

Prof. Dr. Salih ŞANLIOĞLU

Akdeniz Üniversitesi Gen ve Hücre Tedavi Merkezi, ANTALYA

ÖZET

Glukagon-benzeri peptid-1 (GLP-1), pankreas beta hücrelerinden glukoz indüklü insülin sekresyonunu tetikleyerek insülinotropik etki gösteren bir inkretin hormonudur. Pankreas delta hücrelerinden somatostatin salınımını tetikleyerek alfa hücrelerinden glukagon salınımını baskılar. Ayrıca iştah kaybı, gıda alımının azalması ve gastrik boşalmanın yavaşlamasıyla oluşan kilo kaybının dışında, miyokard performansının artması, infarktüs alanının daralması ve tip 2 diabetes mellitus (T2DM) hastalarında endotelial fonksiyonların düzenlenmesi gibi yararlı etkiler sergiler. Bunların haricinde beta hücre proliferasyonunu ve farklılaşmasını tetiklemek, beta hücre apoptozunu engellemek gibi fonksiyonları da vardır.

İnkretin yanıtının yetersizliği (%60 oranında bir düşüş) T2DM hastalarında görülen en temel bozukluklardan biri olduğundan, GLP-1 gen nakli yoluyla bu yetersizliğin giderilmesi cazip bir deneysel gen tedavi metodu olarak karşımıza çıkar. Başlangıçta pankreasa doğrudan etkin bir biçimde gen transferi yapılması konusunda karşılaşılan teknik zorluklar, GLP-1 aracılı *in vivo* gen transferi çalışmalarının başarısını oldukça sınırlamıştır. Son zamanlarda gen aktarımı için farklı tekniklerden ve çeşitli gen transfer vektörlerinden faydalanmaya yönelik kaydedilen yeni gelişmeler sayesinde, T2DM deneysel hayvan modellerinde, GLP-1 gen naklinin terapötik etkinliğinin daha etkin olarak değerlendirilmesi sağlanmıştır.

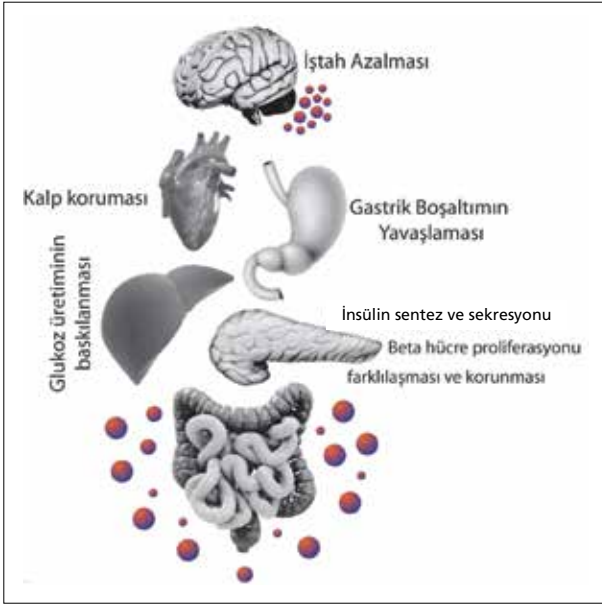
Sonuç olarak, yeni yapılan gen terapi çalışmaları ile GLP-1 peptid ve analoglarının glukoz toleransının gelişmesi, hipergliseminin düzeltilmesi, iştahın baskılanması ve gıda alımının azalmasına bağlı olarak ağırlık kaybına sebep olması gibi birçok klinik yararı deneysel hayvan modellerinde de tekrarlanabilmiştir. Bunun yanında, GLP-1 odaklı gen terapisi insülin duyarlılığının dışında, uygulama yapılan deneklerde adipokin profillerinde bariz değişimlere yol açarak obezite ile indüklenmiş T2DM ile ilişkili abdominal ve hepatik yağlanmayı da azaltmayı başarmıştır.

73.1 GİRİŞ

İnkretin etkisi, oral yolla alınan karbonhidratların, intravenöz yolla verilen glukozla oranla intestinal hormon aracılı insülin sekresyonunu daha fazla artırması olarak tanımlanır¹. Bu hormonlar, pankreas beta hücrelerinden glukoz ile indüklenmiş insülin sekresyonunu (insülinotropik etki) tetiklemek üzere intestinal mukozadan salınır. Dolayısıyla, inkretin hormonlar periferik dokulara glukoz transferine yardımcı olarak postprandiyal glukoz seviyelerinin belirli düzeylerde tutulmasında önemli rol oynar². Gastrik inhibitör polipeptid/glukoz-bağımlı insülinotropik polipeptid (GIP) ve GLP-1, insanlarda postprandiyal glukoz-bağımlı insülin sekresyonunun %70'inden sorumlu olan insülinotropik etkili inkretin hormonlardır³. İnsülinotropik aktivitenin kalanı ise

kısmen, vazoaktif intestinal peptid (VIP) ve pitüiter adenilat siklaz-aktifleştirici peptid (PACAP) gibi nörotransmitterlere dayandırılabilir^{4,5}.

Glukagon-benzeri peptid-1, glukoz homeostazının düzenlenmesinde görev alan iki önemli bağırsak-kökenli inkretin hormondan birisidir (Şekil 73.1). GLP-1'in insülinotropik aktivitesi, prelinik ve klinik çalışmalarla kanıtlanmıştır^{6,7}. Öğünlerden sonra, GLP-1 kan dolaşımına salınarak G protein kenetli reseptör (GLP-1R) aracılığıyla, glukoz-bağımlı insülin salınımını ve pankreas beta hücrelerinde insülin biyosentezini stimüle eder⁸. GLP-1 sekresyonuna neden olan etkili ajanlar karbonhidratlardır, ancak proteinler ve yağlar da GLP-1 sekresyonuna katkı sağlar^{9,10}. İnsülinotropik faaliyetin dışında, GLP-1 glukagon salınımını baskılar ve yaşa bağlı gelişen glukoz intoleransında iyileştirici etki gösterir¹¹.

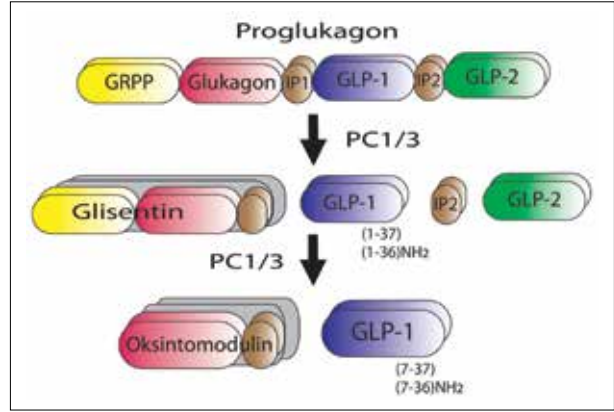


Şekil 73.1. GLP-1 peptidinin majör antidiyabetik özellikleri¹¹³. GLP-1 (resimdeki sferik moleküller), hem kalın bağırsakta (ileum) yerleşmiş intestinal L hücrelerinden salgınır, ve hem de arka beyinde primer olarak soliter traktın nükleusunda üretilir. GLP-1'in ana hedef organları, pankreas, karaciğer, mide, kas, adipoz doku ve beyindir. GLP-1 ayrıca, pankreasta delta hücrelerinden somatostatin sekresyonunu uyarırken alfa hücrelerinden glukagon sekresyonunu baskılar. Bunun dışında, GLP-1 gastrik asit sekresyonunu azaltır. Adipoz ve kas dokusunda GLP-1'in etkisi görsellik açısından yığılma yaratmaması için şekile dahil edilmemiştir.

