti ve diğ., 2016; Marselli ve diğ., 2014; Talchai ve diğ., 2012) T2D’de fonksiyonel β -hücre kitlesinin kaybına katkıda bulunan önemli bir faktör olduğunu göstermektedir (Rahier ve diğ., 2008; Sakuraba ve diğ., 2002) (Şekil 2.2:).

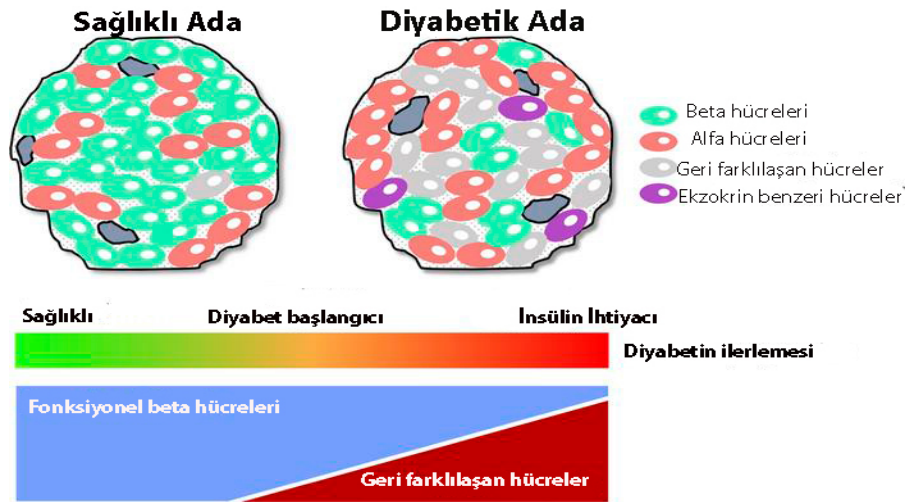


Şekil 2.2: β -hücre kaybında rol alan uzun yıllardır kabul gören hücre ölümü ile ilgili ve yeni öne sürülen dediferensiyasyon ile ilgili hipotezler (Dor ve Glaser, 2013).

2.4 BETA HÜCRE GERİ FARKLILAŞMASI

İnsülin, kan glikozu homeostazını kontrol etmek için gerekli olan bir peptid hormondur. Göreceli insülin eksikliği ve insülin aktivitesinde azalma veya kayıp hiperglisemi ile sonuçlanır (Amerikan Diyabet Derneği, 2021). Değişen metabolik taleplere yanıt olarak yeterli β -hücre kitlesinin korunması önemlidir. β -hücre kitlesi proliferasyon, geri farklılaşma ve ölüm dengesi tarafından sıkı bir şekilde düzenlenmektedir (Alejandro ve diğ., 2015). Yüksek glikoz ve lipid konsantrasyonuna kronik maruziyet oksidatif stres, endoplazmik retikulum (ER) stresi ve inflamasyon dahil olmak üzere çeşitli mekanizmalar yoluyla β -hücrelerinde fonksiyon kaybına yol açmaktadır (Brereton ve diğ., 2016). β -hücrelerinin fonksiyonundaki devam eden azalma, β -hücre kitlesinin kaybına neden olarak T2D gelişimine katkıda bulunmaktadır (Stoffers, 2004).

β -hücre geri farklılaşması, bu hücelere özgü anahtar transkripsiyon faktörleri, insülin, glikoz metabolizması genleri, protein işleme ve salgı yolu genleri dahil olmak üzere β -hücrelerinde yüksek ekspresyonu görülen genlerin azalmış ekspresyonu ve normal β -hücrelerinde çok düşük seviyelerde eksprese edilen veya baskılanan genlerin yukarı düzenlenmesi ile kendini gösterir (Bensellam ve diğ., 2012, Lemaire ve diğ., 2017). Diyabetik hayvanların farklılaşmamış adacıklarında progenitör hücre belirteçlerinin varlığı gözlemlenmiştir (Talchai ve diğ., 2012). Bu değişiklikler β -hücrelerinin metabolik ve yapısal olarak yeniden yapılandırılmasına ve sonuçta kusurlu insülin sekresyonuna yol açar. **Şekil 2.3:**'te T2D gelişiminde pankreatik adacıklardaki β -hücre popülasyonunun değişimi gösterilmiştir. Dediferensiyasyon sürecinde β -hücre karakteri ve fonksiyonunda önemli rol alan transkripsiyon faktörleri *FOXO1*, *INS*, *MafA*, *PDX1*, *NKX6.1*, *SLC2A2*'yi kodlayan genlerin ekspresyonlarının baskılanması ve β -hücrelerinde baskılanmış halde bulunan *LDH* ve *hekzokinaz* gibi genlerin ekspresyonunda meydana gelen artış (Weir ve diğ., 2013) ile β -hücre kimliği ve fonksiyonu kaybolur (Accili ve diğ., 2016). Buna karşın *NEUROG3*, *l-myc*, *OCT4*, *NANOG* gibi progenitör hücre belirteçleri ve *Vimentin*, *Nestin* gibi mezenkimal kök hücre belirteçlerinde artış görülür (Nordmann ve diğ., 2017). Ek olarak, β -hücre geri farklılaşması, hiperglukagonemide insülin/glukagon oranındaki değişikliğin kritik bir belirleyicisidir, T2D'li hastalarda kontrolsüz hiperglisemiye katkıda bulunur (Dunning ve diğ., 2007) ve bu durum T2D'nin ilerlemesini daha da hızlandırabilir.



Şekil 2.3: Tip 2 Diyabet gelişiminde β -hücre popülasyonundaki değişim gösterilmiştir (Amo-Shiinoki ve diğ., 2021).

2.4.1 Beta Hücre Geri Farklılaşmasında Glukotoksisite ve Lipotoksisitenin Rolü

T2D'de, genetik ve çevresel faktörlerin karmaşık etkileşimi sonucunda insülin sekresyonunda bozulmaya neden olur. Ardından gelişen kronik hiperglisemi, β -hücresi fenotipi üzerinde daha fazla hasar oluşturarak fonksiyonel β -hücre kitlesinin ilerleyici düşüşüne ve zamanla hastalığın kötüleşmesine yol açar. Bu durum glukotoksisite olarak adlandırılır (Bensellam ve diğ., 2012). Glukotoksisite ile ilişkili β -hücre kimliği kaybı, özellikle insülinin azalmış ekspresyonuna ilaveten β -hücrelerine özgün birçok genin ekspresyonundaki değişikliklerle karakterize edilir. β -hücrelerinin temel görevi dolaşımdaki glikoz seviyelerini fizyolojik aralıkta tutabilmek için insülin sentezi ve salınımı yapmaktır (MacDonald ve diğ., 2005). Artan kanıtlar, uzun süreli yüksek plazma glikoz ve yağ asidi seviyelerinin β -hücre fonksiyonunu azalttığını göstermektedir. Bu durum glukolipotoksisite olarak bilinir. Glukotoksisite ve lipotoksisite arasındaki güçlü ilişki hiperglisemi ile yağ asitlerinin oksidasyonunun azalması ve böylelikle lipotoksisite oluşmasının yolunun açılması şeklinde açıklanmaktadır (Poitout ve diğ., 2008).

2.4.2 Beta Hücre Geri Farklılaşmasında Endoplazmik Retikulum Stresinin Rolü

Endoplazmik retikulum protein sentezi, katlanması ve protein sekresyonundan önce proteinin kalitesinin belirlenmesinden sorumludur. Kronik hiperglisemi, β -hücrelerinde insülin transkripsiyonu ve translasyonunu uyararak insülin biyosentezinin artmasına bağlı olarak ER lümeninde katlanmamış veya yanlış katlanmış proteinlerin birikmesine neden olur (Fonseca ve diğ., 2011; Scheuner ve diğ., 2005). Gelişen ER stresine cevaben “katlanmamış protein cevabı” (UPR) olarak adlandırılan bir adaptif sistemin aktivasyonu sağlanır. UPR, protein translasyonunu azaltarak ve yanlış katlanmış proteinlerin birikimini hafifleterek, yanlış katlanmış proteinleri uzaklaştırıp şaperon üretimini artıran sinyal yollarını aktive etmek için ER ile ilişkili protein bozulması (ERAD)’nı teşvik ederek ER stresini azaltır ve böylece ER homeostazını sağlar (Karunakaran ve diğ., 2012). UPR, ER membranındaki üç transmembran proteinin aktivasyonu aracılığıyla gerçekleşir: i.) Protein kinaz-RNA benzeri ER kinaz/ökaryotik translasyon başlatıcı faktör-2 alfa (PERK/eIF2alfa), ii.) İnositol-gerektiren 1/X-kutu bağlama proteini 1 (IRE1/XBP-1), iii.) Aktive edici transkripsiyon faktörü 6 (ATF6) (Eizirik ve diğ., 2007; Kaufman ve diğ., 2002). Stres altında olmayan hücrelerde, bu üç UPR sinyal ileticisi ER şaperonu GRP78 ile ilişkilidir. ER lümeninde yanlış katlanmış proteinler biriktikçe, bu sensörler salınır ve aktive edilir: ATF6 Golgi'ye taşınır ve orada parçalanır, ATF6'nın sitoplazmik parçası nükleusa geçer, IRE1 α ile PERK oligomerleşir ve otofosforile

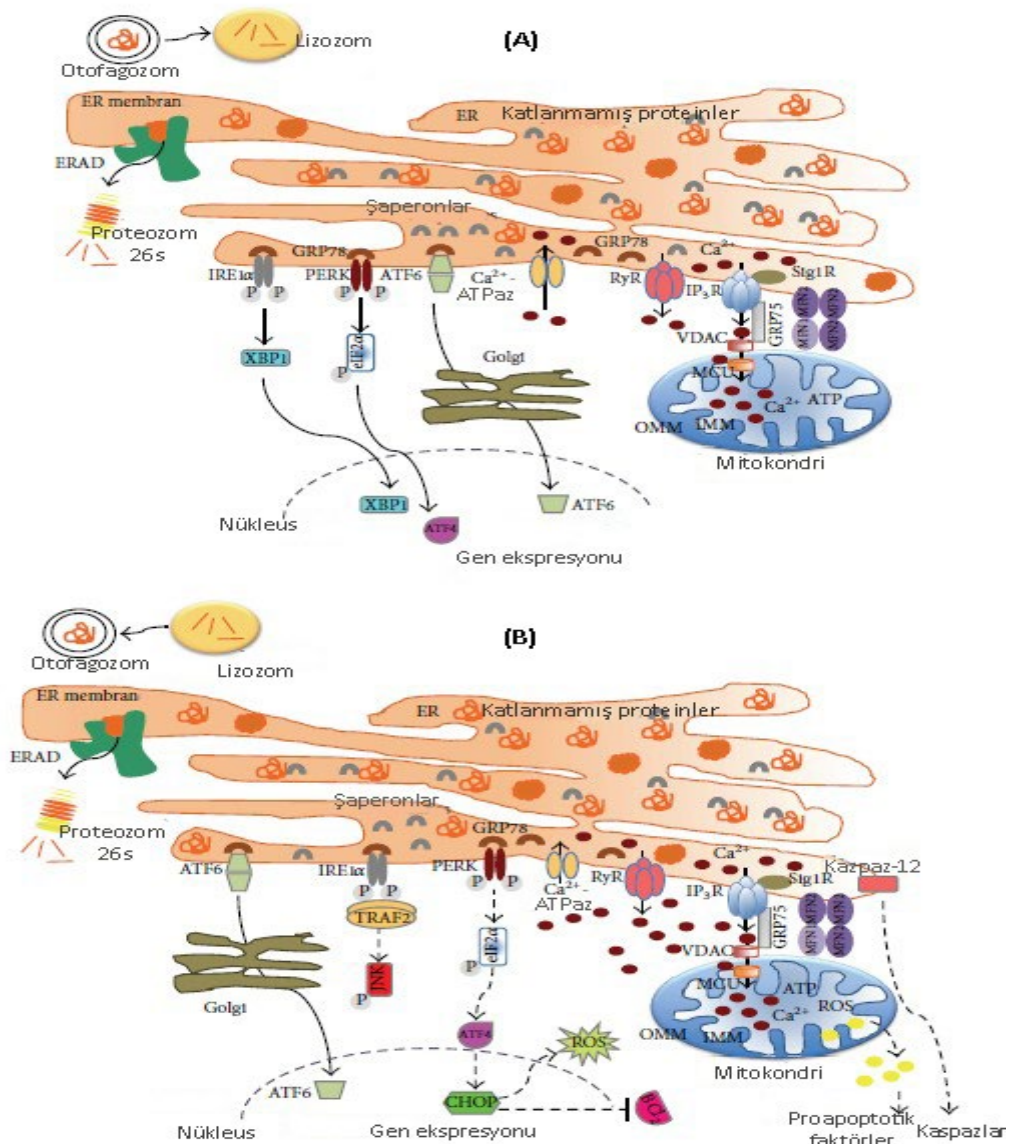
olur. Fosforile IRE1 α , XBP1 mRNA'nın kesimini katalizlerken, aktive olmuş PERK eIF2 α 'yı fosforile eder ve genel çeviri hızını azaltırken ATF4 gibi seçici mRNA'ların çevirisini indükler. UPR dallarının bu aşağı akım etkileri, ER protein katlanma kapasitesini artıran proteinlerin kodladığı genlerin ifadesini indükler. Aynı zamanda, ERAD proteazomda ayrıştırma yoluyla terminale ulaşmış yanlış katlanmış proteinleri uzaklaştırmak için hızlandırılır ve agregat halindeki proteinler otofajik lizozomal yol ile parçalanır. ER'den mitokondriye Ca⁺² transferi, mitokondriyal metabolizmayı ve ATP üretimini sürdürür ve hücrenin hayatta kalmasını sağlar (Pereira ve diğ., 2013).

Uzun süreli veya şiddetli ER stresi koşullarında, ATF6, IRE1 α ve PERK sensörleri apoptotik sinyal iletim yollarını başlatır. Riyanodin reseptörleri (RyR'ler) ve IP3R'ler aracılığıyla ER Ca⁺² akışı mitokondriyal Ca⁺² aşırı yüklenmesi, ROS birikimi ve ATP tükenmesine neden olur ve böylece mitokondriye bağımlı apoptoza yol açar. PERK'in aşağı akım efektörlerinden biri olan CHOP, Bcl-2'nin ifadesini inhibe eder ve ROS üretimini tetikleyerek apoptozu teşvik eder. Aktive olan IRE1 α , TRAF2'yi çeker, bunun sonucunda JNK'nın aktive olmasına neden olur ve ER'de yer alan kaspaz-12'nin aktive olmasını sağlar, bu da kaspaz kaskadının aktive olmasına yol açar (Pereira, 2013) (**Şekil 2.4:**).

UPR sinyal molekülleri arasından sadece ATF6, insülin geninin ekspresyonunu uyaran PDX1 ve MafA transkripsiyon faktörlerini baskılar (Seo ve diğ., 2008). ER stresi varlığında ATF6, ER'den Golgi'ye geçer (Haze ve diğ., 1999) ve burada proteazlar tarafından kesilir (Ye ve diğ., 2000). ER stresine adaptif yanıt, β -hücrelerinin farklılaşmış fenotipini korumak için çok önemlidir. Artan kanıtlar, β -hücrelerinin ER'deki adaptif UPR başarısızlığının β -hücre dediferansiyasyonu ve β -hücre fonksiyonu kaybı ile ilişkili olduğunu göstermektedir (Herbert ve diğ., 2016). Birçok çalışma, ada amiloid birikimi, sürekli yüksek glikoz veya yağ asidine maruz kalma ve proinflamatuvar sitokinlerin artmış seviyeleri de dahil olmak üzere çeşitli faktörlerin β -hücrelerinde ER stresini aktive ettiğini göstermektedir (Herbert ve Laybutt, 2016; Oh ve diğ., 2018).

Park ve arkadaşlarının (2007) yaptıkları bir çalışmada INS-1 β -hücrelerine uygulanan yüksek glikoz konsantrasyonu sonucunda yetim nükleer reseptör (SHP)'ün ekspresyonunun arttığı ve insülin gen ekspresyonunun baskılandığı gösterilmiştir. Seo ve arkadaşları (2008), ATF6 ekspresyonunun artmasının SHP ekspresyonunu artırdığını ve β -hücrelerinde PDX-1 ve MafA ekspresyonunu baskıladığını göstermiştir. ER stresinin erken aşamalarında oksidatif stres

Ca^{2+} 'nin ER'den mitokondriye geçmesini sağlayarak metabolik aktivitenin ve dolayısıyla ROS üretiminin artmasına neden olur. Artan ROS, ER'den daha çok Ca^{2+} 'nin mitokondriye geçmesine neden olur ve bu döngünün devam ettiği bir geri besleme mekanizması oluşur (Cao ve Kaufman, 2014). Bu uyarlanabilir yanıtın ince ayarı, β -hücre farklılaşmış fenotipinin korunması için önem taşır. Adaptif UPR'nin başarısızlığının diyabetin ilerlemesi ve β -hücre geri farklılaşması ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Herbert ve Laybutt, 2016).



Şekil 2.4: (A) Katlanmamış protein birikimine cevaben gelişen UPR ve (B) uzun süreli veya şiddetli ER stresi altındaki hücrelerde UPR yolları şematize edilmiştir (Pereira, 2013).

2.4.3 Beta Hücre Geri Farklılaşmasında Mitokondrinin Rolü

Mitokondriyal metabolizmanın, pankreatik β -hücrelerinden insülin salgılanmasının ana belirleyicisi olduğu konusunda fikir birliği vardır. Daha spesifik olarak mitokondri, ATP üreterek ve insülin salınımıyla sonuçlanan bir olaylar dizisini başlatarak hücre dışı glikoza karşı β -hücre tepkilerine aracılık eder ve mitokondriyal oksidatif metabolizmanın bozulması glikoz ile uyarılan insülin sekresyonu (GSIS)'nu bozar (Mulder, 2017). Ayrıca, mitokondriyal fonksiyon bozukluğu, mitokondriyal membran potansiyelinde değişikliğe neden olur ve bu da mitokondri aracılı apoptoza yol açtığından (Xiong ve diğ., 2014) β -hücre kitlesinin kontrolünde kritik bir rol oynar.

Yapılan çalışmalarda mitokondrilerde de ER'ye benzer bir katlanmamış protein cevap mekanizması olduğu gösterilmiştir (Hu ve Feng, 2011). CHOP transkripsiyon faktörü, ER stresinde rol aldığı gibi mitokondrinin UPR mekanizmasında da rol alır. CHOP ve C/EBP β mitokondriyal UPR (UPR^{mt})'ye yanıt veren genlerin transkripsiyonunu aktive etmek için hetero-dimerize olur. CHOP içermeyen hücrelerde UPR^{mt} proteinlerini kodlayan genlerde ekspresyon gerçekleşmediğinden CHOP'un mitokondriyal UPR sinyalinde önemli olduğu öne sürülmüştür (Aldridge ve diğ., 2007). Fizyolojik koşullar altında ATF5 mitokondrilerde yerleşir. Ancak, diyabet gibi mitokondriyal fonksiyonun bozulduğu şartlarda ATF5 sitozolde birikir ve nükleusa geçer (Fiorese ve diğ., 2016). Mitokondri ve ER, hücrel homeostazın ve hayatta kalmanın sürdürülmesi için temel olan hassas bir ağ bağlantısı oluşturur (Giorgi ve diğ., 2009). Yapısal bağlantıya ek olarak, ER ve mitokondri arasında doğrudan bir lipid transferi vardır (Beller ve diğ., 2010). Ayrıca, yeni sentezlenmiş proteinlerin şaperon destekli katlanması, ATP üreten Krebs döngüsünde yer alan mitokondride konumlanan dehidrogenazların düzenlenmesi ve Ca^{+2} bağımlı enzimlerin aktivasyonu gibi süreçleri düzenleyen bu iki organel arasında dinamik bir Ca^{+2} iyon değişimi vardır (Franzini-Armstrong ve diğ., 2007). ER ve mitokondri arasındaki protein translokasyonu, bu iki organelin stres sırasında iletişim kurduğu başka bir mekanizmadır. Bu tür taşıyıcı proteinlerden biri, BIP (immünoglobulin ağır zincir bağlayıcı protein) olarak da bilinen GRP78'dir. ER'de Ca^{+2} bağlayıcı bir moleküler şaperon olan GRP78, UPR sinyalini ER membranına bağlı PERK, IRE1 ve ATF6 proteinlerine bağlanarak kontrol eder (Yoshida, 2007) ve stres kaynaklı apoptozu baskılar (Reddy ve diğ., 2003). Kalsiyum iyonofor A23187 veya ER Ca^{+2} - ATPaz inhibitörü thapsigargin uygulanması sonucu uyarılan ER stresi, GRP78'in mitokondriye translokasyonuna

yol açar (Sun ve diğ., 2006). Sıçan astrositlerinde, hipoksi ile uyarılan ER stresi, mitokondriyal ATP'ye bağlı proteazlar Yme1 ve Lon ekspresyonunu uyararak stresin ER'den mitokondriye geçmesine neden olur (Hori ve diğ., 2002).

T2D, mitokondriyal fonksiyon bozukluğu ile karakterizedir. Mitokondriler hücrel çevre ile mitokondriyal DNA fragmentleri, mitokondriyal lipidler, metabolitler ve küçük peptidler gibi çeşitli moleküller aracılığıyla iletişim kurar (Valera-Alberni ve Canto, 2018). Mitokondriyal türevli peptidler (MDP'ler), mitokondri genomundaki kısa açık okuma çerçeveleri tarafından kodlanan sinyal peptitleridir (Okada ve diğ., 2017). Obezite gibi patofizyolojik koşullar altında, besin maddelerinin aşırı oksidasyonu, mitokondriyal stresi indükleyebilir, bu da UPR^{mt} ve stres sinyal yolunun başlatılmasına yol açabilir. UPR^{mt} ve sinyal yollarındaki kusurlar, mitokondrinin bütünlüğünü ve homeostazını bozarak ER stresine ve insülin direncine neden olabilir (Hu ve Liu, 2011). β -hücrelerinin mitokondrileri insülin sekresyonunu desteklemek amacıyla ATP formunda enerji sağlar (Jitrapakdee ve diğ., 2010). Mitokondriyal bozukluk ve anormal mitokondriyal morfoloji hipergliseminin başlamasından önce oluşur ve β -hücre kaybında önemli rol oynar (Lu ve diğ., 2010). Glukolipotoksite ile uyarılan mitokondriyal fonksiyon bozukluğu, β -hücre kaybında rol alır ve metabolik stres kaynaklı ROS üretiminde artışa neden olur. Glukolipotoksisite durumunda antioksidanlar insülin sekresyonunu artırır ve β -hücre apoptozunu baskılar (Lim ve diğ., 2011).

Son kanıtlar, mitokondriyal füzyon, fisyon ve mitofajinin yüksek düzeyde düzenlenmiş süreçleri olan mitokondriyal dinamiklerin, pankreatik β -hücre farklılaşmasında önemli bir rol oynadığını göstermektedir. Değişen koşullar altında mitokondriler hücrel enerji ihtiyacına uyum sağlayabilmek için morfolojik değişiklikler geçirirler. Bu değişiklikler mitokondriyal fisyon ve füzyon döngülerinden oluşur. Mitokondriyal fisyon küçük mitokondrileri üretirken, birbirine bağlı büyük mitokondri ağları füzyon yoluyla oluşur (Westermann, 2010). Enerji talebi açısından, parçalanmış mitokondriler zengin bir besin ortamıyla ilişkilendirilirken, uzun mitokondriler açlıkla ilişkilendirilir (Schrepfer ve Scorrano, 2016). Diğer taraftan, mitokondri uzaması, besinlerin kısıtlı olduğu otofaji benzeri mekanizmalar sırasında ATP üretimini sürdürmek için enerji verimliliğinde bir artışa yol açar (Gomes ve diğ., 2011). Mitokondriyal dinamiklerden özellikle mitofaji, işlev bozukluğuna sahip mitokondrilerin seçici olarak uzaklaştırılmasını sağlar ve hücrede sağlıklı mitokondri popülasyonunu korur. Mitokondriyal dinamikler, mitokondriyal membranda oligomerleşme ve sonrasında membranın yeniden

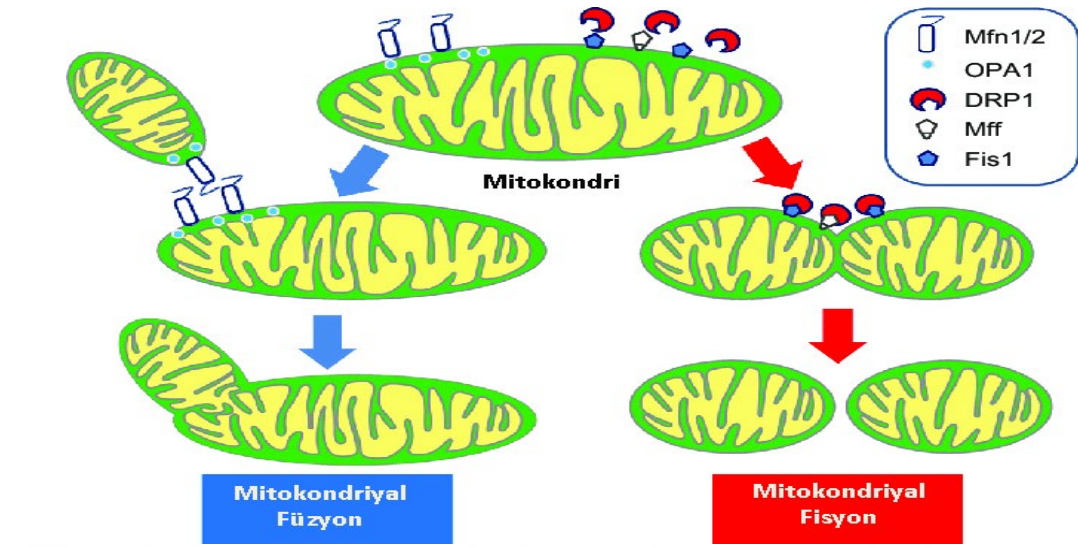
modellenmesi yeteneğine sahip membranla ilişkili dinamin benzeri proteinlerin (DRP) koordine edilen eylemleri tarafından düzenlenir (Giacomello ve diğ., 2020)

2.4.3.1 Mitokondriyal Füzyon

Mitokondriyal füzyonda, mitokondri dışı membranı (OMM)'nda konumlanan Mitofusin 1 (Mfn1) ve Mitofusin 2 (Mfn2) proteinleri gibi dinamin ilişkili GTPaz'lar rol alır. Bu proteinler OMM'ye iki transmembran bölgelerinden bağlanırlar ve geri kalan bölgeleri sitoplazmada bulunur. Füzyon esnasında bu proteinlerin sitozolik kısımda bulunan bölgeleri komşu mitokondrilerin Mfn'leri ile bağlanmasını sağlar (Koshiba ve diğ., 2004). Komşu mitokondrilerdeki karşılıklarının dimerleşmesiyle Mfn1 ve 2, OMM'yi yakın bir konuma getirerek füzyonu kolaylaştırır. Mfn2, ER'de de bulunur ve ER'nin mitokondriye bağlanmasını kontrol eder (Basso ve diğ., 2018). Mitokondrinin iç membranı (IMM)'nın füzyonu ise Optik atrofi 1 (OPA1) adı verilen diğ. bir dinamin homoloğu ile sağlanır (Wong ve diğ., 2000). Dış membrandaki Mfn1 ve iç membrandaki OPA1 arasında bir etkileşim vardır. Her iki membranın füzyonu için enerji sağlamak amacıyla GTP'nin hidrolizi gerekir (Meeusen ve diğ., 2004). İç membranın füzyonu için ayrıca elektrokimyasal membran potansiyelinin sağlanması gerekmektedir. Bunun nedeni, membran potansiyeli kaybolduğunda OPA1'in proteolitik işlemlerinin artmasıdır. Bu da OPA1'i inaktive forma dönüştürür (Ishihara ve diğ., 2006).

2.4.3.2 Mitokondriyal Fisyon

Mitokondriyal fisyonda çoğunlukla sitoplazmada bulunan Drp1 rol alır. Fisyon esnasında Drp1, OMM'de bulunan kesim bölgelerine yönelir ve mitokondri etrafında bir heliks oluşturur. Fisyon 1 (Fis1), C-ucu bölgesinden OMM'ye tutunur. Bu proteinin geri kalan kısmı sitoplazmaya dönüktür ve fisyonun başlaması için Drp1 ile etkileşime girer (Mozdy ve diğ., 2000). Aşırı besine maruz kalma mitokondriyal fisyonu artırır ve mitokondriyal füzyonu azaltır (Liesa ve diğ., 2013). Ayrıca mitokondriyal fisyon, mitofaji ile hasarlı mitokondrinin ortamdan uzaklaştırılabilmesi için önemlidir (Wai ve Langer, 2016). Aşırı mitokondriyal fisyon, elektron taşıma zinciri (ETC) bozukluğu ile parçalanmış mitokondri birikimine neden olur ve memeli hücrelerinde mitokondriyal ROS'u arttırdığı için zararlı olabilir (Yu ve diğ., 2006). **Şekil 2.5:**'te Mitokondriyal fisyon ve füzyonda görev alan moleküllerin etkileşimini gösteren şema verilmiştir.

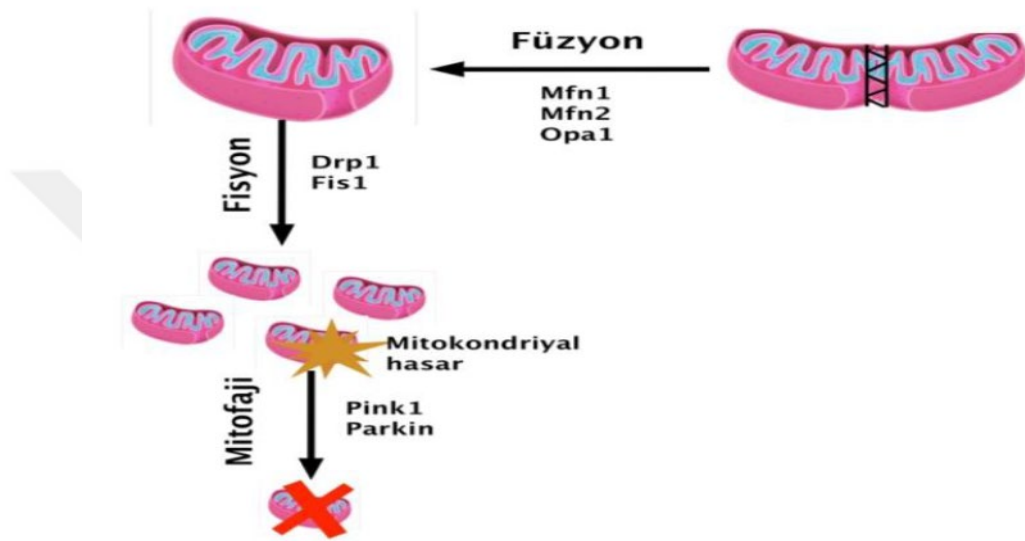


Şekil 2.5: Mitokondriyal fisyon ve füzyonda görev alan moleküllerin etkileşimini gösteren şema (van der Blik ve diğ., 2013'ten uyarlanmıştır).

2.4.3.3 Mitofaji

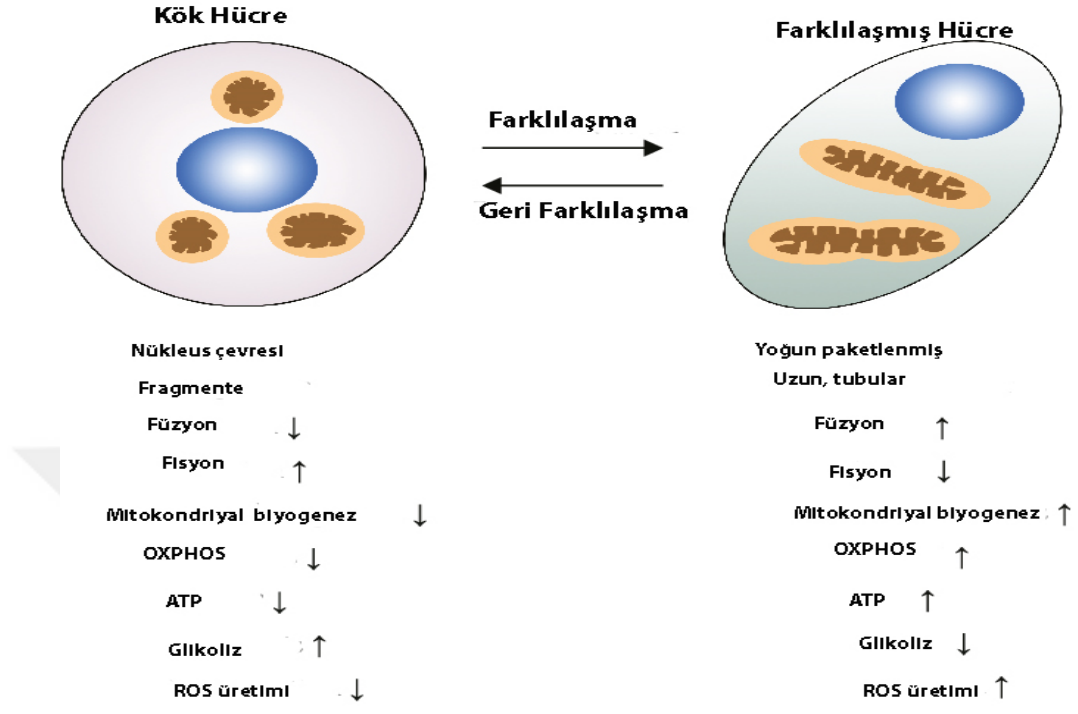
Mitofajide rol alan PINK1 bir mitokondriyal serin/treonin kinaz (Ser/Thr) iken, Parkin bir E3 ubiquitin ligazdır. Normal koşullarda, Parkin sitoplazmada bulunur ve E3 aktivitesini inhibe eder. PINK1, Parkin'i fosforile ederek sitoplazmadan mitokondriye mitofaji için geçişini sağlar (Agarwal ve Muqit, 2022). Normal hücrelerde, sitoplazmada bulunan PINK1 proteini, iç mitokondriyal membrana taşınır, membrandaki presenilinler ile ilişkili eşkenar dörtgen benzeri protein (PARL) proteazları tarafından kesilir ve ubiquitin-proteazom yoluyla hızla parçalanır (Sekine ve Youle, 2018). Mitokondri hasar gördüğünde veya mitokondriyal membran potansiyeli kaybolduğunda, PINK1 artık kesilmez ve parçalanmaz, ancak dış mitokondriyal membranda istikrarlı bir şekilde yerleşir. Daha sonra PINK1 doğrudan Parkin'i, Parkin'in korunmuş bir kalıntısı olan Ser65'ten fosforile eder (McLelland ve diğ., 2018). Bu bölge Parkin'in ubiquitin benzeri (Ubl) alanında yer alır. Fosforilasyon, Parkin'i sitoplazmadan dış mitokondriyal membran yüzeyine taşır ve Parkin'in E3 ligaz aktivitesini uyarır. PINK1/Parkin aracılı mitofaji, gerilime bağımlı anyon kanallarının (VDAC1) ve P62/SQSTM1'in aktivitesine bağlıdır (Ivankovic ve diğ., 2016). Bu proteinler doğrudan hafif zincir 3 (LC3) ile etkileşime girerek otofagozomları çekmek için kullanılır. Hasar görmüş mitokondriler otofagozomların içine alınır ve parçalanmak üzere lizozomlara taşınır (Villa ve diğ., 2017). Drp1 aracılı fisyonun, mitokondrileri otofagozomal yutulmasını kolaylaştırmak için fragmentlere bölerek

(Rambold ve diğ., 2011) ve/veya hasarlı mitokondriyal alt birimleri elimine etmek suretiyle parçalayarak mitofajiyi kolaylaştırdığı düşünülmektedir (Twig ve diğ., 2008). Yüksek glikoz, oksidatif stresi artırır ve ROS aşırı üretimi, mitokondriyal fisyonun ana düzenleyicisi olan Drp1'in aracılık ettiği mitokondriyal parçalanmaya neden olur (Smirnova ve diğ., 2001). **Şekil 2.6:**'da Mitokondriyal fisyon, füzyon ve mitofaji ilişkisi ve bu süreçlerde rol alan moleküller gösterilmiştir.



Şekil 2.6: Mitokondriyal fisyon, füzyon ve mitofaji ilişkisi ve bu süreçlerde rol alan moleküller gösterilmiştir (Literatürdeki bilgiler özetlenerek oluşturulmuştur).

Geri farklılaşma sonucu kök hücre benzeri özellik gösteren hücrelerde ve farklılaşmış olan hücrelerdeki mitokondriyal fenotip ve fonksiyonel özellikler farklılık gösterir. Çoğu kök hücre tipinde, mitokondri genellikle nükleus çevresinde lokalizedir ve parçalanmış ve daha az kristal küçük morfoloji (olgunlaşmamış morfoloji) ile karakterize edilir. Buna bağlı olarak, mitokondriyal fisyon yüksek iken mitokondriyal biyogenez düşüktür, bu denge düşük mitokondriyal kitleyi korur. Kök hücreler genellikle ana enerji metabolizması olarak glikolize dayanır ve düşük ATP, oksidatif fosforilasyon (OXPHOS) ve ROS seviyelerine sahiptir. Farklılaşmış hücrelerde, mitokondri daha geniş ve uzun tübüler morfolojiye dönüşmektedir. Buna bağlı olarak, mitokondri birikimi ile mitokondriyal füzyon ve biyogenez artar. Kök hücreler ile karşılaştırıldığında, farklılaşmış hücreler daha yüksek ATP, ROS ve OXPHOS seviyelerine sahiptir (Fu ve diğ., 2019). **Şekil 2.6:**'da kök hücre ve farklılaşmış hücre arasındaki mitokondriyal fonksiyon ve morfoloji farkları ile ilişkili şekil özetlenmiştir.



Şekil 2.7: Kök hücre ve farklılaşmış hücre arasındaki mitokondriyal fonksiyon ve morfoloji farkları şematize edilmiştir (Fu ve diğ., 2019).

Organeller arası iletişim, hücre biyolojisinin yeni ortaya çıkan bir yönüdür ve bu ağın metabolizmanın hücresel ihtiyaçlara göre adaptasyonuna izin verdiği bildirilmiştir. İlginç bir şekilde, ER ve mitokondri artık hücre içinde bireysel organel olarak kabul edilmezler, çünkü fiziksel olarak yüksek derecede dinamik ve düzenlenmiş bir şekilde etkileşimde bulundukları mitokondriye bağlı zarlar (MAM) olarak adlandırılan özel mikroalanlar oluştururlar (Herrera ve Simmen, 2017). Organel temas bölgesi, zar füzyonunu içermez, ancak "protein köprüleri" aracılığıyla gerçekleşir (Csordas ve diğ., 2018). MAM'ın hücresel Ca^{+2} homeostazında merkezi bir rol oynadığı iyi bilinmektedir (Romero-Garcia ve Prado-Garcia, 2019) ve daha yakın zamanda ER-mitokondri etkileşimlerinin, mitokondri dinamikleri, oksidatif metabolizma (Romero-Garcia ve Prado-Garcia, 2019) ve apoptoz (Verfaillie ve diğ., 2012) gibi mitokondri fonksiyonlarının birçok yönünü düzenleyebileceği gösterilmiştir. Bu işlevlerin çoğu, mitokondrinin Ca^{+2} içeriğiyle sıkı bir şekilde bağlantılıdır. ER'den mitokondriye aktarılan Ca^{+2} , krebs döngüsünün üç farklı enziminin Ca^{+2} bağımlı olması sebebiyle mitokondriyal enerji metabolizmasının düzenlenmesinde hayati öneme sahiptir. Ca^{+2} aktarımının inhibisyonu veya

eksikliği ATP seviyelerinin azalmasına neden olur (Denton, 2009); bu nedenle MAM, hücrelerin hormonal ve besin sinyalleşmesi için önemli bir merkez olarak görülmektedir. Bu konuda, son kanıtlar diyabetik hastalarda ER-mitokondri iletişim bozukluğu ve β -hücre fonksiyon bozukluğu arasında bir ilişki olduğunu bildirmektedir (Thivolet ve diğ., 2017). Mekanistik olarak, ER-mitokondri iletişim bozukluğu mitokondriyal fonksiyon bozukluğu ve ER stresi, değişmiş Ca^{+2} homeostazını teşvik ederek diyabette insülinin hem etkisini hem de salınmasını değiştirmektedir (Rieusset, 2017). Ayrıca, palmitat uygulamasıyla ER stresinin indüklenmesinin, fare Min6-B1 β -hücre hattında ER-mitokondri etkileşimini önemli ölçüde azalttığı ve glikoz uyarımlı insülin sekresyonu (GSIS)'nu değiştirdiği gösterilmiştir (Thivolet ve diğ., 2017).

2.5 Beta Hücre Geri Farklılaşmasında İnflamasyonun Rolü

T2D'li hastalardaki adacıkların patolojisi, immün hücrelerin infiltrasyonu, proinflamatuvar sitokinler, kemokinler, apoptoz ve fibrozu uyaran ve kısmen de pankreatik hücre fonksiyon kaybına neden olan amiloid birikimler ile karakterizedir (Yu ve diğ., 2020). T2D'li bireylerin pankreatik adalarında görülen kronik inflamasyon, insülin sekresyonu ve duyarlılığını bozar (Nordmann ve diğ., 2017).

Glikoz, serbest yağ asitleri ve insan amiloid polipeptitleri gibi metabolik uyaranların, IL1 β sinyal yolunu ve pankreas adacıklarında Pyrin Alanı İçeren NLR Ailesi 3 (NLRP3)'ü aktive ettiği öne sürülmüştür (Wen ve diğ., 2011). Çok sayıda çalışmada, T-hücresi ve makrofaj kaynaklı sitokinlerin, T2D'nin patogenezeine önemli katkılarda bulunduğunu gösterilmiştir (Zhong ve diğ., 2017). T2D donörlerinden alınan pankreas kesitlerinde, IL1 β üreten β -hücreleri ve ardından bozulmuş β -hücre fonksiyonu gözlenmiştir. Düşük IL1 β konsantrasyonlarına uzun süre maruz kalma, T2D'de gözlemlendiği gibi β -hücre kimliğinin kaybıyla ilişkili olan *INS*, *MafA* ve *PDX1* gibi genlerin ekspresyonunu baskılamıştır (Zhong ve diğ., 2017). İyi huylu tümörleri olan diyabetik olmayan hastalardan alınan adacıkları kullanan bir çalışmada, β -hücre farklılaşmasının hiperglisemiden önce tetiklenebileceği doğrudan kanıtlanmıştır, bu da inflamasyonun doğrudan β -hücre farklılaşmasını uyurabileceğini göstermektedir (Wang ve diğ., 2019).

Nordmann ve arkadaşlarının (2017), yapmış olduğu çalışmada da IL1 β , IL6 ve TNF α gibi proinflamatuvar sitokinlerin hem insan hem de fare adalarına uygulanması β -hücrelerinin geri

farklılaşmasına neden olurken, anti-inflamatuar maddelerin (anti-IL1 β , anti-TNF α ya da NFkB'yi inhibe eden sodyum salisilat) uygulanması ile β -hücre farklılaşması sağlanmıştır.



3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1 HÜCRE KÜLTÜRÜ UYGULAMALARI

22-26 pasaj sayısı aralığındaki INS1E sıçan β -hücreleri %10 fetal sığır serumu (FBS; Capricorn), %1 Penisilin-Streptamisin (PES; 100 U/mL, penisilin G100, 100 μ g/mL, streptamisin; Lifetech), %1 L-glutamin (200 nM, Lifetech), 10 mM HEPES (Sigma), 1mM sodyum pirüvat (Gibco) ve 50 μ M β -merkaptöetanol (Sigma) içeren RPMI 1640 (Gibco) medyumunda, 37 °C ve %5 CO₂, %95 nemli ortamda inkübe edildi (Gezginci-Oktayoglu ve diğ., 2021). INS1E hücrelerine Central BioHub firması tarafından sağlanan 3'er adet sağlıklı, PD'li ve T2D'li bireylerden elde edilmiş olan serum örnekleri uygulandı. Uygulanan serum örneklerinin HbA1c seviyeleri ile donörlerin cinsiyet, yaş, boy, kilo ve vücut kütle endeksi bilgileri **Tablo 3.1:**'de verilmiştir. Ayrıca, öncül yayınlarda IL1 β sitokininin β -hücre dediferensiyasyonuna neden olabileceği belirlendiğinden dolayı dediferensiyasyonun pozitif kontrolü olarak bu sitokin de INS1E hücrelerine uygulandı. Hücrelere uygulanacak olan serum örnekleri için FBS'nin olmadığı destekleyici bir medyum hazırlanması amacıyla sığır serum albümini (BSA; Sigma) kullanıldı. Hücre canlılığını en az etkileyecek BSA konsantrasyonu MTT hücre canlılık testi ile belirlendi.

Deney şartları:

- Sağlıklı Serum (SS): %1 Sağlıklı İnsan Serumu+ %5 BSA içeren RPMI
- Pre-Diyabetik Serum (PD): %1 PD'li Hasta Serumu+%5 BSA içeren RPMI
- Tip 2 Diyabetik Serum (T2D): %1 T2D'li Hasta Serumu+%5 BSA içeren RPMI
- Geri Farklılaşma Pozitif Kontrolü: 1 ng/mL IL1 β + %10 FBS içeren RPMI

Tablo 3.1: INS1E hücrelerine uygulanan serum örneklerinin HbA1c değerleri ile donörlerin cinsiyet, yaş, boy, kilo ve vücut kütle endeksi bilgileri. Ortalama değerler verilmiştir (n=3).

DONÖR	HbA1c	CİNSİYET	YAŞ	BOY (m)	KİLO (kg)	VÜCUT KÜTLE ENDEKSİ (BMI; kg/m ²)
Sağlıklı	%4,8±0,03	Kadın	62±0,50	1,80±0,07	85±2,0	26±3,0
PD	%6,4±0,03	Kadın	51±0,88	1,74±0,05	69±4,0	23±2,0
T2D	%7,2±0,03	Kadın	56±1,18	1,78±0,04	93±5,0	29±2,0

3.2 HÜCRE CANLILIK TESTİ

MTT testi hücre canlılığı, proliferasyonu ve sitotoksitenin bir göstergesi olarak hücre metabolik aktiviteyi ölçmek için kullanılmaktadır. Bu kolorimetrik testin prensibi, sarı bir tetrazolyum tuzunun (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür veya MTT) metabolik olarak aktif hücreler tarafından mor formazan kristallerine indirgenmesine dayanır (Berridge ve Tan, 1993). Canlı hücreler, MTT'yi formazana indirgeyen NAD(P)H'ye bağımlı oksidoredüktaz enzimleri içerir. Çözünmeyen formazan kristalleri, dimetil sülfoksit (DMSO) kullanılarak çözündürülür ve elde edilen renkli solüsyon, çok kuyulu bir spektrofotometre kullanılarak 450 nanometre dalga boyunda absorbansı ölçülür (Wang ve Roper, 2014).