Buna ek olarak, GLP-1 hücre farklılaşmasına¹² ve beta hücre kütlelerinde artışa¹³ yol açan mitojenik etkilere sahiptir. Gastrointestinal hareketliliğin azalması ve merkezi sinir sistemi (MSS) üzerinden etki göstererek iştah ve gıda alımının azalmasına bağlı olarak kilo kaybına sebebiyet verir¹⁴. Son olarak, miyokard iskemisi ve kalp yetersizliği hastalarında GLP-1'in yararlı etkilerinin olduğu gösterilmiştir¹⁵.

Tip 2 diyabet hastalarında yapılan izoglisemik glukoz tolerans testleri açıkça göstermektedir ki, sağlıklı kontrol bireylere göre T2DM hastalarında inkretin etkisi %50 oranında azalmıştır¹⁶. Dolayısıyla, inkretinler postprandiyal glukoz dolaşımının ana modülatörleri olduğundan, inkretin yanıtının kaybı, T2DM hastalarında kesin olarak glukoz intoleransına yol açmaktadır. İlginç bir şekilde, T2DM hastalarında, postprandiyal GIP sekresyonu değişmezken, öğün sonrası oluşan GLP-1 yanıtı, oldukça azalmıştır¹⁷. Ek olarak, T2DM hastalarında GIP uygulaması ile inkretin yanıtı alınmazken GLP-1'in insülinotropik etkisi muhafaza edilmiştir¹⁸. T2DM hastalarında, azalmış beta hücre yanıtı, GLP-1 infüzyonu ile geri kazanılabildiğinden¹⁹, GLP-1, T2DM tedavisi için terapötik bir ajan olarak değerlendirilmektedir.

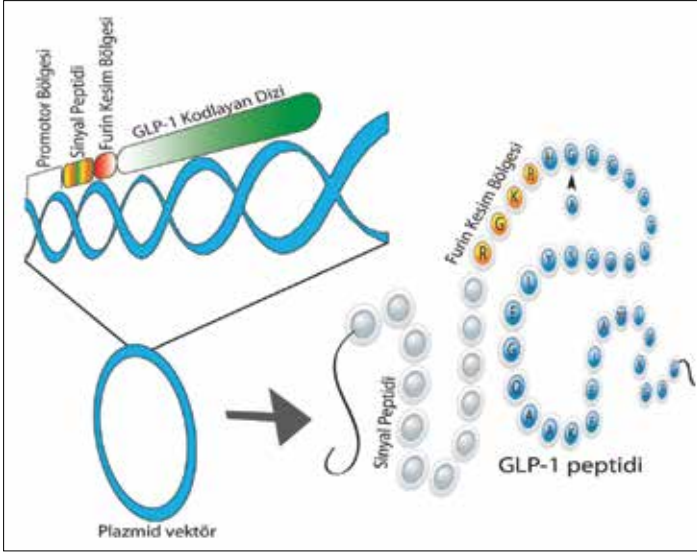
Glukagon-benzeri peptid-1, 180 amino asitten oluşan bir prohormon olan proglukagonun bir parçası olarak sentezlenmektedir²⁰. GLP-1 ile birlikte, proglukagon



Şekil 73.2. Bağırsak L hücrelerinde proglukagon işleme süreci¹⁰⁸. Bağırsakta prohormon konvertaz 1/3 (PC1/3) aktivitesi ile işlem sürecine giren proglukagon; glisentin, GLP-1₁₋₃₇ ve/veya GLP-1₁₋₃₆ amide, Ara Peptid 2 (IP-2) ve GLP-2 üretilir. Daha sonra yine PC1/3 enzim aktivitesiyle glisentin ve GLP-1'den oksintomodulin ve GLP-1₇₋₃₇ ve/veya GLP-1₇₋₃₆ amide oluşturulur.

fragmanından glukagon, GLP-2, glisentin ve oksintomodulin gibi farklı küçük peptidler de kodlanmaktadır (Şekil 73.2). Preglukagonun, farklı posttranslasyonel işlem sürecine girmesiyle, bağırsak ve pankreasta sırasıyla, GLP-1 ve glukagon üretilir²¹. Post-translasyonel süreç, iki farklı dokuda spesifik olarak eksprese edilen iki prohormon konvertaz aracılığıyla gerçekleşir. Bu prohormon konvertazlar, pankreasta PC2²² ve bağırsak L hücrelerinde PC3'tür²³. Ek olarak, GLP-1, arka beyinde, primer olarak soliter traktın nükleusunda üretilir ve gıda alım mekanizmasını düzenler^{24,25}. Gıda alımının azalması, öğün sıklığı, yeme isteği gibi, GLP-1'in gıda alımı ile ilişkili faydalarından sorumlu olan üretim, esas olarak beyinsapı nöronlarında gerçekleşen GLP-1 üretimidir²⁵⁻²⁸.

Glukagon-benzeri peptid-1, hipoglisemiye neden olmaksızın, etkin bir şekilde glukoz ile indüklenmiş insülin salınımını uyarır²⁹. Ancak, GLP-1 yaygın bir serin proteaz olan DPP-4 ile hızla kesime uğradığından, biyolojik yarı ömrü oldukça kısadır (2-3 dakika). Bu özellik, sık sık injeksiyon gerektirmesi veya daha fazla miktarlarda kullanılması gerekliliğinden dolayı GLP-1'in terapötik kullanımını sınırlandırmaktadır³. Biyolojik ömrü kısa olan GLP-1'in bu özelliğini telafi etmek amacıyla biyolojik olarak aktif GLP-1 üretiminin ve sekresyonunun sağlanması için viral ve viral olmayan gen aktarım teknolojileri geliştirilmiştir³⁰. Preproglukagon transgeninin öngörülemez bir glukagon üretimi veya fonksiyonu tam olarak bilinmeyen diğer peptidlerin üretimine yol açabilme potansiyeli dolayısıyla, gen transfer deneylerinde tüm preproglukagon cDNA'sının aktarımı yerine, sadece GLP-1 kodlayan sekans, GLP-1₇₋₃₇'nin aktarımı tercih edilmektedir (Şekil 73.3). Ayrıca, GLP-1 reseptörünün bağlanması için GLP'in ilk 2 aminoasidi oldukça önemli olduğundan, metiyonin başlangıç kodunu içeren, GLP-1₇₋₃₇ kodlayan yapıların, bir DNA sentezleyici yardımıyla sentezlenmesi gerekmektedir. Peptidin salınımından önce aktif formunun üretilebilmesi