Serum örneklerinin FBS içermeyen medyum içinde uygulanabilmesi için FBS dışında hücreleri destekleyici bir ortam olarak BSA'lı medyumun ve uygulanacak serum örneklerinin BSA'lı medyuma kıyasla hücre canlılığına etki etmeyecek konsantrasyonlarının belirlenebilmesi amacıyla MTT testi uygulandı. Böylece hücrelerde anlamlı bir canlılık kaybına neden olmayan BSA konsantrasyonu desteğiyle ve BSA'lı medyuma kıyasla IC50 değerinin üzerindeki konsantrasyonda hücrelerin büyük çoğunluğunun canlılığını koruyan ve aynı zamanda proliferasyona neden olmayan serum konsantrasyonu belirlendi. Daha sonrasında geri farklılaşmanın belirlendiği konsantrasyon ve sürede hücre canlılığındaki değişimler belirlendi.

MTT canlılık testi için hücreler %0,25 tripsin- EDTA (Thermo) uygulanarak kaldırıldı ve 96 kuyulu plakalara kuyu başına 5×10^4 hücre ekildi. Yaklaşık %80 konfluensiye ulaşıldığında serum örnekleri 24 saat süre ile uygulandı. Hücrelere 5 mg/mL stok MTT'den 30 μ L uygulandı ve 4 saatlik inkübasyon süresinin sonunda oluşan formazan kristalleri DMSO ile çözündürülüp

optik yoğunluk 570 nm dalga boyunda mikroparka okuyucuda (BioTek, μ Quant) belirlendi (Coskun ve diğ., 2017).

WST-1, MTT gibi bir tetrazolyum tuzudur. Mitokondriyal dehidrogenazlar tarafından formazan kristallerine dönüştürülür. Ancak oluşan formazan MTT'den farklı olarak suda çözünen formdadır. Oluşan formazan direkt olarak hücrede bulunan dehidrogenazlarla ilişkilidir. Bu yüzden WST-1 ile aynı zamanda hücrelerin metabolik aktivitesi de ölçülebilir (Ishiyama ve diğ., 1993). Kısaca hücreler MTT testinde olduğu gibi deneye hazır hale getirildikten 48 saat sonra 10 μ L WST-1 hücrelere uygulandı. 4 saat, 37°C'de inkübasyondan sonra optik yoğunluk 450 nm dalga boyunda mikroparka okuyucuda (BioTek, μ Quant) belirlendi.

3.3 GERÇEK ZAMANLI GERİ ÇEVİRİM POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (QRT-PCR)

Deney şartları, INS1E hücrelerine 48 saat uygulandıktan sonra β -hücre geri farklılaşmasının belirlenebilmesi amacıyla olgun β -hücre genleri *INS2*, *NeuroD1*, *PDX1* ve *SLC2A2*; pre-endokrin hücre belirteç geni *NEUROG3*; pankreatik multipotent hücre belirteç genleri *PTF1A* ve *NKX6.1* ve kök hücre belirteçleri *OCT4*, *NANOG*, *Vimentin* ve *Nestin* genlerinin anlatım düzeyleri qRT-PCR tekniği kullanılarak ölçüldü. Bu teknik 5 basamakta gerçekleştirildi:

3.3.1 RNA İzolasyonu

INS1E hücrelerine 48 saat süre ile %1 konsantrasyonda serum örnekleri ve geri farklılaşmanın pozitif kontrolü olarak 1 ng/mL IL1 β uygulandı. Uygulama sonunda EcoPURE Total RNA İzolasyon Kiti'nin talimatlarına uyularak RNA izolasyonu yapıldı. Kısaca, hücreler kuyulardan kaldırıldıktan sonra 1200 rpm'de santrifüjlendi ve pelete 400 μ L Ecopure lizis/bağlanma tamponu eklendikten sonra tüpler 10 sn boyunca vortekslendi. Daha sonra 400 μ L absölü etanol lizatlara eklendi ve tüpler karıştırıldı. Lizat etanol karışımı Ecopure kolonlarına aktarıldı ve en yüksek hızda 30 sn oda ısısında santrifüjlendi. Toplama tüpündeki sıvı atıldı. Kolonlara 400 μ L Ecopure yıkama tamponu 1 eklendi ve yine santrifüj yapıldı. Kolonlar iki kez Ecopure yıkama tamponu-2 ile yıkandıktan sonra Ecopure kolonlar temiz bir ependorf tüpe alındı ve üzerlerine 50 μ L Ecopure elüsyon tamponu eklendi. Oda ısısında 1 dk inkübasyondan sonra tüpler, en yüksek hızda, 30 sn, oda ısısında santrifüj edildi ve daha sonra tüplerdeki RNA yeni bir santrifüj tüpüne alındı. Elde edilen RNA'nın saflaştırılması için DNaz I (Thermo) uygulandı ve 37 °C'de 30 dakika inkübe edildi. Daha sonra 15 mM EDTA (Sigma) 75°C'de 5 dakika uygulanarak

DNAaz'ın inhibisyonu sağlandı. İzole edilen RNA miktarları ve saflıkları Nanodrop cihazı kullanılarak (Shimadzu Biotech, BioSpec-nano) belirlendi.

3.3.2 cDNA Eldesi

1 µg RNA, High-Capacity cDNA Reverse Transcription kiti (Thermo) kullanılarak cDNA'ya çevrildi. cDNA eldesi için gerçekleştirilen basamaklar **Tablo 3.2:**'de özetlenmiştir. Elde edilen cDNA örneklerinin miktarları (A260) ve saflıkları (A260/A280) Nanodrop cihazı (Shimadzu Biotech, BioSpec-nano) kullanılarak belirlendi.

Tablo 3.2: cDNA çevrimi için uygulanan basamaklar.

Ayarlar	1. Basamak	2. Basamak	3. Basamak	4. Basamak
Sıcaklık	25°C	37°C	85°C	4°C
Zaman	10 dk.	120 dk.	5 dk.	Bekleme

3.3.3 qPCR ile Gen Ekspresyon Analizi

300 ng cDNA, 10 µL SYBR Green (GeneBioMark) ve primer karışımı (Eurofins) PCR tüplerine eklenerek son hacim RNAz-DNAz içermeyen su ile 20 µL'ye tamamlandı. Gen ekspresyon analizleri için kullanılan primer dizileri **Tablo 3.3:**'de; üreticinin talimatlarına uygun olarak gerçekleştirilen qPCR basamakları ise **Tablo 3.4:**'de verilmiştir. İnternal kontrol gen olarak 18sRNA ve kontrol grup olarak sağlıklı insan serumunun uygulandığı hücrelerden elde edilen eşik döngüsü (CT) değerleri kullanıldı. Sonuçlar Livak yöntemine göre $2^{-\Delta\Delta CT}$ formülüyle hesaplandı (Ercin ve diğ., 2018).

Tablo 3.3: qRT-PCR çalışmaları için kullanılan primer dizileri.

Gen	Forward Primer	Reverse Primer	Kaynak
INS2	TCTTCTACACACCCATGTCCC	GGTGCAGCACTGATCCAC	Xiao ve diğ., 2019
SLC2A2	GACACCCCACTCATAGTCACA	CAGCAATGATGAGAGCATGTG	Ren ve diğ., 2016
NeuroD1	TCAGCATCAATGGCAACTTC	AAGATTGATCCGTGGCTTTG	Song ve diğ., 2023
PDX1	GGATGAAATCCACCAAAGCTCAC	AGCATCACTGCCAGCTCCA	Kiba, 2022
NEUROG3	CTGCGCATAGCGGACCACAGCTTC	CTTCACAAGAAGTCTGAGAACACCAG	Yang ve diğ., 2017
Pax4	GTATCTAATGGCTGTGTGAGC	CTGGGAGCCTTGTCCTGGGTAC	Lee ve diğ., 2009
FoxO1	GCCGTGCTACTCGTTTGC	CTTGGGTCAGGCGGTTC	Wu ve diğ., 2012
PTF1A	CCTCTCCAAGGTAGACACGC	CTTGGGATGTGGTGTCACTG	Akinci ve diğ., 2012
OCT4	GGGATGGCATACTGTGGAC	CTTCCTCCACCCACTTCTC	Meek ve diğ., 2010
NANOG	GCCCTGAGAAGAAAGAAGAG	CGTACTGCCCCATACTGGAA	Li ve diğ., 2016
Nestin	AGAGAAGCGCTGGAACAGAG	AGGTGTCTGCAACCGAGAGT	Miao ve diğ., 2018
Vimentin	ACATCCACCCGCACCTAC	CAACTCCCTCATCTCCTCCTC	Li ve diğ., 2010
18sRNA	CATTGGAACGTCTGCCCTAT	GTTTCTCAGGCTCCCTCTCC	Uchida ve diğ., 2010

Tablo 3.4: qRT-PCR basamakları.

qRT-PCR Aşamaları	Sıcaklık	Zaman	
Ön Denatürasyon	95 °C	2 dk.	
Denatürasyon	95 °C	10 sn.	45 Döngü
Primerlerin bağlanması	60 °C	10 sn.	
Uzama	72 °C	20 sn.	

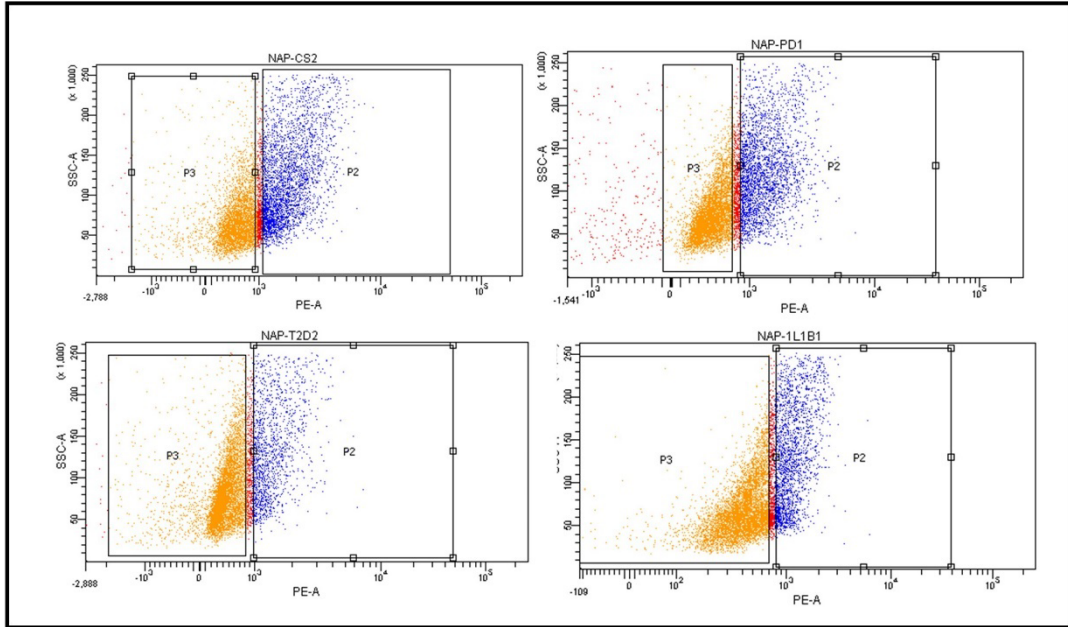
3.4 AKIM SİTOMETRİK ANALİZLER

3.4.1 İnsülin İşaretleme ile Geri Farklılaşan Hücre Popülasyonunun Belirlenmesi

β -hücre belirteci olgun insülin üreten hücre popülasyonu ile insülin üretmeyen öncül hücre popülasyonu akım sitometri yöntemi ile belirlendi. Bu yöntem için 6 kuyulu kültür kaplarına ekilen INS1E hücreleri kap yüzeyini doldurduktan sonra deney şartları 48 saat uygulandı. Deney süresinin sonunda hücreler %0,25 Tripsin-EDTA (Gibco) ile kaldırıldı ve 1×10^6 yoğunlukta olacak şekilde akım sitometri tüplerine alındıktan sonra işaretleme tamponu ile yıkandı, ardından %2 paraformaldehit (Merck) ile 10 dakika boyunca $+4^\circ\text{C}$ 'de fiks edildi. Hücreler, %0,5 Triton X-100 (Sigma) içeren PBS'te 10 dakika boyunca oda ısısında permeabilize edildi. Sonrasında FBS içeren işaretleme tamponu içinde 1:1000 oranında sulandırılan tavşandan elde edilmiş anti-sığan insülin-PE konjuge antikor (Abcam) ve ayrıca hücrelerde otofloresans ya da özgün olmayan bağlanmadan kaynaklanan floresans sinyalin tespit edilebilmesi için PE-konjuge tavşan IgG (R&D Systems) izotip kontrolü 1:10 oranında, karanlıkta, oda ısısında, 30 dakika boyunca uygulandı. İnkübasyon bitiminde hücreler işaretleme tamponuna alınıp floresans kanal 2 (FL2)'de FACS Calibur (BD) akım sitometri cihazı kullanılarak analiz edildi (Ercin ve diğ., 2018). İnsülin negatif hücre popülasyonlarının oranları ölçüldü ve elde edilen verilere göre insülin taşımayan hücre popülasyon oranı belirlendi.

3.4.2 Akım Sitometrik Hücre Ayrımı (FACS) Yöntemi ile İnsülin⁺ Hücre Popülasyonu ve İnsülin⁻ Hücre Popülasyonunun İzole Edilmesi

1×10^6 hücre 75 cm^2 'lik kültür flasklarına ekildi ve %80 konfluensiye ulaşıldığında deney şartları 48 saat süreyle uygulandıktan sonra %0,25 Tripsin-EDTA ile hücreler kaldırıldı. Her bir deney şartından yaklaşık 20×10^6 hücre akım sitometri tüplerine alındı ve işaretleme tamponu ile yıkandıktan sonra insülin işaretlemesi 3.4.1 alt başlığında belirtildiği şekilde yapıldı. Laboratuvarımızda bulunan BD FACS Calibur cihazı ile hücre ayrımı yapılamadığından hücre ayırma işlemleri İstanbul Üniversitesi ASDETAE'de bulunan BD FACS Aria hücre ayırma cihazı kullanılarak hizmet alımı şeklinde tarafımızca gerçekleştirildi.



Şekil 3.1: İki popülasyonun ayrımında kullanılan plotlar ve kapılar verilmiştir. P2: İnsülin⁺ hücre popülasyonu kapısı, P3: İnsülin⁻ hücre popülasyonu kapısı.

3.4.3 Annexin V/PI İşaretlemesi ile Apoptotik ve Nekrotik Hücre Ölüm Oranlarının Belirlenmesi

Annexin V/PI işaretlemesi, serum örnekleri ve geri farklılaşmanın pozitif kontrolü olarak IL1 β uygulanan hücrelerdeki apoptotik ve nekrotik ölüm oranlarını belirleyebilmek amacıyla yapıldı. 6 kuyulu plakalara ekilmiş ve %80 konfluensiye ulaşmış olan hücrelere 48 saat süreyle deney şartları uygulandıktan sonra hücreler kaldırıldı ve 1×10^6 hücre olacak şekilde akım sitometri

tüplerine alındı. Daha sonra içlerinden 1×10^5 hücre yeni tüplere ayrıldı. Hücreler PBS ile yıkandıktan sonra 37°C 'de 15 dk. RNAz uygulaması yapıldı. İnkübasyon sonrası Annexin V/PI işaretlemesi AAT Bioquest Cell Meter Annexin V Binding Apoptosis Assay Kit'in talimatlarına göre yapıldı. Akım sitometri cihazında analizler Annexin V için FL1 kanalı, PI için FL2 kanalı kullanılarak yapıldı. Dot plotta quadrant kapı kullanılarak Annexin V⁺/PI⁺ apoptotik hücre popülasyonu ve Annexin V⁺/PI⁺ nekrotik hücre popülasyonları yüzde olarak belirlendi (Chen ve diğ., 2022).

3.4.4 JC-1 İşaretlemesi ile Mitokondriyal Membran Potansiyelinin ($\Delta\Psi\text{m}$) Belirlenmesi

Mitokondriyal membran potansiyeli, katyonik bir boya olan 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyaenina iodide (JC-1; Santa Cruz) kullanılarak ölçüldü. Canlı hücrelerde mitokondrileri biriken JC-1 (maksimum absorpsiyon/emisyon 585/590 nm) den dolayı kırmızı işaretlenirken, ölen hücrelerde boya monomerik formda (maksimum absorpsiyon/emisyon 510/530 nm) olduğundan hücreler yeşil görünür. Kırmızı (agregat JC-1) / Yeşil (Monomerik JC-1) floresans yoğunluğu mitokondriyal membran potansiyelini verir (Bassino ve diğ., 2015). Kısaca, 6 kuyulu plakalara ekilmiş ve %80 konfluensiye ulaşmış olan hücrelere 48 saat süreyle deney şartları uygulandıktan sonra hücreler kaldırıldı ve 1×10^6 hücre akım sitometri tüplerine alındı. JC-1, 2.5 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda, 15 dk. süreyle 37°C 'de uygulandı. İnkübasyon sonrasında hücreler PBS ile yıkandıktan sonra akım sitometri cihazında FL1 ve FL2 kanalında analize alındı, FL2/FL1 oranı $\Delta\Psi\text{m}$ olarak hesaplandı.

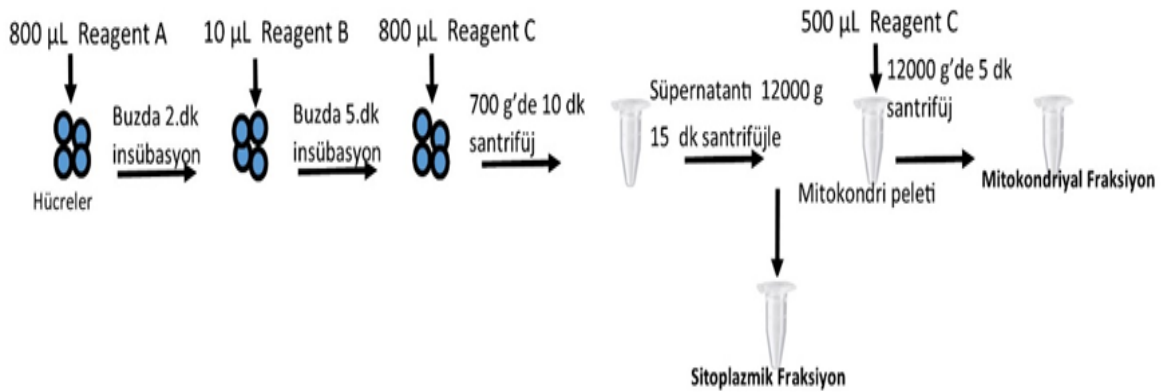
3.5 SIMPLE WESTERN

Hedef proteinlerin miktarlarının belirlenmesi için Simple Western yöntemi kullanıldı. Bu yöntem, kapalı bir sistemde geleneksel Western Blotlama veya ELISA tekniğinin çok basamaklı uygulamaları sırasında uygulayıcıdan kaynaklanan hataları bertaraf ederek az miktarda örnek ile kısa sürede hassas bir değerlendirme yapılabilme imkanı tanıdığından geleneksel western blot metoduna üstünlük sağlamaktadır (Nguyen ve diğ., 2011).

3.5.1 Mitokondriyal Fraksiyon ve Sitoplazmik Fraksiyon İzolasyonu

Mevcut projede dediferensiyasyon mekanizmasının araştırılması kapsamında sağlıklı, PD'li ve T2D'li insanların serum örneklerinin ve IL1 β 'nın INS1E hücrelerine uygulanmasını takiben β -hücre belirteci olgun insülin üreten hücre popülasyonu ile insülin üretmeyen öncül hücre

popülasyonunun sitoplazmik ve mitokondriyal fraksiyonları Mitokondriyal İzolasyon Kiti (Thermo Scientific)'nin uygulama talimatlarına uyularak izole edildi. Kısaca, insülin üreten hücre popülasyonları ve insülin üretmeyen öncül hücre popülasyonlarına 800 μ L Mitokondri İzolasyon Reaktif-A eklendi ve 5 sn. boyunca orta hızda vortekslendikten sonra 2 dk. buz üzerinde bekletilen tüplerin içerisine 10 μ L Mitokondri İzolasyon Reaktif-B koyuldu. Tüpler yüksek hızda vortekslendi ve 5 dk. buzda bekletildikten sonra 800 μ L Mitokondri İzolasyon Reaktif-C eklendi. Elde hafif çalkalanan tüpler 700 g hızda 10 dk. +4 °C'de santrifüjlendi ve süpernatant yeni 1,5 mL'lik ependorflara alındı. Daha sonra 12.000 g hızda 15 dk. boyunca +4 °C'de tekrar santrifüj yapıldı. Santrifüj sonunda süpernatantta bulunan sitoplazmik fraksiyonlar temiz ependorflara alındı. Peletin üzerine 500 μ L Mitokondri İzolasyon Reaktif-C eklendi ve 12.000 g hızda 5 dk. santrifüjlendi. Süpernatant atıldı ve pelette bulunan mitokondrilerin izolasyonu için %2 SDS içeren 150 mM Tris tamponu eklendi. Daha sonra vortekslenen tüm tüpler en yüksek santrifüj hızında 2 dk. santrifüjlendi. Süpernatantta bulunan mitokondriyal fraksiyon yeni tüplere alındı. **Şekil 3.2:**'de mitokondriyal fraksiyonun izolasyonu için uygulanan aşamalar şematize edilmiştir. İzole edilen sitoplazmik ve mitokondriyal fraksiyonların protein miktarları nanodrop (Shimadzu Biotech, BioSpec-nano) cihazı ile (A280) ölçüldü.



Şekil 3.2: Mitokondriyal fraksiyonun izolasyonu için kullanılan kitin aşamaları.

3.5.2 Simple Western Yöntemi

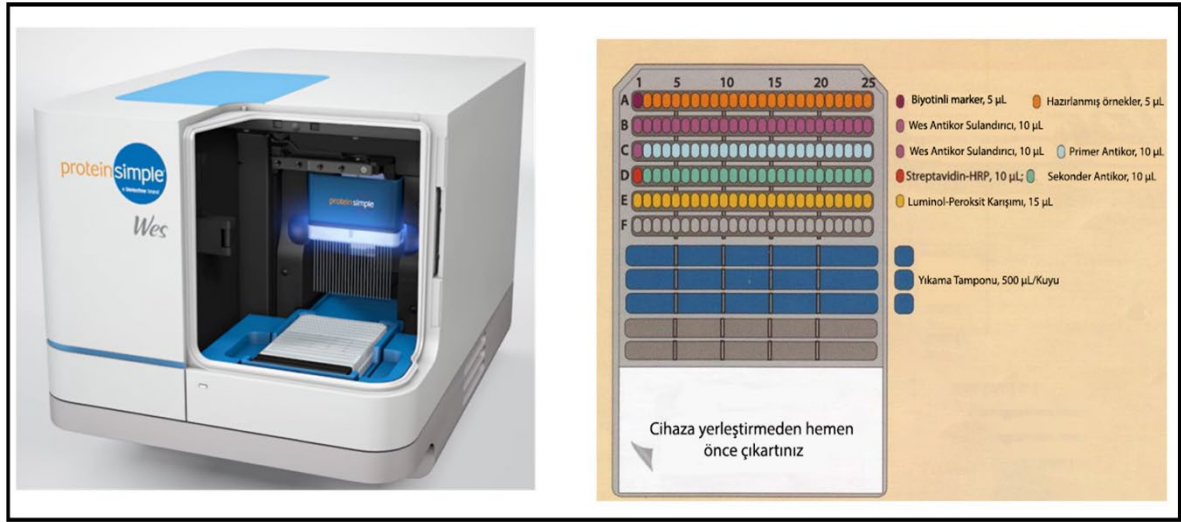
Simple Western analizleri Wes Sistemi (Protein Simple) ile yapıldı. Bu analiz için numuneler, 5X Floresan Standardı ve DTT ile seyreltilerek hazırlandı. Numuneler, 95°C'de 5 dakika

süreyle denatüre edildi ve ardından örneklerdeki proteinler 12-230 kDa Wes nanokapiller ayırma modülünde ayrıştırıldı. Hedef proteinlere özgü tavşanda ve farede üretilmiş primer antikorlar Protein Simple Antikor Sulandırıcı ile sulandırılarak önerilen dilüsyonlarda uygulandı. Anti-tavşan ile anti-fare saptama modülündeki tavşan ve fare primer antikorlarına uygun HRP işaretli sekonder antikorlar ile özgün reaksiyonların geliştirilmesi sağlandı. Luminol S ile kemiluminesans sinyal elde edildi. Sitoplazmik fraksiyon yükleme kontrolü olarak β -aktin, mitokondriyal fraksiyon yükleme kontrolü olarak VDAC1 kullanıldı ve elde edilen kemiluminesans sinyal ile normalizasyon yapıldı (Gezginci-Oktayoglu ve diğ., 2021). Sitoplazmik fraksiyonda insülin, ER stres belirteci CHOP ve GRP78; apoptoz belirteci olarak aktif-kaspaz 3, mitokondriyal fraksiyonda ise mitokondriyal stres belirteci HSP60; mitokondriyal füzyon belirteçleri OPA1 ve Mfn2; mitokondriyal fisyon belirteçleri DRP1 ve Fis1; mitofaji belirteçleri PINK1 ve PARKIN proteinlerinin seviyeleri özgün primer antikorlar kullanılarak belirlendi. **Tablo 3.5:**'te Simple Western yöntemi için kullanılan antikorlar, **Şekil 3.3:**'te ise Simple Western kuyularının hazırlanışı verilmiştir.

Tablo 3.5: Simple Western yöntemi için kullanılan antikorlar ve sulandırma oranları.

Antikor	Konak	Dilüsyon	Marka
İnsülin	Tavşan	1:20	Abcam
GRP78/HSPA5	Tavşan	1:25	Novus
CHOP/GADD153	Tavşan	1:50	Novus
HSP60	Tavşan	1:500	Novus
Mfn2	Tavşan	1:100	Novus
OPA1	Tavşan	1:50	Novus
DRP1	Tavşan	1:50	Novus
Fis1	Tavşan	1:50	Novus
Pink1	Tavşan	1:100	Novus
Parkin	Tavşan	1:50	Novus
Kaspaz-3 (pro ve kesilmiş)	Tavşan	1:100	Novus

UCP2	Tavşan	1:10	CST
IL1 β	Tavşan	1:10	Santa Cruz
VDAC1	Tavşan	1:10	Novus
B-aktin	Tavşan	1:12,5	Biolegend



Şekil 3.3: Simple Western cihazı ve kuyuların hazırlanışı.

3.6 MİTOKONDİRİYAL KİTLENİN BELİRLENMESİ

MitoTracker boyaları, hafif tiyol reaktif klorometil parçası içeren hücreye nüfuz eden mitokondri boyalarıdır. İnkübasyonun ardından MitoTracker boyaları, plazma zarı boyunca pasif olarak yayılır ve canlı hücrelerin mitokondrilerinde birikir (Clutton ve diğ., 2019).

3.6.1 Florimetrik Ölçüm

Florimetre ile hücrelerdeki mitokondri miktarının belirlenebilmesi amacıyla öncelikle siyah 96 kuyulu plakalara 5×10^4 hücre ekildi ve %80 konfluensiye ulaşan kuyulara deney şartları 48 saat boyunca uygulandıktan sonra MitoTracker Green boyası (Thermo Scientific) 400 nM konsantrasyonda 15 dk boyunca 37 °C’de uygulandı. Uygulama bitiminde florimetrede (BioTek μ quant) eksitasyon 490/ emisyon 516 nm dalga boyunda absorbands değerleri okundu. Daha sonra normalizasyon için plakalardaki hücrelere proteaz ve fosfotaz inhibitörü içeren lizis

tamponu (Cell Signaling Technologies, CST) koyuldu ve ultrasonikatörde 10 sn sonikasyon 10 sn buzda bekletme basamakları 5 kez tekrarlanarak hücreler lizis edilip protein miktarları Bradford yöntemi ile belirlendi. Kısaca 80, 40, 20, 10 ve 8 µg/mL konsantrasyonlarda BSA standart çözeltileri hazırlandı. Örnekler 1:160 oranında ultra saf su ile sulandırıldı ve standartlar ile örnekler 96 kuyulu mikrolakalara 160 µL olacak şekilde eklendi. Daha sonra 40 µL Bradford boyası üzerlerine eklenip, 5 dakika oda ısısında inkübe edildikten sonra mikrolaka okuyucuda (Biotek-µquant) 595 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçüldü. Standart grafik kullanılarak protein miktarları hesaplandı.

3.6.2 Floresan Mikroskopik Analiz

Deney şartları arasında hücrelerin mitokondri şekil ve boyutları arasındaki farkın belirlenebilmesi amacıyla MitoTracker Green boyası ile işaretlenen hücreler floresans mikroskopta görüntülendi. Kısaca, 1×10^5 hücre 12 mm çaplı yuvarlak cam lamellerin üzerine ekildi ve deney şartları 48 saat uygulandı. Deney süresi bitiminde MitoTracker Green boyası 400 nM konsantrasyonda 15 dk boyunca 37°C’de uygulandı ve inkübasyon süresi sonunda hücreler PBS ile yıkandı. Daha sonra hücreler %4 paraformaldehit ile fiksle edildi. Hücreler PBS ile yıkandıktan sonra floresan mikroskopta FITC filtresi kullanılarak (Olympus, BX53) görüntüleme yapıldı.

3.7 LC-MS/MS (SIVI KROMATOĞRAFİSİ-KÜTLE SPEKTROMETRESİ)

Serum örneklerindeki proteinler LC-MS/MS yöntemiyle analiz edildi. Laboratuvarımızda gerekli alt yapı bulunmadığından, bu çalışma Acıbadem LabMed Sağlık Hizmetleri A.Ş.’den hizmet alımı şeklinde gerçekleştirildi. Kısaca, serum örneklerindeki proteinler tripsin uygulaması ile enzimatik olarak peptidlere sindirildi ve peptidler nanoUPLC-ESI-qTOF-MS sistemine tabi tutuldu (nanoultra-performans LC ve ESI kuadrupole TOF MS, Waters). Sağlıklı, PD’li ve T2D’li serum örneklerindeki proteinlerin ifade farklılıkları (kantitatif değerler) Progenesis LC-MS yazılım ile hesaplandı (Haçarız ve diğ., 2014).

PD’li ve T2D’li hastaların serum örnekleri ve sağlıklı kontrol serum örnekleri arasındaki ifade farklılığı $\geq 1,5$ olan proteinler ifadesi artan proteinler olarak kabul edildi. Ayrıca p-değeri (p) $< 0,05$ olan proteinlerdeki değişimler anlamlı kabul edildi. Analiz için tanımlanan peptid sayıları 1 olan proteinler değerlendirme dışı bırakıldı. Proteomik veriler UniProt protein veri tabanında araştırıldı (Yılmaz ve diğ., 2016). Proteinlerin biyoinformatik analizleri için birbirleriyle

etkileşen proteinlerin belirlenmesi amacıyla arama aracı olarak (STRING; Szklarczyk ve diğ., 2015) ve Qiagen Ingenuity Pathway Analysis (IPA) veri tabanları kullanıldı. Ayrıca ısı haritası ve volkan plot grafikleri için Graphpad Prism 9.0 istatistik programı kullanıldı. Isı haritası grafiği için p-değerlerinin $-\log_{10}$ 'u kullanıldı. Volkan plot için ise katlı artışların $\log_2$ değerleri ile q değerlerinin $-\log_{10}$ değerleri kullanıldı.

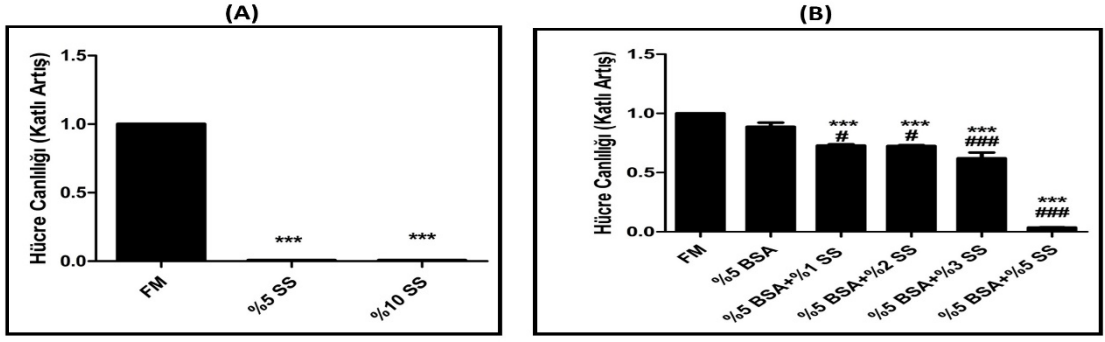
3.8 İSTATİKSEL ANALİZ

Tüm deneyler 3 tekrarlı olarak yapıldı. ANOVA testini takiben çoklu karşılaştırmalar Tukey testi uygulandı. Sonuçlar ortalama $\pm$ SEM olarak hesaplandı ve $p<0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1 HÜCRE CANLILIK TESTİ BULGULARI

Geri farklılaşmanın *in vitro* ortamda gösterilebilmesi amacıyla sağlıklı, pre-diyabetli ve T2D'li serum örneklerinin INS1E β -hücrelerine uygulanması planlandı. Normal şartlarda hücre kültüründe INS1E β -hücrelerinin canlılığını desteklemek amacıyla %10 FBS içeren medyum kullanılmaktadır. İnsan serum örneklerinin FBS'nin içerdiği proteinler ile etkileşiminin önüne geçebilmek amacıyla öncelikle FBS içermeyen medyumun içinde sağlıklı insan serum örnekleri %5 ve %10 konsantrasyonlarda 24 saat süre ile INS1E hücrelerine uygulandı ve bu konsantrasyonların hücrelerin canlılığı üzerindeki etkisi MTT canlılık testi ile belirlendi. Her iki konsantrasyonda da serum örneklerinin FBS içeren tam medyum (FM) kontrol şartına kıyasla hücre canlılığını büyük oranda azalttığı belirlendi ($p<0,001$). 24 saat serum örnekleri uygulanan hücrelerin canlılık oranları sırasıyla; FM: $1,00\pm0,00$, %5 Serum: $0,007\pm0,00$, %10 Serum: $0,007\pm0,00$ olarak hesaplandı. Dolayısıyla insan serum örneklerinin hücrelere FBS'ye benzer bir destek protein içeren medyum içerisinde uygulanması gerektiği düşünüldü (**Şekil 4.1:(A)**). Bunun için %5 BSA içeren medyum hazırlandı (Paula ve diğ., 2015) ve bu medyum içerisinde %1, %2, %3 ve %5 konsantrasyonlardaki serum örnekleri INS1E hücrelerine uygulandı. %5 BSA'lı medyumun kontrol FM medyumuna kıyasla hücre canlılığına etki etmediği ancak %1 ($p<0,001$), %2 ($p<0,001$), %3 ($p<0,001$) ve %5 ($p<0,001$) sağlıklı serum örnekleri ile hazırlanan medyumların kontrol FM medyumuna kıyasla hücre canlılığını anlamlı olarak azalttığı belirlendi. %5 BSA'lı medyumla kıyasla %1 ($p<0,05$), %2 ($p<0,05$), %3 ($p<0,001$) ve %5 ($p<0,001$) sağlıklı serum örnekleri ile hazırlanan medyumların hücre canlılığını azalttığı belirlendi. Uygulanan medyumların hücre canlılık oranları sırasıyla; FM: $1,00\pm0,00$, %5 BSA: $0,89\pm0,04$, %5 BSA+%1 Serum: $0,73\pm0,01$, %5 BSA+%2 Serum: $0,72\pm0,01$, %5 BSA+%3 Serum: $0,62\pm0,05$, %5 BSA+%5 Serum: $0,04\pm0,00$ olarak hesaplandı. IC50 değerinden daha düşük ve hücrelerin yaklaşık %80'inin canlılığını koruduğu belirlenen %5 BSA+%1 serum örneklerinin kullanılmasına karar verildi (**Şekil 4.1: (B)**).

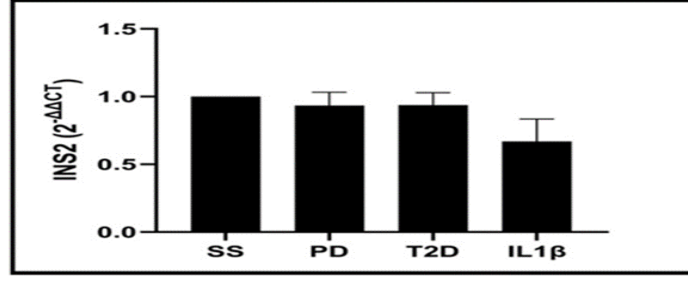


Şekil 4.1: (A) 24 saat süre ile %5 ve %10 serum örneği uygulamasının INS1E hücrelerinin canlılığı üzerine etkileri, (B) 24 saat süre ile %5 BSA'lı medyum ve bu medyumun içinde %1-%5 konsantrasyonda uygulanan serum örneklerinin INS1E hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkileri verilmiştir. *** $p<0,001$ FM'ye göre, # $p<0,05$ ve #### $p<0,001$ %5 BSA'ya göre. FM: Tam medyum, SS: Sağlıklı insanlardan elde edilen serum örneği.

4.2 BETA HÜCRE GERİ FARKLILAŞMASI İLE İLGİLİ BULGULAR

4.2.1 24 Saatlik Deney Süresinin Sonunda *INS2* Gen Ekspresyonu Seviyeleri

Hücre canlılığı bulgularına göre belirlenen konsantrasyonlarda serum örnekleri INS1E hücrelerine uygulandıktan sonra geri farklılaşmanın gerçekleşme süresinin belirlenebilmesi amacıyla öncelikle 24. saatte olgun β -hücre belirteç geni *INS2* gen ekspresyon seviyelerindeki değişiklik qRT-PCR yöntemi ile belirlendi. Buna göre deney gruplarında SS kontrol grubuna kıyasla *INS2* gen ekspresyonunda anlamlı bir değişiklik olmadığı, dolayısıyla geri farklılaşmanın 24. saatte gerçekleşmediği belirlendi. Grupların *INS2* gen ekspresyon seviyeleri sırasıyla, SS: $1,00\pm0,00$, PD: $0,93\pm0,07$, T2D: $0,94\pm0,07$, IL1 β : $0,67\pm0,12$ olarak hesaplandı (Şekil 4.2.1:). Etkin geri farklılaşmanın 24 saatten daha uzun sürede gerçekleştiği düşünülerek deney süresi 48 saat olarak belirlendi.



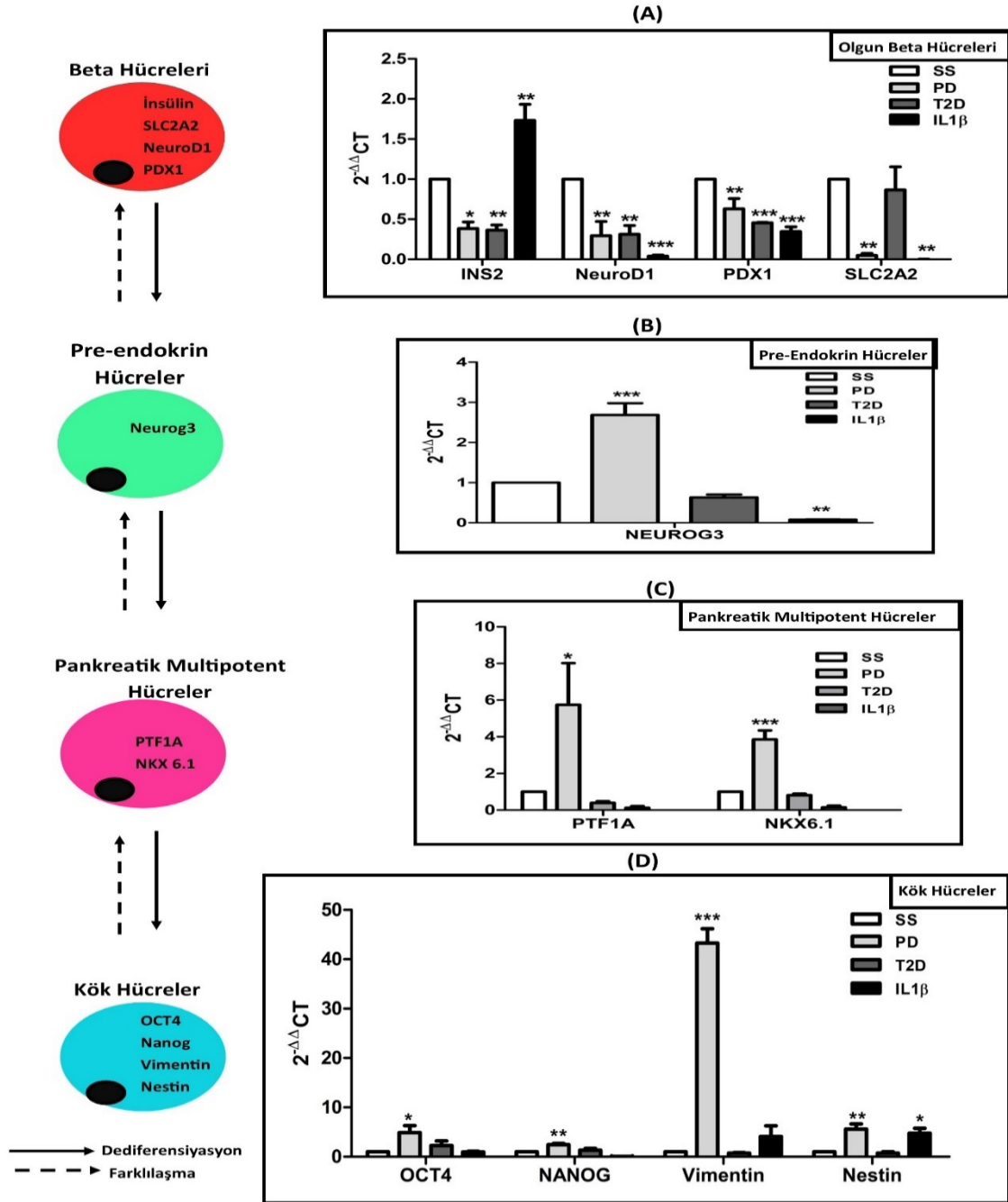
Şekil 4.2.1: 24. saatte *INS2* gen ekspresyon seviyelerine ait grafik verilmiştir.

4.2.2: Gen Ekspresyonu Düzeyinde Elde Edilen Bulgular

Sağlıklı serum (%1; SS), pre-diyabetik serum (%1; PD), tip 2 diyabetik serum (%1; T2D) ve interlökin 1β (1 ng/mL; IL1β) 48 saat süre ile INS1E β-hücrelerine uygulandı. Deney süresinin sonunda hücrelerden RNA izolasyonu yapılarak olgun β-hücre transkripsiyon faktörleri *INS2*, *NeuroD1*, *PDX1* ve *SLC2A2* genleri, pre-endokrin hücre transkripsiyon faktör geni *NEUROG3*, pankreatik multipotent hücre transkripsiyon faktörü *PTF1A* ve NKX6.1 genleri ve kök hücre transkripsiyon faktörleri *OCT4*, *NANOG*, *Vimentin* ve *Nestin* genlerinin ekspresyon düzeyleri qRT-PCR yöntemi ile belirlendi. Olgun β-hücre genlerinden *INS2*'nin gen ekspresyon düzeyi PD ($p < 0,05$) ve T2D ($p < 0,01$) gruplarında SS kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak baskılandığı, ancak IL1β grubunda anlamlı bir artış olduğu ($p < 0,01$) belirlendi. Grupların *INS2* gen ekspresyon seviyeleri sırasıyla, SS: $1,00 \pm 0,00$, PD: $0,38 \pm 0,08$, T2D: $0,36 \pm 0,06$, IL1β: $1,73 \pm 0,20$ olarak hesaplandı. *NeuroD1* gen ekspresyon seviyelerinin ise tüm gruplarda SS kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak baskılandığı belirlendi (PD: $p < 0,01$, T2D: $p < 0,01$, IL1β: $p < 0,001$). Grupların *NeuroD1* gen ekspresyon seviyeleri sırasıyla, SS: $1,00 \pm 0,00$, PD: $0,29 \pm 0,18$, T2D: $0,31 \pm 0,11$, IL1β: $0,04 \pm 0,01$ olarak hesaplandı. Uygulanan deney şartlarının *PDX1* gen ekspresyonu seviyelerinin de SS kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak baskılandığı belirlendi (PD: $p < 0,01$, T2D: $p < 0,001$ ve IL1β: $p < 0,001$). Grupların *PDX1* gen ekspresyon seviyeleri sırasıyla, SS: $1,00 \pm 0,00$, PD: $0,63 \pm 0,13$, T2D: $0,45 \pm 0,01$, IL1β: $0,35 \pm 0,06$ olarak hesaplandı. PD ($p < 0,01$) ve IL1β ($p < 0,01$) uygulamaları *SLC2A2* gen ekspresyonunu SS kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak baskılarken T2D uygulamasının *SLC2A2* gen ekspresyon seviyesini değiştirmedeği belirlendi. Grupların *SLC2A2* gen ekspresyon seviyeleri sırasıyla, SS: $1,00 \pm 0,00$, PD: $0,049 \pm 0,02$, T2D: $0,87 \pm 0,29$, IL1β: $0,00 \pm 0,00$ olarak hesaplandı. Tüm bu sonuçlara göre PD serum örneklerinin INS1E β-hücrelerine 48 saat süre ile uygulanmasıyla

olgun β -hücre genlerinin tümünün gen ekspresyon seviyelerinin baskılandığı, T2D serum örneklerinin etkisinin *SLC2A2* geni hariç PD serum örneklerinin etkisine benzer olduğu belirlendi. Ayrıca, geri farklılaşmanın pozitif kontrolü olarak kullanılan IL1 β 'nın *INS2* gen ekspresyonunu artırdığı ancak diğer genlerin ekspresyonunu baskıladığı tespit edildi (**Şekil 4.2.2: (A)**). Bu bulgulara göre olgun β -hücre genlerinin PD ve T2D serum örneklerinin INS1E hücrelerine uygulanması ile baskılanması, β -hücrelerinin temel fonksiyonu olan insülin üretiminde kayıp olduğuna işaret etmektedir. Geri farklılaşmanın belirlenebilmesi için β -hücre gelişimi esnasında öncül hücrelere özgü genlerin ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi gerekmektedir. Bu amaçla pre-endokrin hücre belirteci olan *NEUROG3*'ün gen ekspresyon seviyesi belirlendi. PD uygulanan hücrelerde *NEUROG3* ekspresyon seviyesinin SS kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak arttığı ($p<0,001$), T2D grubunda bir değişiklik gözlenmediği, IL1 β grubunda ise anlamlı olarak azaldığı ($p<0,01$) belirlendi. Grupların *NEUROG3* gen ekspresyon seviyeleri sırasıyla, SS: $1,00\pm0,00$, PD: $2,69\pm0,29$, T2D: $0,63\pm0,07$, IL1 β : $0,08\pm0,01$ olarak hesaplandı (**Şekil 4.2.2: (B)**). Pankreatik multipotent hücre genleri *PTF1A* ve *NKX6.1*'in ekspresyon seviyeleri belirlendi. *PTF1A* gen ekspresyon seviyesinin sadece PD ($p<0,05$) serum örneği uygulanan hücrelerde SS kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak arttığı belirlendi. Grupların *PTF1A* gen ekspresyon seviyeleri sırasıyla, SS: $1,00\pm0,00$, PD: $5,74\pm2,28$, T2D: $0,38\pm0,10$, IL1 β : $0,12\pm0,10$ olarak hesaplandı. *NKX6.1* gen ekspresyon seviyesinin de sadece PD serum örneği uygulanan hücrelerde SS kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak arttığı ($p<0,001$) belirlendi. Grupların *NKX6.1* gen ekspresyon seviyeleri sırasıyla, SS: $1,00\pm0,00$, PD: $3,85\pm0,50$, T2D: $0,81\pm0,08$, IL1 β : $0,14\pm0,09$ olarak hesaplandı (**Şekil 4.2.2: (C)**). Son olarak geri farklılaşmanın kök hücre düzeyine kadar ilerleyip ilerlemediğinin belirlenebilmesi amacıyla kök hücre belirteç genleri olan *OCT4*, *NANOG*, *Vimentin* ve *Nestin* gen ekspresyon seviyeleri ölçüldü. Buna göre, PD serum örneği uygulanan hücrelerin *OCT4* ($p<0,05$), *NANOG* ($p<0,01$), *Vimentin* ($p<0,001$) ve *Nestin* ($p<0,01$) genlerinin ekspresyon seviyeleri SS kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak arttığı belirlendi. T2D grubunda bir değişiklik gözlenmezken IL1 β uygulaması sonrasında sadece *Nestin* gen ekspresyonunun artırdığı ($p<0,05$) belirlendi. Grupların *OCT4*, *NANOG*, *Vimentin* ve *Nestin* gen ekspresyon seviyeleri sırasıyla, *OCT4* için; SS: $1,00\pm0,00$, PD: $4,92\pm1,40$, T2D: $2,27\pm0,90$, IL1 β : $0,98\pm0,11$. *NANOG* için; SS: $1,00\pm0,00$, PD: $2,42\pm0,25$, T2D: $1,30\pm0,38$, IL1 β : $0,08\pm0,00$. *Vimentin* için; SS: $1,00\pm0,00$, PD: $43,28\pm2,92$, T2D: $0,72\pm0,14$, IL1 β : $4,11\pm2,15$. *Nestin* için; SS: $1,00\pm0,00$, PD: $5,60\pm1,03$, T2D: $0,72\pm0,29$, IL1 β : $4,78\pm0,99$ olarak hesaplandı (**Şekil 4.2.2: (D)**). Tüm gen ekspresyon

seviyelerindeki sonuçlar göz önüne alındığında yalnızca PD grubunda β -hücrelerinin pre-endokrin hücre, pankreatik multipotent hücre ve kök hücre seviyesine kadar geri farklılaştıkları belirlendi.