Şekil 73.3. GLP-1'i kodlayan gen terapi vektör tasarımı¹¹³. Transgen ekspresyonunu hedef organa sınırlamak için hücre spesifik promotor kullanılır (örn. insülin promotörü). Psödodiplleme yoluyla epitop hedefleme ve viral vektörlerin alternatif serotiplerini kullanma dokuya özgün gen sentezi için gereklidir. GLP-1'in sekretuar yollara yönlendirilmesi için farklı sinyal peptitleri tercih edilebilir. Furin kesim bölgesi, GLP-1'in sinyal peptidinden ayrılması için gereklidir. Alanin (Ala) aminoasidinin Glisin (Gli) ile yer değiştirilmesi ile, DPP-4 kesimine dirençli GLP-1 elde edilir.

için, GLP-1 kodlayan yapının başındaki aminoasitlerin, furin endopeptidazları tarafından uzaklaştırılabilmesi amacıyla, GLP-1 cDNA'sına, başlangıç kodonunu takiben bir furin tanıma bölgesi (RGRR) yerleştirilir. Son olarak, GLP-1 peptidinin endokrin-dışı dokularda üretiminin ve salınımının gerçekleşmesi için GLP-1'in sekretuar yollara yönlenebilmesi ve post-translasyonel işleme sürecinin bir sinyal peptidaz aracılığıyla gerçekleşmesi gerekmektedir. Bu amaçla oluşturulacak yapıya bir sekretuar sinyal peptidinin dahil edilmesi gerekmektedir. Tüm bunların ışığında bu yazıda, diyabet tedavisi amacıyla GLP-1 cDNA'sının aktarımını konu alan gen terapi-sindeki son gelişmeler vurgulanmaktadır.

73.2 VİRAL OLMAYAN GEN TRANSFERİ YAKLAŞIMLARI

Plazmidler: Diyabetik hayvanlarda *in vivo* GLP-1 gen aktarımının sonuçlarını değerlendirmek amacıyla, plazmid tabanlı bir gen aktarım metodu geliştirilmiştir³¹ ve bu amaçla başlangıç kodonu ile GLP-1'i kodlayan bölge arasına bir furin ayrılma/ tanıma bölgesi yerleştirilerek modifiye bir GLP-1₇₋₃₇ cDNA'sı oluşturulmuştur. Zucker diyabetik sıçanlara (ZDF) polietilenimin/pGLP1 kompleksinin intravenöz tek doz injeksiyonu sonucunda, glukoz ile indüklenmiş insülin salınımında artış ve iki hafta süreyle kan glukoz seviyelerinde düşüş gözlenmiştir. GLP-1 ekspresyonunda artış sağlamak amacıyla, furin tanıma bölgesi içeren GLP-1₇₋₃₇ cDNA'sı taşıyan plazmid, NF-κB bağlama bölgeleri içeren bir SV40 promotor bölgesi ile birleştirilmiştir³². Polietilenimin/pGLP1 kompleksinin, diyet ile indüklenmiş obez (DIO) farelere, sistemik tek doz injeksiyon ile uygulanması sonucunda insülin sekresyonunda artış, ve iki haftadan daha uzun süreyle kan glukoz seviyelerinde düşüş gözlenmiştir.

Glukagon-benzeri peptid-1'in kısa ömrü ve aktarımının bağırsak dışı yollardan yapıma zorunluluğu dolayısıyla, GLP-1'in terapötik etkisini uzatmak ve arttırmak için, aktif insan GLP-1'i ve fare IgG1 ağır zincir sabit bölgeleriyle (GLP1/Fc) bir füzyon proteini oluşturulmuştur³³. IgG-Fc homodimerizasyonu, doğal GLP-1'e kıyasla daha uzun yarı ömre sahip, bivalent GLP-1 peptid ligandlarının formasyonuna yol açmıştır. Oluşan bu büyük moleküler ağırlığa sahip homodimerler, renal klirensi yavaşlatıp konjuge peptidinin degradasyonunu azaltmıştır. GLP-1/Fc füzyon proteininin aktarımından üç ay sonra *db/db* farelerde, açlık kan glukoz seviyelerinin normalizasyonu ile birlikte, glukoz ile indüklenmiş insülin sekresyonunun arttığı ve glukagon salınımının azaldığı gözlenmiştir. Bu sonuçlar, GLP-1/Fc plazmid injeksiyonunun anti-diyabetik etkilerinin gözlenmesinin zaman aldığını göstermektedir. Bununla birlikte, GLP-1/Fc füzyon proteini kan-beyin bariyerini geçemediğinden, bu uygulama vücut ağırlığı ve periferik insülin duyarlılığı üzerine herhangi bir etki göstermemiştir.

Plazmid DNA ile yoğun elektrostatik etkileşimlere girerek plazmid DNA'sının nükleazların saldırısından korunmasını sağlayan katyonik polimerlerin bu özelliklerinden yararlanmak amacıyla kitosan tabanlı bir gen aktarım sistemi geliştirilmiştir³⁴. Ek olarak, kitosan bazlı nanopartiküller, sıkı intraselüler bağlantı bölgelerinden geçebilecek kadar küçük olduklarından, hücre içerisine girerek GLP-1 kodlayan plazmid DNA'sının aktarımını sağlayabilir³⁵. Furin tanıma bölgesi ve cytomegalovirus (CMV) promotor bölgesi içeren ve GLP-1'i kodlayan bir plazmid DNA'sı ile oluşturulmuş kitosan bazlı nano-kompleksler 12 haftalık, ZDF-diyabetik sıçanlara uygulanmış ve bu nano-komplekslerin terapötik etkinlikleri değerlendirilmiştir³⁶. Kitosan-GLP-1 nanopartikülleriyle yapılan 5 injeksiyonun ardından 49 gün sonra plazma GLP-1 miktarlarında belirgin bir artış gözlenmiştir. Uygulama yapılmış sıçanların glukoz toleransında gelişme görülmesine ve ağırlık kazanımlarında azalma olmasına

rağmen dolaşımdaki insülin artışının geçici olduğu ve son injeksiyondan sonra sadece 14 gün sürdüğü belirlenmiştir. İlginç bir şekilde, nano-komplekslerin subkütan (s.c.) injeksiyonu, intramüsküler (i.m.) gen aktarımına göre daha etkili olmuştur. Bu durum, injeksiyon bölgesinde oluşan bir inflamatuvar reaksiyonun vektör yayılımını engelleyici bir etki göstermiş olmasından kaynaklanmış olabilir. Son zamanlarda yapılan bir *in vitro* çalışmada, spesifik kitosan formülasyonları aracılığıyla doğal GLP-1, s-4 dirençli GLP-1 analogları ve DPP-4 mRNA hedefli siRNA moleküllerinin aktarımı araştırılmıştır³⁷. Kitosan formülasyonları aracılığıyla etkin bir şekilde nükleik asit aktarımı yapılan hücre hatlarında, doğal GLP-1'e kıyasla, DPP-4 dirençli GLP-1 analoglarında 5 kat daha fazla artış gözlenmiştir. Ek olarak, kitosan formülasyonları kullanılarak gerçekleştirilmesi amaçlanan DPP-4 gen susturma yaklaşımı başarılı olmuş ve ticari olarak kullanılan lipoplex DharmaFECT molekülüne göre bu yaklaşımla daha düşük toksisite gözlenmiştir.

Eksendin-4 (Eksenatid), daha uzun yarı ömürlü ve etkin bir GLP-1R agonistidir (doğal GLP-1 ile %50 sekans homolojisi vardır). Bu sebeple, iki farklı plazmid kullanılarak gerçekleştirilecek iki basamaklı bir transkripsiyon amplifikasyon metodu ile eksendin-4 ekspresyon sistemi tasarlanmıştır. Bu sistemde, bir plazmidde etkili bir transkripsiyon faktörü kodlayan sekans, ikinci plazmidde ise eksendin-4'ü kodlayan sekansın promotörü bulunmaktadır³⁸. Gen transfer aracı olarak düşük toksisite ve yüksek transfeksiyon etkinliği göstermesi dolayısıyla *Arjinin-sistaminbisakrilamid-siaminohekzan polimer grafiti (ABP)* seçilmiş ve yüksek yağlı yemle beslenmiş C57BL/6J farelerde artan glukoz ile indüklenmiş insülin salınımı ile birlikte, düşük kan glukoz seviyeleri gözlenmiştir.

73.3 VİRAL GEN TRANSFER YAKLAŞIMLARI

Adenovirus: Gen transfer etkinliğinin artırılması amacıyla, GLP-1₇₋₃₇'yi kodlayan adenoviral ekspresyon vektörleri tasarlanarak, *db/db* farelere ve ZDF diyabetik sıçanlara bu vektörlerin sistemik injeksiyonu gerçekleştirilmiştir³⁹. Modifiye edilmiş GLP-1 kodlayan bölgeye (peptidin DPP4-dirençli hale gelmesi için Alanin-glisin yer değişimi), bir lider sekans ve bir furin tanıma bölgesi bağlanarak dolaşımda sürekli olarak yüksek seviyelerde aktif GLP-1₇₋₃₇ ekspresyonu sağlanmış ve bu sayede hiperglisemi düşürülmüştür. Adenovirus-GLP-1 vektörünün sistemik injeksiyonu, ZDF-diyabetik sıçanlarda gıda alımını azaltarak ağırlık kaybına ve glukoz tolerans gelişimine yol açmıştır.

Farklı bir yaklaşımda DPP-4 dirençli GLP-1₇₋₃₇, bir furin kesim bölgesi ile birlikte fare büyüme hormonunun (mGH) sekretuar sekansına bağlanmış ve farelerin çene altı bezlerinde GLP-1 ekspresyonu sağlamak amacıyla adenovirus vektörlerine klonlanmıştır⁴⁰. Ad-GLP-1 aktarımı ile kontrol vektör injeksiyonu yapılmış farelere göre üç kat daha yüksek serum GLP-1 seviyelerine ulaşılmıştır. Buna bağlı olarak kan

glukozunun daha hızlı temizlenmesi ve alloksan ile indüklenmiş hipergliseminin düşürülmesi sağlanmıştır. Tükürük bezlerindeki ekzokrin hücrelerden salınan GLP-1, dolaşım sisteminde kan glukoz seviyelerini etkilemek amacıyla kullanılabilmektedir. Ancak, adenovirus aracılı GLP-1 gen aktarımının tükürük bezlerine retrodükta infüzyonu, viral omurga kaynaklı bir inflamatuvar reaksiyon oluşmasına ve GLP-1'in terapötik etkinliğinin sınırlanmasına yol açabilir.

Kesintisiz GLP-1 ekspresyonunun beta hücre rejenerasyonuna etkisinin değerlendirilmesi amacıyla, CMV promotör ve albümin lider sekansı içeren GLP-1 cDNA'sı (rAd-GLP-1) taşıyan bir adenoviral vektör oluşturulmuş ve farelerde *in vivo* olarak test edilmiştir⁴¹. Streptozotosin (STZ) ile indüklenmiş diyabetik fareler ve immün yetersizlikli nonobez diyabetik (NOD) farelerin birleşimi olan NOD/SCID farelere yapılan tek doz intravenöz rAd-GLP-1 injeksiyonu, 10 gün içinde farelerin diyabetik durumlarında düzelmeye yol açmış ve 20. günde normoglisemiye ulaşılmasını sağlamıştır. Ayrıca, rAd-GLP-1 uygulaması almış farelerde, kontrol adenovirus vektörü verilen STZ ile indüklenmiş diyabetik farelere oranla, pankreasta insülin pozitif hücre sayısında artış ve dolayısıyla yüksek seviyelerde insülin sekresyonu gözlenmiştir. Bu doğrultuda, insülin üreten pankreas beta hücrelerinin rejenerasyonu, GLP-1 aracılı gen terapisinin diyabet tedavisinde potansiyel bir terapötik strateji olabileceğini göstermiştir. CMV promotör ve insülin lider sekansı ile oluşturulan GLP-1₇₋₃₇'i kodlayan yeni bir rekombinant adenovirus (Ad-ILGLP-1), 12 haftalık T2DM ZDF sıçanlara intrevenöz yolla injekte edilmiş⁴² ve dolaşımda yüksek seviyelerde GLP-1 miktarı ile birlikte, bu sıçanlarda glukoz toleransı gelişmiş ve 3 hafta süreyle normoglisemi gözlenmiştir. Ancak hem pre-diyabetik hem de diyabetik ZDF sıçanlarda benzer şekilde, adenovirus aracılı GLP-1 gen aktarımında koruma, adenovirus vektörleri ile indüklenen gen ekspresyonunun geçici olması dolayısıyla, sadece 21 gün sürmüştür.

Obezite ve insülin direnci, düşük dereceli kronik inflamasyonla bağlantılıdır⁴³. Adipoz dokunun, insülin direnci oluşumuna katkı sağlayan bir inflamasyon kaynağı olması dolayısıyla, GLP-1'in adipoz doku üzerindeki anti-inflamatuvar etkisinin değerlendirilmesi amacıyla GLP-1 üreten bir rekombinant adenovirus (rAd-GLP-1) üretilmiş ve *ob/ob* farelere uygulanmıştır⁴⁴. rAd-GLP-1 uygulaması almış *ob/ob* farelerin yağ kütlesi, adiposit boyutları ve lipojenik mRNA ekspresyon seviyelerinde, uygulama almayan farelere oranla belirgin bir azalma gözlenmiştir. Subkütan yağlarda bir değişiklik olmazken abdominal yağlanmanın azalması, daha önceki gözlemleri destekleyici nitelikte olup abdominal yağ birikiminin insülin direnci ile ilişkili olduğunu göstermiştir⁴⁵. Adipositlerde (makrofajlarla birlikte) inflamatuvar yolakların doğrudan inhibisyonu, GLP-1'in insülin duyarlılığını geliştirdiğini ortaya koymaktadır.