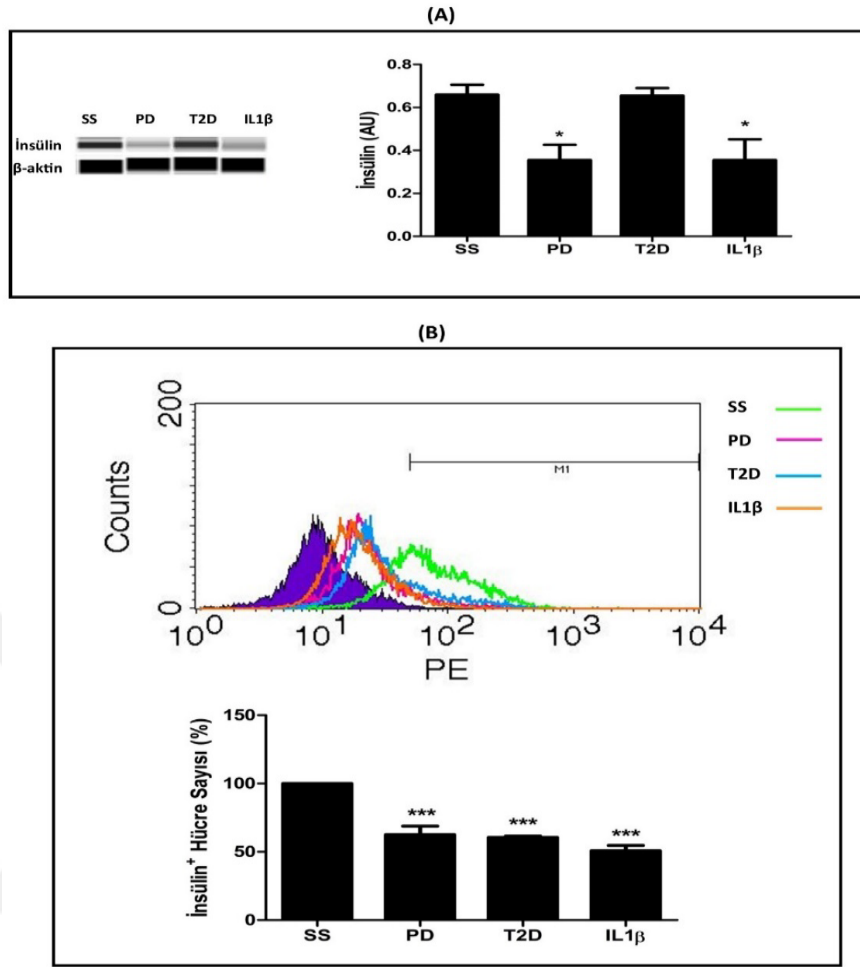


Şekil 4.2.2: β -hücre geri farklılaşmasının gen ekspresyon düzeyinde belirlenmesi. (A) Olgun β -hücre genlerinin ekspresyon seviyelerindeki değişikliği gösteren grafik, (B) Pre-endokrin hücre gen ekspresyon seviyelerindeki değişikliği gösteren grafik, (C) Pankreatik multipotent hücre genlerinin ekspresyon seviyelerindeki değişikliği gösteren grafik, (D) Kök hücre genlerinin

ekspresyon seviyelerindeki değişikliği gösteren grafik verilmiştir. * $p<0,05$, ** $p<0,01$ ve *** $p<0,001$ SS kontrol grubuna göre.

4.2.3 Protein Düzeyinde Elde Edilen Bulgular

Gen ekspresyon sonuçlarına göre PD ve T2D serum örnekleri uygulanan INS1E β -hücrelerinde 48. saat sonunda *INS2* başta olmak üzere olgun β -hücre belirteç genlerindeki baskılanmalarının insülin proteini düzeyine yansıyor yansımadiğının belirlenmesi, β -hücrelerinin fonksiyon kaybını belirlemek için önemlidir. Dolayısıyla olgun β -hücrelerinin özgün belirteci olan insülin üretiminin protein düzeyinde de baskılandığının gösterilmesi gerekmektedir. Simple western ve akım sitometri teknikleri kullanılarak insülin protein miktarındaki ve insülin üreten hücre popülasyonundaki değişiklikler belirlendi. Deney şartlarının hücrelere uygulanmasının ardından elde edilen sitoplazmik fraksiyonda simple western tekniği kullanılarak belirlenen insülin protein seviyelerinin PD ($p<0,05$) ve geri farklılaşmanın pozitif kontrolü olan IL1 β ($p<0,05$) gruplarında SS kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak azaldıği belirlendi. Grupların insülin seviyeleri sırasıyla, SS: $0,66\pm0,05$, PD: $0,36\pm0,07$, T2D: $0,65\pm0,04$, IL1 β : $0,35\pm0,10$ olarak hesaplandı (**şekil 4.2.3: (A)**). Ayrıca, serum örneklerinin β -hücrelerini geri farklılaşırken hangi moleküler mekanizmayı kullandıği ve bu mekanizmalar içerisinde mitokondrinin rolünün belirlenebilmesi amacıyla insülin⁺ ve insülin⁻ hücrelerin akım sitometri tekniği ile izole edilip daha sonrasında mitokondriyel fraksiyon izolasyonu gerçekleştirilmesi planlandığından dolayı akım sitometrik hücre ayırımı cihazı ile hücrelerin izolasyonu gerçekleştirilmeden önce insülin⁺ hücre oranları belirlendi. Akım sitometrik analiz sonuçlarına göre insülin⁺ hücrelerin PD ($p<0,001$), T2D ($p<0,001$) ve IL1 β ($p<0,001$) gruplarında SS kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir azalma belirlendi. Grupların insülin⁺ hücre oranları sırasıyla, SS: $100\pm0,00$, PD: $62,56\pm6,24$, T2D: $60,51\pm1,07$, IL1 β : $50,77\pm3,95$ olarak hesaplandı (**şekil 4.2.3: (B)**) Hem gen ekspresyonu hem de protein düzeyindeki insülin seviyelerindeki değişiklikler göz önünde bulundurulduğunda PD grubunda β -hücrelerinin geri farklılaştığı belirlendi. T2D grubunda β -hücrelerinin fonksiyonlarını kaybettiği ancak geri farklılaşmanın gerçekleşmediği gösterildi.

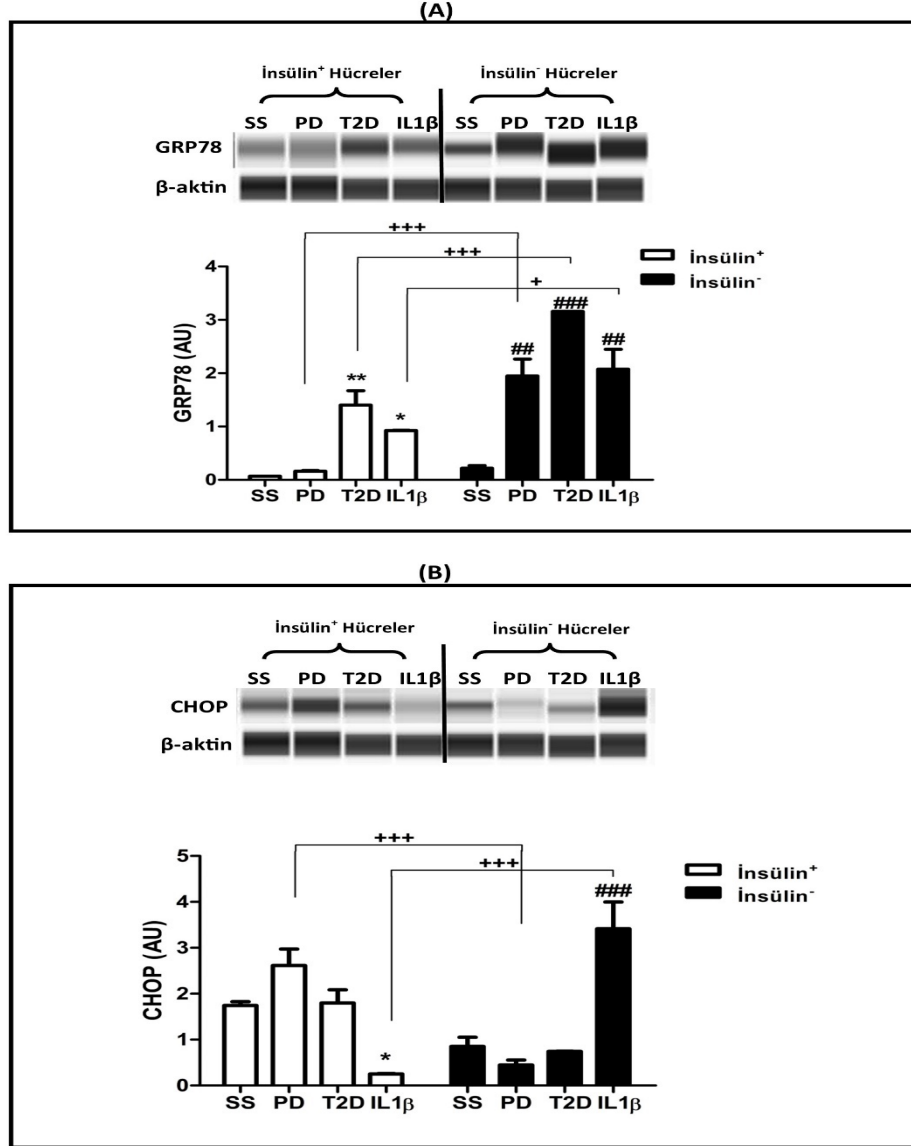


Şekil 4.2.3: (A) Simple Western yöntemiyle belirlenen insülin bantları ve bu bantların yoğunluklarını gösteren grafik verilmiştir. (B) Akım sitometrik insülin floresan yoğunluğunu (%) gösteren histogram plot ve analiz sonuçlarını yansıtan grafik verilmiştir. * $p<0,05$ ve *** $p<0,001$ SS kontrol grubuna göre.

4.3 BETA HÜCRE GERİ FARKLILAŞMASININ ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRESİ İLE İLİŞKİSİ

Aşırı protein sentezine bağlı olarak ER’de biriken yanlış katlanmış proteinler, ER stresine ve ardından β -hücre yetmezliğine katkıda bulunabilecek anahtar bir faktördür. Özellikle β -hücrelerinde ER protein yükünün birincil nedeni olan proinsülin biyosentezi, insülin direncine yanıt olarak 50 kata kadar artabilir. Artan proinsülin sentezi hızı, ER ortamındaki değişikliklerle birlikte yanlış katlanmış proinsülinin birikmesine neden olabilir. Sonuç olarak, artan proinsülin biyosentezi, ER homeostazını yeniden kurmak için adaptif UPR’yi uyarır (Scheuner ve Kaufman, 2008). Bu bilgiden yola çıkılarak deney şartları β -hücrelerine uygulandıktan sonra

geri farklılaşmada ER stresinin rolü araştırıldı. İzole edilen insülin⁺ ve insülin⁻ hücre popülasyonlarından elde edilen sitoplazmik fraksiyonda GRP78 ve CHOP proteinlerinin seviyelerindeki değişimler simple western yöntemi ile gösterildi. İnsülin⁺ hücre popülasyonunun GRP78 protein seviyelerinde T2D ($p<0,01$) ve IL1 β ($p<0,05$) gruplarında SS kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir artış belirlendi. İnsülin⁻ hücre popülasyonunda ise PD ($p<0,01$), T2D ($p<0,001$) ve IL1 β ($p<0,01$) gruplarında SS kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir artış görüldü. PD ($p<0,001$), T2D ($p<0,001$) ve IL1 β ($p<0,05$) gruplarında insülin⁻ hücre popülasyonunda insülin⁺ hücre popülasyonuna kıyasla GRP78 protein seviyelerinde anlamlı bir artış belirlendi. Deney gruplarının insülin⁺ hücre popülasyonunda GRP78 protein seviyeleri sırasıyla, SS: $0,07\pm0,00$, PD: $0,16\pm0,01$, T2D: $1,4\pm0,27$, IL1 β : $0,92\pm0,01$, insülin⁻ hücre popülasyonunda GRP78 protein seviyeleri sırasıyla, SS: $0,22\pm0,05$, PD: $1,95\pm0,32$, T2D: $3,16\pm0,00$, IL1 β : $2,08\pm0,38$ olarak hesaplandı (**Şekil 4.3:(A)**). İnsülin⁺ hücre popülasyonunda, CHOP protein seviyelerinde IL1 β grubunda SS kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir azalma belirlendi ($p<0,05$). İnsülin⁻ hücre popülasyonunda ise IL1 β grubunda SS kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir artış ($p<0,001$) görüldü. PD grubunda insülin⁻ hücre popülasyonunda insülin⁺ hücre popülasyonuna kıyasla anlamlı bir azalma gözlenirken ($p<0,001$), IL1 β grubunda ise anlamlı bir artış belirlendi ($p<0,001$). Deney gruplarının insülin⁺ hücre popülasyonunda CHOP protein seviyeleri sırasıyla, SS: $1,74\pm0,08$, PD: $2,61\pm0,36$, T2D: $1,8\pm0,29$, IL1 β : $0,25\pm0,00$ insülin⁻ hücre popülasyonunda CHOP protein seviyeleri sırasıyla, SS: $0,85\pm0,20$, PD: $0,45\pm0,11$, T2D: $0,74\pm0,00$, IL1 β : $3,41\pm0,58$ olarak hesaplandı (**Şekil 4.3:(B)**).



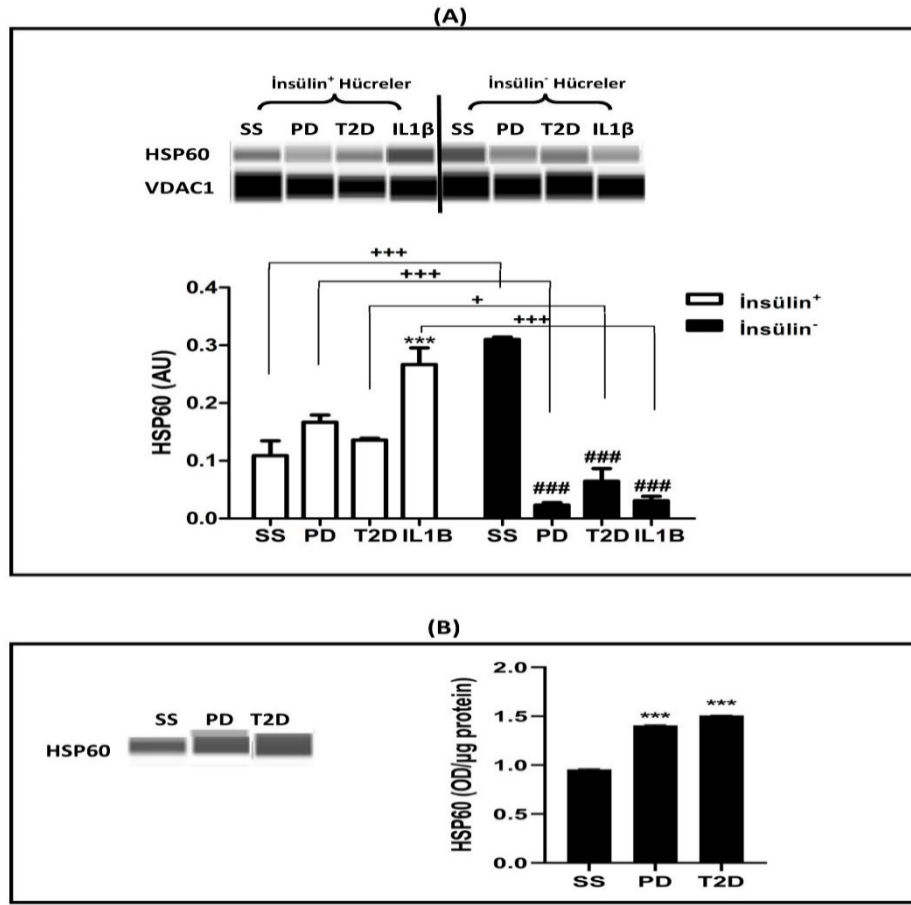
Şekil 4.3: İnsülin⁺ ve insülin⁻ hücre popülasyonlarında GRP78 (A) ve CHOP (B) protein bantları ve bu bantların yoğunluklarını gösteren grafikler verilmiştir. *p<0,05, **p<0,01 insülin⁺ SS'ye göre. ##p<0,01, ###p<0,001 insülin⁻ SS'ye göre. +p<0,05, +++p<0,05 insülin⁺ hücre popülasyonuna göre.

4.4 BETA HÜCRE GERİ FARKLILAŞMASININ MİTOKONDİRİYAL FONKSİYON KAYBI İLE İLİŞKİSİ

4.4.1 Mitokondriyal Stres

Endoplazmik retikuluma benzer şekilde mitokondrilerde stres koşullarında artan oksidatif fosforilasyon ile bu süreçte rol alan mitokondriyal proteinlerin sentezindeki artışa bağlı olarak yanlış katlanmış veya hiç katlanmamış proteinlerin birikimi söz konusudur. Bu durumda

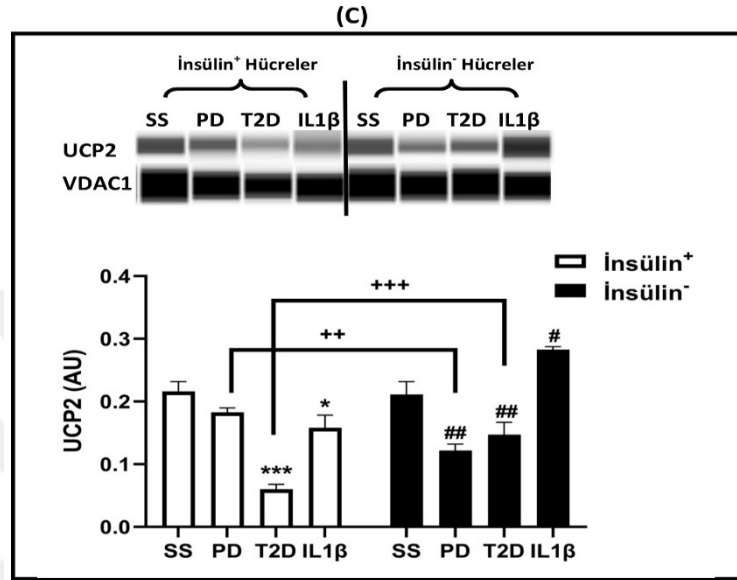
HSP60'ın mitokondrilerde aşırı üretimi ile sitoplazmaya translokasyonu gerçekleşir ve UPR^{mt} başlar (Rodriguez ve diğ., 2020). Bu bilgiden yola çıkılarak deney şartları β -hücrelerine uygulandıktan sonra geri farklılaşmada mitokondriyal stresin rolü araştırıldı. İzole edilen insülin⁺ ve insülin⁻ hücre popülasyonlarından elde edilen mitokondriyal fraksiyonda HSP60 proteini simple western yöntemi ile gösterildi. İnsülin⁺ hücre popülasyonunda, HSP60 protein seviyelerinde IL1 β grubunda SS kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir artış belirlendi ($p<0,001$). İnsülin⁻ hücre popülasyonunda ise PD ($p<0,001$), T2D ($p<0,001$) ve IL1 β ($p<0,001$) gruplarında SS kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir azalma görüldü. İki hücre popülasyonu arasında ise SS grubunda anlamlı bir artış görülürken ($p<0,001$); PD ($p<0,001$), T2D ($p<0,05$) ve IL1 β ($p<0,001$) gruplarında insülin⁻ hücre popülasyonunda insülin⁺ hücre popülasyonuna kıyasla anlamlı bir azalma belirlendi. İnsülin⁺ hücre popülasyonunda HSP60 protein seviyeleri sırasıyla, SS: $0,11\pm0,03$, PD: $0,17\pm0,01$, T2D: $0,14\pm0,00$, IL1 β : $0,27\pm0,03$; insülin⁻ hücre popülasyonunda HSP60 protein seviyeleri sırasıyla, SS: $0,31\pm0,00$, PD: $0,02\pm0,00$, T2D: $0,06\pm0,02$, IL1 β : $0,03\pm0,01$ olarak hesaplandı (**Şekil 4.4.1: (A)**). Serum örneklerindeki HSP60 seviyeleri de simple western yöntemi ile belirlendi. PD ($p<0,001$) ve T2D ($p<0,001$) serum örneklerinde SS örneğine kıyasla anlamlı bir artış belirlendi. Serum örneklerindeki HSP60 seviyeleri sırasıyla; SS: $0,96\pm0,01$, PD: $1,41\pm0,01$, T2D: $1,51\pm0,00$ olarak hesaplandı (**Şekil 4.4.1: (B)**).



Şekil 4.4.1: (A) İnsülin⁺ ve insülin⁻ hücre popülasyonlarında HSP60 protein bantları ve bu bantların yoğunluklarını gösteren, (B) Serum örneklerinde HSP60 protein bantları ve bu bantların yoğunluklarını gösteren grafik verilmiştir. ***p<0,001 insülin⁺ SS'ye göre. ###p<0,001 insülin⁻ SS'ye göre. +p<0,05, +++p<0,001 insülin⁺ hücre popülasyonuna göre, (B) şekli için ***p<0,001 SS'e göre.

UCP2'nin mitokondriyal fonksiyon bozukluğunun önlenmesine katkı sağladığı bilinmektedir (Kukat ve diğ., 2014). Deney şartları β-hücrelerine uygulandıktan sonra izole edilen insülin⁺ ve insülin⁻ hücre popülasyonlarından elde edilen mitokondriyal fraksiyonda UCP2 proteinini simple western yöntemi ile gösterildi. İnsülin⁺ hücre popülasyonunda, UCP2 protein seviyelerinde T2D (p<0,001) ve IL1β (p<0,05) grubunda SS kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir azalma belirlendi. İnsülin⁻ hücre popülasyonunda ise PD (p<0,01) ve T2D (p<0,01) gruplarında SS kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir azalma görülürken IL1β (p<0,05) grubunda anlamlı bir artış belirlendi. İki hücre popülasyonu arasında ise T2D grubunda anlamlı bir artış görülürken (p<0,001); PD (p<0,01) grubunda insülin⁻ hücre popülasyonunda insülin⁺ hücre popülasyonuna kıyasla anlamlı bir azalma belirlendi.

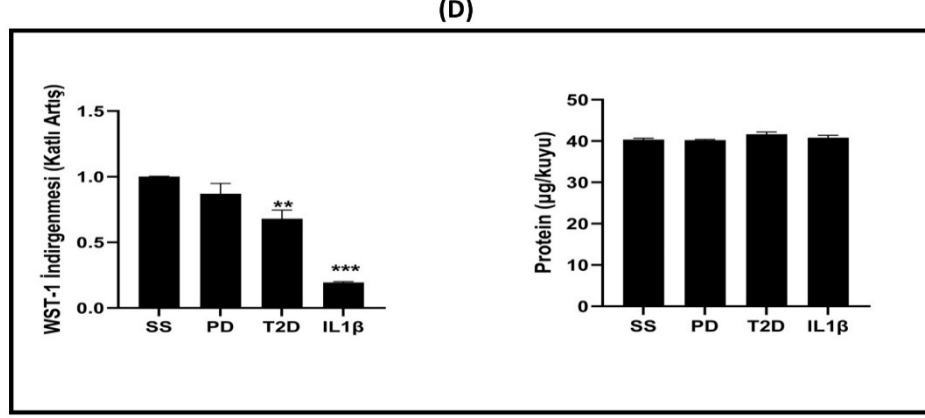
İnsülin⁺ hücre popülasyonunda UCP2 protein seviyeleri sırasıyla, SS: $0,22 \pm 0,02$, PD: $0,18 \pm 0,01$, T2D: $0,06 \pm 0,01$, IL1 β : $0,16 \pm 0,02$; insülin⁻ hücre popülasyonunda UCP2 protein seviyeleri sırasıyla, SS: $0,21 \pm 0,02$, PD: $0,12 \pm 0,01$, T2D: $0,15 \pm 0,02$, IL1 β : $0,28 \pm 0,00$ olarak hesaplandı (Şekil 4.4.1: (C)).



Şekil 4.4.1: (C) İnsülin⁺ ve insülin⁻ hücre popülasyonlarında UCP2 protein bantları ve bu bantların yoğunluklarını gösteren grafik verilmiştir. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ insülin⁺ SS'ye göre. # $p < 0,05$, ## $p < 0,001$ insülin⁻ SS'ye göre. ++ $p < 0,01$, +++ $p < 0,001$ insülin⁺ hücre popülasyonuna göre.

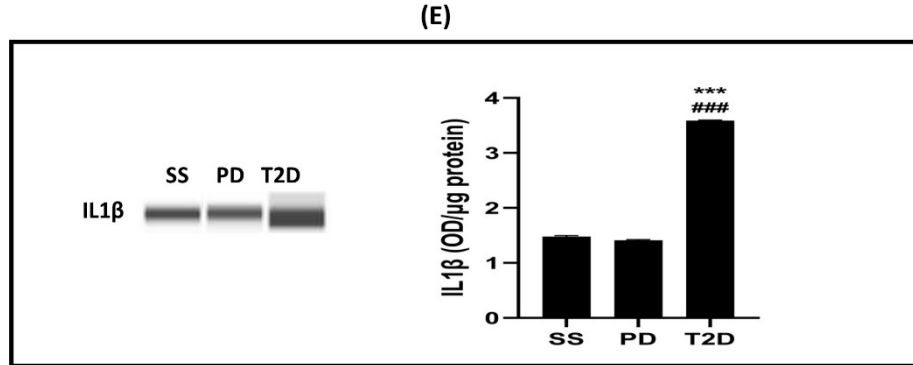
Bilindiği gibi mitokondriyal stres mitokondri fonksiyon kaybı ile ilişkilidir. İnsülin⁺ hücre popülasyonunda IL1 β şartındaki mitokondriyal stres sonucunda aynı zamanda mitokondriyal fonksiyon kaybının belirlenebilmesi için WST-1 testi yapıldı. WST-1 indirgeme testi, hücrel indirgeme kapasitesini ölçer. Bu testte, elektron çiftleştirici bir reaktif aracılığıyla hücre dışında bulunan WST-1 tetrazolium tuzunun indirgenmesi sonucunda yüksek derecede ışık emici bir formazan ürününün oluşumu meydana gelir. WST-1 indirgenmesi, hücrel indirgeme kapasitesinin dolaylı bir ölçümünü sağlar ve NADH seviyeleri ile ilişkilidir (Berridge ve diğ., 2005). Deney grupları INS1E hücrelerine uygulandıktan sonra WST-1 testi yapıldı. T2D ($p < 0,01$) ve IL1 β ($p < 0,001$) gruplarında SS kontrol grubuna kıyasla baskılanma belirlendi. Daha sonra bu baskılanmaların hücre kaybı ile ilişkisinin belirlenebilmesi amacıyla WST-1 uygulanan kuyulardaki hücrelerin protein seviyeleri Bradford yöntemi ile belirlendi ve deney grupları arasında bir farklılık gözlenmedi. WST-1 indirgenme seviyeleri sırasıyla, SS: $1,00 \pm 0,00$, PD: $0,87 \pm 0,08$, T2D: $0,68 \pm 0,06$, IL1 β : $0,19 \pm 0,01$; protein seviyeleri sırasıyla, SS:

40,34±0,35, PD: 40,21±0,16, T2D: 41,64±0,53, IL1 β : 40,80±0,61 olarak hesaplandı (Şekil 4.4.1: (D)).



Şekil 4.4.1: (D) Hücrelerin WST-1 indirgenme seviyelerini gösteren grafik solda, protein seviyelerini gösteren grafik sağda verilmiştir. **p<0,01 ve ***p<0,001 SS grubuna göre.

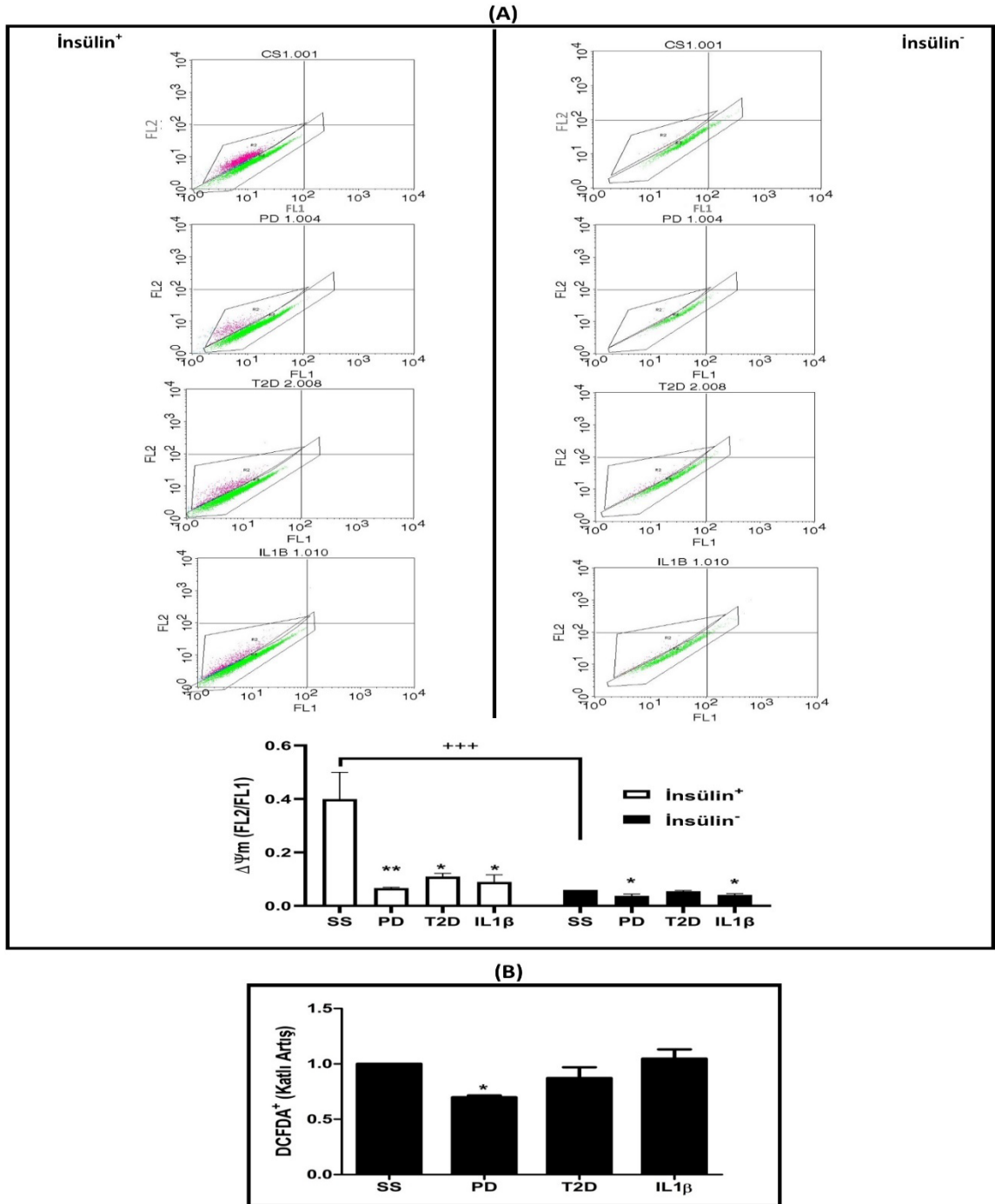
T2D ve IL1 β gruplarının WST-1 bulgularındaki benzerliklerinden yola çıkarak serum örneklerindeki IL1 β seviyeleri simple western yöntemi ile belirlendi. T2D (p<0,001) serum örneğinde SS örneğine kıyasla anlamlı bir artış belirlendi. Serum örneklerindeki IL1 β seviyeleri sırasıyla; SS: 1,48±0,02, PD: 1,41±0,01, T2D: 3,59±0,01 olarak hesaplandı (Şekil 4.4.1: (E)).



Şekil 4.4.1: (E) Serum örneklerinde IL1 β protein bantlarını ve bu bantların yoğunluklarını gösteren grafik verilmiştir. ***p<0,001 SS'e göre.

syy4.4.2 Mitokondriyal Membran Potansiyeli ($\Delta\Psi_m$)

Mitokondriyal membran potansiyelinin azalması biyoenerjetik stres ile ilişkilidir (Swerdlow, 2020). Mitokondriyal stresin kaynaklarından biri olarak biyoenerjetik stresin geri farklılaşmadaki rolünün belirlenebilmesi amacıyla deney şartları β -hücrelerine uygulandıktan sonra mitokondriyal membran potansiyelindeki değişiklik akım sitometri yöntemi ile belirlendi. JC-1 işaretlemesinden sonra normal mitokondriyal fonksiyon gösteren ve enerji üretimi için oksidatif fosforilasyonu daha çok kullanan hücrelerde, mitokondri membranındaki iyon değişimleri ile agregat JC-1 (kırmızı) oluşur ancak, mitokondriyal fonksiyonlarında azalma meydana gelen ve oksidatif fosforilasyon yerine enerji üretimi için daha çok glikolizi tercih eden hücrelerde monomerik JC-1 (yeşil) oluşur (Sivandzade ve diğ., 2019). Agregat JC-1'in monomer JC-1'e oranlanması yolu ile mitokondriyal membran potansiyeli belirlenir. İnsülin⁺ hücrelerin mitokondriyal membran potansiyelinin PD ($p<0,01$), T2D ($p<0,05$) ve IL1 β ($p<0,05$) gruplarında SS kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak azaldığı belirlendi. En belirgin azalmanın PD grubunda olduğu değerlendirildi. İnsülin⁻ hücrelerin mitokondriyal membran potansiyelinin PD ($p<0,05$) ve IL1 β ($p<0,05$) gruplarında SS kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak azaldığı belirlendi. SS grubunda insülin⁻ popülasyonda insülin⁺ popülasyona kıyasla anlamlı bir azalma görüldü ($p<0,001$). İnsülin⁺ hücrelerin deney gruplarının mitokondriyal membran potansiyeli sırasıyla, SS: $0,4\pm0,1$, PD: $0,07\pm0,00$, T2D: $0,11\pm0,01$, IL1 β : $0,09\pm0,03$, insülin⁻ hücre gruplarının mitokondriyal membran potansiyeli sırasıyla SS: $0,06\pm0,00$, PD: $0,04\pm0,00$, T2D: $0,06\pm0,01$, IL1 β : $0,04\pm0,00$ olarak hesaplandı. (Şekil 4.4.2:(A)). Hücrelerin stres uyaranları dışında oksidatif fosforilasyonu kullanma oranları ile ROS seviyelerinde değişimler gözlenmektedir (Schieber ve Chandel, 2014) Çalışmamızda hücrelerin mitokondriyal fonksiyonundaki değişiklikler ve oksidatif fosforilasyon kullanım oranlarının belirlenebilmesi için deney şartları uygulandıktan sonra hücrelerin ROS seviyelerindeki değişiklikler DCFHDA işaretlemesi ile florimetrik olarak DCFDA absorbansı ölçülerek belirlendi. Sonuç olarak, sadece PD grubunda SS kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir azalma belirlendi ($p<0,05$). Deney gruplarının ROS seviyeleri sırasıyla, SS: $1,00\pm0,00$, PD: $0,70\pm0,02$, T2D: $0,87\pm0,10$, IL1 β : $1,05\pm0,08$ olarak hesaplandı (Şekil 4.4.2:(B)).

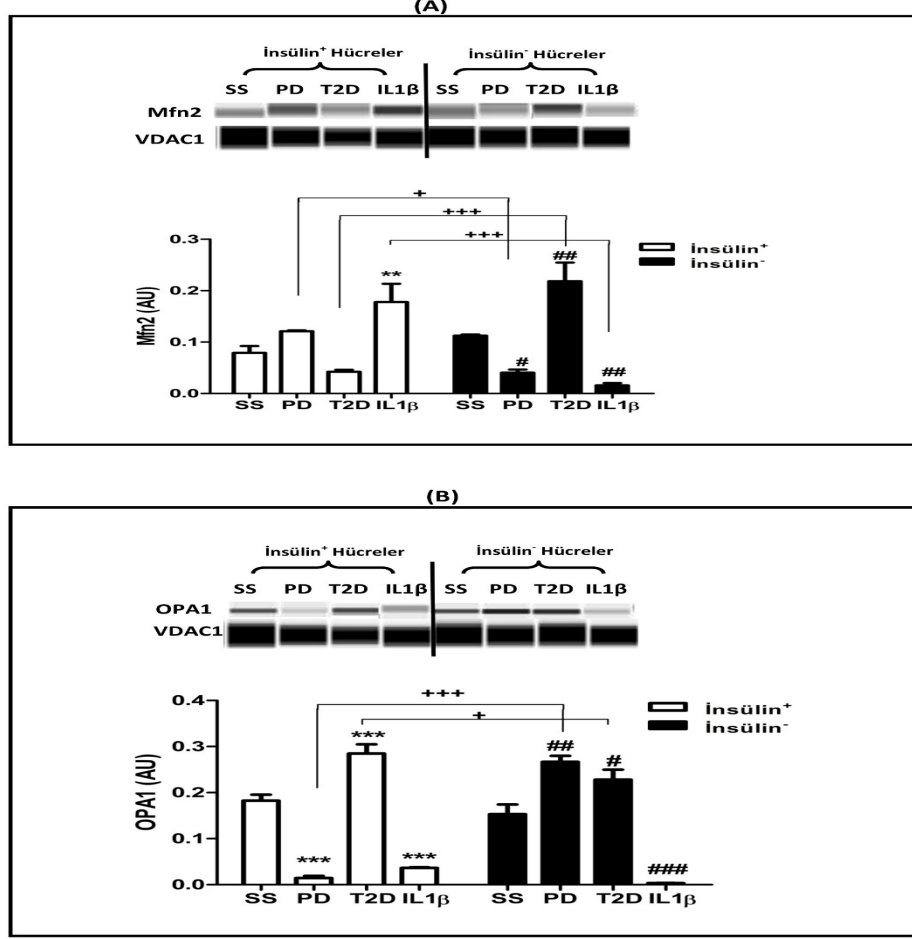


Şekil 4.4.2: (A) İnsülin⁺ ve insülin⁻ hücre popülasyonlarının mitokondriyal membran potansiyeli ($\Delta\Psi_m$) plotları ve FL2/FL1 oranlarını gösteren grafikler, (B) Hücrelerin DCFDA⁺ seviyelerini gösteren grafik verilmiştir. * $p < 0,05$ ve ** $p < 0,01$ SS'ye göre. +++ $p < 0,001$ insülin⁺ hücre popülasyonuna göre.

4.5 BETA HÜCRE GERİ FARKLILAŞMASININ MİTOKONDRIYAL FÜZYON İLE İLİŞKİSİ

Mitokondriler, çeşitli uyarılara ve hücrenin metabolik taleplerine yanıt olarak füzyon ve fisyon arasında değişen iki zıt süreç ile morfolojilerini sürekli değiştiren oldukça dinamik, karmaşık organellerdir (Ranieri ve diğ., 2013). Füzyon, hasarlı veya yaşlanmış mitokondriler dahil olmak üzere komşu mitokondriler arasında içerik, DNA ve metabolitlerin değiş tokuşuna izin vererek hayatta kalmalarını destekler (Nakada ve diğ., 2001). Mfn2, mitokondrinin dış zarında füzyonu sağlarken OPA1 iç mitokondri membranının füzyonunu sağlar (Darshi ve diğ., 2011). Çalışmamızda deney şartları β -hücrelerine uygulandıktan sonra geri farklılaşmada mitokondriyal füzyonun rolü araştırıldı. İzole edilen insülin⁺ ve insülin⁻ hücre popülasyonlarından elde edilen mitokondriyal fraksiyonda Mfn2 ve OPA1 proteinlerinin seviyelerindeki değişimler simple western yöntemi ile belirlendi. İnsülin⁺ hücre popülasyonunda, Mfn2 protein seviyelerinde IL1 β grubunda SS kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir artış belirlendi ($p<0,01$). İnsülin⁻ hücre popülasyonunda ise PD ($p<0,05$) ve IL1 β ($p<0,01$) gruplarında SS kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir azalma görülürken, T2D grubunda anlamlı bir artış belirlendi ($p<0,01$). PD ($p<0,05$) ve IL1 β ($p<0,001$) gruplarında insülin⁻ hücre popülasyonunda insülin⁺ hücre popülasyonuna kıyasla anlamlı bir azalma görülürken T2D grubunda anlamlı bir artış belirlendi ($p<0,001$). Grupların insülin⁺ hücre popülasyonunda Mfn2 protein seviyeleri sırasıyla, SS: $0,08\pm0,01$, PD: $0,12\pm0,00$, T2D: $0,04\pm0,00$, IL1 β : $0,18\pm0,04$, insülin⁻ hücre popülasyonunda Mfn2 protein seviyeleri sırasıyla, SS: $0,11\pm0,00$, PD: $0,04\pm0,01$, T2D: $0,22\pm0,04$, IL1 β : $0,02\pm0,00$ olarak hesaplandı (**Şekil 4.5:(A)**). İnsülin⁺ hücre popülasyonunda, OPA1 protein seviyelerinde PD ($p<0,001$) ve IL1 β ($p<0,001$) gruplarında SS kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir azalma gözlenirken, T2D grubunda anlamlı bir artış belirlendi ($p<0,001$). İnsülin⁻ hücre popülasyonunda ise PD ($p<0,01$) ve T2D ($p<0,05$) gruplarında SS kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir artış belirlenirken, IL1 β grubunda SS kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir azalma görüldü ($p<0,001$). PD grubunda insülin⁻ hücre popülasyonunda insülin⁺ hücre popülasyonuna kıyasla anlamlı bir artış belirlenirken ($p<0,001$), T2D grubunda anlamlı bir azalma belirlendi ($p<0,05$). Grupların insülin⁺ hücre popülasyonunda OPA1 protein seviyeleri sırasıyla, SS: $0,18\pm0,01$, PD: $0,01\pm0,00$, T2D: $0,28\pm0,02$, IL1 β : $0,04\pm0,00$; insülin⁻ hücre popülasyonunda OPA1 protein seviyeleri sırasıyla, SS: $0,15\pm0,02$, PD: $0,27\pm0,01$, T2D: $0,23\pm0,02$, IL1 β : $0,00\pm0,00$ olarak hesaplandı (**Şekil 4.5:(B)**). Gruplardaki Mfn2 ve OPA1 protein seviyelerine bakıldığında özellikle T2D grubunun insülin⁻

hücre popülasyonunda görülen her iki protein seviyelerindeki artış göz önünde bulundurularak T2D grubunda fonksiyonunu yitiren hücrelerde mitokondriyal füzyon olduğu sonucuna varıldı.