Yüksek yağlı diyet ile indüklenmiş obez fare modelinde, artmış Eksendin-4 ekspresyonunun uzun dönemde *in vivo* etkilerini incelemek amacıyla, bir yardımcı-bağımlı adenoviral

vektör (HDAd) üretilmiştir⁴⁶. Obez hastalarda meydana gelen metabolik değişimleri daha iyi taklit edeceği düşünüldüğünden, genetik olarak değiştirilmiş aşırı obez kemirgen modeller yerine bu hayvan modeli kullanılmıştır. Yüksek yağlı diyetle beslenen farelere tek doz HDAd-Ex4 injeksiyonu sonrasında, glukoz homeostazında gelişme ve glikojenik enzim aktivitesinde azalma görülmüştür. Bu etkilere rağmen, uygulama sonrasında dolaşımdaki insülin seviyelerinde herhangi bir artış gözlenmezken, uygulama almış hayvanlarda hepatik yağların azaldığı ve adipokin profilinin geliştiği belirlenmiştir. Yüksek yağlı diyet ile beslenen farelerde gözlenen ağırlık kazanımındaki düşüş, enerji tüketiminde artışa bağlı olup gıda alımında değişim ile ilgili değildir.

Adeno Assosiyé Virus (AAV): Fare insülin II promotor (MIP) kontrolünde, yeşil florasan proteini kodlayan çift iplikli AAV serotip 8 vektörü, pankreas beta hücrelerinde doku-spesifik transdüksiyon sağlar⁴⁷. Bu veriler göz önünde bulundurularak eGFP yerine GLP-1'i kodlayan DsAAV8-MIP oluşturulmuş ve çoklu düşük doz STZ uygulaması ile beta hücre hasarı yaratılmış diyabetik farelere intraperitoneal injeksiyon yoluyla uygulanmak suretiyle GLP-1'in terapötik etkinliği değerlendirilmiştir⁴⁸. Hiperglisemiden korunma sağlanmış olmasına rağmen, beta hücrelerinde, dsAAV'nin yetersiz transdüksiyonuna bağlı olarak (%27), dolaşımdaki GLP-1 seviyesinde artış oluşturabilecek kadar yüksek bir GLP-1 ekspresyonu sağlanamamıştır. Bununla birlikte, adacık içinde lokalize GLP-1 üretimi gerçekleşmiş ve adacık foksiyon ve sağkalmında gelişme gözlenmiştir.

Hepatosit büyüme faktörü (HGF)'nin adenoviral aktarımı, pankreas beta hücre ölümünü engelleyici ve transplantasyon açısından önemli olan adacık hücre kütesini minimize edici özelliği⁴⁹ dolayısıyla, diyabet tedavisinde terapötik bir ajan olarak değerlendirilmektedir⁵⁰. GLP-1 ve HGF'nin ortak uygulaması ile, obez hastalarda insülin duyarlılığında gelişim ve vücut ağırlığında azalma gözlenmiştir³. Bu durumdan yola çıkılarak beta hücre büyüme faktörleri, GLP-1 ve HGF'nin diyabet tedavisindeki etkinliklerinin gen terapisi yaklaşımıyla test edilmesi amacıyla dsAAV vektörleri oluşturulmuştur. AAV vektörlerinin transgen aktarım kapasitelerinin kısıtlı olması dolayısıyla (~2.5 kb), HGF reseptörünün sadece kısmi aktivasyon potensiyeline sahip N ve K1 bölgeleri (HGF/NK1) dsAAV vektörüne klonlanmıştır⁵¹. GLP-1 ve HGF/NK1 fragmanlarının dsAAV vektör aracılı aktarımı, pankreas adacık hücre proliferasyonunu indükleyerek *db/db* farelerde diyabet başlangıcının daha geç dönemde gerçekleşmesini sağlamıştır. AAV vektörlerinin kısıtlı transgen aktarım kapasiteleri dolayısıyla HGF fragmanının (NK1) bir kısmı aktarılabilirdiğinden, daha önceden tahmin edildiği gibi, *db/db* farelerde insülin direnci ve ağırlık kazancında bir etki görülemediği.

Obez *db/db* farelerde GLP-1 gen transferinin uzun dönemdeki antidiyabetojenik etkilerinin incelenmesi amacıyla, fare Igk zinciri lider sekansı ve fürin kesim bölgesi içeren ve

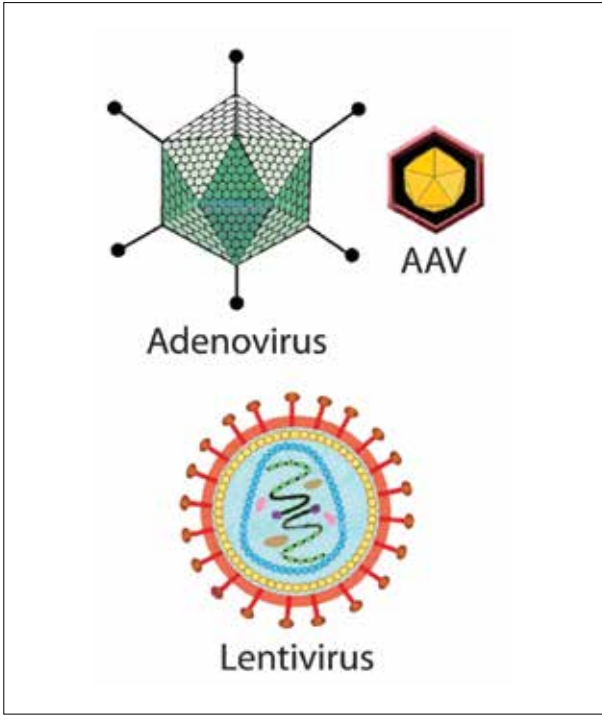
GLP-1₇₋₃₇'i kodlayan bir dsAAV vektörü oluşturulmuştur⁵². Karaciğerde stabil transdüksiyon sağlamak amacıyla CMV enhansör/tavuk β -aktin promotörü kullanılmıştır. dsAAV GLP-1 vektörünün tek doz injeksiyonu sonucunda, dolaşımdaki GLP-1 miktarında 4-10 kat artış sağlanmış ve buna bağlı olarak dört ay süreyle kan glukoz seviyelerinde düşüş gözlenmiştir. Onsekiz hafta boyunca devamlı GLP-1 ekspresyonu sağlanmış olmasına rağmen, vücut ağırlığında herhangi bir etki gözlenmemiştir.

Yüksek düzeylerde protein üretimi ve kan dolaşımına protein sekresyonu yapan tükürük bezleri, bu özellikleri dolayısıyla gen terapisi stratejilerinde uygun bir hedef organ olarak değerlendirilmektedir⁵³. AAV serotip 5 (AAV5) ile kemirgen tükürük bezlerine etkin gen transferi sağlanabildiğinden⁵⁴, AAV5 aracılı eksendin-4 gen aktarımı, iki farklı T2DM deneysel hayvan modelinde [Zucker fa/fa ve Yüksek Yağlı Diyet (HFD) ile beslenen sıçanlar] test edilmiştir⁵⁵. Eksendin-4'ü kodlayan sekans, sinir büyüme faktörünün (NGF) sekretuar sinyal peptidine bağlanmış ve ayrıca bir furin kesim bölgesi eklenmiştir. Tükürük bezlerine perkütan yolla yapılan AAV5 injeksiyonunu takiben, diyabetik hayvanların kanında ve tükürük bezlerinde, farmakolojik seviyelerde artmış eksendin-4 ekspresyonu gözlenmiş ve buna bağlı olarak glisemik kontrolün ve insüline duyarlılığın geliştiği ve ağırlık kaybının gerçekleştiği gözlenmiştir.

73.4 GLP-1 ARACILI GEN TERAPİ YAKLAŞIMLARINDA STRATEJİK NOKTALAR

Vektör seçimi: Polietilenimin plazmid DNA kompleksleri kullanılarak yapılan ilk plazmid tabanlı gen aktarım tekniklerinde, insülin sekresyonu ve kan glukoz seviyelerinde sadece geçici etkiler gösterilmiştir. Bu durum, esas olarak plazmid tabanlı gen aktarım metodlarının doğasında var olan kısa dönemli gen ekspresyonu sağlayabilme özelliklerine bağlı olmakla birlikte, GLP-1'i kodlayan sekansın bir sekretuar sinyal içermemesi ile de ilişkilidir^{31,32}. Benzer olarak, kitosan aracılı gen transfer stratejilerinde, geçici GLP-1 gen ekspresyonu sağlandığından, insülinotropik aktivitenin kalıcılığı açısından kitosan-DNA komplekslerinin tekrarlayan uygulamalarına ihtiyaç duyulmaktadır. Tüm bunlarla birlikte, spesifik kitosan formülasyonlarının DPP-4 hedefli siRNA stratejileri ile birlikte kullanımı, çok daha etkin sonuçlara ulaşabilmektedir³⁷. Son olarak GLP-1/Fc füzyon proteini kodlayan plazmidler kullanılarak yürütülen deneyler, oluşan bu bivalan GLP-1 ligandının, ileri çalışmalarda değerlendirilmesi gereken yapısal stabiliteye sahip güçlü bir GLP-1 analogu olduğunu göstermiştir³³.

Glukagon-benzeri peptid-1 gen aktarımı için birçok viral olmayan gen aktarım sistemi test edilmiş olsa da, şu an için gen transferi yöntemlerinde en iyi seçim viral vektörlerdir (Şekil 73.4). Test edilen viral vektörler arasında, adenoviral



Şekil 73.4. GLP-1 gen naklinde kullanılan viral vektörler. Adenovirüsler; üzerlerinde kılıfı olmayan (zarfsız) 90-100 nm çapında orta büyüklükte ikozahedral nükleokapsid içerisinde çift zincirli DNA genomu olan virüslardır. Adeno asosiyasyon virusu ise 20 nm çapında oldukça küçük, zarfsız ve genomları tek zincirli DNA'dan oluşan vektörlerdir. Diğer taraftan lentivirüsler; 80-100 nm çapında üzerlerinde kılıfı olan (zarflı), genom olarak her nükleokapsid içinde iki tane pozitif zincirli RNA taşıyan gen nakil araçlarıdır.

vektörler, çok sayıda farklı dokuda etkin transdüksiyon sağlama ve hem bölünen hem de bölünmeyen hücreleri infekte edebilmesi açısından oldukça etkili vektörler olup yüksek titrede üretim verimi ve büyük transgen aktarımı sağlayabilmektedir⁵⁶. Bununla birlikte, adenovirüs ile transdükte edilmiş hücreler, adenovirüsler tarafından kodlanan viral peptidlerin antijenitesi dolayısıyla immün sistem tarafından hızla temizlenmekte ve dolayısıyla bu özellik uzun süreli transgen ekspresyonunu ciddi bir şekilde sınırlandırmaktadır⁵⁷. Ek olarak, adenovirüs vektörlerinin yüksek dozlarda sistemik transferi, ciddi olumsuz sonuçlara yol açabilmekte⁵⁸, ve nötralize edici antikörlerin varlığı sebebiyle tekrarlayan vektör uygulaması verimli olmamaktadır. Birinci nesil adenovirüs vektörlerin aksine, yardımcı-bağımlı (gutless) adenoviral (HDAd) vektörler, ITR'ler haricinde neredeyse tüm viral genlerin silinmiş olması dolayısıyla viral proteinleri kodlamadıklarından⁵⁹, gözardı edilebilecek seviyede düşük bir toksisiteye sahip⁶⁰ olup uzun süreli (hatta yaşam boyu) transgen ekspresyonu sağlamaktadırlar⁶¹. Dolayısıyla, DIO farelere HDAd aracılı eksendin-4 gen aktarımı, ağırlık kazanımında azalma gibi bazı metabolik değişimlerin araştırmacılar tarafından uzun süreli takibine olanak sağlamıştır, ki bu durum, birinci nesil adenovirüs vektörler ile olası değildir⁴⁶.

Bununla birlikte, diyabet hayvan modellerinde HDAd-aracılı GLP-1 gen aktarımının terapötik etkinliği ile ilgili çalışmalar halen sürdürülmektedir.

Adenovirüs vektörlerine benzer şekilde, AAV-tabanlı vektörler hem bölünen hem bölünmeyen hücreleri infekte edebilmektedir. AAV genomu tek iplikli DNA (ssDNA)'dan oluştuğundan, transdükte edilmiş hücrelerde çift iplikli DNA'ya (dsDNA) dönüşüm, rAAV aracılı gen aktarımında hız kısıtlayıcı bir aşama olarak görülmektedir^{62,63}. Transdüksiyon etkinliğini arttırmak amacıyla, ITR'larda oluşturulan mutasyonlar yardımıyla geliştirilen dsAAV vektörleri ile çift iplikli, hairpin benzeri DNA dimerlerinin, AAV kapsitlerine öncelikli paketlenmesi sağlanmıştır⁶⁴. Klasik tek iplikli DNA vektör genomlarından oluşan AAV vektörlerinin pankreas içi enjeksiyonları, sınırlı sayıda adacık hücrelerinin transdüksiyonu ile sonuçlanmıştır⁶⁵. Bu nedenle *in vivo* pankreas gen transferinde geniş çaplı, dayanıklı ve stabil transgen ekspresyonu sağlamak amacıyla farklı gen aktarım yöntemleri ve farklı AAV vektör serotipleri keşfedilmiştir⁴⁷. Sonuç olarak, dsAAV vektör serotip 8 (dsAAV8) C57BL/6 ve BALB/c farelerde, uzun süreli, stabil gen transferi ve ekspresyonu sağlamıştır. Bu bilgilere rağmen, AAV vektörleri oldukça sınırlı transgen kapasitesi, düşük transdüksiyon etkinliği ve düşük titrede üretim kapasitesine sahiptirler⁶⁶. Bunlara ek olarak, yabani tip AAV, insan genomunda 19. kromozomun spesifik bir bölgesine (AAVS1) entegre olduğundan (AAVS1), rekombinant AAV (rAAV) konakçı kromozomuna entegrasyon için gerekli rep proteininden yoksundur⁶⁷. AAV vektörleri, yavaş bölünen hücrelerde epizomal olarak kalırlar ve adenovirüs vektörlerine kıyasla immünojeniteleri düşüktür^{68,69}, bu şekilde pankreas beta hücrelerinde uzun süreli stabil gen ekspresyonu sağlayabilmektedirler.