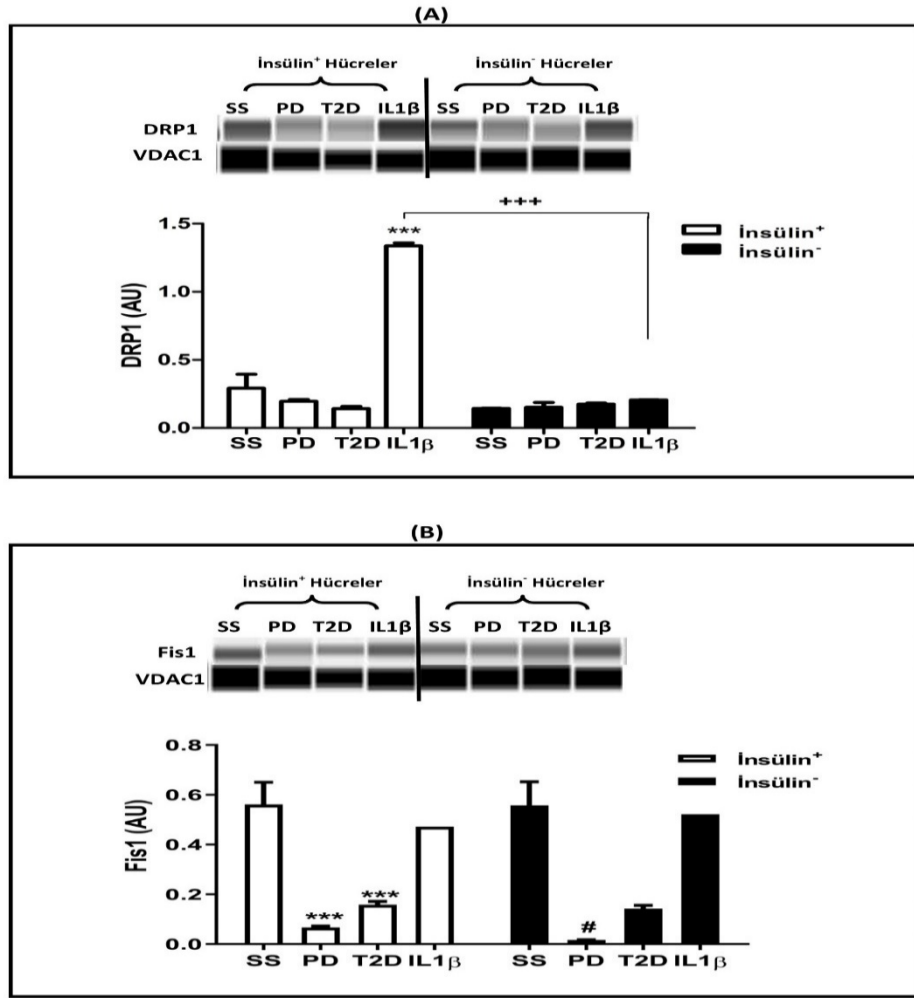


Şekil 4.5: İnsülin⁺ ve insülin⁻ hücre popülasyonlarında Mfn2 (A) ve OPA1 (B) protein bantları ve bu bantların yoğunluklarını gösteren grafikler verilmiştir. **p<0,01 ve ***p<0,001 insülin⁺ SS'ye göre. #p<0,05, ##p<0,01, ###p<0,001 insülin⁻ SS'ye göre. +p<0,05, +++p<0,001 insülin⁺ hücre popülasyonuna göre.

4.6 BETA HÜCRE GERİ FARKLILAŞMASININ MİTOKONDİRİYAL FİSYON İLE İLİŞKİSİ

Mitokondriyal fisyon yeni mitokondri oluşturmak için gereklidir, aynı zamanda hasarlı mitokondrilerin ortadan kaldırılmasını sağlar ve yüksek düzeyde hücresel stres sırasında apoptozu kolaylaştırabilir (Youle ve Blik, 2012). Bu süreç DRP1 ve Fis'in kontrolünde gerçekleşir (Gao ve diğ., 2021). Çalışmamızda deney şartları β-hücrelerine uygulandıktan sonra geri farklılaşmada mitokondriyal fisyonun rolü araştırıldı. İzole edilmiş olan insülin⁺ ve insülin⁻

hücre popülasyonlarından elde edilen mitokondriyal fraksiyonda DRP1 ve Fis1 proteinlerinin seviyelerindeki değişimler simple western yöntemi ile belirlendi. İnsülin⁺ hücre popülasyonunda, DRP1 protein seviyelerinde IL1 β grubunda SS kontrol serumuna kıyasla anlamlı bir artış belirlendi ($p<0,001$). İnsülin⁻ hücre popülasyonunda ise gruplar arasında SS kontrol grubuna kıyasla bir değişiklik gözlenmedi. IL1 β grubunun insülin⁻ hücre popülasyonunda insülin⁺ hücre popülasyonuna kıyasla DRP1 seviyesinde anlamlı bir azalma belirlendi ($p<0,001$). Deney gruplarının insülin⁺ hücre popülasyonunda DRP1 protein seviyeleri sırasıyla, SS: $0,29\pm0,10$, PD: $0,20\pm0,01$, T2D: $0,14\pm0,02$, IL1 β : $1,34\pm0,02$; insülin⁻ hücre popülasyonunda DRP1 protein seviyeleri sırasıyla, SS: $0,14\pm0,00$, PD: $0,15\pm0,03$, T2D: $0,17\pm0,01$, IL1 β : $0,21\pm0,00$ olarak hesaplandı (**Şekil 4.6:(A)**). İnsülin⁺ hücre popülasyonunda Fis1 protein seviyelerinde PD ($p<0,001$) ve T2D ($p<0,001$) gruplarında SS kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir azalma belirlendi. İnsülin⁻ hücre popülasyonunda ise PD grubunda SS kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir azalma tespit edildi ($p<0,05$). İki hücre popülasyonu arasında ise bir değişiklik belirlenmedi. Deney gruplarının insülin⁺ hücre popülasyonunda Fis1 protein seviyeleri sırasıyla, SS: $0,56\pm0,09$, PD: $0,07\pm0,01$, T2D: $0,16\pm0,01$, IL1 β : $0,47\pm0,00$ insülin⁻ hücre popülasyonunda Fis1 protein seviyeleri sırasıyla, SS: $0,56\pm0,21$, PD: $0,02\pm0,00$, T2D: $0,14\pm0,01$, IL1 β : $0,52\pm0,00$ olarak hesaplandı (**Şekil 4.6:(B)**).

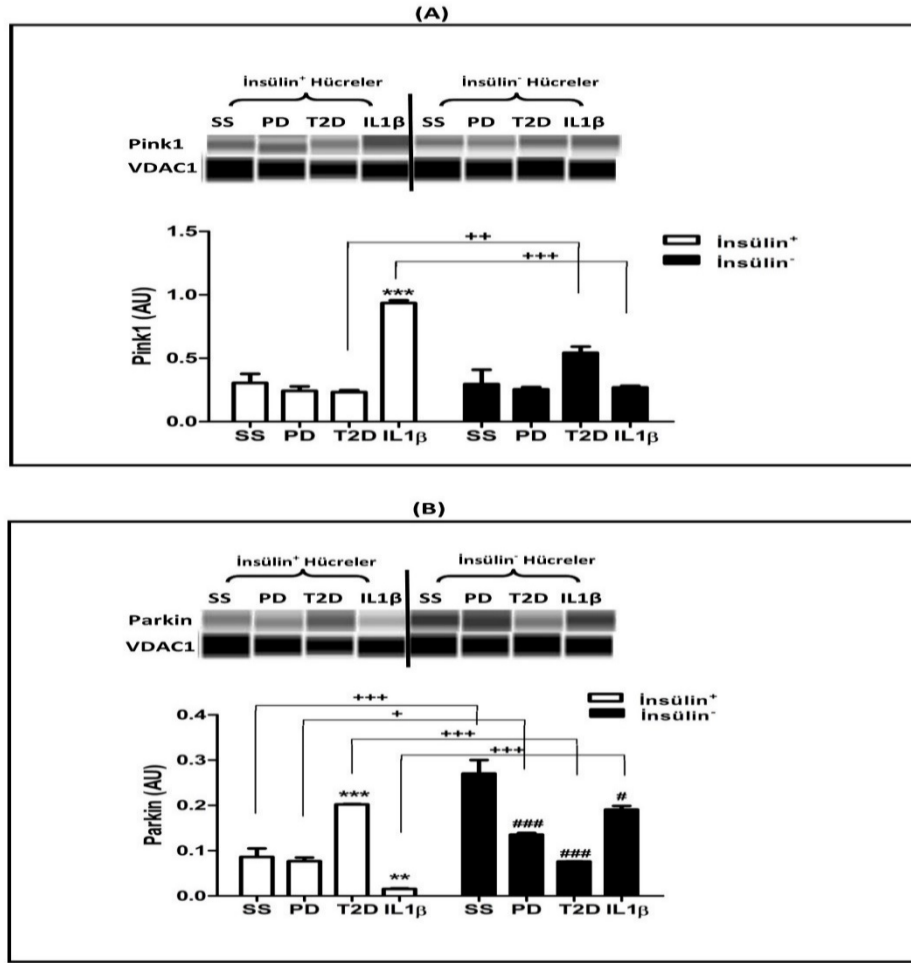


Şekil 4.6: İnsülin⁺ ve insülin⁻ hücre popülasyonlarında DRP1 (A) ve Fis1 (B) protein bantları ve bu bantların yoğunluklarını gösteren grafikler verilmiştir. ***p<0,001 insülin⁺ SS'ye göre. #p<0,05 insülin⁻ SS'ye göre. +++p<0,001 insülin⁺ hücre popülasyonuna göre.

4.7 BETA HÜCRE GERİ FARKLILAŞMASININ MİTOFAJİ İLE İLİŞKİSİ

İşlevsiz veya hasarlı mitokondri, mitofaji ile seçici olarak ortadan kaldırılır. Pink1, depolarize mitokondri üzerinde birikerek bir E3 ubiquitin ligaz olan Parkin'in mitofajiyi başlatmak için mitokondriye alınmasını sağlar (Matsuda ve diğ., 2010). Çalışmamızda deney şartları β-hücrelerine uygulandıktan sonra geri farklılaşmada mitofajinin rolü araştırılması amacıyla izole edilen insülin⁺ ve insülin⁻ hücre popülasyonlarından elde edilen mitokondriyal fraksiyonda Pink1 ve Parkin proteinlerinin seviyelerindeki değişimler simple western yöntemi ile gösterildi. İnsülin⁺ hücre popülasyonunda, Pink1 protein seviyelerinde IL1β grubunda SS kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir artış belirlendi (p<0,001). İnsülin⁻ hücre popülasyonunda ise deney grupları

ile SS kontrol grubu arasında bir değişiklik gözlenmedi. T2D grubunda insülin⁻ hücre popülasyonunda insülin⁺ hücre popülasyonuna kıyasla anlamlı bir artış ($p<0,01$), IL1 β grubunun insülin⁻ hücre popülasyonunda ise insülin⁺ hücre popülasyonuna kıyasla anlamlı bir azalma belirlendi ($p<0,001$). Deney gruplarının insülin⁺ hücre popülasyonunda Pink1 protein seviyeleri sırasıyla, SS: $0,31\pm0,07$, PD: $0,24\pm0,03$, T2D: $0,23\pm0,01$, IL1 β : $0,94\pm0,02$, insülin⁻ hücre popülasyonunda Pink1 protein seviyeleri sırasıyla, SS: $0,30\pm0,11$, PD: $0,26\pm0,02$, T2D: $0,54\pm0,05$, IL1 β : $0,27\pm0,01$ olarak hesaplandı (**Şekil 4.7.:(A)**). İnsülin⁺ hücre popülasyonunda Parkin protein seviyelerinde T2D grubunda SS kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir artış ($p<0,001$), IL1 β grubunda ise anlamlı bir azalma belirlendi ($p<0,01$). İnsülin⁻ hücre popülasyonunda PD ($p<0,001$), T2D ($p<0,001$) ve IL1 β ($p<0,05$) gruplarında SS kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir azalma tespit edildi. SS ($p<0,001$), PD ($p<0,05$) ve IL1 β ($p<0,001$) gruplarının insülin⁻ hücre popülasyonlarında insülin⁺ hücre popülasyonlarına kıyasla Parkin seviyelerinde anlamlı bir artış, T2D grubunda ise azalma belirlendi ($p<0,001$). Deney gruplarının insülin⁺ hücre popülasyonunda Parkin protein seviyeleri sırasıyla, SS: $0,09\pm0,02$, PD: $0,08\pm0,01$, T2D: $0,20\pm0,00$, IL1 β : $0,02\pm0,00$; insülin⁻ hücre popülasyonunda Parkin protein seviyeleri sırasıyla, SS: $0,27\pm0,03$, PD: $0,14\pm0,00$, T2D: $0,08\pm0,00$, IL1 β : $0,19\pm0,01$ olarak hesaplandı (**Şekil 4.7.:(B)**).

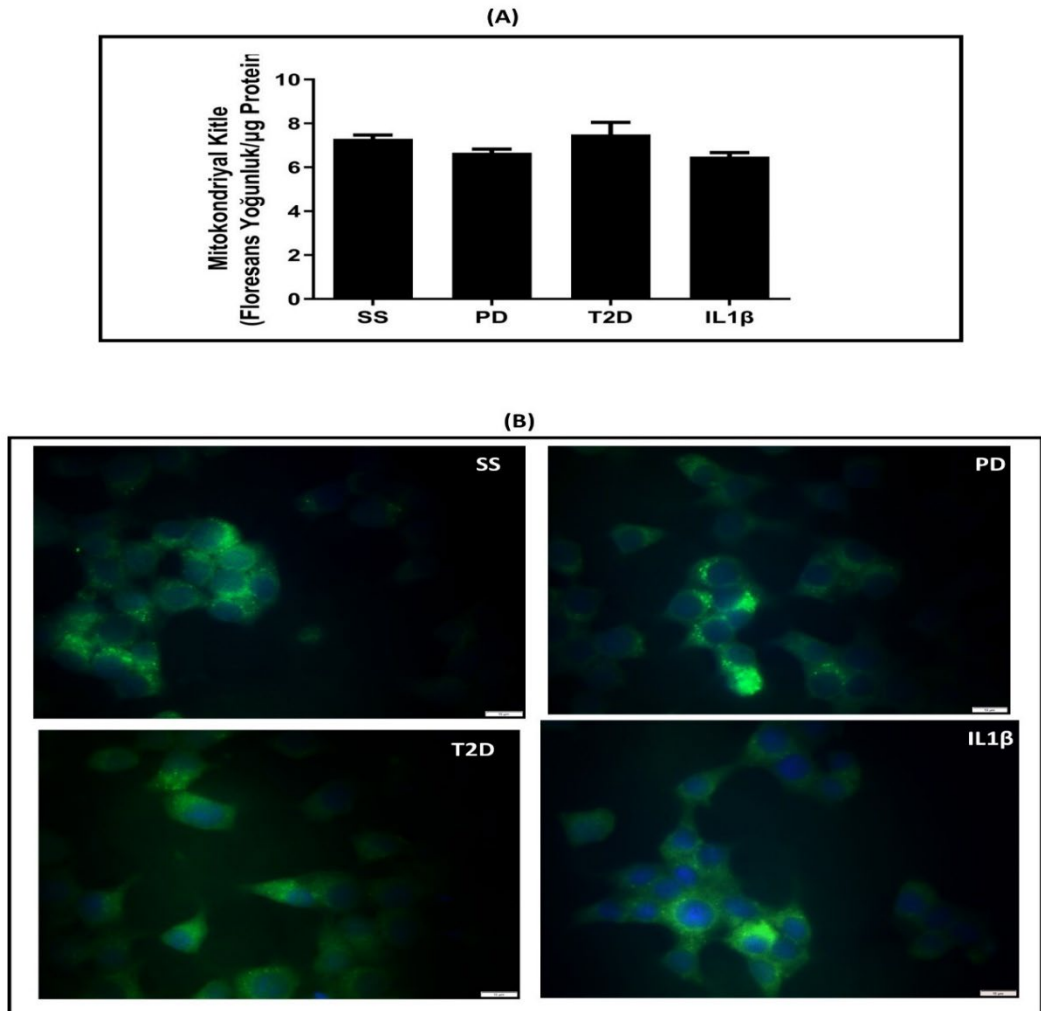


Şekil 4.7: İnsülin⁺ ve insülin⁻ hücre popülasyonlarında Pink1 (A) ve Parkin (B) protein bantları ve bu bantların yoğunluklarını gösteren grafikler verilmiştir. **p<0,01, ***p<0,001 insülin⁺ SS'ye göre. #p<0,05, ###p<0,001 insülin⁻ SS'ye göre. +p<0,05, ++p<0,01, +++p<0,001 insülin⁺ hücre popülasyonuna göre.

4.8 MİTOKONDRIYAL KİTLEDEKİ DEĞİŞİM İLE İLGİLİ BULGULAR

Mitokondriyal dinamiklerin değişimi ile mitokondri kitlesinde değişim olup olmadığının belirlenebilmesi amacıyla deney şartları uygulandıktan sonra hücrelere MitoTracker Green uygulanarak florimetrik yöntemle mitokondriyal kitle seviyeleri ölçüldü. Yapılan analiz deney grupları arasında bir fark olmadığını göstermektedir. Mitokondriyal fisyon ve füzyon olaylarında mitokondrilerin yapıları değiştiğinden dolayı MitoTracker Green ile işaretlenmiş olan mitokondrilerin yapılarındaki değişimin gözlenebilmesi amacıyla floresan mikroskopta hücreler incelendi. Mikroskobik gözlemler sağlıklı insan serumu uygulanan kontrol hücrelerde sitoplazmaya homojen dağılmış, floresans ışıması yüksek ve yuvarlak görünümlü

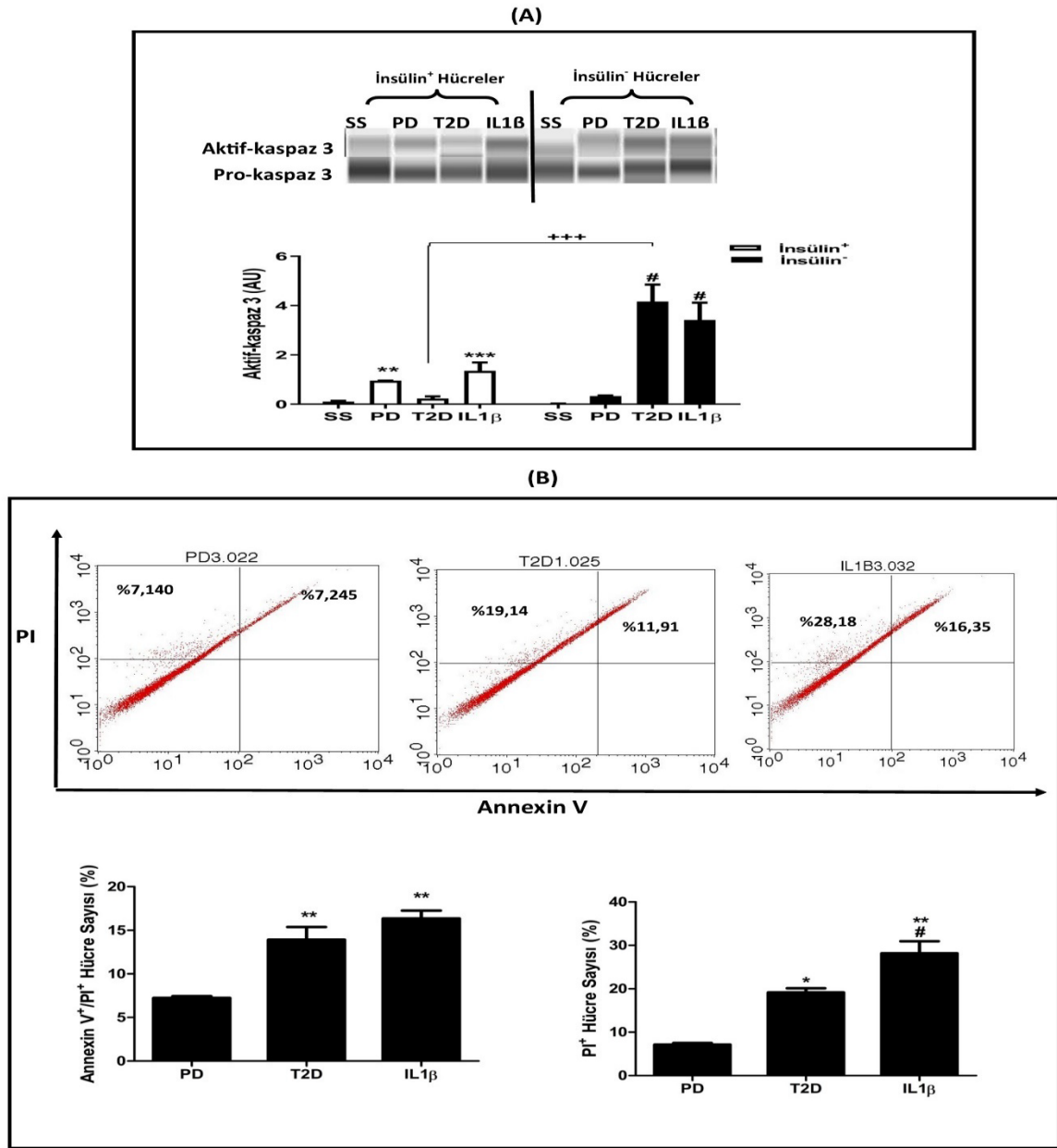
mitokondrilerin varlığını; PD hastalarından elde edilen serum örneklerinin uygulandığı β -hücrelerinde nükleusa yakın konumlanmış ve hücrenin bir kutbunda yoğunlaşmış, floresans ışıması yüksek ve yuvarlak görünümlü mitokondrilerin varlığını; T2D hastalarından elde edilen serum örneklerinin uygulandığı β -hücrelerinde sitoplazmada homojen dağılmış, floresans ışıması düşük ve nispeten uzamış görünümlü mitokondrilerin varlığını; IL1 β uygulanan β -hücrelerinde ise bazı hücrelerde nükleusun etrafında birleşmiş, bazı hücrelerde ise sitoplazmada homojen dağılmış, genel olarak floresans ışıması düşük mitokondrilerin varlığı dikkat çekmiştir.



Şekil 4.8: (A) Mitokondriyal kitledeki değişimi gösteren grafik (floresan yoğunluk/ μ g protein), (B) Mitokondri yapılarının floresan mikroskoptaki görüntüleri (X400) verilmiştir.

4.9 BETA-HÜCRE ÖLÜMÜ BULGULARI

Tip 2 diyabet gelişiminde görülen β -hücre kitlesindeki azalmanın β -hücrelerinin ölümü ile ilgili olduğunu gösteren yayınların yoğunluğundan dolayı deney gruplarımızdan PD'deki geri farklılaşma T2D'deki olası fonksiyon kaybı ve IL1 β 'daki mitokondriyal stres ve ER stres bulgularından yola çıkarak deney şartlarının hücre ölümü üzerindeki etkisi araştırıldı. Bu amaçla aktif kaspaz-3 protein miktarı simple western yöntemi ile belirlendikten sonra Annexin V/PI işaretlemesi ile akım sitometrik analiz yapıldı. İzole edilen insülin⁺ ve insülin⁻ hücre popülasyonlarından elde edilmiş sitoplazmik fraksiyonda aktif-kaspaz 3 seviyesindeki değişimler simple western yöntemi ile gösterildi. İnsülin⁺ hücre popülasyonunda, aktif kaspaz-3 protein seviyelerinde PD ($p<0,01$) ve IL1 β ($p<0,001$) gruplarında SS kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir artış belirlendi. İnsülin⁻ hücre popülasyonunda T2D ($p<0,05$) ve IL1 β ($p<0,05$) gruplarında SS kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir artış belirlendi. T2D grubunun insülin⁻ hücre popülasyonunda insülin⁺ hücre popülasyonuna kıyasla aktif-kaspaz 3 protein seviyesinde anlamlı bir artış belirlendi ($p<0,001$). Deney gruplarının insülin⁺ hücre popülasyonunda aktif-kaspaz 3 protein seviyeleri sırasıyla, SS: $0,10\pm0,03$, PD: $0,95\pm0,00$, T2D: $0,23\pm0,08$, IL1 β : $1,36\pm0,34$; insülin⁻ hücre popülasyonunda aktif-kaspaz 3 protein seviyeleri sırasıyla, SS: $0,03\pm0,00$, PD: $0,33\pm0,03$, T2D: $4,17\pm1,09$, IL1 β : $3,42\pm1,01$ olarak hesaplandı (**Şekil 4.9: (A)**). Aktif-kaspaz 3'ün sadece hücre ölümünde değil aynı zamanda hücre rejenerasyonunda da rol aldığı bilgisinden yola çıkılarak PD grubundaki artışın ölüm ile ilişkisinin gösterilebilmesi amacıyla Annexin V/PI işaretlemesi sonrası akım sitometri analizi yapıldı. Buna göre; apoptotik hücreler olan Annexin V⁺/PI⁺ hücrelerin T2D ($p<0,01$) ve IL1 β ($p<0,01$) gruplarında PD grubuna kıyasla anlamlı olarak arttığı belirlendi. Ayrıca nekrotik hücreleri temsil eden PI⁺ hücrelerin de T2D ($p<0,05$) ve IL1 β ($p<0,01$) gruplarında PD grubuna kıyasla arttığı belirlendi. IL1 β grubundaki hücrelerin T2D grubuna kıyasla da nekrotik hücre yüzdesinin yüksek olduğu belirlendi ($p<0,05$). Deney gruplarının apoptotik hücre yüzdeleri sırasıyla, PD: $7,25\pm0,19$, T2D: $13,93\pm1,45$, IL1 β : $16,35\pm0,91$, nekrotik hücre yüzdeleri sırasıyla, PD: $7,14\pm0,39$, T2D: $19,14\pm0,98$, IL1 β : $28,18\pm2,78$ olarak hesaplandı (**Şekil 4.9: (B)**).



Şekil 4.9: (A) İnsülin⁺ ve insülin⁻ hücre popülasyonlarında aktif ve pro-kaspaz-3 protein bantları ve bu bantların yoğunluklarını gösteren grafik, (B) Annexin/PI işaretlemesi sonrası apoptotik (Annexin V⁺/PI⁺) hücre yüzdeleri (solda) ile nekrotik (PI⁺) hücre yüzdeleri (sağda) ve bu sonuçlara ait plotlar verilmiştir. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 insülin⁺ SS'ye göre. #p<0,05 insülin⁻ SS'ye göre. +++p<0,001 insülin⁺ hücre popülasyonuna göre. B şekli için *p<0,05, **p<0,01 PD'ye göre, #p<0,05 T2D'ye göre.

4.10 LC-MS/MS BULGULARI

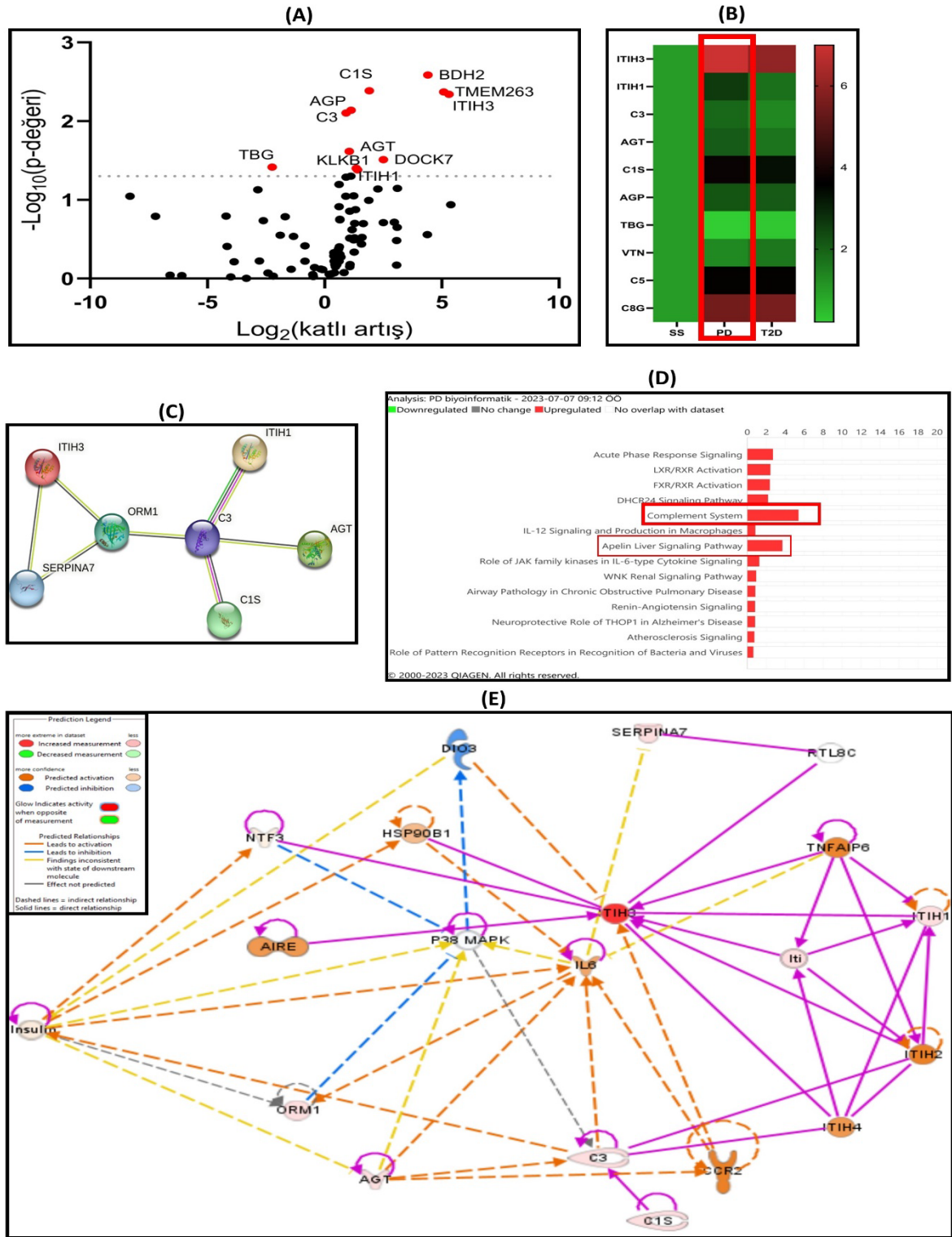
4.10.1 PD Hastalarından Elde Edilen Serum Örneklerinde Tam Proteom Analizi

PD ve T2D hasta serumlarında bulunan ve β -hücrelerinde geri farklılaşma, fonksiyon kaybı ve/veya ölüme neden olabilecek proteinlerin belirlenebilmesi için üçer adet sağlıklı, PD'li ve T2D'li insan serum örneğinde tam proteom analizi LC-MS/MS yöntemiyle yapıldı. Analiz sonuçlarına göre katlı artış $\geq 1,5$ olan ve bu değişimin istatistiksel olarak anlamlı olduğunu gösteren $p < 0,05$ bulunan proteinler filtrelendi. Proteinlerin birbirleri ile etkileşimlerinin belirlenebilmesi amacıyla yapılan biyoinformatik analizler için proteinler arasında güven (confidince) değeri > 40 olan proteinler ile analizlere devam edildi. Buna göre, PD'li hasta serumlarında sağlıklı insanların serumlarına göre anlamlı artış gösteren 10 adet protein ve azalma gösteren 1 adet protein tanımlandı. Tanımlanan proteinlerin güven (confidince) oranları, p-değerleri ve tanımlanan peptid sayıları **Tablo 4.1:**'de verilmiştir.

Tablo 4.1: LC-MS/MS ile tanımlanan proteinlerin güven oranı (%), p-değeri, katlı artış ve peptid sayıları verilmiştir. Analize alınan proteinler kalın yazı ile belirtilmiştir.

Gen Adı	Güven oranı (%)	p-değeri	Katlı artış	Peptid Sayısı
BDH2	16,27	0,003	21,26	2
C1S	115,94	0,004	3,75	14
TMEM263	18,99	0,004	34,03	2
ITIH3	40,43	0,005	39,48	9
ORM1	86,39	0,007	2,19	7
C3	1111,36	0,008	1,89	111
AGT	61,89	0,02	2,07	8
DOCK7	45,57	0,03	5,69	7
KLKB1	16,99	0,039	2,55	3
ITIH1	183,648	0,041	2,64	20
SERPINA7	45,38	0,038	0,22	7

Tam proteom analizi sonucu tanımlanan proteinlerin volkan plot analizi yapıldı. Bunun için proteinlerin p-değerlerinin $-\text{Log}_{10}$ 'u ve katlı artış değerlerinin Log_2 'si alındı. Sonuçta tanımlanan 11 proteinin de anlamlı değişimler gösterdiği belirlendi (**Şekil 4.10.1: (A)**). Bu proteinlerden güven değeri yüksek olan proteinler seçilerek analizlere devam edildi. Seçilen proteinler kalın işaretli olarak **Tablo 4.1:**'de verilmiştir. Isı grafiğinde PD ve T2D grupları arasında bazı proteinlerin katlı artış olarak benzer görüldüğü dikkati çekmektedir. Ancak p değerlerindeki farklara bakılarak istatistiksel olarak anlamsız değişimler analiz dışı bırakılmıştır. Tüm proteinlerin ısı haritası grafikleri **Şekil 4.10.1: (B)**'de verilmiştir. Belirlenen proteinlerin birbirleri ile etkileşimlerinin belirlenebilmesi için öncelikle String veri tabanında ITIH3, ITIH1, C1S, ORM1, C3, AGT ve SERPINA7 proteinleri analiz edildi ve tüm proteinlerin birbirleri ile etkileşim içinde olduğu belirlendi (**Şekil 4.10.1: (C)**). Daha sonra bu proteinlerin hangi moleküler yolda bulunduğu belirlenebilmesi amacıyla Qiagen Ingenuity Pathway Analysis (IPA) veri tabanı kullanıldı. Bu veri tabanına tanımlanan proteinlerin Uniprot numaraları ve ham p-değerleri ile yanlış keşif değeri (FDR) oranları verilerek analiz yapıldı. Analiz sonuçlarına göre tüm 7 proteinin komplement sistemde yukarı düzenlendiği belirlendi (**Şekil 4.10.1: (D)**). Daha sonra bu proteinlerin diğer moleküllerle etkileşimlerini gösteren network analizi sonucu mor renkte birbirine bağlanan moleküller direkt etkileşim halinde olan moleküller olarak belirlendi. Diğer renklerdeki moleküllerin etkileşimi ise dolaylı olarak gerçekleştiği tespit edildi (**Şekil 4.10.1: (E)**).



Şekil 4.10.1: (A) Tanımlanan proteinlerin volkan grafiği, (B) Isı haritası grafiği, (C) String sonuçlarına göre proteinlerin birbirleri ile etkileşimlerini gösteren şekil, (D) Analize alınan proteinlerin ana moleküler yolağını gösteren grafik, (E) Analize alınan proteinlerin diğer moleküllerle etkileşimini gösteren yolak verilmiştir.

4.10.2 T2D Hastalarından Elde Edilen Serum Örneklerinde Tam Proteom Analizi

T2D hastalarından elde edilen serum örneklerinde yapılan LC-MS/MS uygulaması sonucu elde edilen proteinlerin analizi başlık 4.10.1’de anlatıldığı şekilde yapıldı. Buna göre, T2D’li hasta serumlarında sağlıklı insanların serumlarına göre anlamlı artış gösteren 5 adet protein tanımlandı. Bu proteinlerin güven (confidence) oranları (%), p-değerleri ve tanımlanan peptid sayıları **Tablo 4.2:**’de verilmiştir.

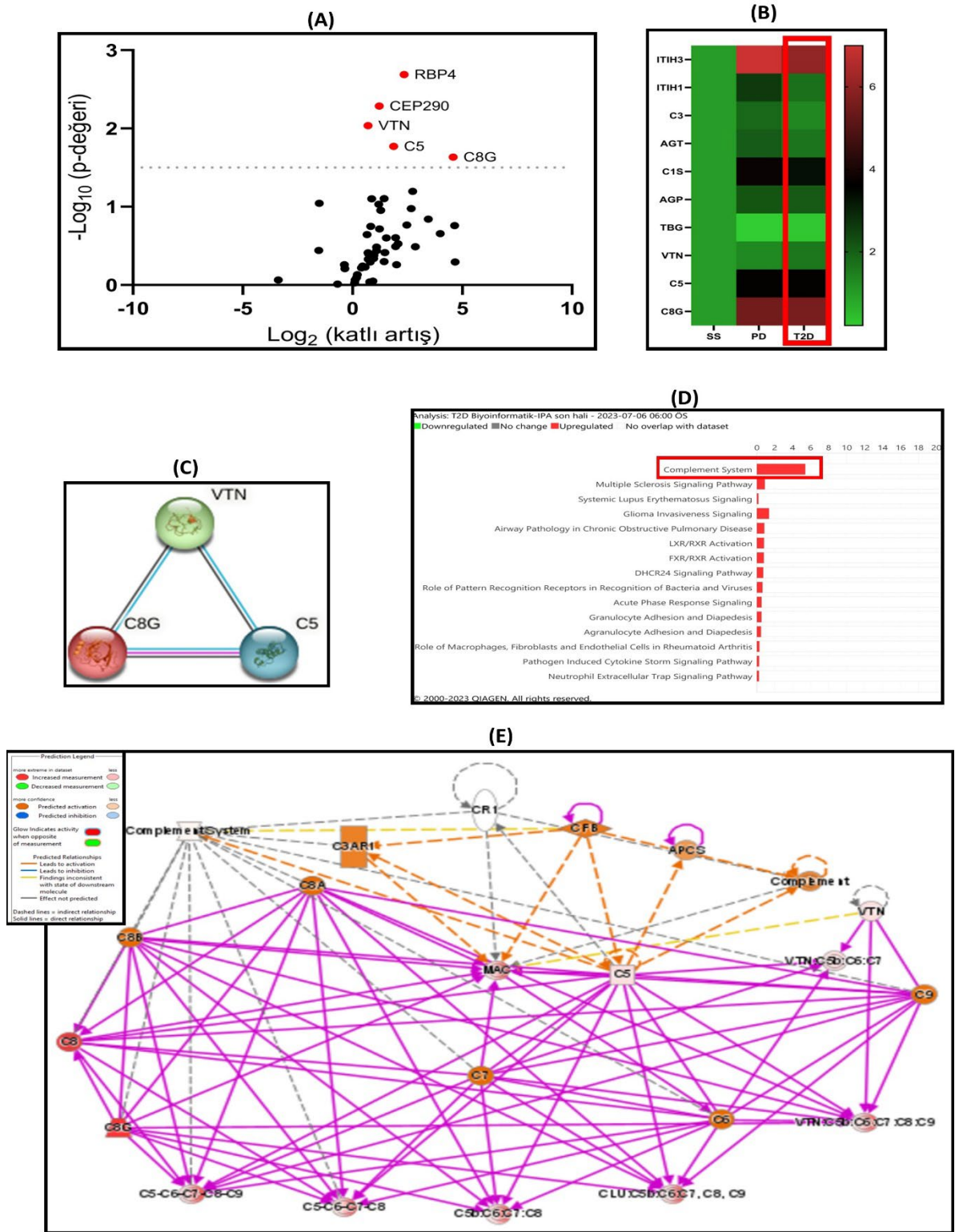
Tablo 4.2: LC-MS/MS ile tanımlanan proteinlerin güven oranı (%), p-değeri, katlı artış ve peptid sayıları verilmiştir. Analize alınan proteinler kalın yazıyla belirtilmiştir.

Gen Adı	Güven oranı (%)	p-değeri	Katlı artış	Peptid Sayısı
RBP4	13,1	0,002	5,09	2
CEP290	107,7215	0,005	2,3	19
VTN	93,36	0,009	1,6	11
C5	121,29	0,02	3,7	17
C8G	26,32	0,02	23,9	4

Tam proteom analizi sonucu tanımlanan proteinlerin volkan plot analizi yapıldı. Bunun için proteinlerin p-değerlerinin $-\log_{10}$ ’u ve katlı artış değerlerinin $\log_2$ ’si alındı. Sonuçta tanımlanan 5 proteinin de anlamlı değişim gösterdiği belirlendi (**Şekil 4.10.2: (A)**). Bu proteinlerden güven değeri yüksek olan proteinler seçilerek analizlere devam edildi. Sadece C8G proteini VTN ve C5 ile ilişkili olan ana moleküler yolda yer aldığından güven değerinden bağımsız olarak analizlere dahil edildi. Seçilen proteinler **Tablo 4.2:**’de kalın yazı ile belirtilmiştir. Isı grafiğinde PD ve T2D grupları arasında bazı proteinlerin katlı artış olarak benzer görüldüğü dikkati çekmektedir. Ancak p değerlerindeki farklara bakılarak istatistiksel olarak anlamsız değişimler analiz dışı bırakılmıştır. Tüm proteinlerin ısı haritası grafikleri **Şekil 4.10.2: (B)**’de verilmiştir. Belirlenen proteinlerin birbirleri ile etkileşimlerinin belirlenebilmesi için öncelikle String veri tabanında C5, VTN ve C8G proteinleri analiz edildi ve tüm

proteinlerin birbirleri ile etkileşim içinde olduğu belirlendi (**Şekil 4.10.2: (C)**). Daha sonra bu proteinlerin hangi moleküler yolakta bulunduğunun belirlenebilmesi amacıyla Qiagen IPA veri tabanı kullanıldı. Bu veri tabanına tanımlanan proteinlerin Uniprot numaraları ve ham p-değerleri ile FDR oranları kullanılarak analiz yapıldı. Analiz sonuçlarına göre 3 proteinin Komplement sistemde yer aldığı belirlendi (**Şekil 4.10.2: (D)**). Daha sonra bu proteinlerin diğer moleküllerle etkileşimlerini gösteren ağ analizi yapıldı ve sonuç olarak (**Şekil 4.10.2: (E)**)’de mor renkte birbirine bağlanan moleküller direkt etkileşim halinde olan moleküller; diğer renklerdeki moleküllerin etkileşiminin ise dolaylı olarak gerçekleştiği tespit edildi.





Şekil 4.10.2: (A) Tanımlanan proteinlerin volkan grafiği, (B) Isı haritası grafiği, (C) String sonuçlarına göre proteinlerin birbirleri ile etkileşimlerini gösteren şekil, (D) Analize alınan proteinlerin ana moleküler yolağını gösteren grafik, (E) Analize alınan proteinlerin diğer moleküllerle etkileşimini gösteren yolak verilmiştir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Diyabet, endokrin pankreasın işlev bozukluğundan kaynaklanan karmaşık bir metabolik bir bozukluktur. T1D’de otoimmün reaksiyonlar T2D’de ise glukolipotoksik ortam, β -hücrelerinde işlev bozukluğuna ve/veya nihayetinde hücre kaybına yol açar (Avrahami ve diğ., 2020; Sachs ve diğ., 2020). Pankreatik β -hücreleri, sağlıklı ve hasta bireylerin adacıklarında heterojen bir popülasyon olarak bulunur (Bader ve diğ., 2016; Roscioni ve diğ., 2016). Sağlıklı adacıklarda, β -hücreleri olgunlaşmamış ve olgun alt popülasyonlar içerir. Strese maruz kalan β -hücreleri tepkisel cevap olarak embriyonik ve neonatal β -hücrelerinin transkriptomu ile kısmen örtüşen gelişimsel bir yörünge boyunca geri farklılaşabilir (Sachs ve diğ., 2020; Talchai ve diğ., 2012). Bu noktadan çıkışla geri farklılaşan hücrelerde stresi ve yeniden farklılaşmasını durdurarak başarılı rejeneratif stratejiler geliştirilebileceği düşünülebilir. Alternatif olarak, olgunlaşmamış β -hücrelerinin proliferasyonunu tetiklemek ve ardından β -hücre kimliğini geri kazanmak için uyarılabilecek olgunlaşma aşaması terapötik bir seçenek olabilir. Bu doğrultuda, farelerde ve insanlarda yapılan iki ayrı çalışma, kanonik olmayan Wnt uyarımı üzerine, olgunlaşmamış ve proliferatif β -hücre alt popülasyonunun, olgun ve fonksiyonel bir fenotip elde etmeye yönlendirilebileceğini göstermiştir (Bader ve diğ., 2016; Yoshihara ve diğ., 2020).

Çalışmamızda, T2D gelişiminin ön aşaması olan PD ve T2D hastalarının serumunda bulunan uyaranların sıçan INS1E pankreatik β -hücre fenotipi üzerindeki etkilerini araştırmayı amaçladık. Bu kapsamda ilk olarak insan serumunun sıçan INS1E pankreatik β -hücrelerinin canlılığı üzerine olan etkilerini araştırabilmek amacıyla bu hücrelerin kültür ortamında bulunan FBS’nin yerine eşdeğer seviyede sağlıklı insan serumu uygulandı. Elde edilen bulgulara göre hücre canlılığının belirgin olarak azaldığı tespit edildi ve FBS’nin yokluğunda insan serumunun hücrelere yeterli yaşamsal desteği sağlayamadığı düşünüldü. Çok yakın tarihli bir çalışmada fetal serumun, kültürde memeli hücre dizilerinin ölmeden çoğalmasını desteklerken, yetişkin serumunun kültürde hücrelerin terminal farklılaşmasına ve ölümüne yol açtığı belirlenmiştir. Fetal ve yetişkin serumunun peptidleri ve proteinleri sıvı kromatografi, nano elektrosprey iyonizasyon ve tandem kütle spektrometresi (LC-ESI-MS/MS) ile analiz edilmiştir. Fetal serum α -fetoprotein içerirken, yetişkin serum örneklerinin bu proteini içermediği tespit edilmiştir. Ayrıca, fetal serumda insülin, insülin benzeri büyüme faktörü (IGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF), epidermal büyüme faktörü (EGF) ve trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF)’nün daha yüksek seviyelerde bulunduğu belirlenmiştir; MEGF, HDGFRP ve PSIP1 gibi yeni fetal

büyüme faktörleri ve TNFR, EGFR, NTRK2 ve THRA'nın varlığı da keşfedilmiştir (Chen ve diğ., 2022). Dolayısıyla fetal serumun memeli hücrelerine sağladığı yaşamsal desteğin erişkin insan serumuyla sağlanamaması şaşırtıcı bir bulgu değildir. İnsan serumu uygulanan sıçan INS1E pankreatik β -hücrelerinin canlılığını koruyabilecek bir kültür bileşeni olarak medyuma BSA eklenmiş ve %1 sağlıklı insan serumu+%5 BSA varlığında hücrelerin canlılığının büyük oranda korunduğu belirlenerek bu kültür bileşenlerinin uygulanmasına karar verilmiştir. Bu çalışma tasarlanırken göz önüne alınan diğer bir husus, insan serumundaki bileşenlerin sıçan hücrelerine etki edip etmeyeceği sorusudur. Literatürde bulunan benzer çalışmalarda sıçan serumunun insan hücrelerine (Shin ve diğ., 2016) veya insan serumunun sıçan hücrelerine uygulandığı (Schuetz ve diğ., 1992) çalışmaların bulunması iki tür arasındaki serum bileşenlerinin ve algılayıcı moleküllerin benzer olduğunu düşündürmektedir.

Embriyonik gelişim sırasında, ortak bir endokrin progenitör popülasyonu, glukagon üreten α -hücreleri, insülin üreten β -hücreleri, somatostatin üreten δ -hücreleri, ghrelin ifade eden ϵ -hücreleri ve pankreatik polipeptit üreten PP-hücreleri dahil olmak üzere farklı endokrin hormonlar üreten hücre tiplerine farklılaşır. Bunlar yetişkin pankreasındaki Langerhans adacıklarında kümelenen ana hormon üreten hücre tipleridir (Bakhti ve diğ., 2019; Bastidas-Ponce ve diğ., 2017). Embriyonik gelişim sırasında, β -hücreleri tam olgunlaşmamış olduğundan farklı glikoz seviyelerine yanıt olarak doğru şekilde insülin salgılayamazlar (Huang ve diğ., 2018). Doğumdan sonra, besin alımını takiben β -hücreleri bir olgunlaşma sürecinden geçer (Salinno ve diğ., 2019). Olgun β -hücreleri *Ucn3*, *MafA*, *Glut2* (kemirgenlerde) ve *Glut1* (insanlarda) dahil olmak üzere bir dizi olgunlaşma geninin ifadesi ile tanımlanır (Blum ve diğ., 2012; Nishimura ve diğ., 2015). Biriken kanıtlar, yetişkin pankreasında yüksek proliferatif potansiyele sahip olgunlaşmamış bir fenotipi koruyan küçük popülasyon da dahil olmak üzere farklı β -hücre alt popülasyonlarının varlığını bildirmiştir (Rui ve diğ., 2017; Salem ve diğ., 2019; van der Meulen ve diğ., 2017).

Çalışmamızda, T2D gelişiminin ön aşaması olan PD ve T2D hastalarının serumunda bulunan uyaranların ve geri farklılaşmanın pozitif kontrol şartı olarak uygulanan IL1 β 'nın sıçan INS1E pankreatik β -hücre fenotipi üzerindeki etkilerini gösterebilmek için gen ekspresyonu düzeyinde pankreatik β ve progenitör hücrelere özgün transkripsiyon faktörlerinin değişimi araştırıldı. Bulgular, IL1 β uygulanan hücrelerde şaşırtıcı bir şekilde olgun β -hücre belirteci *INS2* gen ekspresyonunda anlamlı bir artışa karşın *NeuroD1*, *PDX1* ve *SLC2A2* gen ekspresyonunda

anlamalı bir baskılanma olduğunu göstermektedir. Nordmann ve ekibi (2017) tarafından β -hücre geri farklılaşmasında enflamasyonun rolünü araştırmak üzere yapılan bir çalışmada fare ve sıçan adacıklarının 24 saat boyunca $IL1\beta$ 'ya maruz bırakılması, β -hücre transkripsiyon faktörleri *INS2*, *SLC2A2*, *PDX1*'in mRNA ekspresyonunun azalmasına neden olmuş ve bu bulgular $IL1\beta$ 'nın β -hücre geri farklılaşmasını uyardığı yönünde değerlendirilmiştir. Söz konusu çalışma ile mevcut çalışmamızda yapılan deneyler arasındaki en belirgin fark, Nordman ve ekibinin Langerhans adalarında, bizim çalışmamızda ise tek β -hücre kültüründe analiz yapılmasıdır. Adalarda bulunan çok farklı tipte somatik hücelere ilaveten progenitör hücreler gen ekspresyon seviyelerinde farklı sonuçlara ulaşılmasının nedeni olabilir. Söz konusu çalışmada internal kontrol gen olarak *GAPDH* seçilmiş ve normalizasyon bu genin ekspresyon düzeyine göre yapılmıştır. Oysa, *GAPDH*'nin farklı hücre tiplerinde farklı düzeylerde eksprese edildiği bilinmektedir ve bu tür farklı tipte hücrelerin bulunduğu örneklerde normalizasyon için uygun olmadığı göz önünde bulundurulmalıdır (Caradec ve diğ., 2010; Guo ve diğ., 2013). Çalışmamızda kullanılan *18sRNA*, virüs ile enfekte olan hücreler dahil birçok farklı hücre tipinde ve farklı deneysel şartlarda en güvenilir internal kontrol gen olarak gösterilmektedir (Kuchipudi ve diğ., 2012). Çalışmamızda $IL1\beta$ uygulanan β -hücrelerinde *NeuroD1*, *PDX1* ve *SLC2A2* gen ekspresyonunda anlamalı bir baskılanma tespit etmemize karşın, olgun β -hücresinin temel belirteci olan *INS2* gen ekspresyonunda artış belirlenmiş olması bu hücrelerin geri farklılaşmadığının bir göstergesi olarak değerlendirilmiştir. β -hücre gelişiminin önceki basamaklarının belirteç genlerinde de *Nestin* hariç baskılanma tespit edilmiş olması bu görüşü desteklemektedir. *Nestin* tek başına kök hücre belirteci olarak kabul edilemeyeceğinden (Qui ve diğ., 2007), $IL1\beta$ uygulanan β -hücrelerinde geri farklılaşmadan bahsedilmesi mümkün değildir.

T2D hastalarından elde edilen serum örneklerinin β -hücrelerine uygulanmasıyla glikoz taşıyıcısı *SLC2A2* geni hariç olgun β -hücre genlerinin ekspresyonunda belirgin bir baskılanma tespit edilmiş olmakla birlikte β -hücre gelişiminin önceki basamaklarının belirteç genlerinde anlamalı bir değişiklik olmadığı belirlenmiştir. *MafA*, β -hücre farklılaşmasında ikincil geçişin başlangıcında ifade edilen bir *INS2* geni transkripsiyon faktörüdür. *MafA* ekspresyonunun başlangıcı, β -hücresinin insülin sekresyonu ile glikoz konsantrasyonlarındaki değişikliklere yanıt verme yeteneğinin kazanılması ile çakışır (Matsuoka ve diğ., 2004; Olbrot ve diğ., 2002). Çalışmamızda, T2D hastalarından elde edilen serum örneklerinin uygulandığı β -hücrelerinde

Maia ve *INS2* gen ekspresyonlarında baskılanma gözlenmesi fonksiyonel bir baskılanma olabileceği yönünde değerlendirilmiştir.

PD hastalarından elde edilen serum örneklerinin β -hücrelerine uygulanmasıyla tüm olgun β -hücre genlerinin ekspresyonunda belirgin bir baskılanma olduğu saptandı. Diğer taraftan, β -hücre gelişiminin önceki basamaklarının belirteç genleri *NEUROG3*, *PTF1A*, *NKX6.1*, *OCT4*, *NANOG*, *Vimentin* ve *Nestin* ekspresyonlarında anlamlı bir artış belirlendi. Talchai ve ekibinin (2012) β -hücre geri farklılaşması ile ilgili yaptığı öncül deneylerden bu yana *NEUROG3*, *OCT4* ve *NANOG* progenitör benzeri hücrelere geri farklılaşma durumunun belirlenmesi için biyobelirteç olarak kullanılmaktadır. Bu bulgular, PD hastalarından elde edilen serum örneklerinin uygulandığı β -hücrelerinde tam anlamıyla bir geri farklılaşmanın meydana geldiğini, hatta hücrelerin birincil kök hücre seviyesine kadar yeniden programlandığını göstermektedir. β -hücre geri farklılaşması ile ilişkili araştırmaların hiperglisemi (Weir ve diğ., 2013), enflamasyon (Nordmann ve diğ., 2017) ve yaşlanma (Murao ve diğ., 2022) gibi fizyolojik stres durumlarında araştırıldığı görülmektedir. Ancak, PD hastalarının serumundaki uyarıların β -hücre geri farklılaşmasını uyarabileceği hipotezi ilk kez bu çalışmada değerlendirilmiş ve kanıtlanmıştır.

Bir sonraki adımda β -hücrelerinin temel belirteci olan insülin hormonunun seviyelerindeki değişimler belirlendi. Elde edilen bulgular T2D hastalarından elde edilen serum örneklerinin uygulandığı hücrelerin insülin seviyesinde bir değişim olmazken, PD hastalarından elde edilen serum örneklerinin uygulandığı hücreler ile IL1 β uygulanan hücrelerin insülin seviyelerinde anlamlı bir azalma olduğunu göstermektedir. Bu bulgular, T2D hastalarından elde edilen serum örneklerinin uygulandığı hücrelerde geri farklılaşma olmadığını, PD'li hasta serumunun uygulandığı hücrelerde ise geri farklılaşmanın gerçekleştiği hipotezlerini doğrulamaktadır. IL1 β uygulanan hücrelerde insülin seviyesinin azalması ise düşündürücüdür. Gen ekspresyonu seviyesinde uyarılan *INS2* üretimine karşı protein seviyesindeki azalma, insülin hormonunun hücrede azalmasına karşı transkript üretiminin artmış olması yönünde değerlendirilebileceği gibi *INS2* mRNA'sının hücrede birikmesinden kaynaklanan stres durumunun hücreleri ölüme yönlendirebileceği şeklinde de yorumlanabilir (Ghiasi ve diğ., 2018). Proinflamatuvar sitokinler, kısmen β -hücre transkriptomunun regülasyonu ile T1D ve T2D hastalarında görülen β -hücre yetmezliği ve apoptoz ile ilişkilendirilmiştir (Eizirik ve diğ., 2009). İnsan adacıklarındaki 29.000'den fazla transkriptin yaklaşık %20'sinin seviyeleri, apoptoz ve inflamasyonla ilişkili

genler dahil olmak üzere sitokinler tarafından düzenlenir. İnsan adacıklarında eksprese edilen genlerin %35'i alternatif birleştirme işlemine tabi tutulur ve sitokinler, birleştirilmiş transkriptlerin sayısında önemli değişikliklere neden olur (Eizirik ve diğ., 2012).

Tüm hücre popülasyonunda insülin üreten β -hücre sayısının ve insülin üretmeyen hücre sayısının belirlenebilmesi amacıyla akım sitometrik analizler yapıldı. Sonuç, PD hastalarından elde edilen serum örneklerinin uygulandığı hücreler ile IL1 β uygulanan hücrelerde toplam insülin seviyesindeki değişime benzer olarak baskılanma meydana geldiğini desteklemektedir. Ancak, T2D hastalarından elde edilen serum örneklerinin uygulandığı hücrelerde de β -hücre popülasyonunun azalmış olması toplam insülin seviyesindeki değişiminden farklılık göstermektedir. Bu bulgu, T2D hastalarından elde edilen serum örneklerinin uygulandığı hücrelerde kontrol gruba göre daha az sayıda β -hücresi bulunduğu, ancak bu hücrelerin yüksek miktarda insülin içerdiği şeklinde yorumlanmış ve bu gruptaki hücrelerin fonksiyon kaybına uğradığı görüşünü desteklediği düşünülmüştür.

T2D hastalarının pankreasında düşük fonksiyonel β -hücre kütleline neden olan hücresel süreçlere yönelik araştırmalar genel olarak kronik glukolipotoksisteye maruz kalmanın neden olduğu β -hücrelerinin apoptotik ölümü üzerinde yoğunlaşmaktadır (Donath ve diğ., 2005; Tomita, 2016). Çalışmamızda PD ve T2D hastalarından elde edilen serum örnekleri ile IL1 β uygulanan β -hücrelerinde apoptotik hücre oranı AnnexinV/PI işaretlemesini takiben akım sitometrik yöntemle ölçüldü. Elde edilen bulgulara göre en düşük apoptotik ve nekrotik hücre PD hastalarından elde edilen serum örneklerinin uygulandığı hücrelerde gözlenirken, T2D hastalarından elde edilen serum örneklerinin uygulandığı hücrelerde apoptotik hücre sayısının PD hastalarından elde edilen serum örneklerinin uygulandığı hücrelere kıyasla istatistik olarak anlamsız hafif bir artış gösterdiği, ancak nekrotik hücrelerin anlamlı bir şekilde arttığı belirlendi. En yüksek apoptotik ve nekrotik hücre ölümüne IL1 β uygulamasının neden olduğu tespit edildi. Diğer dikkat çeken bir bulgu, PD hastalarından elde edilen serum örneklerinin uygulandığı hücre popülasyonunda apoptotik ve nekrotik hücre sayısının birbirine yakın ve çok düşük olması; T2D hastalarından elde edilen serum örneklerinin uygulandığı hücrelerde nekrotik hücre sayısının apoptotik hücre sayısından fazla olması; IL1 β uygulanan hücrelerde ise nekrotik hücre sayısının apoptotik hücre sayısından yaklaşık 2 kat daha yüksek olmasıdır. Bu bulgu, T2D veya IL1 β varlığında β -hücrelerinin apoptotik hücre ölümünden nekrotik hücre ölümüne geçiş yapabileceği ve bu durumu inflamatuvar sitokinlerin yönlendirme olasılığını

düşündürmüştür. Literatürde IL1 β 'ya yanıt olarak β -hücre ölümünün nekroz (Collier ve diğ., 2006; Steer ve diğ., 2006) veya apoptoz (Grunnet ve diğ., 2009; Gurzov ve diğ., 2010) yoluyla ilerlediğini öne süren çalışmalar mevcuttur. Ancak, T2D veya IL1 β varlığında β -hücrelerinin apoptotik hücre ölümünden nekrotik hücre ölümüne geçiş yapabileceği hipotezini net olarak destekleyen verilere rastlanmamıştır. RIPK1, bu tür çapraz karışmayı düzenleyen önemli düğüm molekülü olarak öne çıkmaktadır (Anderton ve diğ., 2020). RIPK1 tarafından aktiflenen protein kinaz RIPK3 psödokinaz karışık soy kinaz alanı benzeri (MLKL)'nin aktivasyonunu sağlar. Sonuç olarak gerçekleşen hücre zarlarının yırtılmasının hücre içi bileşenlerin salınmasına neden olduğu bir programlanmış hücre ölümü biçimi olan nekroptozu tetikler (Yoon ve diğ., 2017). T2D veya IL1 β varlığında β -hücrelerinin apoptotik hücre ölümünden nekrotik hücre ölümüne geçiş yapabileceği hipotezini net olarak ortaya koyabilmek için RIPK1, RIPK3 ve MLKL proteinlerinin aktif formlarının seviyelerinin ölçülmesi gerekmektedir.

Kaspazlar, apoptozda iyi tanımlanmış rolleriyle bilinen proteazlardır. Bununla birlikte, artan kanıtlar kaspazların apoptoz dışındaki çoklu fonksiyonlarını göstermektedir. Kaspazların apoptotik olmayan rolleri arasında proliferasyon, tümör baskılama, farklılaşma, nöral gelişim ve yaşlanma sayılabilir. Kaspaz-3 hücre farklılaşmasında, yenilenmesinde ve nöral gelişimde belirgin ve herhangi bir apoptotik aktivite içermeyen şekillerde önemli rollere sahiptir (Shalini ve diğ., 2015). Nöronal Wnt2'nin yukarı düzenlenmesinin ve astrosit geri farklılaşmasının kaspaz-3'e bağlı olması ilginçtir (Fan ve diğ., 2020). Yaralanmanın neden olduğu Wnt aktivasyonu gösterilmiştir (Bastakoty ve Young, 2016), ancak yaralanmanın Wnt sinyalini nasıl aktive ettiği ise belirsizliğini korumaktadır. Düşük organizasyonlu hayvanlarda, örneğin hidrada, apoptoz kaynaklı Wnt aktivasyonu, kafa rejenerasyonunu başlatmak için çok önemlidir (Chera ve diğ., 2009). Memelilerde yapılan iki çalışma, memeli derisinde ve tümör dokularında, apoptotik hücrelerin potansiyel bir Wnt sinyal aktivatörü olan prostoglandin-E2 salarak yara iyileşmesini (Li ve diğ., 2010) ve tümör hücresi repopülasyonunu (Huang ve diğ., 2011) indüklediğini bildirmiştir (Goessling ve diğ., 2009). Bir başka çalışmada, mikrogliya proliferasyonunun apoptoz ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Askew ve diğ., 2017). Çalışmamızda PD hastalarından elde edilen serum örneklerinin uygulandığı insülin⁺ β -hücrelerinde aktif kaspaz-3 seviyesinde bir artış gözlenmesine karşın insülin⁻ hücrelerde aktif kaspaz-3 seviyesinde sağlıklı insan serumunun uygulandığı kontrol gruba göre anlamlı bir değişim olmadığı belirlendi. Diğer gruplara göre düşük oranda apoptoz ile birlikte bu bulgu PD hastalarından elde edilen serum örneklerine maruziyetin β -hücrelerini kaspaz-3 aracılı düşük

seviyeli bir apoptoz ile ilişkili geri farklılaşmaya yönlendirebileceği şeklinde yorumlandı. Diğer taraftan, T2D hastalarından elde edilen serum örneklerinin uygulandığı insülin⁺ β -hücrelerinde aktif kaspaz-3 seviyesinde anlamlı bir artış gözlenmezken insülin⁻ hücrelerde aktif kaspaz-3 seviyesinde sağlıklı insan serumunun uygulandığı kontrol gruba göre belirgin bir artış olduğu tespit edildi. Bu bulgu, apoptotik hücrelerin insülin⁻ popülasyonda yer aldığını göstermektedir. Bu bulgular T2D'li hasta serumuna maruziyetin β -hücrelerinde insülin üretimini baskıladığı ve insülin üretemeyen bu hücrelerin kaspaz-3 aracılı apoptoz ile ölüme gidebileceği şeklinde yorumlandı. IL1 β uygulanan insülin⁺ ve insülin⁻ hücrelerde aktif kaspaz-3 seviyesinde anlamlı bir artış tespit edildi ve IL1 β 'nın hem β -hücreleri hem de insülin üretemeyen hücrelerde kaspaz-3 aracılı apoptozu tetikleyebileceği şeklinde yorumlandı. İnsanlardan ve farelerden elde edilen kanıtların IL1 β aracılığıyla uyarılan pankreatik β -hücre apoptozunu uyardığının gösterilmiş olması bulgularımızı desteklemektedir (Li ve diğ., 2019).

T2D hastalarının pankreasında düşük fonksiyonel β -hücre kütlelerine neden olan mekanizmalara yönelik araştırmaların odaklandığı diğer bir hücresel süreç genel olarak kronik glukolipotoksisteye maruz kalmanın neden olduğu ER stresidir (Back ve Kaufman, 2012; Fonseca ve diğ., 2011). Diyabetik bireylerin pankreatik β -hücrelerinde artmış UPR sinyalinin bir sonucu olan ER stresinin varlığı artık şüphe götürmez bir gerçek olarak kabul edilmektedir. Bununla birlikte, ER stresi yanıtındaki bu artışın T2D'de gözlenen β -hücre yetmezliğine önemli ölçüde katkıda bulunup bulunmadığı veya bunun metabolik değişime adapte olabilmek için bir başa çıkma mekanizmasını temsil edip etmediği tartışmalıdır. Hücreler, hastalığın ilerleme sürecinde gelişen metabolik taleplerdeki değişikliklere uyum sağlar. Mevcut kanıtlar, protein yanlış katlanma stresine yanıt olarak hücresel homeostazı sürdürmenin yanı sıra pankreatik β -hücrelerinin gelişimleri, işlevleri ve hayatta kalmaları için düzenlenmiş bir UPR'ye gereksinim duyulduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, β -hücre fonksiyonu ve hayatta kalma için optimal UPR'nin önemli olduğu ve uzun süreli ER stresi sinyalinin β -hücrelerine zararlı olabileceği bilinmektedir (Shrestha ve diğ., 2021). Çalışmamızda UPR varlığı, ER'nin protein kalite kontrolünü sağlayan ve ayrıca ER-transmembran sinyal moleküllerinin aktivasyonunu kontrol etmek için kritik olan önemli bir ER şaperon proteini GRP78 (Wang ve diğ., 2009)'in, ER stresi ise GRP78 ile birlikte CHOP (Zheng ve diğ., 2014) seviyelerindeki değişimlerin belirlenmesi yoluyla araştırıldı. PD hastalarından elde edilen serum örneklerinin uygulandığı hücreler arasında yer alan insülin⁺ β -hücrelerinde GRP78 seviyesinde sağlıklı insan serumunun uygulandığı kontrol gruba göre anlamlı bir değişim gözlenmemesine karşın insülin⁻ hücrelerde

GRP78 seviyesinde sağlıklı insan serumunun uygulandığı kontrol gruba göre anlamlı bir artış olduğu belirlendi. Bu grupta CHOP seviyelerinde bir değişim gözlenmediğinden insülin⁻ hücrelerde ER stresinden bağımsız bir UPR yanıtının varlığı dikkat çekiciydi. Çin'in Şanghay kentindeki bir araştırma ekibi, β -hücre geri farklılaşmasından UPR kusurlarının sorumlu olabileceğini öne sürmüştür. Min6 fare β -hücrelerinde UPR'yi düzenleyen şaperon protein GPR94 veya XBP1'in baskılanması, progenitör genleri yukarı doğru düzenlerken β -hücrelerine özgün genlerin ekspresyonunu aşağı doğru düzenlenmesine neden olmuştur. Dahası, gen ifadesindeki bu değişiklikler, GPR94 ifadesi geri yüklendiğinde tersine çevrilmiştir ve etkili bir UPR uygulanamaması durumunda β -hücrelerinin geri farklılaşabileceği sonucuna varılmıştır (Song ve diğ., 2022). Çalışmamızda PD hastalarından elde edilen serum örneklerinin uygulandığı insülin⁺ β -hücrelerinde etkili bir UPR gelişmemesi sonucunda hücrelerin geri farklılaştığı ve yeni oluşan insülin⁻ hücrelerin UPR geliştirebildiği fikri ortaya çıkmıştır. T2D hastalarından elde edilen serum örneklerinin uygulandığı hücreler arasında yer alan insülin⁺ ve insülin⁻ hücrelerde GRP78 seviyesinde sağlıklı insan serumunun uygulandığı kontrol gruba göre bir artış olduğu, ancak bu hücrelerde CHOP seviyelerinde bir değişim gözlenmediğinden ER stresinden bağımsız bir UPR yanıtının geliştiği belirlendi. Bu durumda, T2D hastalarından elde edilen serum örneklerinin uygulandığı hücreler arasında yer alan insülin⁺ β -hücrelerinde etkili bir UPR geliştiği ve bu yolla apoptotik hücre ölümünün engellenebildiği düşünülmüştür. UPR'nin Bcl2 ailesi proteinlerinin antiapoptotik üyelerini pozitif olarak düzenleyerek apoptozu engelleyebildiği bilinmektedir (Darling ve Cook, 2014; Yang ve diğ., 2016). İnsülin⁻ hücreler PD hastalarından elde edilen serum örneklerinin uygulandığı gruba benzer olarak UPR geliştirebilmektedir. UPR'nin progenitör ve kök hücrelerin karakterinin korunmasında önemli olduğuna dair birçok çalışma vardır. Örneğin UPR'nin geçici aktivasyonunun Yamanaka transkripsiyon faktörleri OCT4, SOX2, KLF4 ve c-MYC ile somatik hücrelerin indüklenmiş pluripotent kök hücrelere yeniden programlanması için gerekli olduğu bildirilmiştir (Simic ve diğ., 2019). GRP78'in koşullu nakavt edilmesinin, apoptoz yoluyla hematopoietik kök hücreler (HSC)'in tükenmesine yol açtığı ve UPR'nin kemirgen HSC'lerin hayatta kalmasına katkıda bulunduğu bildirilmiştir (Wey ve diğ., 2012). In vitro bağırsak kök hücrelerinin, ER stresi indükleyicilerine maruz kaldığında ve GRP78'in in vivo koşullu kaybı durumunda farklılaştığı belirlenmiştir (Heijmans ve diğ., 2013). Bu bulgular ER stresinin ve UPR'nin doku gelişimi, kök hücre özelliklerinin korunması ve farklılaşmasının önemli düzenleyicileri olduğunu göstermektedir. Dolayısıyla, insülin⁻ hücrelerde GRP78 seviyesinin artışı PD hastalarından elde

edilen serum örneklerinin uygulandığı grupta öncül hücre karakterlerinin kazanımı ve T2D hastalarından elde edilen serum örneklerinin uygulandığı grupta β -hücre fonksiyon kaybı ile ilişkilendirilebilir. IL1 β uygulanan hücreler arasında yer alan insülin⁺ ve insülin⁻ hücrelerde GRP78 seviyesinde sağlıklı insan serumunun uygulandığı kontrol gruba göre bir artış olduğu, ancak insülin⁺ hücrelerde CHOP seviyelerinde bir azalma gözlenirken, insülin⁻ hücrelerde CHOP seviyelerinde bir artış olduğu tespit edildi. Bu durumda IL1 β uygulanan insülin⁺ hücrelerde ER stresinden bağımsız bir UPR yanıtının geliştiği, ancak insülin⁻ hücrelerde ER stresinin geliştiği belirlendi. Bu bulgular, IL1 β 'nın özellikle insülin⁻ hücrelerde ER stresi aracılığıyla hücre ölümüne neden olduğunu düşündürmektedir.

Mitokondriyal fonksiyon bozukluğu ve oksidatif stresin T2D patogenezinin ayrılmaz bir parçası olabileceğine dair artan kanıtlar dikkat çekicidir. Isı şoku proteini HSP60, mitokondriyal bozukluk koşulları altında UPR^{mt} ile indüklendiği bilinen bir mitokondriyal stres proteinidir. Bu hücre içi protein normalde mitokondride konumlanmasına rağmen, birçok çalışma bu proteinin sistemik dolaşımında da bulunduğunu göstermiştir. Yuan ve ekibi (2011), diyabetik olmayan kontrollerle karşılaştırıldığında T2D hastalarının hem tükürük hem de serum örneklerinde yüksek HSP60 düzeylerinin varlığını bildirmişlerdir. Çalışmamızda PD ve T2D hasta serumlarında HSP60 düzeylerinin artmış olduğu belirlenmiştir. PD hasta serumunda HSP60 seviyesindeki değişim ilk kez gösterilmiştir. ER ve mitokondri yakın temas halinde olup fiziksel ve işlevsel olarak etkileşime girer. Biriken veriler, mitokondriyi çeşitli hücresel fonksiyonların merkezine yerleştirmekte ve mitokondrinin otofaji ve iltihaplanma gibi sinyal yollarının bütünleştiricisi olduğunu öne sürmektedir. Protein homeostazı enfeksiyonlara, oksidatif strese ve enerji eksikliğine karşı özellikle hassastır. Bu nedenle, organel fonksiyonunu etkileyen çevresel uyaranlar, farklı UPR'lerin uyumlu aktivasyonuna yol açar (Rath ve Haller, 2012). Çalışmamızda, yalnızca IL1 β uygulanan insülin⁺ β -hücre popülasyonunda HSP60 seviyelerinde artış olduğu belirlenmiştir. Literatür taramasında çalışmamıza benzer olarak IL1 β uygulamasının β -hücre popülasyonunda HSP60 seviyeleri üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak, IL1 β 'nın N9 mikrogial hücrelerinde TLR4-p38-MAPK eksenini yoluyla iltihabı daha da artıran HSP60 ekspresyonunu indüklediğinin gösterilmesi (Swaroop ve diğ., 2016) HSP60'ın mevcut enflamatuvar uyarının şiddetlendirilmesinde rol oynadığını düşündürmektedir. T2D hastalarının serumunda bulunan yüksek HSP60 seviyeleri TLR2 ve TLR4 reseptörleri ile etkileşerek vasküler endotel hücreler gibi hedef hücrelerde proinflamatuvar sitokinlerin salınmasına yol açabilmektedir. Bu nedenle, bir proinflamatuvar

sinyal molekölü olarak görev yapan HSP60, T2D'nin bir özelliği olarak kabul edilen çözölmemiş vasküler enflamasyonda rol oynayabilir. HSP60'ın diyabette enflamatuvar süreçler için önemli bir düzenleyici rol oynadığı ve ayrıca mitokondriyal stres ile inflamasyon arasında önemli bir bağlantı sağlayabileceği düşünölmektedir (Juwono ve Martinus, 2016). İlginç bir bulgu olarak çalışmamızda PD veya T2D hastalarından elde edilen serum örneklerinin uygulandığı β -hücrelerinde mitokondriyal HSP60 seviyelerinde değişiklik belirlenmemiştir. Yukarıda yer alan çalışmalar ışığında PD veya T2D hastalarından elde edilen serum örneklerinin uygulandığı β -hücrelerinde HSP60'ın hücre dışına salınmış olma olasılığı yüksektir. Bu hipotezin doğrulanabilmesi için PD ve T2D hastalarından elde edilen serum ve hücre kültürü medyumunu örneklerinin uygulandığı hücrelerin kültür medyumunda HSP60 seviyelerinin belirlenmesi gerekmektedir.

HSP ekspresyonundaki değişikliklerin öncöl hücrelerde kendini yenileme, farklılaşma, çevresel strese ve yaşlanmaya karşı duyarlılık ile ilişkili olabileceği bilinmektedir (Fan, 2012). HSP60 adipoz doku kökenli mezenkimal kök hücreler ile HSC'lerde farklılaşma ile ilişkilendirilmiştir (DeLany ve diğ., 2005; Kol ve diğ., 2000). Çalışmamızda insülin⁻ popölasyonda en yüksek HSP60 seviyesinin sağlıklı serum uygulanan grupta gözlenmiş olması bu gruptaki hücrelerin farklılaşmaya kararlanan ancak insülin üretmeyen progenitör hücreler olduğunu düşündürmektedir. PD veya T2D hastalarından elde edilen serum örneklerinin veya IL1 β 'nın uygulandığı grupta yer alan insülin⁻ hücrelerde belirlenen HSP60 seviyelerindeki anlamlı baskılanma bu hücrelerin öncöl hücre karakterine daha yakın olduğunu düşündürmektedir.

OXPHOS kusuru, mtDNA tükenmesi ve kusurlu mitokondriyal protein kalite kontrol mekanizmaları mitokondriyal proteotoksik strese neden olabilir. Bu durum, UPR^{mt}'yi tetikler, HSP60 gibi mitokondriye yönelik stres yanıt genlerinin transkripsiyonunu yönlendirir (Coyne ve Chen, 2018). Çalışmamızda, mitokondriyal fonksiyon kaybı ile HSP60 seviyesi arasındaki ilişkinin gösterilebilmesi için deney şartları INS1E β -hücrelerine uygulandıktan sonra tetrazolyum tuzu WST-1'in mitokondriyal dehidrogenazlar tarafından indirgenme oranı belirlendi. Sonuç olarak, PD hastalarından elde edilen serum örneklerinin uygulandığı hücrelerde WST-1 indirgenme oranında bir farklılık gözlenmezken T2D hastalarından elde edilen serum örneklerinin uygulandığı hücrelerde WST-1 indirgenme seviyesinin nispeten hafif fakat istatistiksel olarak anlamlı olarak azaldığı, IL1 β uygulanan hücrelerde ise WST-1 indirgenme oranında çok belirgin bir azalma olduğu dikkatimizi çekti. WST-1 reaktifi genel

olarak hücre canlılığı testlerinde kullanıldığından kuyulardaki hücre miktarının belirlenmesi için hücreler lize edilip protein seviyeleri ölçüldü. Sonuç olarak gruplar arasında protein seviyelerinde bir farklılık tespit edilmediğinden WST-1 indirgenmesindeki değişimlerin doğrudan mitokondriyal dehidrogenazların aktivitesindeki azalma ile ilişkili olduğu düşünüldü. OXPHOS sistemi bileşenlerinden Kompleks-1'i oluşturan NADH dehidrogenaz, elektronların solunum zincirine ana giriş noktası olduğundan, solunumda hız sınırlayıcı adım olarak önerildiğinden ve dolayısıyla enerji metabolizmasında merkezi bir rol oynadığından (Sharma ve diğ., 2009), WST-1 indirgenmesinin azaldığı T2D ve özellikle IL1 β gruplarında OXPHOS'un baskılandığı düşünülebilir. IL1 β uygulanan hücreler arasında bulunan insülin⁺ β -hücrelerinin mitokondriyal HSP60 seviyesindeki artış ile WST-1 indirgenme oranındaki azalma uyumlu olmasına karşın T2D grubunda HSP60 seviyelerinde herhangi bir değişim gözlenmemiş olması HSP60'ın tek başına OXPHOS veya mitokondriyal fonksiyon kaybı ile ilişkilendirilemeyeceğini göstermektedir.

Reaktif oksijen türleri, kök hücrelerin kaderini belirlemede önemli bir rol oynar. Kök hücrelerde enerji üretimi esas olarak yüksek glikoliz oranıyla artan laktat üretimine yol açarken, OXPHOS aktivitesi sınırlıdır, bu da oksijen tüketiminin ve ROS üretiminin düşük seviyelerde korunmasını sağlar (Wanet ve diğ., 2015). Kök hücrelerin sessizliği ve kendini yenilemeyi sürdürmesi için düşük ROS seviyeleri gereklidir. ROS üretimindeki artışlar, seviyeye bağımlı bir şekilde kök hücre çoğalmasına, farklılaşmasına, yaşlanmasına ve apoptoza neden olarak tükenmelerine neden olur. Bu nedenle, kök hücrelerde ROS üretim seviyesi, bir organizmanın ömrü boyunca doku homeostazını sürdürme ve hasarlı dokuları onarma yeteneğine sahip olmalarını sağlamak için sıkı bir şekilde düzenlenir (Zhou ve diğ., 2013). Çalışmamızda, yalnızca PD'li hasta serumu uygulanan β -hücrelerinde ROS seviyesinde anlamlı bir baskılanma tespit edilmiş ve bu durum geri farklılaşma ile ilişkilendirilmiştir. Genel olarak, yüksek glikoz metabolizmasının hücrel ROS seviyelerini artırdığı, insülin salgılayan hücrelere zarar verdiği ve yaşa bağlı diyabetik fenotiplere yol açtığı kabul edilmektedir (Bhatti ve diğ., 2022). Aksine Wang ve ekibi (2019), yüksek glikozun hem memeli hücrelerinde hem de yuvarlak solucan *C. elegans*'ta paraquat tarafından indüklenen ROS üretimini baskıladığını göstermiştir. Tutarlı bir şekilde, ROS tarafından düzenlenen transkripsiyon faktörü SKN-1'in glikoz tarafından etkisiz hale getirildiği tespit edilmiştir. Söz konusu çalışma, glikoz ve ROS aracılı hastalıklara ilişkin mevcut anlayışımızın üzerinde önemli bir etkiye sahip olabilecek, glikozun ROS ile benzeri görülmemiş bir etkileşimini ortaya koymaktadır. Çalışmamızda elde ettiğimiz ve söz konusu

makaleden elde edilen bulgular bir arada T2D gelişiminin ön aşaması olan PD basamağında yükselen glikoz seviyelerine cevaben hücrelerin geri farklılaştığı ve ROS seviyelerinin baskılanarak hücrelerin kendini zararlı etkilerden koruyabildiğini; hastalığın ilerleyen aşamalarında ise bu baskılanmanın ortadan kalktığını ve hücrelerin hasara açık hale geldiğini düşündürmektedir. PD koşullarında ROS seviyelerinin baskılanmasını sağlayan moleküler mekanizmaların aydınlatılması T2D tedavisi için yeni terapötik yaklaşımlar geliştirilebilmesini sağlayabilir. Mevcut bulgulara göre erken aşamadaki oksidatif stres hormetik ROS'u indükleyebilir ve bu da SKN-1 gibi transkripsiyon faktörlerini aktive ederek oksidatif stres tepkisini harekete geçirir. Glikoz bu tür hormetik ROS'u baskılayabilir, dolayısıyla SKN-1 gibi transkripsiyon faktörlerini inhibe edebilir. Hormetik ROS'un glikoz tarafından baskılanması, daha sonraki yaşamda ve organizma ölümünde kontrolsüz ROS yükselmesine yol açar (Wang ve diğ. 2019). Bu bilgilerin ışığında, PD aşamasında ROS'un baskılanması T2D patogenezi hızlandıran bir etkidir ve bu baskının PD aşamasında ortadan kaldırılması için SKN-1 gibi transkripsiyon faktörlerinin uyarılması T2D tedavisi için yeni terapötik yaklaşımlar geliştirilebilmesini sağlayabilir.

Aynı tip hücrelerde bile mitokondriler heterojendir ve farklı fonksiyonel özellikler gösterirler. Sağlık ve hastalık durumlarında mitokondriyal morfoloji, membran potansiyeli ve kalsiyum düzeyleri farklıdır. Bununla birlikte, hastalık sırasında mitokondriyal heterojenite derecesi de değişir. Fizyolojik durumdaki heterojenlik, fiziksel olarak farklı mitokondriyal alt popülasyonlardan kaynaklanır. Genel olarak mitokondriyal heterojenite, hücresel sistem için biyolojik strese hücresel adaptasyonu sağlamada koruyuculuk sağladığından yararlı iken bazı durumlarda koruyucu mekanizmaları inhibe edebileceğinden zararlı olabilir (Ngo ve diğ., 2021). Aşırı glikoz ve serbest yağ asidi seviyeleri, β -hücrelerinde hücre içi MMP heterojenitesini artırır (Johnston ve diğ., 2016; Molina ve diğ., 2009). İn vitro yüksek besin mevcudiyetinin tek bir β -hücre içindeki MMP heterojenitesini artırdığının gösterilmesi, diyabetik β -hücrelerinde mitokondriyal işlev bozukluğunun boyutu ile ilgili fikir vermektedir. β -hücrelerinde mitokondri hiperpolarizasyonu, yükselen glikoz konsantrasyonuna yanıt olarak insülin salgılanması ile ilişkilidir (Nicholls ve Ward, 2000). Pankreatik β -hücre MMP'sinin, mitokondriyal anyon taşıyıcı protein ailesinin bir üyesi olan ayrıştırıcı protein 2 (UCP2) tarafından düzenlenebileceği üzerinde durulmaktadır. UCP2, mitokondriyal membran potansiyelini azaltmak için proton sızıntısını kolaylaştırır ve böylece ATP sentezini zayıflatır. UCP2'nin insülin sekresyonunu negatif yönde düzenlediği obezite, β -hücre fonksiyon

bozukluğu ve T2D arasında önemli bir bağlantı olduğu bildirilmiştir (Polonsky ve Semenkovich, 2001; Zhang ve diğ., 2001). Obezite ve kronik hiperglisemi mitokondriyal süperoksit ($O_2 \bullet^-$) üretimini artırır (Patane ve diğ., 2002) ve UCP2'nin aktivasyonunu sağlayarak pankreatik adacık β -hücre fonksiyon bozukluğun sonuçlandırır (Joseph ve diğ., 2004; Krauss ve diğ., 2003). UCP2 aracılı proton sızıntısının Genipin tarafından inhibisyonunun, in vitro izole pankreas adacıklarında ve in vivo diyete bağlı T2D hayvan modelinde obezite ve yüksek glikoz kaynaklı β -hücre fonksiyon bozukluğunu akut bir şekilde tersine çevirdiği tespit edilmiştir (De Souza ve diğ., 2007; Zhang ve diğ., 2006). Bu gözlemler, UCP2'nin mitokondrilerde üretilen süperoksit tarafından aktivasyonunun, T2D patogenezi sırasında β -hücre fonksiyon bozukluğunun gelişimine katkıda bulunabileceğini göstermektedir. Çalışmamızda PD veya T2D hastalarından elde edilen serum örnekleri veya IL1 β uygulanan hücrelerde sağlıklı insan serumu uygulanan hücrelere kıyasla MMP değerlerinde genel olarak anlamlı bir baskılanma olduğu belirlenmiştir. Yalnızca T2D hastalarından elde edilen serum örneklerinin uygulandığı grubun insülin⁻ hücrelerinde MMP değerinin değişmediği belirlenmiştir. Bu bulgular, geri farklılaşan veya ölmekte olan hücrelerde MMP kaybının ortak bir özellik olduğunu, fonksiyon kaybının tek başına MMP ile ilişkili olmadığını düşündürmüştür. Ayrıca, geri farklılaşan veya fonksiyonunu yitiren veya ölmekte olan progenitör hücre benzeri popülasyonun mitokondriyal fraksiyonunda UCP2 seviyeleri ölçüldü. Sonuç olarak, mitokondriyal UCP2 seviyelerinin T2D serum örneği uygulanan hücreler arasında bulunan insülin⁺ hücrelerde belirgin olarak azaldığı, aynı grubun insülin⁻ hücrelerinde ise insülin⁺ hücrelere kıyasla anlamlı bir artış olduğu belirlendi. Bu bulgu, mitokondriyal UCP2 baskılanmasının β -hücre fonksiyon kaybı ile ilişkili olabileceğini ve fonksiyonunu kaybeden insülin üretemeyen β -hücrelerinde UCP2 seviyesi artmış olsa da bu seviyenin halen sağlıklı insan serumu uygulanan kontrol grubundan düşük olması sebebiyle bu hücrelerin farklılaşmış hücre fenotipine yakın bir ara popülasyon olduğunu düşündürmüştür. UCP2, mitokondriyal glikoz oksidasyonunu önleyerek ve bir substrat şant mekanizması aracılığıyla glikolizi kolaylaştırarak insan pluripotent hücreleri (hPSC)'nin enerji metabolizmasında düzenleyici bir rol oynar. Erken farklılaşma ile hPSC proliferasyonu yavaşlar, enerji metabolizması azalır ve UCP2 baskılanır, bu da glikolizin azalmasına ve mitokondriyal glikoz oksidasyonunun korunmasına veya artmasına neden olur. Ektopik UCP2 ifadesi, bu metabolik geçişi ve hPSC farklılaşmasını bozar. Genel olarak, hPSC'ler aktif mitokondriler içerir ve tam farklılaşma potansiyeli için UCP2'nin baskılanması gerekir (Zhang ve diğ., 2016). Bu bilgi, hipotezimizi

desteklemektedir. Diğer taraftan, mitokondriyal UCP2 seviyelerinde T2D grubuna göre daha az fakat anlamlı bir baskılanma IL1 β uygulanan hücreler arasında bulunan insülin⁺ hücre popülasyonunda belirlenmiştir, ancak bu grubun insülin⁻ hücrelerinde insülin⁺ hücrelere kıyasla anlamlı bir artış tespit edilmemiştir. Bu durumda IL1 β uygulamasının β -hücre fonksiyon kaybına neden olabileceği düşünülmüştür ki bu görüşü destekleyen birçok makale mevcuttur (Maedler ve diğ., 2017; Wang ve diğ., 2010). Ayrıca, IL1 β uygulanan hücreler arasında yer alan insülin⁻ hücrelerin mitokondriyal UCP2 seviyelerinde sağlıklı insan serumu uygulanan kontrol grubuna göre anlamlı bir artış gözlenmiş olması, yukarıda verilen bilgiler göz önünde bulundurularak, bu hücrelerin mitokondriyal fonksiyonunda baskılanma olduğunu ve hücre metabolizmasının glikolize kaydığını düşündürmüştür. Mitokondriyal UCP2 seviyelerinin PD serum örneği uygulanan hücreler arasında bulunan insülin⁺ hücrelerde değişmediği, aynı grubun insülin⁻ hücrelerinde ise insülin⁺ hücrelere kıyasla anlamlı bir azalma olduğu belirlenmiştir. Bu bulgu, PD grubundaki insülin⁺ hücrelerin mitokondriyal fonksiyon kaybının olmadığı ve geri farklılaşan hücrelerde UCP2 seviyesi artmış olsa da bu seviyenin halen sağlıklı insan serumu uygulanan kontrol grubundan düşük olması sebebiyle mitokondriyal metabolizmanın tam olarak glikolize yönelmemiş olabileceğini düşündürmektedir.

Mitokondriyal dinamikler, kök hücreler ve farklılaşmış hücreler arasında farklılık gösterir. Kök hücrelerde, mitokondri genellikle perinükleer yerleşimli, küre şeklinde, parçalanmış ve noktalı şekillerde ve daha az kristal olarak karakterize edilir. Genellikle kök hücrelerdeki mitokondriler OXPHOS, ATP ve ROS seviyelerinin düşük olduğu olgunlaşmamış bir durumdadır. Bir bakış açısına göre mitokondrinin bu durumu, kök hücrelerin genel işleviyle eşleşir; kök hücreler, farklılaşmış hücre kaynağı olarak nükleer genomu, epigenomu ve mitokondriyal genomları korumaya hizmet eder. Bu nedenle, olgunlaşmamış bir mitokondri durumu, yaygın ve feci sonuçlara yol açabilme potansiyeli taşıyan ROS kaynaklı genotoksositeye karşı korunmasına yardımcı olur. Terminal hücre tiplerine farklılaşma ile birlikte mitokondriyal içerik artar, genişlemiş, uzamış ve tübüler morfoloji kazanır. Farklılaşmış hücrelerde, mitokondri yoğun bir şekilde paketlenmiş, yüksek oranda dallanmış ve sitoplazma boyunca dağılmıştır (Wenyan ve diğ., 2019). Çalışmamızda, gruplar arasında mitokondriyal kütlede bir değişim belirlenmese de mikroskopik gözlemler sağlıklı insan serumu uygulanan kontrol hücrelerde sitoplazmaya homojen dağılmış, floresan ışıması yüksek ve yuvarlak görünümlü mitokondrilerin varlığını; PD hastalarından elde edilen serum örneklerinin uygulandığı β -hücrelerinde nükleusa yakın konumlanmış ve hücrenin bir kutbunda

yoğunlaşmış, floresan ışıması yüksek ve yuvarlak görünümlü mitokondrilerin varlığını; T2D hastalarından elde edilen serum örneklerinin uygulandığı β -hücrelerinde sitoplazmada homojen dağılmış, floresan ışıması düşük ve uzamış görünümlü mitokondrilerin varlığını; IL1 β uygulanan β -hücrelerinde ise bazı hücrelerde nükleusun etrafında birleşmiş, bazı hücrelerde ise sitoplazmada homojen dağılmış, genel olarak floresan ışıması düşük mitokondrilerin varlığı dikkat çekmiştir. Bu gözlem, PD hastalarından elde edilen serum örneklerinin uygulandığı β -hücrelerinde geri farklılaşan hücrelerin mitokondriyal morfolojisine sahip hücrelerin bulunduğunu göstermektedir. T2D hastalarından elde edilen serum örneklerinin uygulandığı β -hücrelerinde mitokondriyal morfoloji somatik hücre özelliği göstermektedir. IL1 β uygulanan grupta farklı mitokondriyal morfolojiye sahip alt popülasyonlar olduğu, bu popülasyonlardan bazılarının somatik hücre bazılarının ise apoptotik hücrelerde gözlenen mitokondriyal ağır parçalanması ile ortaya çıkan mitokondriyal morfoloji sergilediği tespit edilmiştir. Apoptoz sırasında, DRP1 odakları mitokondri üzerinde birikir ve sitokrom c salınımı ve kaspaz aktivasyonundan önce mitokondriyal fisyonu aracılık eder (Landes ve Martinou, 2011; Hasnat ve diğ., 2020). Yaptığımız analizlere göre yalnızca IL1 β uygulanan β -hücrelerinde yüksek seviyede DRP1 tespit edilmiş olması bu gözlemi desteklemektedir.