Adenovirüsler da adeno-assosiyasyon virüsleri de seçici olarak pankreası infekte etmezler. Bu gen transfer vektörlerinin her ikisi de, sistemik aktarımı takiben primer hedef dokusu karaciğer olmak üzere, yaygın doku tropizmi göstermektedir⁶⁵. Dolayısıyla, pankreasta hedef alınan hücre tipine aktarım yapılabilmesi için, pankreasa⁶⁵ veya çölyak arterine⁷⁰ doğrudan enjeksiyon gerekmektedir. Sistemik enjeksiyonla beta hücre spesifik gen ekspresyonunu sağlamak amacıyla, insülin promotörleri de kullanılabilir⁴⁸. Pankreas dışındaki hücrelerin transdüksiyonu, olumsuz etki yaratacak potansiyele sahip olduğundan^{71,72}, bu problemlerin çözümü amacıyla doğal pankreatotropik virüsler kullanılabilir. Örneğin, B grubu koksakivirüsler (CVB'ler), pankreas adacık ve ekzokrin dokularında oldukça güçlü bir tropizm gösterirler⁷³. CVB'ler ayrıca kalp ve karaciğer dokularını da hedeflediklerinden, zayıflatılmış CVB aşısından (vCVB(dm)) elde edilmiş iki orjinal mutasyon eklenerek CVB'nin pankreasa hedeflenmesini sağlayan özgün bir pankreatotropik suş geliştirilmiştir⁷⁴. GLP-1 ekspresyon eden vCVB(dm) (vCVB(dm)GLP-1) enjeksiyonu, diyabetik Balb/c farelerde pankreas insülin miktarını arttırmak ve beta hücre neogenezini stimüle etmek suretiyle hiperglisemiye düşürmüştür⁷⁵. Bununla birlikte; düşük transdüksiyon etkinliği, inflamatuvar yanıt oluşturma ve

konakçı genomuna entegre olamama özellikleri dolayısıyla, vCVB(dm)GLP-1 sadece 4-7 gün süren geçici bir transgen ekspresyonu sağlayabilmektedir. Geçmişte T1DM ile ilişkili olması dolayısıyla bu tür vektörlerin klinik kullanımı tavsiye edilmemektedir.

In vivo olarak uzun süreli gen ekspresyonu sağlanabilmesi için, viral vektörlerin genoma entegrasyonu gereklidir. Entegrasyon yeteneği olan vektörler arasında, bölünen ve bölünmeyen hücreleri infekte edebilme yeteneği, yok denebilecek kadar az immünojenik özellikleri ve zararlı mutasyonlara yol açmamaları dolayısıyla, lentiviral vektörler doğru seçim gibi görünmektedir^{76,77}. Lentiviral vektörler, yabancıl tip HIV-1 ile infekte olsa dahi genomdan çıkmadıklarından klinik uygulamalar için güvenli olarak kabul edilmektedirler. Lentiviral vektörlerin veziküler stomatit virus-G protein (VSV-G) ile psödotiplendirilmesi de, yaygın doku tropizmi ile birlikte yüksek verimde titre sağlamak açısından önemlidir^{78,79}. Henüz lentiviral vektörlerle ilgili herhangi bir doz sınırlayıcı toksisite bildirilmemiş olup, çoklu enjeksiyonlar sonrasında dahi toksisite oluşma kaygısı minimal düzeydedir. Sonuç olarak, psödotipleme yöntemiyle veya dokuya spesifik promotörlerin kullanımıyla pankreas adacıklarının hedeflendiği lentivirus-aracılı GLP-1 gen aktarımı, GLP-1 aracılı gen tedavi yaklaşımlarının güvenilirlik ve terapötik etkinlik açısından geliştirilmesi açısından önemli olabilir.

Promotor seçimi: Viral vektörler kullanılarak GLP-1 gen aktarımının yapıldığı bazı çalışmalarda ilk olarak kullanılan belirleyici promotörler CMV, tavuk β -aktin veya ubikitin gibi güçlü ancak kontrolsüz GLP-1₇₋₃₇ ekspresyonu sağlayan promotörlerdir. Bu çalışmalar, insülin duyarlılığının gelişimi ile birlikte kan glukozunun azalmasına yol açan plazma GLP-1 seviyelerindeki artışı açıkça göstermiş olsa da transgen ekspresyonunun gerçekleştiği bölge ile ilgili net bir bilgi açıklamamıştır. Ek olarak, GLP-1 ekspresyonunun sürekliliğinin hangi noktada GLP-1 reseptörünü duyarısızlaştırarak GLP-1 dirençli bir durum yaratacağı veya ne tür yan etkilere sebep olacağı konusu da bilinmemektedir. Bu bağlamda, gen aktarımının güvenilirliği ve toksisitesi ile ilgili sorunların çözümünde doku spesifik promotörler kullanılabilir. Bu bağlamda, promotor seçimi, transgen ekspresyonu gerçekleştirecek olan hedef dokuya göre yapılmaktadır. Örneğin, LPK promotörü kullanılarak, karaciğer spesifik GLP-1 gen ekspresyonu, başarıyla gerçekleştirilmiştir⁸⁰.