Mitokondriler, hücresel metabolik homeostazın korunmasında önemli bir rol oynar. Bu organeller yüksek bir plastisiteye sahiptir ve hücrelerin metabolik yüküne bağlı olarak füzyon, fisyon, mitofaji ve mitokondriyal biyogenez gibi dinamik süreçler geçirirler. T2D’de, β -hücreleri yüksek konsantrasyonda glikoz seviyelerine maruz kalır. Mitokondriler böyle bir ortamda, DRP1 artışı ve OPA1/MFN bozulmasının yanı sıra mitofaji bozukluğu ile füzyon yerine bölünme eğilimi gösterir (Bhansali ve diğ., 2020). Hafif hiperglisemik hastalar T2D hastaları ile karşılaştırıldığında mitofaji ile ilgili gen ifadelerinde (*NIZ*, *PINK1*, *Parkin*) baskılanma olduğu belirlenmiştir (Scheele ve diğ., 2007). Daha küçük mitokondri boyutuna sahip T2D hastalarında şişmiş ve bozulmuş mitokondrilere de rastlanmaktadır (Bhansali ve diğ., 2017). Artmış mitokondriyal ROS ile birlikte işlevsiz mitokondri birikimi, pankreatik β -hücrelerinde oksidatif hasarı tetikler ve sonunda apoptoz yoluyla β -hücrelerinin ölümünü kolaylaştırmanın yanı sıra insülin direncini artırır (Hou ve diğ., 2008; Sidarala ve diğ., 2020). Fisyon proteinleri, DRP1 ve Fis1’i içerir. DRP1 molekülleri, mitokondriyal zarları GTP’ye bağlı bir şekilde daraltmak için halka benzeri bir yapı halinde birleşirken, Fis1 mitokondriyal membrana bağlıdır ve sitozolik alanı aracılığıyla DRP1 moleküllerinin toplanmasına katılır. Dolayısıyla aslen mitokondrilerin parçalanarak küçülmesini sağlayan molekül DRP1’dir

(Loson ve diğ. 2013). Çalışmamızda, fisyon gözlenen tek grup yukarıda bahsedildiği gibi yüksek seviyede DRP1 tespit edilen IL1 β uygulanan β -hücreleridir. Bu grup da dahil olmak üzere hiçbir deneysel şartta Fis1 değişimi gözlenmemiştir. Fis1, DRP1'in mitokondri membranına konumlanmasını sağlayan öncül bir fisyon proteini olduğundan, IL1 β uygulanan β -hücrelerinde fisyonun ileri bir aşamada olduğu düşünülmüştür. PD veya T2D hasta serumu uygulanan hücrelerde sağlıklı insan serumu uygulanan kontrol gruba göre Fis1 proteininde azalma olduğu dikkat çekmektedir. Fis1 RNAi, INS-1 hücrelerinde maksimum solunum kapasitesini düşürerek bozulmuş mitokondriyal fonksiyona neden olurken mitokondriyal morfolojinin değişmediği bildirilmiştir. Ayrıca Fis1 yıkımının, INS-1 hücrelerinde glikozla uyarılan insülin sekresyonunu azalttığı da gösterilmiştir (Twig ve diğ., 2008). Bu bulgulardan yola çıkarak PD veya T2D hasta serumu uygulanan hücrelerde gözlenen Fis1 seviyelerindeki azalmanın mitokondriyal fonksiyon bozukluğuna bağlı β -hücre fonksiyon kaybı ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür.

Mitofaji, hasarlı mitokondri ve işlevsiz mitokondriyi temizlemek için çalışan seçici bir otofaji mekanizmasıdır. Kanıtlar, mitofajinin T2D ve metabolik homeostazın düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığını göstermektedir. Kusurlu mitofajinin insülin direnci gelişimiyle bağlantılı olduğu iyi bilinmektedir (Shan ve diğ., 2022). Mitokondriyal parçalanma, oksidatif strese ve hücresel hasara yol açan ve metabolik hastalık ilerlemesine katkıda bulunan ROS üretimindeki artışla ilişkilendirilmiştir (Yoon ve diğ., 2011; Yu ve diğ., 2015). Mitokondri, ETC'yi oluşturan komplekslerin aktivitesi ve MMP dahil olmak üzere çeşitli faktörler tarafından sıkı bir şekilde düzenlenen OXPHOS sırasında ETC'nin bir yan ürünü olarak ROS üretir (Yu ve diğ., 2015). Aşırı mitokondriyal parçalanmanın, mitokondrinin iç zarı ve krista yapısının bozulmasına neden olabileceği ve böylece elektron transferini ve proton taşınmasını bozan ETC komplekslerinde hasara neden olabileceği hipotezi önerilmiştir (Lee ve diğ., 2017; Sessions ve diğ., 2022). Sonuç olarak, ATP üretiminin azalmasına ve ROS üretiminin artmasına neden olan elektron ve proton sızıntısı meydana gelir (Yoon ve diğ., 2011; Yu ve diğ., 2015). Mitokondriyal fisyonun düzensizliği, bozulmuş mitofajiye ve hasarlı mitokondri birikimine yol açabilir, bu da metabolik hastalıklarda oksidatif strese ve enflamasyona katkıda bulunabilir (Adebayo ve diğ., 2021; Chan, 2020). Mitofaji mekanizmasında, PINK1 mitokondriyal hasarı algılar ve fosforilasyon yoluyla Parkin'i aktive eder. Aktif Parkin daha sonra hasarlı mitokondri üzerinde ubiquitin zincirleri oluşturarak onları lizozomlarda parçalanmaları için etiketler (Bingol ve Sheng, 2016). Dolayısıyla, PINK1 tek başına yalnızca hasarlı mitokondrilerin

varlığını gösterirken, Parkin'in mitokondrilerdeki varlığı mitofaji belirteci olarak düşünülebilir. Yukarıda tartışıldığı gibi çalışmamızda yüksek seviyede fisyon belirteci DRP1 tespit edilen IL1 β uygulanan β -hücre popülasyonunda PINK1 seviyelerinin de yüksek olmasına karşın Parkin seviyesinin düşük olduğu belirlenmiştir. Bu gruptaki hücrelerin hasarlı mitokondriler taşımalarına ve fisyon ile parçalanmasına rağmen mitofajiyile ortadan kaldırılamadığı için hücrede biriktiğini ve bu durumun mitokondriyal yolla gerçekleşen hücre ölümü ile ilişkili olduğunu düşünüyoruz. Birçok çalışma mitokondriyal fisyon ve mitofajiyi birbiriyle ilişkili süreçler olarak tanımlasa da mitokondriyal fisyon metabolik yükün fazla olduğu hücrelerde mitokondriyal homeostazın sağlanması için bir savunma sistemi olarak ortaya çıkıp daha küçük mitokondrilerin oluşturulmasıyla sonuçlanır ki bu durum geri farklılaşma sürecinin bir parçasıdır. Diğer dikkat çeken bir bulgu, T2D hastalarından elde edilen serum örneklerinin uygulandığı insülin⁺ hücrelerde Parkin seviyesinin yükseldiğinin yani bu grupta fisyondan bağımsız olarak mitofajinin gerçekleştiğinin belirlenmiş olmasıdır. Benzer bir bulgu olarak mitokondriyal fisyon ve mitofajinin, primer nöronlarda iskemi/reperfüzyon (I/R) hasarını düzenleyen bağımsız mekanizmalar olduğu, DRP1'in I/R hasarının ilerlemesinde nedensel bir rol oynadığı, ancak mitofajinin DRP1 aracılı mitokondriyal fisyon gerektirmediği bildirilmiştir (Anzell ve diğ., 2021). Sonuç olarak, T2D hastalarından elde edilen serum örneklerinin uygulandığı hücreler arasında yer alan insülin⁺ hücrelerde mitofaji gerçekleşse de hücre ölümünün engellenmesinde yeterli olmadığı, dolayısıyla bu grupta mitokondriyal yoldan bağımsız bir hücre ölümü yolağının işlevsel olabileceği düşünülmüştür. İlginç bir bulgu, insülin⁻ hücreler arasında en yüksek Parkin seviyesine sahip olan grubun sağlıklı insan serumu uygulanan hücreler olmasıdır. Bu durum, Parkin seviyesinin kök hücre ve ondan türevlenen birincil progenitör aşamasına doğru azalıyor olma olasılığını, diğer bir deyişle farklılaşmaya kararlanan progenitör hücrelerde Parkin seviyesinin yükselme olasılığını düşündürmektedir. Bu hipotez ile ilgili yapılan bir çalışmada Parkin aracılı mitofajinin iskelet kası rejenerasyonunda önemli bir rol oynadığını ve kas kök hücrelerinin farklılaşması için gerekli olduğu gösterilmiştir (Esteca ve diğ., 2020). Bu bulgular, kök hücre ve ondan türevlenen progenitör hücrelerin son farklılaşma aşamasına kadar ilerlediği süreçte metabolizmalarının oksidatif fosforilasyona yönelmesi ve ROS üretiminin artmasıyla mitokondriyal hasarın oluşması ve dolayısıyla mitofajinin uyarılmasının olası olduğunu düşündürmektedir.

Mitokondriyal füzyon, iç ve dış zar füzyonunun ayrı olaylar olarak meydana geldiği, önce dış zarların füzyonunun ardından iç zar füzyonunun gerçekleştiği iki aşamalı bir süreçtir. Üç büyük

GTPaz'dan biri olan OPA1 iç zar füzyonu, diğer ikisi mitofusinler Mfn1 ve Mfn2 dış zar füzyonu için gereklidir (Song ve diğ., 2009). Çalışmamızda Mfn2 ve Opa1 seviyelerinin yükseldiğini ve dolayısıyla tam olarak füzyonun gerçekleştiğini belirlediğimiz grup, T2D hasta serumunun uygulandığı hücreler arasında bulunan insülin⁻ hücre popülasyonudur. ATP üretimi, füzyon tarafından üretilen geniş mitokondriyal ağlar tarafından düzenlenir (Westermann, 2010). İlginç bir bulgu, füzyon proteini DRP1'in baskın bir negatif formunun ekspresyonu yoluyla artan füzyona yönelik mitokondriyal dinamiklerin modüle edilmesinin, hem mitokondriyal Ca⁺² tutma kapasitesini hem de Ca⁺²'yi belirgin şekilde artırdığının gösterilmiş olmasıdır (Kowaltowski ve diğ., 2019). T2D hasta serumunun uygulandığı hücrelerde ER'den mitokondriye Ca⁺² geçişinde rol alan GRP78 proteinindeki artış söz konusu çalışmanın bulgularını desteklemektedir. Bulgularımız, T2D hastalarının serumunda bulunan faktörlerin insülin üretmeyen hücrelerde GRP78 aracılığıyla ER'den mitokondriye Ca⁺² geçişine neden olabileceğini düşündürmektedir. Mitokondri içi kalsiyum, OXPHOS ile ATP üretiminin uyarılması yoluyla enerji metabolizmasını pozitif yönde etkiler. Aynı zamanda, mitokondride aşırı kalsiyum birikimi, geçirgenlik geçiş gözenəğinin açılması ve bunun sonucunda sitoplazmaya sitokrom c salınımı yoluyla apoptoza yol açabilir (Rasola ve Bernardi, 2011). Yukarıda önerilen hipotezi T2D hasta serumuna maruziyetin β-hücrelerinde insülin üretimini baskıladığı ve insülin üretemeyen bu hücrelerin GRP78 aracılı ER'den mitokondriye Ca⁺² geçişi ve kaspaz-3 aracılı apoptoz ile ölüme gidebileceği yönünde genişletmek mümkündür. Aynı gruptaki insülin⁺ hücrelerde ise sadece OPA1'in arttığı yani iç zar füzyonunun gerçekleştiği belirlendi. Apoptoz sırasında, OPA1'in krista lümeninden sitokrom c salınımını düzenlediği öne sürülmüştür (Frezza ve diğ., 2006; Yamaguchi ve diğ., 2008). Bu nedenle, OPA1 düzeneği durumunun sitokrom c salımı için önemli bir faktör olması muhtemeldir. Kristanın boyun bölgesinde toplanmış OPA1 bir bariyer görevi görür ve OPA1 ayrışması sitokrom c salınımına izin verir (Perkins ve diğ., 2009; Yamaguchi ve Perkins, 2009). T2D hasta serumu uygulanan hücreler arasında yer alan insülin⁺ hücrelerde OPA1 seviyelerinin yüksek olması bu hücrelerde mitokondriyal yolak ilişkili apoptotik ölümün olmadığı fikrini güçlendirmektedir. Yalnızca OPA1'in yüksek olduğu PD hasta serumu uygulanan hücreler arasında bulunan insülin⁻ hücreler için de benzer şekilde yorum yapılabilir. OPA1'in varlığı mitokondriyal iç zarın bütünlüğünün korunması ve hücre ölümünün engellenmesi ve hatta geri farklılaşma ile ilgili olabilir. Çok yakın tarihli bir çalışmada, mitokondriyal uzama ve OPA1'in, pankreas duktal adenokarsinomunda kök hücre karakteri edinme sürecinde önemli rol oynadığı

belirlenmiştir (Carmona-Carmona ve diğ., 2022). Dolayısıyla yukarıda detaylıca tartışıldığı üzere tam bir geri farklılaşma belirlenen PD hasta serumu uygulanan gruptaki insülin⁻ hücrelerde OPA1 inhibisyonunun bu süreci tersine çevirebileceği ve T2D'nin erken aşamalarında tedavi amaçlı kullanılabileceği düşünülebilir. Aksine, aynı grubun insülin⁺ popülasyonunda ve IL1 β uygulanan grupta OPA1'in azalmış olması bu hücrelerde mitokondri aracılı apoptotik ölümün gerçekleştiği fikrini desteklemektedir. IL1 β uygulanan grubun insülin⁺ popülasyonunda yalnızca Mfn2 seviyesinin yüksek olduğu belirlenmiştir. İlginç bir şekilde, yetişkin kalbinde, mitokondriyal füzyon proteinlerinden Mfn2'nin endoplazmik retikulum bağlama ve mitofaji gibi pleiotropik etkilerinin profüzyon etkilerinden daha önemli roller oynayabileceği gösterilmiştir (Ong ve diğ., 2017). Mfn2, ER'den mitokondriye kalsiyum sinyali göndermek için ER'yi mitokondriye bağlar (de Brito ve Scorrano, 2008). Bu hücrelerde Mfn2'nin artışı yukarıda detaylıca tartışılan IL1 β uygulanan grubun insülin⁺ hücrelerinde GRP78 aracılığıyla ER'den mitokondriye Ca⁺² geçişine neden olabileceği fikrini güçlendirmektedir. Aynı grubun insülin⁻ hücrelerinde Mfn2 ve OPA1'in baskılanmış olması bu hücrelerde mitokondriyal füzyon gerçekleşmediğini göstermektedir.

PD ve T2D hasta serumlarında bulunan ve β -hücrelerinde geri farklılaşma, fonksiyon kaybı ve/veya ölüme neden olabilecek proteinlerin belirlenebilmesi için üçer adet sağlıklı, PD'li ve T2D'li insan serum örneğinde LC-MS/MS yöntemiyle tam proteom analizi yapıldı. PD'li hasta serumlarında sağlıklı insanların serumlarına göre anlamlı artış gösteren 6 adet protein ve azalma gösteren 1 adet protein tanımlandı. Bu proteinlerin birbirleriyle etkileşimleri STRING veri tabanı ve IPA yazılımında incelendiğinde 2 farklı protein kümesinin ORM1 ve C3 aracılığıyla etkileşim içinde olabileceği belirlendi. ORM1, insan α 1-asit glikoprotein (orosomucoid, AGP)'i kodlayan gen iken; C3, komplement sistem proteini C3'ü kodlayan gendir. AGP, enflamasyona karşı sistemik reaksiyona yanıt olarak karaciğer ve periferik dokular tarafından üretilen bir akut faz proteinidir. Bu protein, görünüşte birbirinden farklı ama aslında yakından bağlantılı olan en az iki işlevi yerine getirir: bir yandan bir immünomodülatör protein iken, öte yandan plazmadaki en önemli bağlayıcı proteinlerden biridir ve birçok ilacın farmakokinetiğini ve farmakodinamiğini modüle etmenin yanı sıra, iltihaplanma ile ilgili birkaç endojen ligandı da bağlayabilir ve taşıyabilir. Bu protein, patojenlerin bağlanması ve tüm lökosit saldırı süreci boyunca beyaz kan hücrelerinin aktivitesinin modüle edilmesi dahil, enflamasyonla ilgili birçok olayı düzenler. AGP aktivitesinin düzenlenmesi karmaşıktır: enflamasyon, yalnızca AGP serum konsantrasyonunda bir artışa neden olmakla kalmaz, aynı zamanda karbonhidrat kısmında

kalitatif bir değişikliğe neden olarak, her biri farklı ve bazen zıt ve çelişkili aktivitelere sahip çok sayıda glikoform oluşturur. AGP, leptin reseptörü ile etkileşime girerek immünometabolizma alanındaki potansiyel oyuncular arasında yer alabilir (Ceciliani ve Lecchi, 2019). Yapılan çalışmalarda AGP düzeylerinin T2D hastalarında T1D'lilere göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Abdulwahab ve diğ., 2019; Akbay ve diğ., 2004). AGP plazma seviyeleri, yaş ve vücut kitle indeksi ile anlamlı bir korelasyon göstermektedir, obez diyabetik hastalarda obez olmayan diyabetik hastalara göre daha yüksektir. Ayrıca glisemik kontrolü zayıf olan diyabetik hastalarda da AGP plazma seviyelerinin yüksek olduğu bildirilmiştir (Akbay ve diğ., 2004). Metabolik sendromlu hastalarda miyeloperoksidaz ve AGP'nin yağlanma, aterojenik ve hematolojik indeksler ile kesitsel korelasyonları belirlenmiştir (Alquoqa ve diğ., 2018). Sonuç olarak AGP, glisemik kontrolün bozulmasına paralel olarak kanda seviyeleri yükselen ve enflamasyonda rol alan bir protein olarak bilinmektedir. Ekibimiz tarafından yapılan bir in vitro çalışmada glukotoksisite veya glukolipotoksisite ile uyarılmayı takiben ölmekte olan β -hücrelerinden salınarak pankreatik progenitör hücreleri farklılaşma yönünde uyarma kabiliyetine sahip proteinler arasında AGP'nin de yer alması (Gezginci-Oktayoglu ve diğ., 2018) mevcut bulgu ile uyumlu bulunmuştur.

Diğer taraftan, yüksek serum komplementer C3 seviyelerinin yetişkin popülasyonda artmış prediyabet gelişme riski ile ilişkili olduğu gösterilmiş olması, C3'ün yüksek riskli bireylerde prediyabet ve diyabetin birincil önlenmesini iyileştirmek için bir biyobelirteç olarak kullanılabileceğini düşündürmüştür (Bao ve diğ., 2016). Komplementer sistem, doğal bağışıklık sisteminin önemli bir bileşenidir ve T1D'nin patogeneğinde rol oynadığı gösterilmiştir. T1D'nin aksine, diyabet vakalarının %90-95'ini oluşturan T2D, metabolik bir hastalık olmakla birlikte, enflamasyonla ilişkili adacık otoimmün tepkilerinin T2D gelişiminde rol oynadığı bilinmektedir (Brooks-Worrell ve Palmer, 2012; Xu ve diğ., 2013). Ancak, tipik olarak diyabete dönüşecek olan prediyabetin doğasında bağışıklık ve enflamasyonun rolü ile ilgili bilgiler sınırlıdır. C3 ile diyabet arasındaki ilişki, C3'ü insülin direnci ve T2D insidansı ile ilişkilendiren 7 yıllık bir kohort çalışmasıyla güçlendirilmiştir (Wlazlo ve diğ., 2014). İzole edilmiş insan adacıklarında C3 ekspresyonu, T2D, HbA1c ve inflamasyon ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca, adacık hücrelerinde C3 ifadesinin birkaç kemirgen diyabet modelinde yukarı doğru düzenlendiği bildirilmiştir. C3, otofaji için gerekli olan otofaji ile ilgili protein 16-1 (ATG16L1) ile etkileşime girer. Otofaji, T2D sırasında β -hücrelerinin karşılaştığı hücresel stresleri azaltır ve hücresel homeostazı korur. Klonal β -hücrelerinde C3 nakavtı,

otofajiyi bozmuş ve hücrelerin palmitik asit ve IAPP'ye maruz kalmasından sonra artan apoptoza yol açmıştır. C3'ün yokluğunda, otofagozomlar lizozomlarla füzyona uğramazlar. Böylece C3, bozulmuş otofajinin neden olduğu β -hücre fonksiyon bozukluğuna karşı hücreleri koruyan bir faktör olarak T2D'li bireylerin adacıklarında yukarı regüle edilebilir (King ve diğ., 2019). Aynı ayrı AGP ve C3'ün prediyabet gelişiminde etkili olduğunu gösteren bahsi geçen veriler bulunmakla birlikte bu iki proteinin birbiriyle olan ilişkisi ve bu ilişkinin bir sonucu olarak prediyabetin ortaya çıkma durumu ile ilgili bir bilgiye rastlanmamıştır. Serumda bulunan AGP'nin C3'ü bağlayarak onu β -hücrelerine taşıması olasıdır. Doğal formunda, C3'ün bilinen bir reseptörü yoktur, ancak kompleman aktivasyonu sırasında, fonksiyonel reseptörlere bağlanabilen parçalara bölünür (Sahu ve Lambris, 2001). C3 bölünme ürünleri için spesifik reseptörler olan CD46, C3aR, RAGE'nin β -hücrelerinde ifade edildiği gösterilmiştir (King ve diğ., 2019). C3'ün bölünme ürünlerine dönüştükten sonra reseptörlerine bağlanıp β -hücrelerinde geri farklılaşmayı başlatabilme olasılığı değerlendirilebilir. Ancak, yaptığımız proteomik analizlerde C3'ün bölünme ürünlerinde kontrol serum örneklerine kıyasla bir farklılık gözlenmediğinden ve T2D hastalarının adacıklarında CD46, C3aR, RAGE seviyelerinde bir farklılık saptanmadığından (King ve diğ., 2019) bu olasılık düşük görünmektedir. Bu durumda, C3'ün β -hücreleri tarafından endositoz yoluyla hücre içine alındıktan sonra sitoplazmada ATG16L1'i bağlaması ile otofajiyi uyarması (King ve diğ., 2019) yoluyla geri farklılaşma mekanizmasında yer alması hipotezi güçlenmektedir. Bu hipotezi kanıtlayabilmek için işaretli C3, INS1E β -hücrelerine uygulandıktan sonra sitoplazmik fraksiyonda ATG16L1 ile bağlantısını gösterebilmek için immünopresipitasyon yöntemiyle izole edilmeli ve ardından simple western yöntemiyle ATG6L1 gösterilmelidir. Otofajinin gerçekleştiğini göstermek için ise LC3BII/LC3BI oranı belirlenmelidir.

Bildirilen deneysel ve klinik kanıtlar, kompleman sistem, kompleman düzenleyici proteinler ve diyabet komplikasyonlarının patogenezi arasında güçlü bir bağlantı olduğunu desteklemektedir. Kompleman sistemin klasik yolu, C1'i aktive eden bağışıklık kompleksleri tarafından başlatılır. Aktive edilmiş C1 daha sonra, C3'ü bir anafilatoksin olan C3a'ya ve bakteriyel yüzeylerdeki karbonhidratlar veya proteinler üzerindeki hidroksil gruplarına kovalent olarak bağlanan komplementer sistemin çekirdeğindeki bir molekül olan C3b'ye parçalayan C3-konvertazı (C4b2a) aktive eder (Ghosh ve diğ., 2015). Özetle C1, C3'ün parçalanması için gerekli olan bir üst uyaran olarak görev yapar. Dolayısıyla C1 kompleksinin bir parçası olan C1S'nin STRING

veri tabanı ve IPA yazılımıyla yapılan analizlerde C3 ile ilişkili bulunması beklenen bir durumdur.

Diyabet ile ilişkili protein kompleks (DRPC)'lerinin ana bileşenleri, kompleman C3- β alt birimi, inter- α -tripsin inhibitörü ağır zincir H1 ve H2, haptoglobin- β alt birimi ve apolipoprotein A1'dir. Bu proteinler inflamasyonla ve komplemanla ilgilidir. 1446 katılımcıdan alınan serum numuneleri, doğal-PAGE jellerindeki serum DRPC'lerinin dağılımlarına dayalı olarak dört modelde sınıflandırılmıştır. Serum DRPC seviyeleri, T2D'li hastalar> prediyabetli hastalar> sağlıklı kontroller şeklinde bir sırayla kan glikoz seviyeleri ile pozitif bir korelasyona sahiptir (Liu ve diğ., 2018). Daha da önemlisi, serum DRPC düzeylerindeki önemli artış, T2D gelişimi ile yakından ilişkili olabilir. Büyük bir kohort çalışması, kompleman C3'ün diyabet gelişimi için bir risk faktörü olduğunu göstermiştir (Engström ve diğ., 2005). İnter-alfa-tripsin inhibitörü (ITI) bir hafif zincir ve altı ağır zincirden (H1, H2, H3, H4, H5 ve H5L) oluşur (Zhuo ve Kimata, 2008). Liu ve ekibi (2018) tarafından yapılan çalışmada DRPC'ler arasında ITIH1 ve ITIH2 tespit edilmiştir ve Abdulwahab ve ekibi (2019) tarafından yapılan çalışmalarda T2D hastalarının kanında ITIH1 ve ITIH2 seviyelerinde artış olduğu belirlenmiştir. ITI, enflamasyon ve kompleman aktivasyonunda görev alır (Choi-Miura ve diğ., 2000; Garantziotis ve diğ., 2007). STRING veri tabanı ve IPA yazılımı ile yapılan ağ analizlerinde ITIH3, SERPINA7 ve ORM1 birbirleri ile ilişkili görünse de literatür taramasında bu moleküllerin doğrudan ilişkisinin olduğunu gösteren bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ayrıca, ITIH3 seviyelerinin prediyabetik hasta kanında yükseldiği ilk defa çalışmamızda belirlenmiştir ve PD tanısı için biyobelirteç olarak önerilebileceği düşünülmüştür. Tiroksin bağlayıcı globülin (TBG), insanlarda SERPINA7 geni tarafından kodlanan bir globulin proteindir. TBG dolaşımdaki tiroid hormonlarını bağlar. Kan dolaşımında tiroid hormonları tiroksin ve triiodotironin taşımaktan sorumlu 3 taşıma proteininden biridir. Pubertal diyabetik çocuklarda TBG seviyelerinin azalmış olduğu bildirilmiş (Connors ve diğ., 1996) ve diyabetik ketoasidoz sırasında yetişkin hastalarda T4'ün TBG'ye bağlanma özelliğinde önemli bir değişiklik olmaksızın serum TBG ve toplam T4 seviyelerinde önemli düşüşler gözlenmiş (Glinoe ve diğ., 1980) olması bulgularımızı desteklemektedir.

Tip 2 diyabette sıklıkla gözlenen metabolik düzensizlikler, renin-anjiyotensin-aldosteron sistemi (RAAS) aktivitesindeki bozukluklarla ilişkilidir. Lokal RAAS aktivitesi ile T2D komplikasyonları arasında pozitif bir korelasyon kaydedilmiştir. Pankreasta, RAAS asinar ve

adacık hücrelerinde bulunur, asinar RAAS ekzokrin fonksiyonu korur ve adacık RAAS glikoz kaynaklı insülin sekresyonunu düzenleyerek glikoz homeostazına katkıda bulunur (De Zeeuw ve diğ., 2004). İlginç bir şekilde, T2D’de bu sistemin pankreatik β -hücrelerindeki aktivitesi, yağ dokusunda insülin eksikliği ve insülin direnci ile ilişkilendirilmiştir (Leung, 2007). Mkhize ve ekibinin çok yakın tarihte (2022) yaptıkları çalışmada 32 hafta boyunca yüksek yağ ve karbonhidrat içeren bir diyetle maruz bırakılarak prediyabet oluşturulan sıçanların pankreas dokusunda *ANG* gen ekspresyonunun arttığı belirlenmiş ve prediyabet durumundaki pankreatik RAAS aktivitesinin, T2D’de görülen metabolik düzensizliklere katkı sağladığı öne sürülmüştür. RAAS inhibitörlerinin kardiyovasküler sonuçlarını inceleyen çok sayıda çalışma, bu ajanları alan katılımcılarda yeni diyabet başlangıcı riskinin önemli ölçüde azaldığını ortaya koymaktadır. Bu glisemik koruyucu etki, RAAS’ın insülin direnci ve T2D gelişimindeki bilinen etkisine atfedilmiştir. DREAM ve NAVIGATOR çalışmaları, PD hastalarında sırasıyla Ramipril ve Valsartan’ın diyabet insidansı üzerindeki etkisini inceleyen iki büyük randomize kontrollü çalışmadır (Skwiersky ve diğ., 2021). Ayrı ayrı RAAS ve C3’ün prediyabet gelişiminde etkili olduğunu gösteren bahsi geçen veriler bulunmakla birlikte bu iki proteinin birbiriyle olan ilişkisi ve bu ilişkinin bir sonucu olarak prediyabetin ortaya çıkma durumu ile ilgili bir bilgiye rastlanmamıştır.

PD hastalarının serum örneklerinde sağlıklı insanların kontrol serumlarına kıyasla seviyeleri anlamlı olarak artış gösteren tüm proteinler ile ilgili yukarıda detaylandırılan bulgular göz önünde bulundurulduğunda, PD durumunda AGP ve C3 ilişkisinin öne çıktığı görülmektedir. Kompleman sistem sinyalinin AGP aracılığıyla C3 seviyesinde tutulması β -hücre geri farklılaşmasına neden oluyor olabilir. C3’ün, farelerin nefrotübül hücrelerinde epitelyal-mezenkimal geçişi indükleyerek bu hücrelerin geri farklılaşmasına neden olduğunun gösterilmiş (Zhou ve diğ., 2013) olması dışında, bu hipotezi destekleyen bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu hipotezin doğrulanabilmesi için ilk olarak PD hastalarının serum örneklerinden immunopresipitasyon yöntemiyle AGP izole edilip olası C3 bağlantısı simple western yöntemiyle gösterilmelidir. İkinci adımda ise PD hastalarından elde edilen serum örneklerine C3 antikoru eklenerek serumdaki C3 inaktive edilip INS1E β -hücrelerine uygulandıktan sonra kök ve progenitör hücre genlerinin ekspresyon düzeyleri ölçülmelidir. Moleküler mekanizma ile ilgili hipotemiz ise C3’ün β -hücreleri tarafından endositoz yoluyla hücre içine alındıktan sonra sitoplazmada ATG16L1’i bağlaması ile otofajiyi uyarması yoluyla geri farklılaşma mekanizmasında yer alması olasılığıdır. Bu hipotezi kanıtlayabilmek için

işaretleli C3, INS1E β -hücrelerine uygulandıktan sonra sitoplazmik fraksiyonda ATG16L1 ile bağlantısını gösterebilmek için immünopresipitasyon yöntemiyle izole edilmeli ve ardından simple western yöntemiyle ATG6L1 gösterilmelidir. Otofajinin gerçekleştiğini göstermek için ise LC3BII/LC3BI oranı belirlenmelidir.

PD hastalarının serum örneklerinde öne çıkan proteinler ile IPA programında yapılan moleküler yolak araştırmalarında komplement sistemin yanı sıra dikkat çeken diğer bir hücresel yolak apelin sinyal yolağıdır. Bir peptid hormonu olan apelin, anjiyotensin II protein J reseptörü (APJ)'ne bağlanarak etkisini gösterip diyabet ve obezite ile bağlantılı olduğu kabul edilmektedir. Apelin ve reseptörü vücutta yaygın olarak bulunur; glikoz ve lipid metabolizması, homeostaz, strese karşı endokrin yanıt ve anjiyogenez gibi birçok fizyolojik süreçte yer alır. Apelin'in glikoz metabolizmasını düzenlemeye yardımcı olma etkisinden dolayı apelin-APJ sisteminin diyabet ve diyabetik komplikasyonlarla ilişkili olduğu üzerinde durulmaktadır. Apelin glikoz alımını uyarır, insülin duyarlılığını artırır, lipoliz ve yağ asidi oksidasyonunu düzenler. Diyabete bağlı hastalıkların apelin uygulaması ile iyileştirilebileceği öne sürülmüş ve bu nedenle apelin-APJ sistemi, diyabet ve komplikasyonlarında potansiyel bir terapötik hedef haline gelmiştir (Li ve diğ., 2022). Apelin sinyalinin, vasküler endotel hücrelerini pro-anjiyogenik bir duruma doğru yönlendirdiği yani anjiogenezi uyardığı bilinmektedir (Helker ve diğ., 2020). Ancak, diğer organlara ait somatik hücrelerin dinamikleri üzerindeki etkileriyle ilgili bir bilgiye rastlanmamıştır. Kök hücrelerde apelin doğrudan hücre farklılaşması ile ilişkilendirilmektedir (Esmaceli ve diğ., 2019). Apelin'in ekzokrin pankreası, lokal kan akımı düzenlemesini içeren karmaşık bir mekanizma yoluyla etkileyebileceği ve bu etkinin vagal sinirler tarafından yönlendirilebileceği bildirilmiştir (Kapica ve diğ., 2012). İnsan pankreatik duktal adenokarsinom (PDAC) hücrelerinde apelin PI3K/Akt, β -katenin ile onkogenler c-myc ve siklin D1'in uzun süreli aktivasyonunu uyarmış; proliferasyonu, migrasyonu ve glikoz alımını desteklemiştir. Apelin reseptör blokajı, pankreas tümör yükünde bir azalma ile birlikte kanser hücresi proliferasyonunu azaltmıştır. Bu bulgular, apelin sinyal yolunu PDAC gelişimi için yeni bir aktör ve bu tedavi edilemez hastalık için yeni bir terapötik hedef olarak tanımlamıştır (Chaves-Almagro ve diğ., 2022). Apelin'in T2D'li sıçanlarda pankreatik adacık β -hücre kütlelerini arttırdığı tespit edilmiştir (Feng ve diğ., 2019). Diğer taraftan, apelin, AMPK aktivasyonu ve cAMP'nin baskılanması yoluyla insülin sekresyonunu inhibe eder (Guo ve diğ., 2009). Çalışmamızda, PD hastalarında elde edilen serum örneklerinin uygulandığı INS1E β -hücrelerinde tam bir geri farklılaşma tespit edilmiştir. Ancak, literatürde apelin'in geri

farklılaştırıcı etkisini gösteren bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu olasılığın değerlendirilebilmesi için apelin, INS1E β -hücrelerine uygulanarak β -hücre ve progenitör hücrelere özgü genlerin ekspresyon düzeyleri ölçülmelidir.

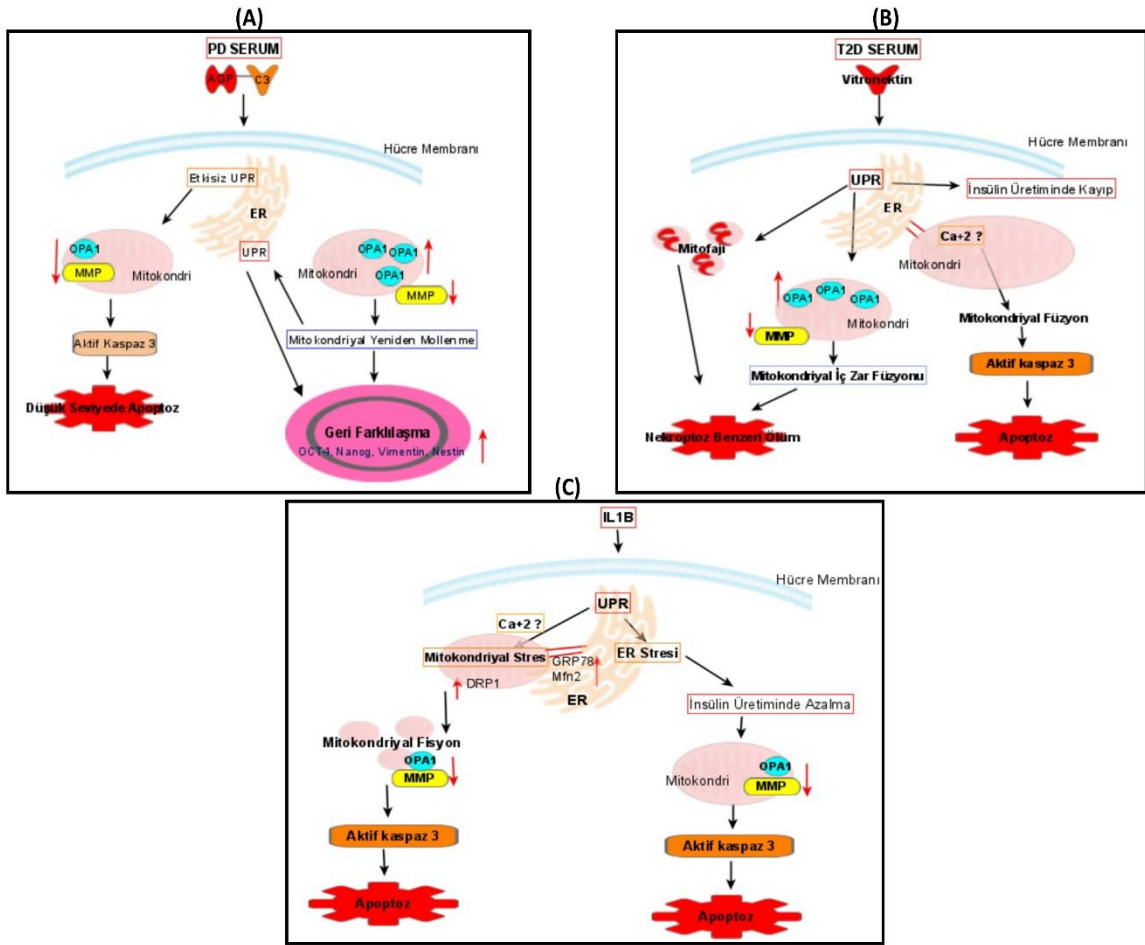
T2D hasta serumlarında sağlıklı insanların serumlarına göre anlamlı artış gösteren ve birbiriyle ilişkili olan 3 adet protein Vitronektin, C8G ve C5 tanımlandı. VTN geni tarafından kodlanan bir glikoprotein olan Vitronektin, plazmada ve hücre dışı matriste bulunan bir hücre yapışma faktörüdür. Vitronektin, pıhtılaşma yollarının düzenlenmesi zar saldırı kompleksi (MAC)'nin oluşumu, hücre bağlanması ve göçü yara iyileşmesi ve doku yeniden şekillenmesi oluşumu dahil olmak üzere çeşitli biyolojik süreçlerde rol alır. Vitronektin, T2D hastalarında hepatik insülin direncinin değerlendirilmesi için bir aday hedef biyobelirteç olarak önerilmiştir (Cao ve diğ., 2018). T2D hastalarının plazmasında vitronektin artışının diyabetiklerde gözlenen pıhtılaşma kaskadındaki patolojik değişiklikler ile ilişkili olabileceği gösterilmiştir (Esser ve diğ., 1994). Ayrıca, vitronektin ve plazminojen aktivatör inhibitör-1 düzeylerinin metabolik sendrom ve T2D riski ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir (Alessi ve diğ., 2011). Vitronektin trombositlerin adezyonu, birikimi ve pıhtılaşmasını düzenleyen bir plazma glikoproteinidir. T2D'li hastaların plazma vitronektin seviyelerinin yüksek olması platelet gibi hücrelerin kümeleşmesine neden olduğundan bu protein genellikle kanın viskozitesinin artması ve pıhtılaşma ile ilişkilendirilmektedir. Obez olmayan diyabetik fareler, erken yaşta otoimmün T-hücresine bağımlı diyabet geliştiren klasik bir T1D modelidir ve bu fareler işlevsel C5'ten yoksun olduğundan, bu modelde kompleman sistemin terminal yolları kesilmiştir (Baxter ve Cooke, 1993). Bununla birlikte, T1D hastalarından alınan serumlarda kompleman sabitleyici anti-adacık antikollarının varlığı gösterilmiş olması, T1D patogenezinde kompleman aracılı β -hücre apoptozu ve adacık iltihabının potansiyel rolüne işaret etmektedir (Conroy ve diğ., 2000; Radillo ve diğ., 1996). Aynı ayrı Vitronektin ve C5'in diyabet patogenezi ile ilişkili olabileceğini gösteren bahsi geçen veriler bulunmakla birlikte bu iki proteinin birbiriyle olan ilişkisi ve bu ilişkinin bir sonucu olarak T2D'nin ortaya çıkma durumu ile ilgili bir bilgiye rastlanmamıştır. Ayrıca, STRING veri tabanı ve IPA yazılımı C8G'yi C5 ve Vitronektin ile ilişkilendirirse de bu ilişkiyi net olarak ortaya koyan bir makaleye rastlanmamıştır. T2D hastalarının serum örneklerinde C5 ve C8G'nin seviyelerinin anlamlı olarak arttığı ilk defa çalışmamızda tespit edilmiş ve T2D tanısı için biyobelirteç olarak önerilebileceği düşünülmüştür. Son olarak, LC-MS/MS analizlerinde T2D hastalarından elde edilen serum örneklerinde kontrole göre artış belirlenen Sentrozomal Protein 290 (CEP290)'nın T2D ile

ilişkisini gösteren herhangi bir makaleye rastlanmamıştır. İlk defa çalışmamızda belirlenen CEP290 proteinin de T2D tanısı için biyobelirteç olarak önerilebileceği düşünülmüştür.

T2D hastalarının serum örneklerinde sağlıklı insanlardan elde edilen serum örneklerine kıyasla seviyeleri anlamlı olarak artış gösteren tüm proteinler ile ilgili yukarıda detaylandırılan bulgular göz önünde bulundurulduğunda, T2D grubunda Vitronektin'in öne çıktığı görülmektedir. Vitronektin β -hücre fonksiyonunun baskılanmasına neden olabilir. Bu konu ile ilgili yapılan bir çalışmada, bazı ortak matris bileşenlerine yapışmanın, insan β -hücreleri tarafından insülinin transkripsiyonu, salgılanması ve depolanması üzerinde önemli bir etkisi olduğuna dair kanıtlar sunulmuştur. Belirli matrislere yanıt olarak integrin-bağımlı adezyon ve sinyal vermenin, birincil insan β -hücreleri tarafından insülin üretimi üzerinde önemli bir olumsuz etkiye sahip olabileceği iddia edilmiştir. Bu tür yanıtların hücre ölümü ile ilişkili olmadığı tespit edilmiştir (Kaido ve diğ., 2006). Vitronektin'in β -hücre fonksiyonunun baskılanmasına neden olma olasılığını destekleyen söz konusu çalışmanın dışında benzer bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu hipotezin doğrulanabilmesi için ilk olarak T2D hastalarından elde edilen serum örneğine vitronektin antikoru eklenerek serumdaki vitronektin inaktive edilip INS1E β -hücrelerine uygulandıktan sonra insülin üretimi ve sekresyonunu düzenleyen genlerinin ekspresyon düzeyleri ölçülmelidir.

Mevcut çalışmadan elde edilen bulgular ve literatürde bulgularımızı destekleyen çalışmalar bir araya getirilerek çalışmamızda kurduğumuz 3 farklı deneyin sonuçları **Şekil 5.1:**'de şematize edilmiştir. Özetle, PD hastalarından elde edilen serum örneklerinde yüksek seviyede bulunan AGP ve C3 proteini aracılığıyla uyarıldığını düşündüğümüz geri farklılaşma mekanizmasında etkisiz UPR^{ER}'nin rol oynayabileceğini, geri farklılaşan hücrelerde UPR^{ER}'nin etkin olduğunu ve mitokondrilerdeki OPA1 aracılı iç zar füzyonunun kök hücre karakterinin kazanılması ve devam ettirilmesinde önemli olabileceğini düşünüyoruz. Aynı gruptaki geri farklılaşmayan β -hücrelerinde ise OPA1 kaybına bağlı olarak mitokondriyal zar geçirgenliğinin artması ve apoptotik moleküllerin sitoplazmaya geçerek kaspaz-3'ü aktive etmesi yoluyla düşük seviyeli apoptozun gerçekleşebileceğini düşünüyoruz (**Şekil 5.1: (A)**). T2D hastalarından elde edilen serum örneklerinde yüksek seviyede bulunan Vitronektin proteini aracılığıyla uyarıldığını düşündüğümüz β -hücre fonksiyon kaybının en önemli göstergesi olan insülin üretememenin yüksek UPR^{ER} ile ilişkili olabileceğini, insülin üretemeyen hücrelerde GRP78 aracılığıyla ER-mitokondri bağlantısının kurulması ile iki organel arasında Ca^{+2} gibi sinyal moleküllerinin

geçişi sonucunda mitokondriyal füzyonun artması ve kaspaz-3 aracılığıyla apoptozun meydana gelebileceğini düşünüyoruz. Aynı gruptaki insülin⁺ β -hücrelerinde ise hem OPA1 aracılı iç zar füzyonunun artması hem de mitofajinin gerçekleşmesi yoluyla mitokondrilerin fonksiyonunu yitirdiği ve bu yolla hücrelerin nekroptoz benzeri bir yol ile ölüme gidebileceğini düşünüyoruz (**Şekil 5.1: (B)**). IL1 β uygulanan β -hücrelerinde dikkat çeken nokta insülin proteini üretemeyen bir popülasyonun mevcut olmasına karşın bu grupta *INS2* gen ekspresyonunun artmış olması dolayısıyla ne tam bir geri farklılaşma ne de tam bir fonksiyon kaybının gerçekleşmemiş olduğunun belirlenmesidir. İnsülin⁺ β -hücrelerinde yüksek UPR^{ER} ile ilişkili olabileceğini düşündüğümüz mitokondriyal hasarın ön planda olduğu görülmektedir. ER-mitokondri bağlantısının kurulması yoluyla iki organel arasında Ca⁺² gibi sinyal moleküllerinin geçişi sonucunda gelişebilecek olan mitokondriyal strese bağlı mitokondriyal fisyon ve OPA1 kaybına bağlı olarak mitokondriyal zar geçirgenliğinin artması ve apoptotik moleküllerin sitoplazmaya geçerek kaspaz-3'ü aktive etmesi yoluyla apoptozun gerçekleşebileceğini düşünüyoruz. IL1 β uygulanan hücreler arasında yer alan insülin üretemeyen hücrelerde ER stresinin ön planda olduğu, OPA1 kaybindan dolayı mitokondriyal zar geçirgenliğinin artması ve apoptotik moleküllerin sitoplazmaya geçerek kaspaz-3'ü aktive etmesi yoluyla apoptozun meydana gelebileceğini düşünüyoruz (**Şekil 5.1: (C)**).



Şekil 5.1: (A) PD grubunun sonuçları, (B) T2D grubunun sonuçları, (C) IL1 β grubunun sonuçları özetlenmiştir. Şema IPA yazılımı kullanılarak çizilmiştir.

Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar, PD hastalarının pankreasında β -hücrelerinin geri farklılaşmasıyla oluşan pre-endokrin hücre, multipotent hücre ve kök hücre olmak üzere üç farklı aşamada öncül hücre popülasyonunun varlığına işaret etmektedir. PD hastalarının serumunda bulunan ve β -hücrelerinin geri farklılaşmasına neden olabilecek iki protein AGP ve C3 öne çıkmaktadır. Bu proteinlerin inhibisyonu yoluyla β -hücrelerinin geri farklılaşmasının baskılanması, yüksek seviyede insülin üretilmesini sağlayarak insülin direncine neden olan yeni β -hücrelerinin önemli bir kaynağı olan öncül hücre popülasyonunun azaltılması ve böylelikle T2D gelişiminin kompenzasyon basamağının yavaşlatılması mümkün olabilir. Diğer bir teröpatik yaklaşım olarak, PD gelişimi sırasında meydana gelen β -hücre geri farklılaşma mekanizmasında öne çıkan mitokondriyal fiyון proteini OPA1'in inhibisyonu aracılığıyla geri farklılaşan hücre popülasyonunun azaltılması yoluyla patogenezin yavaşlatılabileceğini

düşünüyoruz. Ayrıca bulgularımız, T2D hastalarının pankreasında β -hücre fonksiyonunun baskılandığı ve fonksiyonunu yitiren hücrelerin ölüme yatkın olduğuna işaret etmektedir. T2D hastalarının serumunda bulunan ve β -hücrelerinde fonksiyon kaybına neden olabilecek bir protein olarak öne çıkan Vitronektin tedavi için yeni bir hedef olma potansiyeli taşımaktadır. Bu proteinin inhibisyonu yoluyla β -hücrelerinde fonksiyon kaybının baskılanması, hastalığın ileri seviyelerinde neredeyse tamamen tükenmekte olan insülin hormonunun sağlanabilmesi için teröpatik bir yaklaşım olabilir. Diğer taraftan, T2D gelişimi sırasında meydana gelen β -hücre ölümü mekanizmasında öne çıkan mitokondriyal füzyon proteini OPA1'in ve mitofaji proteini Parkin'in inhibisyonu yoluyla nekroptoz benzeri ölüm ile kaybedilen β -hücrelerinin sayısının azaltılması yoluyla sağlıklı β -hücre popülasyonunun artırılmasının yeni bir tedavi seçeneği olarak değerlendirilebileceğini düşünüyoruz.

KAYNAKLAR

- Abdulwahab, R.A., Alaiya, A., Shinwari, Z., Allaith, A.A.A., Giha, H.A., 2019, LC-MS/MS proteomic analysis revealed novel associations of 37 proteins with T2DM and notable upregulation of immunoglobulins, *International journal of molecular medicine*, 43 (5), 2118–2132.
- Accili, D., Talchai, S.C., Kim - Muller, J., Cinti, F., Ishida, E., Ordelheide, A.M., Son, J., 2016, “When β -cells fail: lessons from dedifferentiation, *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 18 (Suppl 1), 117-122.
- Adebayo, M., Singh, S., Singh, A.P., Dasgupta, S., 2021, Mitochondrial fusion and fission: The fine-tune balance for cellular homeostasis, *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 35 (6), e21620.
- Agarwal, S., ve Muqit, M., 2022, PTEN-induced kinase 1 (PINK1) and Parkin: Unlocking a mitochondrial quality control pathway linked to Parkinson’s disease, *Curr. Opin. Neurobiol.*, 72, 111–119.
- Aigha, I.I., Abdelalim, E.M., 2020, NKX6.1 transcription factor: a crucial regulator of pancreatic β cell development, identity, and proliferation, *Stem cell research & therapy*, 11 (1), 459.
- Akbay, E., Yetkin, I., Ersoy, R., Kulaksizoglu, S., Törüner, F., Arslan, M., 2004, The relationship between levels of alpha1-acid glycoprotein and metabolic parameters of diabetes mellitus, *Diabetes, nutrition & metabolism*, 17(6), 331–335.
- Akinci, E., Banga, A., Greder, L. V., Dutton, J. R., Slack, J.M., 2012, Reprogramming of pancreatic exocrine cells towards a beta (β) cell character using Pdx1, Ngn3 and MafA, *The Biochemical journal*, 442(3), 539–550.
- Aldridge, J.E., Horibe, T., Hoogenraad, N.J., 2007, Discovery of genes activated by the mitochondrial unfolded protein response (mtUPR) and cognate promoter elements, *PLoS One*, 2 (9), e874.
- Alejandro, E. U., Gregg, B., Blandino-Rosano, M., Cras-Méneur, C., Bernal-Mizrachi, E., 2015, Natural history of β -cell adaptation and failure in type 2 diabetes. *Molecular aspects of medicine*, 42, 19–41.
- Alessi, M.C., Nicaud, V., Scroyen, I., Lange, C., Saut, N., Fumeron, F., Marre, M., Lantieri, O., Fontaine-Bisson, B., Juhan-Vague, I., Balkau, B., Tregouet, D. A., Morange, P.E., DESIR Study Group, 2011, Association of vitronectin and plasminogen activator inhibitor-1 levels with the risk of metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus. Results from the D.E.S.I.R. prospective cohort, *Thrombosis and haemostasis*, 106 (3), 416–422.
- Al-Khawaga, S., Memon, B., Butler, A.E., Taheri, S., Abou-Samra, A.B., Abdelalim, E.M., 2018, Pathways governing development of stem cell-derived pancreatic β cells: lessons

from embryogenesis *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 93(1), 364–389.

- Alquoqa, R.S., Kasabri, V., Naffa, R., Akour, A., Bustanji, Y., 2018), Cross-sectional correlates of myeloperoxidase and alpha-1-acid glycoprotein with adiposity, atherogenic and hematological indices in metabolic syndrome patients with or without diabetes, *Therapeutic advances in endocrinology and metabolism*, 9 (9), 283–291.
- American Diabetes Association 2 Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes 2021. *Diabetes Care*. 2021,44(Suppl. S1),S15–S33..
- Amo-Shiinoki, K., Tanabe, K., Hoshii, Y., Matsui, H., Harano, R., Fukuda, T., Takeuchi, T., Bouchi, R., Takagi, T., Hatanaka, M., Takeda, K., Okuya, S., Nishimura, W., Kudo, A., Tanaka, S., Tanabe, M., Akashi, T., Yamada, T., Ogawa, Y., Ikeda, E., ... Tanizawa, Y., 2021, Islet cell dedifferentiation is a pathologic mechanism of long-standing progression of type 2 diabetes, *JCI insight*, 6 (1), e143791.
- Anderton, H., Wicks, I.P., Silke, J., 2020, Cell death in chronic inflammation: breaking the cycle to treat rheumatic disease, *Nature reviews. Rheumatology*, 16 (9), 496–513.
- Anzell, A. R., Fogo, G. M., Gurm, Z., Raghunayakula, S., Wider, J. M., Maheras, K. J., Emaus, K. J., Bryson, T. D., Wang, M., Neumar, R. W., Przyklenk, K., Sanderson, T. H., 2021, Mitochondrial fission and mitophagy are independent mechanisms regulating ischemia/reperfusion injury in primary neurons, *Cell death & disease*, 12(5), 475.
- Arda, H.E., Benitez, C.M., Kim, S.K., 2013, Gene regulatory networks governing pancreas development, *Developmental cell*, 25 (1), 5–13.
- Ashcroft, F. M., Rorsman, P., 2012, Diabetes mellitus and the β cell: the last ten years, *Cell*, 148 (6), 1160–1171.
- Askew, K., Li, K., Olmos-Alonso, A., Garcia-Moreno, F., Liang, Y., Richardson, P., Tipton, T., Chapman, M.A., Riecken, K., Beccari, S., Sierra, A., Molnár, Z., Cragg, M.S., Garaschuk, O., Perry, V.H., Gomez-Nicola, D., 2017, Coupled Proliferation and Apoptosis Maintain the Rapid Turnover of Microglia in the Adult Brain, *Cell reports*, 18 (2), 391–405.
- Avrahami, D., Wang, Y.J., Schug, J., Feleke, E., Gao, L., Liu, C., HPAP Consortium, Naji, A., Glaser, B., Kaestner, K.H., 2020, Single-cell transcriptomics of human islet ontogeny defines the molecular basis of β -cell dedifferentiation in T2D, *Molecular metabolism*, 42, 101057.
- Back, S.H. ve Kaufman, R.J., 2012, Endoplasmic reticulum stress and type 2 diabetes, *Annual review of biochemistry*, 81, 767–793.
- Bader, E., Migliorini, A., Gegg, M., Moruzzi, N., Gerdes, J., Roscioni, S.S., Bakhti, M., Brandl, E., Irmeler, M., Beckers, J., Aichler, M., Feuchtinger, A., Leitzinger, C., Zischka, H., Wang-Sattler, R., Jastroch, M., Tschöp, M., Machicao, F., Staiger, H., Häring, H. U., Lickert, H., 2016, Identification of proliferative and mature β -cells in the islets of Langerhans, *Nature*, 535 (7612), 430–434.

- Bagdade, J.D., Bierman, E.L., Porte, D., Jr, 1967, The significance of basal insulin levels in the evaluation of the insulin response to glucose in diabetic and nondiabetic subjects, *The Journal of clinical investigation*, 46 (10), 1549–1557.
- Bakhti, M., Böttcher, A., Lickert, H., 2019, Modelling the endocrine pancreas in health and disease, *Nature reviews. Endocrinology*, 15 (3), 155–171.
- Basso, V., Marchesan, E., Peggion, C., Chakraborty, J., von Stockum, S., Giacomello, M., Ottolini, D., Debattisti, V., Caicci, F., Tasca, E., Pegoraro, V., Angelini, C., Antonini, A., Bertoli, A., Brini, M., Ziviani, E., 2018, Regulation of ER-mitochondria contacts by Parkin via Mfn2, *Pharmacological research*, 138, 43–56.
- Bastakoty, D. ve Young, P.P., 2016, Wnt/ β -catenin pathway in tissue injury: roles in pathology and therapeutic opportunities for regeneration, *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 30 (10), 3271–3284.
- Bastidas-Ponce, A., Scheibner, K., Lickert, H., Bakhti, M., 2017, Cellular and molecular mechanisms coordinating pancreas development, *Development (Cambridge, England)*, 144 (16), 2873–2888.
- Baxter, A.G., Cooke, A., 1993., Complement lytic activity has no role in the pathogenesis of autoimmune diabetes in NOD mice, *Diabetes*, 42 (11), 1574–1578.
- Beller, M., Thiel, K., Thul, P.J., Jäckle, H., 2010, Lipid droplets: a dynamic organelle moves into focus, *FEBS Lett*, 584 (11), 2176–2182.
- Bensellam, M., Jonas, J.C., Laybutt, D.R., 2018, Mechanisms of β -cell dedifferentiation in diabetes: recent findings and future research directions, *Journal of Endocrinology*, 236 (2), R109–R143.
- Bensellam, M., Laybutt, D.R., Jonas, J.C., 2012, The molecular mechanisms of pancreatic β -cell glucotoxicity: recent findings and future research directions. *Molecular and cellular endocrinology*, 364(1-2), 1–27.
- Berridge, M. ve Tan A., 1993, Characterization of the Cellular Reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): Subcellular Localization, Substrate Dependence, and Involvement of Mitochondrial Electron Transport in MTT Reduction, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 303 (2), 474–482.
- Berridge, M.V., Herst, P.M., Tan, A.S., 2005, Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction, *Biotechnology annual review*, 11, 127–152.
- Bhansali, S., Bhansali, A., Dutta, P., Walia, R., Dhawan, V., 2020, Metformin upregulates mitophagy in patients with T2DM: A randomized placebo-controlled study, *Journal of cellular and molecular medicine*, 24 (5), 2832–2846.
- Bhansali, S., Bhansali, A., Walia, R., Saikia, U.N., Dhawan, V., 2017, Alterations in Mitochondrial Oxidative Stress and Mitophagy in Subjects with Prediabetes and Type 2 Diabetes Mellitus, *Frontiers in endocrinology*, 8, 347.

- Bhatti, J.S., Sehrawat, A., Mishra, J., Sidhu, I.S., Navik, U., Khullar, N., Kumar, S., Bhatti, G. K., Reddy, P.H., 2022, Oxidative stress in the pathophysiology of type 2 diabetes and related complications: Current therapeutics strategies and future perspectives, *Free radical biology & medicine*, 184, 114–134.
- Bingol, B. ve Sheng, M., 2016, Mechanisms of mitophagy: PINK1, Parkin, USP30 and beyond, *Free radical biology & medicine*, 100, 210–222.
- Blum, B., Hrvatin, S., Schuetz, C., Bonal, C., Rezania, A., Melton, D.A., 2012, Functional beta-cell maturation is marked by an increased glucose threshold and by expression of urocortin 3, *Nature biotechnology*, 30 (3), 261–264.
- Boland, B.B., Brown, C., Jr, Alarcon, C., Demozay, D., Grimsby, J.S., Rhodes, C.J., 2018, β -Cell Control of Insulin Production During Starvation-Refeeding in Male Rats, *Endocrinology*, 159 (2), 895–906.
- Boyer, L.A., Lee, T.I., Cole, M.F., Johnstone, S.E., Levine, S.S., Zucker, J.P., Guenther, M.G., Kumar, R.M., Murray, H.L., Jenner, R.G., Gifford, D.K., Melton, D.A., Jaenisch, R., & Young, R.A., 2005, Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells, *Cell*, 122 (6), 947–956.
- Brereton, M. F., Rohm, M., Shimomura, K., Holland, C., Tornovsky-Babeay, S., Dadon, D., Iberl, M., Chibalina, M. V., Lee, S., Glaser, B., Dor, Y., Rorsman, P., Clark, A., & Ashcroft, F. M., 2016, Hyperglycaemia induces metabolic dysfunction and glycogen accumulation in pancreatic β -cells, *Nature communications*, 7, 13496.
- Brooks-Worrell, B. ve Palmer, J.P., 2012, Immunology in the Clinic Review Series; focus on metabolic diseases: development of islet autoimmune disease in type 2 diabetes patients: potential sequelae of chronic inflammation, *Clinical and experimental immunology*, 167 (1), 40–46.
- Butler, A.E., Janson, J., Bonner-Weir, S., Ritzel, R., Rizza, R.A., Butler, P.C., 2003, β -cell deficit and increased β -cell apoptosis in humans with type 2 diabetes, *Diabetes*, 52 (1), 102–110.
- Cao, S.S. ve Kaufman, R.J., 2014, Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress in cell fate decision and human disease, *Antioxidants and redox signaling*, 21 (3), 396–413.
- Cao, Y., Li, X., Lu, C., Zhan, X., 2018, The relationship between vitronectin and hepatic insulin resistance in type 2 diabetes mellitus, *Endocrine journal*, 65 (7), 747–753.
- Caradec, J., Sirab, N., Revaud, D., Keumeugni, C., Loric, S., 2010, Is GAPDH a relevant housekeeping gene for normalisation in colorectal cancer experiments?, *British journal of cancer*, 103 (9), 1475–1476.
- Carmona-Carmona, C.A., Dalla Pozza, E., Ambrosini, G., Cisterna, B., Palmieri, M., Decimo, I., Cuezva, J.M., Bottani, E., Dando, I., 2022, Mitochondrial Elongation and OPA1 Play Crucial Roles during the Stemness Acquisition Process in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancers*, 14 (14), 3432.

- Ceciliani, F. ve Lecchi, C., 2019, The Immune Functions of α_1 Acid Glycoprotein. *Current protein & peptide science*, 20 (6), 505–524.
- Chan D.C., 2020, Mitochondrial Dynamics and Its Involvement in Disease, *Annual review of pathology*, 15, 235–259.
- Chaves-Almagro, C., Auriau, J., Dortignac, A., Clerc, P., Lulka, H., Deleruyelle, S., Progetti, F., Nakhlé, J., Frances, A., Berta, J., Gigoux, V., Fourmy, D., Dufresne, M., Gomez-Brouchet, A., Guillermet-Guibert, J., Cordelier, P., Knibiehler, B., Jockers, R., Valet, P., Audigier, Y., Masri, B., 2022, Upregulated Apelin Signaling in Pancreatic Cancer Activates Oncogenic Signaling Pathways to Promote Tumor Development, *International journal of molecular sciences*, 23(18), 10600.
- Chen, Y., Li, X., Su, L., Hu, Q., Li, W., He, J., Zhao, L., 2022, Cyanidin-3-O-Glucoside Ameliorates Palmitic-Acid-Induced Pancreatic Beta Cell Dysfunction by Modulating CHOP-Mediated Endoplasmic Reticulum Stress Pathways, *Nutrients*, 14 (9), 1835.
- Chen, Z.Z., Bowden, P., Dufresne, J., Miao, M., Marshall, J.G., 2022, LEDGF is a new growth factor in fetal serum. *Analytical biochemistry*, 655, 114845.
- Chera, S., Ghila, L., Dobretz, K., Wenger, Y., Bauer, C., Buzgariu, W., Martinou, J.C., Galliot, B., 2009, Apoptotic cells provide an unexpected source of Wnt3 signaling to drive hydra head regeneration, *Developmental cell*, 17 (2), 279–289.
- Choi-Miura, N.H., Takahashi, K., Yoda, M., Saito, K., Hori, M., Ozaki, H., Mazda, T., Tomita, M., 2000, The novel acute phase protein, IHRP, inhibits actin polymerization and phagocytosis of polymorphonuclear cells. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]*, 49 (6), 305–310.
- Cinti, F., Bouchi, R., Kim-Muller, J. Y., Ohmura, Y., Sandoval, P. R., Masini, M., Marselli, L., Suleiman, M., Ratner, L. E., Marchetti, P., Accili, D., 2016, Evidence of β -Cell Dedifferentiation in Human Type 2 Diabetes, *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 101 (3), 1044–1054.
- Clutton, G., Mollan, K., Hudgens, M., Goonetilleke, N., 2019, A Reproducible, Objective Method Using MitoTracker® Fluorescent Dyes to Assess Mitochondrial Mass in T Cells by Flow Cytometry, *Cytometry. Part A: the journal of the International Society for Analytical Cytology*, 95 (4), 450–456.
- Collier, J.J., Fueger, P.T., Hohmeier, H.E., Newgard, C.B., 2006, Pro- and antiapoptotic proteins regulate apoptosis but do not protect against cytokine-mediated cytotoxicity in rat islets and beta-cell lines. *Diabetes*, 55 (5), 1398–1406.
- Connors, M.H., Dunger, D.B., Chapel, H., Jefferson, I., Jowett, T.P., Edwards, P.R., 1996, Diminished thyroxine-binding globulin in pubertal diabetic children, *Diabetes care*, 19 (3), 246–248.
- Conrad, E., Stein, R., Hunter, C.S., 2014, Revealing transcription factors during human pancreatic β cell development, *Trends Endocrinol. Metabol*, 25, 407–414.

- Conroy, S.J., Abdel-Wahab, Y.H., Caraher, E.M., Byrne, P.M., Murphy, E., Nolan, J., Flatt, P. R., Newsholme, P., 2000, Evidence for complement-dependent and -independent inhibition of insulin secretion from clonal beta-cells incubated in the presence of sera of newly diagnosed IDDM patients, *The Journal of endocrinology*, 164 (2), 139–147.
- Cooper, T. T., Sherman, S. E., Bell, G. I., Ma, J., Kuljanin, M., Jose, S. E., Lajoie, G. A., Hess, D.A., 2020, Characterization of a Vimentin^{high}/Nestin^{high} proteome and tissue regenerative secretome generated by human pancreas-derived mesenchymal stromal cells, *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 38(5), 666–682.
- Coskun, E., Ercin, M., Gezginci-Oktayoglu, S., 2017, The Role of Epigenetic Regulation and Pluripotency-Related MicroRNAs in Differentiation of Pancreatic Stem Cells to Beta Cells, *Journal Of Cellular Biochemistry*, 119 (1), 455-467.
- Coyne, L. P., Chen, X.J., 2018, mPOS is a novel mitochondrial trigger of cell death-implications for neurodegeneration, *FEBS letters*, 592 (5), 759–775.
- Csordás, G., Weaver, D., Hajnóczky, G., 2018, Endoplasmic Reticulum-Mitochondrial Contactology: Structure and Signaling Functions, *Trends in cell biology*, 28(7), 523–540.
- Darling, N.J., Cook, S.J., 2014, The role of MAPK signalling pathways in the response to endoplasmic reticulum stress, *Biochimica et biophysica acta*, 1843 (10), 2150–2163.
- Darshi, M., Mendiola, V.L., Mackey, M.R., Murphy, A.N., Koller, A., Perkins, G.A., Ellisman, M.H., Taylor, S.S., 2011, ChChd3, an inner mitochondrial membrane protein, is essential for maintaining crista integrity and mitochondrial function. *The Journal of biological chemistry*, 286 (4), 2918–2932.
- Dassaye, R., Naidoo, S., Cerf, M.E., 2016, Transcription factor regulation of pancreatic organogenesis, differentiation and maturation, *Islets*, 8 (1), 13–34.
- de Brito, O.M., Scorrano, L., 2008, Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria, *Nature*, 456 (7222), 605–610.
- De Souza, C.T., Araújo, E.P., Stoppiglia, L.F., Pauli, J.R., Ropelle, E., Rocco, S.A., Marin, R.M., Franchini, K.G., Carneiro, E.M., Velloso, L.A., 2007, Inhibition of UCP2 expression reverses diet-induced diabetes mellitus by effects on both insulin secretion and action, *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 21 (4), 1153–1163.
- de Zeeuw, D., Remuzzi, G., Parving, H.H., Keane, W.F., Zhang, Z., Shahinfar, S., Snapinn, S., Cooper, M.E., Mitch, W.E., Brenner, B.M., 2004, Proteinuria, a target for renoprotection in patients with type 2 diabetic nephropathy: lessons from RENAAL. *Kidney international*, 65 (6), 2309–2320.
- DeLany, J.P., Floyd, Z.E., Zvonic, S., Smith, A., Gravois, A., Reiners, E., Wu, X., Kilroy, G., Lefevre, M., Gimble, J.M., 2005, Proteomic analysis of primary cultures of human adipose-derived stem cells: modulation by Adipogenesis, *Molecular & cellular proteomics: MCP*, 4 (6), 731–740.

- Denton R.M., 2009, Regulation of mitochondrial dehydrogenases by calcium ions, *Biochimica et biophysica acta*, 1787(11), 1309–1316.
- Dominguez-Bendala, J., 2009, Pancreatic Development In Pancreatic Stem Cells, *Humana Press* (1), 11-31.
- Donath, M.Y., Ehses, J.A., Maedler, K., Schumann, D.M., Ellingsgaard, H., Eppler, E., Reinecke, M., 2005, Mechanisms of beta-cell death in type 2 diabetes, *Diabetes*, 54 (2), S108–S113.
- Dor, Y., Glaser, B., 2013, β -cell dedifferentiation and type 2 diabetes, *The New England journal of medicine*, 368 (6), 572–573.
- Dunning, B. E., Gerich, J. E., 2007, The role of alpha-cell dysregulation in fasting and postprandial hyperglycemia in type 2 diabetes and therapeutic implications, *Endocrine reviews*, 28(3), 253–283.
- Duque, M., Amorim, J.P., Bessa, J., 2021, Ptf1a function and transcriptional cis-regulation, a cornerstone in vertebrate pancreas development, *FEBS J*, 5121–5136.
- Efrat, S., 2019, Beta-Cell Dedifferentiation in Type 2 Diabetes: Concise Review, *Stem Cells*, 37 (10), 1267-1272.
- Ehrhardt, J.D., Gomez, F., 2022, Embryology, Pancreas, *In StatPearls*. StatPearls Publishing.
- Eizirik, D.L., Cardozo, A.K., Cnop, M., 2007, The role for endoplasmic reticulum stress in diabetes mellitus, *Endocrine reviews*, 29 (1), 42-61.
- Eizirik, D.L., Colli, M. L., Ortis, F, 2009, The role of inflammation in insulinitis and beta-cell loss in type 1 diabetes, *Nature reviews. Endocrinology*, 5 (4), 219–226.
- Eizirik, D.L., Pasquali, L., Cnop, M., 2020, Pancreatic β -cells in type 1 and type 2 diabetes mellitus: different pathways to failure, *Nature reviews. Endocrinology*, 16 (7), 349–362.
- Eizirik, D.L., Sammeth, M., Bouckennooghe, T., Bottu, G., Sisino, G., Igoillo-Esteve, M., Ortis, F., Santin, I., Colli, M.L., Barthson, J., Bouwens, L., Hughes, L., Gregory, L., Lunter, G., Marselli, L., Marchetti, P., McCarthy, M.I., Cnop, M., 2012, The human pancreatic islet transcriptome: expression of candidate genes for type 1 diabetes and the impact of pro-inflammatory cytokines, *PLoS genetics*, 8 (3), e1002552.
- Elsayed, A.K., Vimalraj, S., Nandakumar, M., Abdelalim, E.M., 2021, Insulin resistance in diabetes: The promise of using induced pluripotent stem cell technology, *World journal of stem cells*, 13 (3), 221–235.
- Engström, G., Hedblad, B., Eriksson, K. F., Janzon, L., Lindgärde, F., 2005, Complement C3 is a risk factor for the development of diabetes: a population-based cohort study, *Diabetes*, 54 (2), 570–575.

- Ercin, M., Sancar-Bas, S., Bolkent, S., Oktayoglu, S., 2018, Tub and β -catenin play a key role in insulin and leptin resistance-induced pancreatic beta-cell differentiation, *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*, 1865 (12), 1934-1944.
- Esmacili, S., Bandarian, F., Esmacili, B., Nasli-Esfahani, E., 2019, Apelin and stem cells: the role played in the cardiovascular system and energy metabolism, *Cell biology international*, 43 (12), 1332–1345.
- Esser, P., Bresgen, M., Weller, M., Heimann, K., Wiedemann, P., 1994, The significance of vitronectin in proliferative diabetic retinopathy, *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology=Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie*, 232 (8), 477–481.
- Esteca, M.V., Severino, M.B., Silvestre, J.G., Palmeira Dos Santos, G., Tamborlin, L., Luchessi, A.D., Moriscot, A.S., Gustafsson, Å.B, Baptista, I.L., 2020, Loss of Parkin Results in Altered Muscle Stem Cell Differentiation during Regeneration, *International journal of molecular sciences*, 21 (21), 8007.
- Fan G.C., 2012, Role of heat shock proteins in stem cell behavior, *Progress in molecular biology and translational science*, 111, 305–322.
- Fan, H., et al., 2020, Apoptosis-Induced Wnt2/ β -Catenin Signaling Triggers Astrocytic Dedifferentiation and Facilitates Neurogenesis in Ischemic Cortex, *Research Square*, PPR191200.
- Feng, J., Zhao, H., Du, M., Wu, X., 2019, The effect of apelin-13 on pancreatic islet beta cell mass and myocardial fatty acid and glucose metabolism of experimental type 2 diabetic rats, *Peptides*, 114, 1–7.
- Fiorese, C.J., Schulz, A.M., Lin, Y.F., Rosin, N., Pellegrino, M.W., Haynes, C.M., 2016, The Transcription Factor ATF5 Mediates a Mammalian Mitochondrial UPR, *Current Biology*, 26 (15), 2037-2043.
- Fonseca, S.G., Gromada, J., Urano, F., 2011, Endoplasmic reticulum stress and pancreatic β -cell death, *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 22 (7), 266-274.
- Frezza, C., Cipolat, S., Martins de Brito, O., Micaroni, M., Beznoussenko, G.V., Rudka, T., Bartoli, D., Polishuck, R.S., Danial, N.N., De Strooper, B., Scorrano, L., 2006, OPA1 controls apoptotic cristae remodeling independently from mitochondrial fusion, *Cell*, 126 (1), 177–189.
- Fu, W., Liu, Y., Yin, H., 2019, Mitochondrial Dynamics: Biogenesis, Fission, Fusion, and Mitophagy in the Regulation of Stem Cell Behaviors, *Stem cells international*, 2019, 9757201.
- Fu, Z., Gilbert, E.R., Liu, D., 2013, Regulation of insulin synthesis and secretion and pancreatic Beta-cell dysfunction in diabetes, *Current diabetes reviews*, 9 (1), 25–53.

- Gao, F., Reynolds, M.B., Passalacqua, K.D., Sexton, J.Z., Abuaita, B.H., O'Riordan, M.X.D., 2021, The Mitochondrial Fission Regulator DRP1 Controls Post-Transcriptional Regulation of TNF- α , *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 10, 593805.
- Garantziotis, S., Hollingsworth, J.W., Ghanayem, R.B., Timberlake, S., Zhuo, L., Kimata, K., Schwartz, D.A., 2007, Inter-alpha-trypsin inhibitor attenuates complement activation and complement-induced lung injury. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 179 (6), 4187–4192.
- Gezginci-Oktayoglu, S., Onay-Ucar, E., Sancar-Bas, S., Karatug-Kacar, A., Arda, E.S.N., Bolkent, S., 2018, Involvement of dying beta cell originated messenger molecules in differentiation of pancreatic mesenchymal stem cells under glucotoxic and glucolipotoxic conditions, *Journal of cellular physiology*, 233 (5), 4235–4244.
- Gezginci-Oktayoglu, S., Sancar, S., Karatug-Kacar, A., Bolkent, S., 2021, miR-375 induces adipogenesis through targeting Erk1 in pancreatic duct cells under the influence of sodium palmitate, *Journal of cellular physiology*, 236 (5), 3881–3895.
- Ghiassi, S.M., Krogh, N., Tyrberg, B., Mandrup-Poulsen, T., 2018, The No-Go and Nonsense-Mediated RNA Decay Pathways Are Regulated by Inflammatory Cytokines in Insulin-Producing Cells and Human Islets and Determine β -Cell Insulin Biosynthesis and Survival, *Diabetes*, 67 (10), 2019–2037.
- Ghosh, P., Sahoo, R., Vaidya, A., Chorev, M., Halperin, J.A., 2015, Role of complement and complement regulatory proteins in the complications of diabetes, *Endocrine reviews*, 36 (3), 272–288.
- Giacomello, M., Pyakurel, A., Glytsou, C., Scorrano, L., 2020, The cell biology of mitochondrial membrane Dynamics, *Nature reviews. Molecular cell biology*, 21(4), 204–224.
- Giorgi, C., De Stefani, D., Bononi, A., Rizzuto, R., Pinton, P., 2009, Structural and functional link between the mitochondrial network and the endoplasmic reticulum, *International Journal of Biochemical Cell Biology*, 41 (10), 1817–27.
- Glick, E., Leshkowitz, D., Walker, M.D., 2000, Transcription factor BETA2 acts cooperatively with E2A and PDX1 to activate the insulin gene promoter, *The Journal of biological chemistry*, 275 (3), 2199–2204.
- Glinoe, D., Naeije, R., Golstein, J., Fernandez-Deville, M., Vanhaelst, L., 1980, Alterations in circulating thyroid hormones and thyroxine-binding globulin levels during diabetic ketoacidosis, *Journal of endocrinological investigation*, 3 (1), 67–69.
- Goessling, W., North, T.E., Loewer, S., Lord, A.M., Lee, S., Stoick-Cooper, C.L., Weidinger, G., Puder, M., Daley, G.Q., Moon, R. T., Zon, L.I., 2009, Genetic interaction of PGE2 and Wnt signaling regulates developmental specification of stem cells and regeneration, *Cell*, 136 (6), 1136–1147.

- Gomes, L. C., Di Benedetto, G., Scorrano, L., 2011, During autophagy mitochondria elongate, are spared from degradation and sustain cell viability, *Nature cell biology*, 13(5), 589–598.
- González-Garza, M.T., Martínez, H. R., Caro-Osorio, E., Cruz-Vega, D. E., Hernández-Torre, M., Moreno-Cuevas, J.E., 2013, Differentiation of CD133+ stem cells from amyotrophic lateral sclerosis patients into preneuron cells, *Stem cells translational medicine*, 2(2), 129–135.
- Greco, S. J., Liu, K., Rameshwar, P., 2007, Functional similarities among genes regulated by OCT4 in human mesenchymal and embryonic stem cells, *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 25 (12), 3143–3154.
- Grunnet, L.G., Aikin, R., Tonnesen, M.F., Paraskevas, S., Blaabjerg, L., Størling, J., Rosenberg, L., Billestrup, N., Maysinger, D., Mandrup-Poulsen, T., 2009, Proinflammatory cytokines activate the intrinsic apoptotic pathway in beta-cells, *Diabetes*, 58 (8), 1807–1815.
- Guo, C., Liu, S., Sun, M.Z., 2013, Novel insight into the role of GAPDH playing in tumor, *Clinical & translational oncology: official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico*, 15 (3), 167–172.
- Guo, L., Li, Q., Wang, W., Yu, P., Pan, H., Li, P., Sun, Y., Zhang, J., 2009, Apelin inhibits insulin secretion in pancreatic beta-cells by activation of PI3-kinase-phosphodiesterase 3B, *Endocrine research*, 34 (4), 142–154.
- Gurzov, E.N., Germano, C.M., Cunha, D.A., Ortis, F., Vanderwinden, J.M., Marchetti, P., Zhang, L., Eizirik, D.L., 2010, p53 up-regulated modulator of apoptosis (PUMA) activation contributes to pancreatic beta-cell apoptosis induced by proinflammatory cytokines and endoplasmic reticulum stress, *The Journal of biological chemistry*, 285 (26), 19910–19920.
- Haçarız, O., Baykal, A.T., Akgün, M., Kavak, P., Sağıroğlu, M.Ş., Sayers, G.P., 2014, Generating a detailed protein profile of *Fasciola hepatica* during the chronic stage of infection in cattle, *Proteomics*, 14, 1519–1530.
- Hasnat, M., Yuan, Z., Ullah, A., Naveed, M., Raza, F., Baig, M.M.F.A., Khan, A., Xu, D., Su, Y., Sun, L., Zhang, L., Jiang, Z., 2020, Mitochondria-dependent apoptosis in triptolide-induced hepatotoxicity is associated with the Drp1 activation, *Toxicology mechanisms and methods*, 30 (2), 124–133.
- Haze, K., Yoshida, H., Yanagi, H., Yura, T., Mori, K., 1999, Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress, *Molecular Biology of the Cell*, 10 (11), 3787–3799.
- Heijmans, J., van Lidth de Jeude, J.F., Koo, B.K., Rosekrans, S.L., Wielenga, M.C., van de Wetering, M., Ferrante, M., Lee, A. S., Onderwater, J.J., Paton, J. C., Paton, A.W., Mommaas, A.M., Kodach, L.L., Hardwick, J.C., Hommes, D. W., Clevers, H., Muncan, V., van den Brink, G.R., 2013, ER stress causes rapid loss of intestinal epithelial stemness through activation of the unfolded protein response, *Cell reports*, 3 (4), 1128–1139.

- Helker, C.S., Eberlein, J., Wilhelm, K., Sugino, T., Malchow, J., Schuermann, A., Baumeister, S., Kwon, H.B., Maischein, H.M., Potente, M., Herzog, W., Stainier, D.Y., 2020, Apelin signaling drives vascular endothelial cells toward a pro-angiogenic state, *eLife*, 9, e55589.
- Henseleit, K.D., Nelson, S.B., Kuhlbrodt, K., Hennings, J.C., Ericson, J., Sander, M., 2005, NKX6 transcription factor activity is required for alpha- and beta-cell development in the pancreas, *Development*, 132, 3139–3149.
- Herbert, T. P., Laybutt, D.R., 2016, A Reevaluation of the Role of the Unfolded Protein Response in Islet Dysfunction: Maladaptation or a Failure to Adapt?, *Diabetes*, 65(6), 1472–1480.
- Herrera-Cruz, M. S., Simmen, T., 2017, Over Six Decades of Discovery and Characterization of the Architecture at Mitochondria-Associated Membranes (MAMs), *Advances in experimental medicine and biology*, 997, 13–31.
- Holland, A.M., Hale, M.A., Kagami, H., Hammer, R.E., MacDonald, R.J., 2002, Experimental control of pancreatic development and maintenance, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(19), 12236–12241.
- Hori, O., Ichinoda, F., Tamatani, T., Yamaguchi, A., Sato, N., Ozawa, K., Kitao, Y., Miyazaki, M., Harding, H.P., Ron, D., Tohyama, M.M.S.D., Ogawa, S., 2002, Transmission of cell stress from endoplasmic reticulum to mitochondria: enhanced expression of Lon protease, *Journal of Cell Biology*, 157(7), 1151–1160.
- Hou, N., Torii, S., Saito, N., Hosaka, M., Takeuchi, T., 2008, Reactive oxygen species-mediated pancreatic beta-cell death is regulated by interactions between stress-activated protein kinases, p38 and c-Jun N-terminal kinase, and mitogen-activated protein kinase phosphatases, *Endocrinology*, 149 (4), 1654–1665.
- Hu, F. Ve Liu, F., 2011, Mitochondrial stress: a bridge between mitochondrial dysfunction and metabolic diseases?, *Cellular signalling*, 23 (10), 1528–1533.
- Huang, C., Walker, E.M., Dadi, P.K., Hu, R., Xu, Y., Zhang, W., Sanavia, T., Mun, J., Liu, J., Nair, G.G., Tan, H.Y.A., Wang, S., Magnuson, M.A., Stoeckert, C.J., Jr, Hebrok, M., Gannon, M., Han, W., Stein, R., Jacobson, D.A., Gu, G., 2018, Synaptotagmin 4 Regulates Pancreatic β Cell Maturation by Modulating the Ca^{2+} Sensitivity of Insulin Secretion Vesicles, *Developmental cell*, 45 (3), 347–361.e5.
- Huang, Q., Li, F., Liu, X., Li, W., Shi, W., Liu, F.F., O'Sullivan, B., He, Z., Peng, Y., Tan, A. C., Zhou, L., Shen, J., Han, G., Wang, X.J., Thorburn, J., Thorburn, A., Jimeno, A., Raben, D., Bedford, J.S., Li, C.Y., 2011, Caspase 3-mediated stimulation of tumor cell repopulation during cancer radiotherapy, *Nature medicine*, 17 (7), 860–866.
- IDF. 2021, Diabetes Atlas. 10th ed. Brussels: *International Diabetes Federation*.
- Ishihara, N., Fujita, Y., Oka, T., Mihara, K., 2006, Regulation of mitochondrial morphology through proteolytic cleavage of OPA1, *EMBO J*, 25 (13), 2966–2977.

- Ishiyama, M., Shiga, M., Sasamoto, K., Mizoguchi, M., He, P.G., 1993, A new sulfonated tetrazolium salt that produces a highly water-soluble formazan dye. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 41(6), 1118–1122.
- Ivankovic, D., Chau, K. Y., Schapira, A. H., Gegg, M. E., 2016, Mitochondrial and lysosomal biogenesis are activated following PINK1/parkin-mediated mitophagy, *Journal of neurochemistry*, 136(2), 388–402.
- Jennings, R.E., Berry, A.A., Strutt, J.P., Gerrard, D.T., Hanley, N.A., 2015, Human pancreas development, *Development*, 142 (18), 3126–3137.
- Jensen, J., Pedersen, E.E., Galante, P., Hald, J., Heller, R.S., Ishibashi, M., Kageyama, R., Guillemot, F., Serup, P., Madsen, O.D., 2000, Control of endodermal endocrine development by Hes-1, *Nat Genet*, 24 , 36–44i
- Jitrapakdee, S., Wutthisathapornchai, A., Wallace, J.C., MacDonald, M.J., 2010, Regulation of insulin secretion: role of mitochondrial signalling, *Diabetologia*, 53 (6), 1019–1032.
- Johnston, N.R., Mitchell, R.K., Haythorne, E., Pessoa, M. P., Semplici, F., Ferrer, J., Piemonti, L., Marchetti, P., Bugliani, M., Bosco, D., Berishvili, E., Duncanson, P., Watkinson, M., Broichhagen, J., Trauner, D., Rutter, G.A., Hodson, D.J., 2016, Beta Cell Hubs Dictate Pancreatic Islet Responses to Glucose. *Cell metabolism*, 24 (3), 389–401.
- Joseph, J.W., Koshkin, V., Saleh, M.C., Sivitz, W.I., Zhang, C.Y., Lowell, B.B., Chan, C.B., & Wheeler, M.B., 2004, Free fatty acid-induced beta-cell defects are dependent on uncoupling protein 2 expression, *The Journal of biological chemistry*, 279 (49), 51049–51056.
- Jung, Y., Zhou, R., Kato, T., Usui, J.K., Muratani, M., Oishi, H., Heck, M.M.S., Takahashi, S., 2018, Isl1beta overexpression with key beta cell transcription factors enhances glucose-responsive hepatic insulin production and secretion, *Endocrinology*, 159, 869–882.
- Jurgens, C.A., Toukatly, M.N., Fligner, C.L., Udayasankar, J., Subramanian, S. L., Zraika, S., Aston-Mourney, K., Carr, D.B., Westermarck, P., Westermarck, G. T., Kahn, S. E., & Hull, R.L., 2011, β -cell loss and β -cell apoptosis in human type 2 diabetes are related to islet amyloid deposition, *The American journal of pathology*, 178 (6), 2632–2640.
- Juwono, J., Martinus, R.D., 2016, Does Hsp60 Provide a Link between Mitochondrial Stress and Inflammation in Diabetes Mellitus?, *Journal of diabetes research*, 2016, 8017571.
- Kaido, T., Yebra, M., Cirulli, V., Rhodes, C., Diaferia, G., Montgomery, A.M., 2006, Impact of defined matrix interactions on insulin production by cultured human beta-cells: effect on insulin content, secretion, and gene transcription, *Diabetes*, 55 (10), 2723–2729.
- Kaneto, H., Matsuoka, T., 2015, Role of pancreatic transcription factors in maintenance of mature β -cell function, *Int. J. Mol. Sci*, 16, 6281–6297.
- Kapica, M., Jankowska, A., Antushevich, H., Pietrzak, P., Bierla, J. B., Dembinski, A., Zabielski, R., 2012, The effect of exogenous apelin on the secretion of pancreatic juice in

anaesthetized rats, *Journal of physiology and pharmacology: an official journal of the Polish Physiological Society*, 63 (1), 53–60.

- Karunakaran, U., Kim, H. J., Kim, J. Y., Lee, I.K., 2012, Guards and culprits in the endoplasmic reticulum: glucolipotoxicity and β -cell failure in type II diabetes, *Experimental diabetes research*, 2012, 639762.
- Kaufman, R. J., Scheuner, D., Schröder, M., Shen, X., Lee, K., Liu, C. Y., Arnold, S.M., 2002, The unfolded protein response in nutrient sensing and differentiation, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3 (6), 411–421.
- Kawaguchi, Y., Cooper, B., Gannon, M., Ray, M., MacDonald, R.J., Wright, C.V., 2002, The role of the transcriptional regulator Ptf1a in converting intestinal to pancreatic progenitors, *Nat. Genet.*, 32, 128–134.
- Keller, G., 2005, Embryonic stem cell differentiation: emergence of a new era in biology and medicine, *Genes and Development*, 19 1129–1155.
- Kiba T., 2022, Overexpression of pdx-1 gene increases ins1 gene mrna expression, not Ins2 gene mrna expression, in insulinoma cell line rin-5f, *Acta endocrinologica (Bucharest, Romania: 2005)*, 18 (2), 164–167.
- King, B. C., Kulak, K., Krus, U., Rosberg, R., Golec, E., Wozniak, K., Gomez, M. F., Zhang, E., O'Connell, D. J., Renström, E., Blom, A. M., 2019, Complement Component C3 Is Highly Expressed in Human Pancreatic Islets and Prevents β Cell Death via ATG16L1 Interaction and Autophagy Regulation, *Cell metabolism*, 29(1), 202–210.e6.
- Kol, A., Lichtman, A.H., Finberg, R.W., Libby, P., Kurt-Jones, E.A., 2000, Cutting edge: heat shock protein (HSP) 60 activates the innate immune response: CD14 is an essential receptor for HSP60 activation of mononuclear cells, *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 164 (1), 13–17.
- Koshiba, T., Detmer, S.A., Kaiser, J.T., Chen, H., McCaffery, J.M., Chan, D.C., 2004, Structural basis of mitochondrial tethering by mitofusin complexes, *Science*, 305 (5685), 858–862.
- Kowaltowski, A.J., Menezes-Filho, S.L., Assali, E.A., Gonçalves, I.G., Cabral-Costa, J.V., Abreu, P., Miller, N., Nolasco, P., Laurindo, F.R.M., Bruni-Cardoso, A., Shirihai, O. S., 2019, Mitochondrial morphology regulates organellar Ca^{2+} uptake and changes cellular Ca^{2+} homeostasis, *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 33 (12), 13176–13188.
- Krauss, S., Zhang, C.Y., Scorrano, L., Dalgaard, L.T., St-Pierre, J., Grey, S.T., Lowell, B.B., 2003, Superoxide-mediated activation of uncoupling protein 2 causes pancreatic beta cell dysfunction. *The Journal of clinical investigation*, 112(12), 1831–1842.
- Kuchipudi, S.V., Tellabati, M., Nelli, R.K., White, G.A., Perez, B.B., Sebastian, S., Slomka, M. J., Brookes, S. M., Brown, I. H., Dunham, S.P., Chang, K.C., 2012, 18S rRNA is a reliable normalisation gene for real time PCR based on influenza virus infected cells, *Virology journal*, 9, 230.

- Kukat, A., Dogan, S.A., Edgar, D., Mourier, A., Jacoby, C., Maiti, P., Mauer, J., Becker, C., Senft, K., Wibom, R., Kudin, A.P., Hultenby, K., Flögel, U., Rosenkranz, S., Ricquier, D., Kunz, W.S., Trifunovic, A., 2014, Loss of UCP2 attenuates mitochondrial dysfunction without altering ROS production and uncoupling activity, *PLoS genetics*, 10 (6), e1004385.
- Landes, T., Martinou, J.C., 2011, Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: the role of mitochondrial fission, *Biochimica et biophysica acta*, 1813 (4), 540–545.
- Lee, H., Smith, S.B., Yoon, Y., 2017, The short variant of the mitochondrial dynamin OPA1 maintains mitochondrial energetics and cristae structure, *The Journal of biological chemistry*, 292 (17), 7115–7130.
- Lee, J., Wen, J., Park, J. Y., Kim, S. A., Lee, E. J., Song, S.Y., 2009, Reversal of diabetes in rats using GLP-1-expressing adult pancreatic duct-like precursor cells transformed from acinar to ductal cells, *Stem cells and development*, 18 (7), 991–1002.
- Lemaire, K., Granvik, M., Schraenen, A., Goyvaerts, L., Van Lommel, L., Gómez-Ruiz, A., In 't Veld, P., Gilon, P., Schuit, F., 2017, How stable is repression of disallowed genes in pancreatic islets in response to metabolic stress?, *PloS one*, 12 (8), e0181651.
- Lendahl, U., Zimmerman, L. B., McKay, R. D., 1990, CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein, *Cell*, 60(4), 585–595.
- Leung, P.S., 2007, The physiology of a local renin–angiotensin system in the pancreas, *J Physiol*, 580, 31–37.
- Li, C., Cheng, H., Adhikari, B.K., Wang, S., Yang, N., Liu, W., Sun, J., Wang, Y., 2022, The Role of Apelin-APJ System in Diabetes and Obesity, *Frontiers in endocrinology*, 13, 820002.
- Li, J., Xu, J., Qin, X., Yang, H., Han, J., Jia, Y., Zhu, H., Zhu, L., Li, J., Xie, W., Hu, D., Zhang, X., Gao, F., 2019, Acute pancreatic beta cell apoptosis by IL-1 β is responsible for postburn hyperglycemia: Evidence from humans and mice, *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease*, 1865(2), 275–284.
- Li, T., Shuai, L., Mao, J., Wang, X., Wang, M., Zhang, X., Wang, L., Li, Y., Li, W., Zhou, Q., 2016, Efficient Production of Fluorescent Transgenic Rats using the piggyBac Transposon, *Scientific reports*, 6, 33225.
- Li, W.C., Rukstalis, J.M., Nishimura, W., Tchipashvili, V., Habener, J.F., Sharma, A., Bonner-Weir, S., 2010, Activation of pancreatic-duct-derived progenitor cells during pancreas regeneration in adult rats, *Journal of cell science*, 123 (16), 2792–2802.
- Liesa, M. ve Shirihai, O.S., 2013, Mitochondrial dynamics in the regulation of nutrient utilization and energy expenditure, *Cell metabolism*, 17 (4), 491–506.
- Lim, S., Rashid, M.A., Jang, M., Kim, Y., Won, H., Lee, J., Ha, J., 2011, Mitochondria-targeted antioxidants protect pancreatic β -cells against oxidative stress and improve insulin

- secretion in glucotoxicity and glucolipotoxicity, *Cellular Physiology and Biochemistry*, 28 (5), 873-886.
- Liu, N., Cai, X., Liu, T., Zou, J., Wang, L., Wang, G., Liu, Y., Ding, X., Zhang, B., Sun, P., Liang, R., Wang, S., 2020, Hypoxia-inducible factor-1 α mediates the expression of mature β cell-disallowed genes in hypoxia-induced β cell dedifferentiation, *Biochemical and biophysical research communications*, 523(2), 382–388.
- Liu, Y., Wu, Y., Wang, Y., Zhang, M., Li, Z., 2018, Increased Levels of Serum Protein Complexes Are Associated with Type 2 Diabetes, *International journal of medical sciences*, 15 (3), 210–216.
- Losón, O.C., Song, Z., Chen, H., Chan, D.C., 2013, Fis1, Mff, MiD49, and MiD51 mediate Drp1 recruitment in mitochondrial fission, *Molecular biology of the cell*, 24 (5), 659–667.
- Lu, H., Koshkin, V., Allister, E.M., Gyulkhandanyan, A.V., Wheeler, M.B., 2010, Molecular and metabolic evidence for mitochondrial defects associated with β -cell dysfunction in a mouse model of type 2 diabetes, *Diabetes*, 59 (2), 448-459.
- Lyttle, B.M., Li, J., Krishnamurthy, M., Fellows, F., Wheeler, M.B., Goodyer, C.G., Wang, R., 2008, Transcription factor expression in the developing human fetal endocrine pancreas, *Diabetologia*, 51 (7), 1169-1180.
- MacDonald, M. J., Fahien, L. A., Brown, L. J., Hasan, N. M., Buss, J. D., Kendrick, M.A, 2005, Perspective: emerging evidence for signaling roles of mitochondrial anaplerotic products in insulin secretion, *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*, 288 (1), E1-E15.
- Maedler, K., Sergeev, P., Ris, F., Oberholzer, J., Joller-Jemelka, H.I., Spinas, G.A., Kaiser, N., Halban, P.A., Donath, M.Y., 2017, Glucose-induced β cell production of IL-1 β contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets, *The Journal of clinical investigation*, 127 (4), 1589.
- Marselli, L., Suleiman, M., Masini, M., Campani, D., Bugliani, M., Syed, F., Martino, L., Focosi, D., Scatena, F., Olimpico, F., Filippini, F., Masiello, P., Boggi, U., Marchetti, P., 2014, Are we overestimating the loss of beta cells in type 2 diabetes?, *Diabetologia*, 57 (2), 362–365.
- Matsuda, N., Sato, S., Shiba, K., Okatsu, K., Saisho, K., Gautier, C.A., Sou, Y.S., Saiki, S., Kawajiri, S., Sato, F., Kimura, M., Komatsu, M., Hattori, N., Tanaka, K., 2010, PINK1 stabilized by mitochondrial depolarization recruits Parkin to damaged mitochondria and activates latent Parkin for mitophagy, *The Journal of cell biology*, 189 (2), 211–221.
- Matsuoka, T.A., Artner, I., Henderson, E., Means, A., Sander, M., Stein, R., 2004, The MafA transcription factor appears to be responsible for tissue-specific expression of insulin, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101 (9), 2930–2933.
- McLelland, G. L., Goiran, T., Yi, W., Dorval, G., Chen, C. X., Lauinger, N. D., Krahn, A. I., Valimehr, S., Rakovic, A., Rouiller, I., Durcan, T. M., Trempe, J. F., & Fon, E. A., 2018,

- Mfn2 ubiquitination by PINK1/parkin gates the p97-dependent release of ER from mitochondria to drive mitophagy, *eLife*, 7, e32866.
- Meek, S., Buehr, M., Sutherland, L., Thomson, A., Mullins, J. J., Smith, A. J., Burdon, T., 2010, Efficient gene targeting by homologous recombination in rat embryonic stem cells, *PloS one*, 5 (12), e14225
- Meeusen, S., McCaffery, J.M., Nunnari, J., 2004, Mitochondrial fusion intermediates revealed in vitro, *Science*, 305 (5691), 1747–1752.
- Miao, H., Li, R., Han, C., Lu, X., Zhang, H., 2018, Minocycline promotes posthemorrhagic neurogenesis via M2 microglia polarization via upregulation of the TrkB/BDNF pathway in rats, *Journal of neurophysiology*, 120 (3), 1307–1317.
- Miyachi, T., Maruyama, H., Kitamura, T., Nakamura, S., Kawakami, H., 1999, Structure and regulation of the human NeuroD (BETA2/BHF1) gene, *Brain Res Mol Brain Res*, 69, 223–231.
- Mkhize, B.C., Mosili, P., Ngubane, P.S., Sibiyi, N.H., Khathi, A., 2022, Diet-induced prediabetes: Effects on the activity of the renin-angiotensin-aldosterone system in selected organs, *Journal of diabetes investigation*, 13 (5), 768–780.
- Molina, A. J., Wikstrom, J. D., Stiles, L., Las, G., Mohamed, H., Elorza, A., Walzer, G., Twig, G., Katz, S., Corkey, B.E., Shirihai, O.S., 2009, Mitochondrial networking protects beta-cells from nutrient-induced apoptosis, *Diabetes*, 58 (10), 2303–2315.
- Mostafa, D., Yanagiya, A., Georgiadou, E., Wu, Y., Stylianides, T., Rutter, G. A., Suzuki, T., Yamamoto, T., 2020, Loss of β -cell identity and diabetic phenotype in mice caused by disruption of CNOT3-dependent mRNA deadenylation, *Communications biology*, 3 (1), 476.
- Mozdy, A.D., McCaffery, J.M., Shaw, J.M., 2000, Dnm1p GTPase-mediated mitochondrial fission is a multi-step process requiring the novel integral membrane component Fis1p, *Journal of Cell Biology*, 151 (2), 367–380.
- Mulder H., 2017, Transcribing β -cell mitochondria in health and disease. *Molecular metabolism*, 6(9), 1040–1051.
- Murao, N., Yokoi, N., Takahashi, H., Hayami, T., Minami, Y., Seino, S., 2022, Increased glycolysis affects β -cell function and identity in aging and diabetes, *Molecular metabolism*, 55, 101414.
- Nakada, K., Inoue, K., Ono, T., Isobe, K., Ogura, A., Goto, Y. I., Nonaka, I., Hayashi, J.I., 2001, Inter-mitochondrial complementation: Mitochondria-specific system preventing mice from expression of disease phenotypes by mutant mtDNA, *Nature medicine*, 7 (8), 934–940.
- Ngo, J., Osto, C., Villalobos, F., Shirihai, O.S., 2021, Mitochondrial Heterogeneity in Metabolic Diseases, *Biology*, 10 (9), 927.

- Nguyen, U., Squaglia, N., Boge, A., Fung, P.A., 2011, The Simple Western™: a gel-free, blot-free, hands-free Western blotting reinvention, *Nature Methods*, 8 (2011), v-vi.
- Nicholls, D.G., Ward, M.W., 2000, Mitochondrial membrane potential and neuronal glutamate excitotoxicity: mortality and millivolts, *Trends in neurosciences*, 23 (4), 166–174.
- Nichols, J., Zevnik, B., Anastassiadis, K., Niwa, H., Klewe-Nebenius, D., Chambers, I., Schöler, H., & Smith, A., 1998, Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4, *Cell*, 95 (3), 379–391.
- Nishimura, W., Takahashi, S., Yasuda, K., 2015, MafA is critical for maintenance of the mature beta cell phenotype in mice, *Diabetologia*, 58 (3), 566–574.
- Nordmann, T.M., Dror, E., Schulze, F., Traub, S., Berishvili, E., Barbieux, C., Donath, M.Y., 2017, The Role of Inflammation in β -cell Dedifferentiation, *Scientific reports*, 7 (1), 6285.
- Oh, Y. S., Bae, G. D., Baek, D. J., Park, E. Y., Jun, H.S., 2018, Fatty Acid-Induced Lipotoxicity in Pancreatic Beta-Cells During Development of Type 2 Diabetes, *Frontiers in endocrinology*, 9, 384.
- Okada, A.K., Teranishi, K., Lobo, F., Isas, J.M., Xiao, J., Yen, K., Cohen, P., Langen, R., 2017, The Mitochondrial-Derived Peptides, HumaninS14G and Small Humanin-like Peptide 2, Exhibit Chaperone-like Activity, *Scientific Reports*, 7 (1), 7802.
- Olbro, M., Rud, J., Moss, L. G., Sharma, A., 2002, Identification of beta-cell-specific insulin gene transcription factor RIPE3b1 as mammalian MafA, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99 (10), 6737–6742.
- Ong, S.B., Kalkhoran, S.B., Hernández-Reséndiz, S., Samangouei, P., Ong, S.G., Hausenloy, D.J., 2017, Mitochondrial-Shaping Proteins in Cardiac Health and Disease- the Long and the Short of It!, *Cardiovascular drugs and therapy*, 31 (1), 87–107.
- Pang, K., Mukonoweshuro, C., Wong, G.G., 1994, Beta cells arise from glucose transporter type 2 (Glut2)-expressing epithelial cells of the developing rat pancreas, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91 (20), 9559–9563.
- Park, K.G., Lee, K.M., Seo, H.Y., Suh, J.H., Kim, H.S., Wang, L., Won, K.C., Lee, H.W., Park, J.Y., Lee, K.U., Kim, J.G., Kim, B.W., Choi, H.S., Lee, I.K., 2007, Glucotoxicity in the INS-1 rat insulinoma cell line is mediated by the orphan nuclear receptor small heterodimer partner, *Diabetes*, 56 (2), 431–437.
- Patanè, G., Anello, M., Piro, S., Vigneri, R., Purrello, F., Rabuazzo, A.M., 2002, Role of ATP production and uncoupling protein-2 in the insulin secretory defect induced by chronic exposure to high glucose or free fatty acids and effects of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma inhibition, *Diabetes*, 51 (9), 2749–2756.
- Pereira, C.M.F., 2013, Crosstalk between Endoplasmic Reticulum Stress and Protein Misfolding in Neurodegenerative Diseases, *hindawi*, 2013.

- Perkins, G., Bossy-Wetzel, E., Ellisman, M.H., 2009, New insights into mitochondrial structure during cell death, *Experimental neurology*, 218 (2), 183–192.
- Poitout, V., Robertson, R.P., 2007, Glucolipotoxicity: fuel excess and β -cell dysfunction, *Endocrine reviews*, 29 (3), 351–366.
- Polonsky, K.S., Semenkovich, C.F., 2001, The pancreatic beta cell heats up: UCP2 and insulin secretion in diabetes, *Cell*, 105 (6), 705–707.
- PrayGod, G., Filteau, S., Range, N., Kitilya, B., Kavishe, B.B., Ramaiya, K., Jeremiah, K., Rehman, A.M., Changalucha, J., Olsen, M.F., Andersen, A.B., Friis, H., Krogh-Madsen, R., Faurholt-Jepsen, D., 2021, β -cell dysfunction and insulin resistance in relation to pre-diabetes and diabetes among adults in north-western Tanzania: a cross-sectional study, *Tropical medicine & international health : TM & IH*, 26 (4), 435–443.
- Qiu, G., Seiler, M.J., Thomas, B.B., Wu, K., Radosevich, M., Sadda, S.R., 2007, Revisiting nestin expression in retinal progenitor cells in vitro and after transplantation in vivo, *Experimental eye research*, 84 (6), 1047–1059.
- Radillo, O., Nocera, A., Leprini, A., Barocci, S., Mollnes, T. E., Pocecco, M., Pausa, M., Valente, U., Betterle, C., Tedesco, F., 1996, Complement-fixing islet cell antibodies in type-1 diabetes can trigger the assembly of the terminal complement complex on human islet cells and are potentially cytotoxic, *Clinical immunology and immunopathology*, 79 (3), 217–223.
- Rahier, J., Guiot, Y., Goebbels, R. M., Sempoux, C., Henquin, J.C., 2008, Pancreatic beta-cell mass in European subjects with type 2 diabetes, *Diabetes, obesity & metabolism*, 10 Suppl 4, 32–42.
- Rambold, A.S., Kostecky, B., Elia, N., Lippincott-Schwartz, J., 2011, Tubular network formation protects mitochondria from autophagosomal degradation during nutrient starvation, *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 108 (25), 10190–10195.
- Ranieri, M., Brajkovic, S., Riboldi, G., Ronchi, D., Rizzo, F., Bresolin, N., Corti, S., Comi, G.P., 2013, Mitochondrial fusion proteins and human diseases, *Neurology research international*, 2013, 293893.
- Rasola, A., Bernardi, P., 2011, Mitochondrial permeability transition in Ca^{2+} -dependent apoptosis and necrosis, *Cell calcium*, 50 (3), 222–233.
- Rath, E., Haller, D., 2012, Mitochondria at the interface between danger signaling and metabolism: role of unfolded protein responses in chronic inflammation, *Inflammatory bowel diseases*, 18 (7), 1364–1377.
- Reddy, R.K., Mao, C., Baumeister, P., Austin, R.C., Kaufman, R.J., Lee, A.S., 2003, Endoplasmic reticulum chaperone protein GRP78 protects cells from apoptosis induced by topoisomerase inhibitors role of ATP binding site in suppression of caspase-7 activation, *Journal of Biological Chemistry*, 278 (23), 20915–20924.

- Remedi, M. S., Emfinger, C., 2016, Pancreatic β -cell identity in diabetes, *Diabetes, obesity & metabolism*, 18 Suppl 1(Suppl 1), 110–116.
- Ren, B., Tao, C., Swan, M.A., Joachim, N., Martiniello-Wilks, R., Nassif, N. T., O'Brien, B. A., Simpson, A.M., 2016, Pancreatic Transdifferentiation and Glucose-Regulated Production of Human Insulin in the H4IIE Rat Liver Cell Line, *International journal of molecular sciences*, 17(4), 534.
- Rieusset J., 2017, Role of Endoplasmic Reticulum-Mitochondria Communication in Type 2 Diabetes, *Advances in experimental medicine and biology*, 997, 171–186.
- Ritz-Laser, B., Gauthier, B.R., Estreicher, A., Mamin, A., Brun, T., Ris, F., Salmon, P., Halban, P.A., Trono, D., Philippe, J., 2003, Ectopic expression of the beta-cell specific transcription factor Pdx1 inhibits glucagon gene transcription, *Diabetologia*, 46, 810–821.
- Roberts, D.J., Johnson, R.L., Burke, A.C., Nelson, C.E., Morgan, B.A., Tabin, C., 1995, Sonic hedgehog is an endodermal signal inducing Bmp-4 and Hox genes during induction and regionalization of the chick hindgut, *Development*, 121 (10), 3163–3174.
- Roberts, D.J., Smith, D.M., Goff, D.J., Tabin, C.J., 1998, Epithelial-mesenchymal signaling during the regionalization of the chick gut, *Development*, 125 (15), 2791–2801.
- Rodriguez, A., Von Salzen, D., Holguin, B. A., Bernal, R.A., 2020, Complex Destabilization in the Mitochondrial Chaperonin Hsp60 Leads to Disease, *Frontiers in molecular biosciences*, 7, 159.
- Romero-Garcia, S., Prado-Garcia, H., 2019, Mitochondrial calcium: Transport and modulation of cellular processes in homeostasis and cancer (Review), *International journal of oncology*, 54(4), 1155–1167.
- Roscioni, S.S., Migliorini, A., Gegg, M., Lickert, H., 2016, Impact of islet architecture on β -cell heterogeneity, plasticity and function, *Nature reviews. Endocrinology*, 12 (12), 695–709.
- Rui, J., Deng, S., Arazi, A., Perdigoto, A.L., Liu, Z., Herold, K.C., 2017, β Cells that Resist Immunological Attack Develop during Progression of Autoimmune Diabetes in NOD Mice, *Cell metabolism*, 25 (3), 727–738.
- Russ, H. A., Ravassard, P., Kerr-Conte, J., Pattou, F., Efrat, S., 2009, Epithelial-mesenchymal transition in cells expanded in vitro from lineage-traced adult human pancreatic beta cells, *PloS one*, 4(7), e6417.
- Sachs, S., Bastidas-Ponce, A., Tritschler, S., Bakhti, M., Böttcher, A., Sánchez-Garrido, M. A., Tarquis-Medina, M., Kleinert, M., Fischer, K., Jall, S., Harger, A., Bader, E., Roscioni, S., Ussar, S., Feuchtinger, A., Yesildag, B., Neelakandhan, A., Jensen, C. B., Cornu, M., Yang, B., ... Lickert, H., 2020, Targeted pharmacological therapy restores β -cell function for diabetes remission, *Nature metabolism*, 2 (2), 192–209.

- Sahu, A., Lambris, J. D., 2001, Structure and biology of complement protein C3, a connecting link between innate and acquired immunity, *Immunological reviews*, 180, 35–48.
- Sakuraba, H., Mizukami, H., Yagihashi, N., Wada, R., Hanyu, C., Yagihashi, S., 2002, Reduced beta-cell mass and expression of oxidative stress-related DNA damage in the islet of Japanese Type II diabetic patients, *Diabetologia*, 45(1), 85–96.
- Salem, V., Silva, L.D., Suba, K., Georgiadou, E., Neda Mousavy Gharavy, S., Akhtar, N., Martin-Alonso, A., Gaboriau, D. C. A., Rothery, S. M., Stylianides, T., Carrat, G., Pullen, T. J., Singh, S. P., Hodson, D. J., Leclerc, I., Shapiro, A.M.J., Marchetti, P., Briant, L. J. B., Distaso, W., Ninov, N., ... Rutter, G.A., 2019, Leader β -cells coordinate Ca^{2+} dynamics across pancreatic islets in vivo, *Nature metabolism*, 1 (6), 615–629.
- Salinno, C., Cota, P., Bastidas-Ponce, A., Tarquis-Medina, M., Lickert, H., Bakhti, M., 2019, β -Cell Maturation and Identity in Health and Disease, *International journal of molecular sciences*, 20 (21), 5417.
- Scheele, C., Nielsen, A.R., Walden, T. B., Sewell, D.A., Fischer, C.P., Brogan, R.J., Petrovic, N., Larsson, O., Tesch, P.A., Wennmalm, K., Hutchinson, D.S., Cannon, B., Wahlestedt, C., Pedersen, B. K., Timmons, J.A., 2007, Altered regulation of the PINK1 locus: a link between type 2 diabetes and neurodegeneration?, *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 21 (13), 3653–3665.
- Scheuner, D., Kaufman, R.J., 2008, The unfolded protein response: a pathway that links insulin demand with beta-cell failure and diabetes, *Endocrine reviews*, 29 (3), 317–333.
- Scheuner, D., Vander Mierde, D., Song, B., Flamez, D., Creemers, J.W., Tsukamoto, K., Kaufman, R.J., 2005, Control of mRNA translation preserves endoplasmic reticulum function in beta cells and maintains glucose homeostasis, *Nature medicine*, 11 (7), 757.
- Schieber, M., Chandel, N.S., 2014, ROS function in redox signaling and oxidative stress, *Current biology: CB*, 24 (10), R453–R462.
- Schrepfer, E., Scorrano, L., 2016, Mitofusins, from Mitochondria to Metabolism, *Molecular cell*, 61(5), 683–694.
- Schuetz, A.W., Dubin, N.H., Kwon, H., Rock, J., Damewood, M., Ghodgaonkar, R., 1992, Effects of human serum on rat cumulus-oocyte complex functions in vitro: oocyte activation and endocrine secretions, *Journal of assisted reproduction and genetics*, 9 (2), 133–138.
- Sekine, S., Youle, R. J., 2018, PINK1 import regulation; a fine system to convey mitochondrial stress to the cytosol, *BMC biology*, 16(1), 2.
- Seo, H.Y., Kim, Y.D., Lee, K.M., Min, A.K., Kim, M.K., Kim, H.S., Park, K.G., 2008, Endoplasmic reticulum stress-induced activation of activating transcription factor 6 decreases insulin gene expression via up-regulation of orphan nuclear receptor small heterodimer partner, *Endocrinology*, 149 (8), 3832–3841.

- Sessions, D.T., Kim, K.B., Kashatus, J. A., Churchill, N., Park, K.S., Mayo, M.W., Sesaki, H., Kashatus, D.F., 2022, Opa1 and Drp1 reciprocally regulate cristae morphology, ETC function, and NAD⁺ regeneration in KRas-mutant lung adenocarcinoma, *Cell reports*, 41(11), 111818.
- Shalini, S., Dorstyn, L., Dawar, S., Kumar, S., 2015, Old, new and emerging functions of caspases, *Cell death and differentiation*, 22 (4), 526–539.
- Shan, Z., Fa, W.H., Tian, C.R., Yuan, C.S., Jie, N., 2022, Mitophagy and mitochondrial dynamics in type 2 diabetes mellitus treatment, *Aging*, 14 (6), 2902–2919.
- Sharma, L. K., Lu, J., Bai, Y., 2009, Mitochondrial respiratory complex I: structure, function and implication in human diseases, *Current medicinal chemistry*, 16 (10), 1266–1277.
- Shin, H., Choi, S.J., Cho, A.R., Kim, D.Y., Kim, K.H., Kwon, O., 2016, Acute Stress-Induced Changes in Follicular Dermal Papilla Cells and Mobilization of Mast Cells: Implications for Hair Growth, *Annals of dermatology*, 28(5), 600–606.
- Shrestha, N., De Franco, E., Arvan, P., Cnop, M., 2021, Pathological β -Cell Endoplasmic Reticulum Stress in Type 2 Diabetes: Current Evidence, *Frontiers in endocrinology*, 12, 650158.
- Sidarala, V., Pearson, G. L., Parekh, V.S., Thompson, B., Christen, L., Gingerich, M.A., Zhu, J., Stromer, T., Ren, J., Reck, E.C., Chai, B., Corbett, J.A., Mandrup-Poulsen, T., Satin, L.S., Soleimanpour, S.A., 2020, Mitophagy protects β cells from inflammatory damage in diabetes, *JCI insight*, 5 (24), e141138.
- Simic, M.S., Moehle, E.A., Schinzel, R.T., Lorbeer, F.K., Halloran, J.J., Heydari, K., Sanchez, M., Julli  , D., Hockemeyer, D., Dillin, A., 2019, Transient activation of the UPR^{ER} is an essential step in the acquisition of pluripotency during reprogramming, *Science advances*, 5 (4), eaaw0025.
- Sivandzade, F., Bhalerao, A., Cucullo, L., 2019, Analysis of the Mitochondrial Membrane Potential Using the Cationic JC-1 Dye as a Sensitive Fluorescent Probe, *Bio-protocol*, 9 (1), e3128.
- Skwiersky, S., Iwuala, S., Chillumuntala, S., Osafehinti, D., Karam, J., 2021, Renin Angiotensin Aldosterone System, Glucose Homeostasis, and Prevention of Type 2 Diabetes: Mechanistic Insights and Evidence from Major Clinical Trials. IntechOpen.
- Smirnova, E., Griparic, L., Shurland, D.L., van der Bliek, A.M., 2001, Dynamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells, *Molecular Biology of the Cell*, 12 (8), 2245-2256.
- Song, J., Ni, Q., Sun, J., Xie, J., Liu, J., Ning, G., Wang, W., Wang, Q., 2022, Aging Impairs Adaptive Unfolded Protein Response and Drives Beta Cell Dedifferentiation in Humans. *J Clin Endocrinol Metab*, 107 (12), 3231-3241.
- Song, S.H., Han, D., Park, K., Um, J.E., Kim, S., Ku, M., Yang, J., Yoo, T.H., Yook, J. I., Kim, N. H., Kim, H.S., 2023, Bone morphogenetic protein-7 attenuates pancreatic damage

- under diabetic conditions and prevents progression to diabetic nephropathy via inhibition of ferroptosis, *Frontiers in endocrinology*, 14, 1172199.
- Song, Z., Ghochani, M., McCaffery, J.M., Frey, T.G., Chan, D.C., 2009, Mitofusins and OPA1 mediate sequential steps in mitochondrial membrane fusion, *Mol Biol Cell*, 20 (15), 3525-32.
- Stanger, B. Z., Hebrok, M., 2013, Control of cell identity in pancreas development and regeneration, *Gastroenterology*, 144(6), 1170–1179.
- Steer, S. A., Scarim, A.L., Chambers, K.T., Corbett, J.A., 2006, Interleukin-1 stimulates beta-cell necrosis and release of the immunological adjuvant HMGB1, *PLoS medicine*, 3 (2), e17.
- Stoffers D. A., 2004, The development of beta-cell mass: recent progress and potential role of GLP-1, *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme*, 36(11-12), 811–821.
- Sun, F.C., Wei, S., Li, C.W., Chang, Y.S., Chao, C.C., Lai, Y.K., 2006, Localization of GRP78 to mitochondria under the unfolded protein response, *Biochem J*, 396 (1), 31-39.
- Swaroop, S., Sengupta, N., Suryawanshi, A.R., Adlakha, Y.K., Basu, A., 2016, HSP60 plays a regulatory role in IL-1 β -induced microglial inflammation via TLR4-p38 MAPK axis, *Journal of neuroinflammation*, 13, 27.
- Swerdlow, R.H., 2020, Chapter Eight - The mitochondrial hypothesis: Dysfunction, bioenergetic defects, and the metabolic link to Alzheimer's disease,
- Swisa, A., Glaser, B., Dor, Y., 2017, Metabolic Stress and Compromised Identity of Pancreatic Beta Cells, *Frontiers in genetics*, 8, 21.
- Szklarczyk, D., Franceschini, A., Wyder, S., Forslund, K., Heller, D., Huerta-Cepas, J., Simonovic, M., Roth, A., Santos, A., Tsafou, K.P., Kuhn, M., Bork, P., Jensen, L.J., von Mering, C., 2015, STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life, *Nucleic Acids Research*, 43(Database issue), D447-52.
- Talchai, C., Xuan, S., Lin, H. V., Sussel, L., Accili, D., 2012, Pancreatic β cell dedifferentiation as a mechanism of diabetic β cell failure, *Cell*, 150 (6), 1223-1234.
- Thivolet, C., Vial, G., Cassel, R., Rieusset, J., Madec, A. M., 2017, Reduction of endoplasmic reticulum- mitochondria interactions in beta cells from patients with type 2 diabetes, *PloS one*, 12(7), e0182027.
- Thorens B., 2015, GLUT2, glucose sensing and glucose homeostasis, *Diabetologia*, 58(2), 221–232.
- Tomita T., 2016, Apoptosis in pancreatic β -islet cells in Type 2 diabetes, *Bosnian journal of basic medical sciences*, 16 (3), 162–179.

- Twig, G., Elorza, A., Molina A.J., Mohamed, H., Wikstrom, J.D., Walzer, G., Stiles, L. Haigh, S. E., Katz, S., Las, G., Alroy, J., Wu, M., Py, B.F., Yuan, J., Deeney, J.T., Corkey, B.E., Shirihai, O.S., 2008, Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy, *EMBO J*, 27 (2), 433–446.
- Uchida, S., Hara, K., Kobayashi, A., Funato, H., Hobara, T., Otsuki, K., Yamagata, H., McEwen, B.S., Watanabe, Y., 2010, Early life stress enhances behavioral vulnerability to stress through the activation of REST4-mediated gene transcription in the medial prefrontal cortex of rodents, *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 30(45), 15007–15018.
- Valera-Alberni, M. ve Canto, C., 2018, Mitochondrial stress management: a dynamic journey, *Cell Stress*, 2 (10), 253–274.
- van der Bliek, A.M., Shen, Q., Kawajiri, S., 2013, Mechanisms of mitochondrial fission and fusion, *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5(6), a011072.
- van der Meulen, T., Mawla, A.M., DiGrucchio, M.R., Adams, M.W., Nies, V., Dölleman, S., Liu, S., Ackermann, A.M., Cáceres, E., Hunter, A.E., Kaestner, K.H., Donaldson, C.J., & Huising, M.O., 2017, Virgin Beta Cells Persist throughout Life at a Neogenic Niche within Pancreatic Islets, *Cell metabolism*, 25 (4), 911–926.e6.
- Verfaillie, T., Rubio, N., Garg, A. D., Bultynck, G., Rizzuto, R., Decuypere, J. P., Piette, J., Linehan, C., Gupta, S., Samali, A., Agostinis, P., 2012, PERK is required at the ER-mitochondrial contact sites to convey apoptosis after ROS-based ER stress, *Cell death and differentiation*, 19(11), 1880–1891.
- Villa, E., Proïes, E., Rubio-Patiño, C., Obba, S., Zunino, B., Bossowski, J. P., 2017, Parkin-Independent mitophagy controls chemotherapeutic response in cancer cells, *Cell Rep*, 20, 2846–2859.
- Wai, T. ve Langer, T., 2016, Mitochondrial dynamics and metabolic regulation, *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 27 (2), 105–117.
- Wanet, A., Arnould, T., Najimi, M., Renard, P., 2015, Connecting Mitochondria, Metabolism, and Stem Cell Fate, *Stem cells and development*, 24 (17), 1957–1971.
- Wang, C., Guan, Y., Yang, J., 2010, Cytokines in the Progression of Pancreatic β -Cell Dysfunction, *International journal of endocrinology*, 2010, 515136.
- Wang, C., Zhang, Y., Li, F., Wei, Y., 2019, Conserved roles of glucose in suppressing reactive oxygen species-induced cell death and animal survival, *Aging*, 11 (15), 5726–5743.
- Wang, M., Wey, S., Zhang, Y., Ye, R., Lee, A.S., 2009, Role of the unfolded protein response regulator GRP78/BiP in development, cancer, and neurological disorders, *Antioxidants & redox signaling*, 11 (9), 2307–2316.
- Wang, X., Roper, M.G., 2014, Measurement of DCF fluorescence as a measure of reactive oxygen species in murine islets of Langerhans, *Analytical methods : advancing methods and applications*, 6 (9), 3019–3024.

- Weir, G. C., Aguayo-Mazzucato, C., Bonner-Weir, S., 2013, β -cell dedifferentiation in diabetes is important, but what is it?, *Islets*, 5 (5), 233-237.
- Weir, G.C. ve Bonner-Weir, S., 2004, Five Stages of Evolving Beta-Cell Dysfunction During Progression to Diabetes, *Diabetes*, 53 (3), 16–21.
- Wen, H., Gris, D., Lei, Y., Jha, S., Zhang, L., Huang, M. T., Brickey, W. J., Ting, J. P., 2011), Fatty acid-induced NLRP3-ASC inflammasome activation interferes with insulin signaling, *Nature immunology*, 12(5), 408–415.
- Westermann, B., 2010, Mitochondrial fusion and fission in cell life and death, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11 (12), 872-884.
- Wey, S., Luo, B., Lee, A.S., 2012, Acute inducible ablation of GRP78 reveals its role in hematopoietic stem cell survival, lymphogenesis and regulation of stress signaling, *PloS one*, 7 (6), e39047.
- Wierup, N., Svensson, H., Mulder, H., Sundler, F., 2002, The ghrelin cell: a novel developmentally regulated islet cell in the human pancreas, *Regulatory peptides*, 107(1-3), 63–69.
- Wlazlo, N., van Greevenbroek, M.M., Ferreira, I., Feskens, E.J., van der Kallen, C.J., Schalkwijk, C.G., Bravenboer, B., Stehouwer, C.D., 2014, Complement factor 3 is associated with insulin resistance and with incident type 2 diabetes over a 7-year follow-up period: the CODAM Study, *Diabetes care*, 37 (7), 1900–1909.
- Wong, E.D., Wagner, J.A., Gorsich, S.W., McCaffery, J.M., Shaw, J.M., Nunnari, J.M., 2000, The dynamin-related GTPase, Mgm1p, is an intermembrane space protein required for maintenance of fusion competent mitochondria, *Journal of Cell Biology*, 151 (2), 341–352.
- Wu, L., Zhang, Y., Ma, X., Zhang, N., Qin, G., 2012, The effect of resveratrol on FoxO1 expression in kidneys of diabetic nephropathy rats, *Molecular biology reports*, 39 (9), 9085–9093.
- Wysham, C., Shubrook, J., 2020, Beta-cell failure in type 2 diabetes: mechanisms, markers, and clinical implications, *Postgraduate medicine*, 132(8), 676–686.
- Xiao, D., Kou, H., Gui, S., Ji, Z., Guo, Y., Wu, Y., Wang, H., 2019, Age-Characteristic Changes of Glucose Metabolism, Pancreatic Morphology and Function in Male Offspring Rats Induced by Prenatal Ethanol Exposure, *Frontiers in endocrinology*, 10, 34.
- Xiong S, Mu T, Wang G, Jiang X., 2014, Mitochondria-mediated apoptosis in mammals, *Protein Cell*, 5,737–749.
- Xu, J., Zhou, Q., Liu, G., Tan, Y., Cai, L., 2013, Analysis of serum and urinal copper and zinc in Chinese northeast population with the prediabetes or diabetes with and without complications, *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2013, 635214.

- Yamaguchi, R. ve Perkins, G., 2009, Dynamics of mitochondrial structure during apoptosis and the enigma of Opa1, *Biochimica et biophysica acta*, 1787 (8), 963–972.
- Yamaguchi, R., Lartigue, L., Perkins, G., Scott, R.T., Dixit, A., Kushnareva, Y., Kuwana, T., Ellisman, M.H., Newmeyer, D.D., 2008, Opa1-mediated cristae opening is Bax/Bak and BH3 dependent, required for apoptosis, and independent of Bak oligomerization, *Molecular cell*, 31 (4), 557–569.
- Yang, F., Tang, X.Y., Liu, H., Jiang, Z.W., 2016, Inhibition of mitogen-activated protein kinase signaling pathway sensitizes breast cancer cells to endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis, *Oncology reports*, 35 (4), 2113–2120.
- Yang, X.F., Ren, L.W., Yang, L., Deng, C.Y., Li, F.R., 2017, In vivo direct reprogramming of liver cells to insulin producing cells by virus-free overexpression of defined factors, *Endocrine journal*, 64 (3), 291–302.
- Ye, J., Rawson, R.B., Komuro, R., Chen, X., Davé, U.P., Prywes, R., Brown, M.S., Goldstein, J.L., 2000, ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs, *Molecular Cell*, 6 (6), 1355–1364.
- Yilmaz, Z., Eralp Inan, O., Kocaturk, M., Baykal, A.T., Hacariz, O., Hatipoglu, I., Tvarijonaviciute, A., Cansev, M., Ceron, J., Ulus, I.H., 2016, Changes in serum proteins after endotoxin administration in healthy and choline-treated calves, *BMC Veterinary Research*, 12, 210.
- Yoon, S., Kovalenko, A., Bogdanov, K., Wallach, D., 2017, MLKL, the Protein that Mediates Necroptosis, Also Regulates Endosomal Trafficking and Extracellular Vesicle Generation, *Immunity*, 47 (1), 51–65.e7.
- Yoon, Y., Galloway, C.A., Jhun, B.S., Yu, T., 2011, Mitochondrial dynamics in diabetes, *Antioxid. Redox Signal*, 14, 439–457.
- Yoshida, H., 2007, ER stress and diseases, *FEBS J*, 274 (3), 630–658.
- Yoshihara, E., O'Connor, C., Gasser, E., Wei, Z., Oh, T.G., Tseng, T. W., Wang, D., Cayabyab, F., Dai, Y., Yu, R.T., Liddle, C., Atkins, A.R., Downes, M., Evans, R.M., 2020, Immune-evasive human islet-like organoids ameliorate diabetes, *Nature*, 586 (7830), 606–611.
- Youle, R.J. ve van der Blik, A.M., 2012, Mitochondrial fission, fusion, and stress, *Science*, 337 (6098), 1062–1065.
- Yu, T., Robotham, J. L., Yoon, Y., 2006, Increased production of reactive oxygen species in hyperglycemic conditions requires dynamic change of mitochondrial morphology, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(8), 2653–2658.
- Yu, T., Wang, L., Yoon, Y., 2015, Morphological control of mitochondrial bioenergetics. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*, 20 (2), 229–246.

- Yuan, J., Dunn, P., Martinus, R.D., 2011, Detection of Hsp60 in saliva and serum from type 2 diabetic and non-diabetic control subjects, *Cell stress & chaperones*, 16(6), 689–693.
- Zhang, C.Y., Baffy, G., Perret, P., Krauss, S., Peroni, O., Grujic, D., Hagen, T., Vidal-Puig, A.J., Boss, O., Kim, Y.B., Zheng, X.X., Wheeler, M.B., Shulman, G.I., Chan, C.B., Lowell, B.B., 2001, Uncoupling protein-2 negatively regulates insulin secretion and is a major link between obesity, beta cell dysfunction, and type 2 diabetes, *Cell*, 105 (6), 745–755.
- Zhang, C.Y., Parton, L.E., Ye, C.P., Krauss, S., Shen, R., Lin, C.T., Porco, J.A., Jr, Lowell, B.B., 2006, Genipin inhibits UCP2-mediated proton leak and acutely reverses obesity- and high glucose-induced beta cell dysfunction in isolated pancreatic islets, *Cell metabolism*, 3 (6), 417–427.
- Zhang, J., Khvorostov, I., Hong, J.S., Oktay, Y., Vergnes, L., Nuebel, E., Wahjudi, P. N., Setoguchi, K., Wang, G., Do, A., Jung, H.J., McCaffery, J.M., Kurland, I.J., Reue, K., Lee, W.N., Koehler, C.M., Teitell, M.A., 2011, UCP2 regulates energy metabolism and differentiation potential of human pluripotent stem cells, *The EMBO journal*, 30 (24), 4860–4873.
- Zheng, Y.Z., Cao, Z.G., Hu, X., Shao, Z.M., 2014, The endoplasmic reticulum stress markers GRP78 and CHOP predict disease-free survival and responsiveness to chemotherapy in breast cancer, *Breast cancer research and treatment*, 145 (2), 349–358.
- Zhong, J., Gong, Q., Mima, A., 2017, Inflammatory Regulation in Diabetes and Metabolic Dysfunction. *Journal of diabetes research*, 2017, 5165268.
- Zhou, Q., Law, A.C., Rajagopal, J., Anderson, W.J., Gray, P.A., Melton, D.A., 2007, A multipotent progenitor domain guides pancreatic organogenesis, *Developmental cell*, 13 (1), 103–114.
- Zhou, X., Fukuda, N., Matsuda, H., Endo, M., Wang, X., Saito, K., Ueno, T., Matsumoto, T., Matsumoto, K., Soma, M., Kobayashi, N., Nishiyama, A., 2013, Complement 3 activates the renal renin-angiotensin system by induction of epithelial-to-mesenchymal transition of the nephrotubulus in mice, *American journal of physiology. Renal physiology*, 305 (7), F957–F967.
- Zhu, Y., Liu, Q., Zhou, Z., Ikeda, Y., 2017, PDX1, Neurogenin-3, and MAFA: critical transcription regulators for beta cell development and regeneration, *Stem cell research & therapy*, 8(1), 240.
- Zhuo, L. ve Kimata, K., 2008, Structure and function of inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chains *Connective tissue research*, 49 (5), 311–320.
- Zimmet, P.Z., 2017, Diabetes and its drivers: The largest epidemic in human history?, *Clin Diabetes Endocrinol*, 3, 1–8.
- Zulewski, H., Abraham, E. J., Gerlach, M. J., Daniel, P. B., Moritz, W., Müller, B., Vallejo, M., Thomas, M. K., Habener, J. F., 2001, Multipotential nestin-positive stem cells

isolated from adult pancreatic islets differentiate ex vivo into pancreatic endocrine, exocrine, and hepatic phenotypes, *Diabetes*, 50(3), 521–533.



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Merve ERÇİN
Doğum Yeri	
Uyruğu	☒ T.C. ☐ Diğer:
E-Posta Adresi	
Web Adresi	

Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Fakülte	Fen Fakültesi
Bölümü	Biyoloji
Mezuniyet Yılı	01.07.2013

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Biyoloji Anabilim Dalı
Programı	Moleküler Biyoloji Programı

Doktora	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Biyoloji Anabilim Dalı
Program Adı	Moleküler Biyoloji Programı

Makale ve Bildiriler	
Akar, M., Ercin, M., Boran, T., Gezginci-Oktayoglu, S., & Özhan, G. (2023). UR-144, synthetic cannabinoid receptor agonist, induced cardiomyoblast toxicity mechanism comprises cytoplasmic Ca²⁺ and DAPK1 related autophagy and necrosis. <i>Toxicology mechanisms and methods</i>, 33(1), 56–64. https://doi.org/10.1080/15376516.2022.2081829 Ozkan, S., Isildar, B., Ercin, M., Gezginci-Oktayoglu, S., Konukoglu, D., Neşetoğlu, N., Oncul, M., & Koyuturk, M. (2022). Therapeutic potential of conditioned medium obtained from deferoxamine preconditioned umbilical cord mesenchymal stem cells on diabetic nephropathy model. <i>Stem cell research & therapy</i>, 13(1), 438. https://doi.org/10.1186/s13287-022-03121-6	

- Isildar, B., Ozkan, S., Ercin, M., Gezginci-Oktayoglu, S., Oncul, M., & Koyuturk, M. (2022). 2D and 3D cultured human umbilical cord-derived mesenchymal stem cell-conditioned medium has a dual effect in type 1 diabetes model in rats: immunomodulation and beta-cell regeneration. *Inflammation and regeneration*, 42(1), 55. <https://doi.org/10.1186/s41232-022-00241-7>
- Celik, E., Ercin, M., Bolkent, S., & Gezginci-Oktayoglu, S. (2022). Metformin induces mitochondrial remodeling and differentiation of pancreatic progenitor cells into beta-cells by a potential mechanism including suppression of the T1R3, PLC β 2, cytoplasmic Ca⁺², and AKT. *Journal of physiology and biochemistry*, 78(4), 869–883. <https://doi.org/10.1007/s13105-022-00910-8>
- Ercin, M., Gezginci-Oktayoglu, S., & Bolkent, S. (2022). Exendin-4 inhibits small intestinal glucose sensing and absorption through repression of T1R2/T1R3 sweet taste receptor signalling in streptozotocin diabetic mice. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine*, 246, 87–101. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2022.03.012>
- Gezginci-Oktayoglu, S., Ercin, M., Sancar, S., Celik, E., Koyuturk, M., Bolkent, S., & Bolkent, S. (2021). Aspartame induces cancer stem cell enrichment through p21, NICD and GLI1 in human PANC-1 pancreas adenocarcinoma cells. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 153, 112264. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112264>
- Ercin, M., Sancar-Bas, S., Bolkent, S., & Gezginci-Oktayoglu, S. (2018). Tub and β -catenin play a key role in insulin and leptin resistance-induced pancreatic beta-cell differentiation. *Biochimica et biophysica acta. Molecular cell research*, 1865(12), 1934–1944. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.09.010>
- Gezginci-Oktayoglu, S., Coskun, E., Ercin, M., & Bolkent, S. (2018). 4-Methylcatechol prevents streptozotocin-induced acute kidney injury through modulating NGF/TrkA and ROS-related Akt/GSK3 β / β -catenin pathways. *International immunopharmacology*, 64, 52–59. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.08.017>
- Coskun, E., Ercin, M., & Gezginci-Oktayoglu, S. (2018). The Role of Epigenetic Regulation and Pluripotency-Related MicroRNAs in Differentiation of Pancreatic Stem Cells to Beta Cells. *Journal of cellular biochemistry*, 119(1), 455–467. <https://doi.org/10.1002/jcb.26203>
- Oztay, F., Sancar-Bas, S., Gezginci-Oktayoglu, S., Ercin, M., & Bolkent, S. (2018). Exendin-4 partly ameliorates - hyperglycemia-mediated tissue damage in lungs of streptozotocin-induced diabetic mice. *Peptides*, 99, 99–107. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2017.12.007>
- Gezginci-Oktayoglu, S., Turkyilmaz, I. B., Ercin, M., Yanardag, R., & Bolkent, S. (2016). Vitamin U has a protective effect on valproic acid-induced renal damage due to its anti-oxidant, anti-inflammatory, and anti-fibrotic properties. *Protoplasma*, 253(1), 127–135. <https://doi.org/10.1007/s00709-015-0796-3>

BİLDİRİLER

Erçin M., Oktayoğlu S., 2021, Diyabetik Farelere Exendin-4 Uygulanması Tatlı Tat Reseptörü Sinyalizasyonunu Baskılayarak Kan Glikoz Seviyelerini İndirger, VII. Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, İstanbul, Türkiye, 28 - 31 Ekim 2021, ss.137-138.

Çelik E., Erçin M., Bolkent Ş., Oktayoğlu S., 2021, Metformin T1R3/PLC β 2/Ca²⁺/CAMKK2/LKB1/AKT Yolağını Baskılayarak Mitokondriyal Yeniden Şekillenmeyi ve Pankreatik Priogenitör Hücrelerin Beta-Hücrelerine Farklılaşmasını Uyarır, İstinye Üniversitesi Kök Hücre ve Doku Mühendisliği Sempozyumu, İstanbul, Türkiye, 27 - 28 Şubat 2021, ss.84-85.

Erçin M., Sancar S., Çelik E., Koyutürk M., Bolkent H. S., Oktayoğlu S., et al., 2021, Aspartam, İnsan Pankreas Adenokarsinom Hücre Hattında p21, NICD ve Gli1 Aracılığıyla Kanseri Kök Hücre Populasyonunun Artmasına Neden Olur, İstinye Üniversitesi Kök Hücre ve Doku Mühendisliği Sempozyumu, İstanbul, Türkiye, 27 - 28 Şubat 2021, ss.91-92.

Ercin, M., Gezginci-Oktayoglu, S., 2018, The Effect of Insulin And Leptin Resistance On Pancreatic Beta-Cell Differentiation, 5th BBDC-JOSLIN-UCPH conference Prevention of Beta Cell Dysfunction in T1D and T2D: Role of Inter-organ Communication, Kobenhavn, Danimarka, 26- 27 Ekim 2018, ss.25

Ercin, M., Gezginci-Oktayoglu, S., Bolkent, S., 2015, Exendin-4 impairs intestinal tissue damage through its proliferative and anti-fibrotic effects in diabetic rats, FEBS Journal, 82 (Suppl. 1), 152.

Gezginci-Oktayoglu, S., Turkyilmaz, I., B., Ercin, M., Yanardag, R., Bolkent, S., 2014, Reversing Effect Of Vitamin U on Valproic Acid-Induced Renal Damage Through its Anti-Oxidant, Anti-Inflammatory and Anti-Fibrotic Properties, FEBS Journal, 281 (Suppl. 1), 162.

PATENTLER

Gezginci-Oktayoglu, S., Coskun, E., Ercin, M., TR 2016/20292- Beta Hücre Oluşumunu Sağlamak İçin Bazı Mikro RNA'ların Kullanılması (Ulusal İncelemeli Patent).

Gezginci-Oktayoglu, S., Coskun, E., Ercin, M., TR 2016/20327- İnsülin ile İlişkili Hastalıkların Tedavisinde Bazı Mikro RNA'ların Kullanılması (Ulusal İncelemeli Patent).