Glukoregülatör aktiviteleri olan insülin promotörü, pankreas beta hücrelerine özgü transgen ekspresyonu sağlaması açısından, oldukça etkili bir promotördür⁴⁷. DsAAV8-MIP-GLP-1'in intraperitoneal aktarımı, pankreas beta hücrelerine lokalize GLP-1 ekspresyonu sağlarken, aynı zamanda farelerde STZ ile indüklenmiş diyabet gelişimine karşı koruyucu etki oluşturmaktadır. Buna rağmen, pankreas beta hücrelerinde lokalize GLP-1 ekspresyonu, plazma GLP-1 seviyelerini arttıracak kadar yeterli olmadığında, GLP-1'in insülin duyarlılığına, gıda alımına ve ağırlık kaybına etkisi gibi kapsamlı terapötik etkinlikleri sınırlı kalmaktadır. Dolayısıyla,

lokalize gen ekspresyonu dolaşımdaki GLP-1 miktarını arttırmada yetersizdir. Bu sebeple, insülin duyarlılığı ve ağırlık kaybının oluşmasında etkili olan adipositler, kas ve karaciğer gibi glukoregülatör dokular ile GLP-1'in karşılıklı etkileşimi sınırlanmaktadır. GLP-1 intestinal endokrin L hücrelerinden salınır. Bağırsaklarda lokalize etki gösteren GLP-1, gastrik boşalmayı ve gastrik asit salınımını inhibe ederek MSS üzerinden gıda alımının azalmasına ve ağırlık kaybına yol açar. Dolayısıyla GLP-1 ekspresyonunun pankreas beta hücreleri ile sınırlandırılması, GLP-1'in yararlı gastrointestinal etkilerinin kesintiye uğramasına yol açabilir⁴⁸.

Bölgeye özgü entegrasyon: Retrovirus vektörlerin onkojenik potansiyelleri göz önünde bulundurulduğunda⁸¹, insersiyonel mutagenез riskinden kaçınmak amacıyla gen terapi vektörlerinin bölgeye özgü entegrasyonunun önemi ortaya çıkmaktadır. İnsan parvovirus AAV, tercihli olarak insanda 19. kromozoma entegre olmaktadır⁸². AAV genomu rep ve cap kodlayan, her iki tarafında ters çevrilmiş terminal tekrarlar (ITR) barındıran, başlıca iki açık okuma çerçevesi içerir. Rep, 19. kromozom üzerinde bulunan AAV hedef sekansına (AAVS1) bölgeye özgü entegrasyon için gereklidir. AAVS1'e Rep-bağımlı entegrasyon için 16 bp uzunluğunda bir Rep-bağlama elementi (RBE) olması yeterlidir. Bu sebeple, transgenik farelerde AAVS1 bölgelerine terapötik genlerin *in vivo* aktarımını sağlamak amacıyla, RBE sekansları taşıyan plazmidler geliştirilmiştir⁸³. 16 bp RBE ve bir Rep proteini ile birlikte insan kan pıhtılaşma faktörü IX (hFIX)'u kodlayan bir plazmidin hidrodinamik enjeksiyonu, AAVS1 lokusuna hFIX'in başarılı bir şekilde aktarılmasını sağlamıştır. Benzer şekilde, iki plazmidin intramüsküler enjeksiyonu ile viral olmayan bir GLP-1/Fc gen terapi stratejisi test edilmiştir. Bu plazmidlerden biri, 16 bp RBE-ITR ile bağlı GLP1/Fc (RBE/ GLP-1/Fc) fragmanı taşıırken, diğer plazmid, GLP-1 kodlayan sekansın AAVS1 lokusuna entegrasyonunu sağlamak amacıyla AAV Rep (Rep78) kopyası taşımaktadır⁸⁴. RBE/ GLP-1/ Fc'nin AAVS1 bölgesine bölgeye özgü entegrasyonu ile kalıcı GLP-1/Fc protein ekspresyonu sağlanmış ve bunun sonucunda yüksek yağlı diyet ile beslenen farelerde herhangi bir zararlı etki görülmeden, ağırlık kazanımında azalma ve insülin duyarlılığında iyileşme gözlenmiştir. Tüm bu sonuçlar, gen terapi vektörlerinin deneysel aktarımında, insersiyonel mutagenез riski olmadan, AAV vektörlerinin bölgeye özgü entegrasyonunun uygulanabilir bir yaklaşım olduğunu göstermiştir.

Gen aktarım yöntemleri: Son zamanlarda diyabette gen terapi yaklaşımları genel olarak transplantasyon için pankreas adacıklarının *ex vivo* modifikasyonuna yönelmektedir^{85,86}. Beta hücre farklılaşmasını veya insülin gen ekspresyonunu indüklemek amacıyla, ilgilenilen terapötik genin ekspresyonu için karaciğer ve kas dokusu gibi pankreas kaynaklı olmayan dokular, hedef organ olarak seçilmektedir⁸⁶. Pankreas beta hücrelerine gen transferinde uygulanabilir birkaç strateji vardır. Lipofeksiyon ve elektroporasyon gibi viral olmayan vektör aktarım sistemlerinde, pankreas adacıklarında düşük seviyede transdüksiyon gözlenirken,⁸⁷ viral

vektörler adacıkları oldukça etkin şekilde transdükte etmektedir⁸⁵. Adenoviral vektörler, yüksek titrelerde üretilebilir, yüksek transdüksiyon etkinliğine sahiptirler ve görece olarak vektör inşası daha kolaydır. Ancak adacıklardaki endokrin hücrelerin kümelenmiş yapısı dolayısıyla, pankreas adacıklarına adenovirus aracılı gen aktarımı işleminin uygulanabilirliği daha zordur⁸⁸. Pankreas adacıklarına kolodok kanalından^{89,90} veya pankreasın distal kanalından⁹¹ uygulanan adenovirus vektör aracılı *in vivo* gen transferi işlemleri ile etkin gen aktarımı sağlanamamıştır. Ayrıca, adenovirus vektörlerine karşı konakçının immün yanıtı sonucu oluşan pankreatit dolayısıyla kalıcı gen ekspresyonu sağlanamamıştır. Sadece hepatik arter, portal ven ve dalak arterinin ligasyonu sonrasında çölyak artere injeksiyon, pankreas adacıklarının yüksek düzeyde ve etkin biçimde transdüksiyonunu sağlar⁷⁰.

Pankreasa ssAAV'nin direkt injeksiyonu ile, terapötik etki gösterecek kadar yeterli pankreas adacık transdüksiyonu gerçekleştirilememiştir⁶⁵. Diğer yandan, dsAAV vektörleri, ssAAV vektörlerine kıyasla daha yüksek transdüksiyon etkinliğine sahiptir. C57BL10 farelerin pankreas adacıklarında, uzun süreli ve güçlü bir gen ekspresyonu sağlamak amacıyla, dsAAV vektörleri kullanılarak üç farklı aktarım yolu (intraperitoneal, intraduktal ve intravenöz) karşılaştırılmıştır⁴⁷. İntravenöz olarak aktarılan dsAAV vektörlerinin birçoğu karaciğer tarafından süzüldüğünden, bu aktarım yönteminde intraperitoneal injeksiyonla yapılan aktarıma göre 5-10 kat daha az pankreas transdüksiyon etkinliği gözlenmiştir. Buna rağmen, viral partiküllerin adacık içerisine difüzyon kısıtları dolayısıyla, intraperitoneal injeksiyon ile yapılan aktarımda, merkezdeki hücrelere kıyasla adacığın periferisindeki hücreler primer olarak transdüksiyona uğramıştır. İlginç bir şekilde, endoskopik retrograd kolanjiyopankreatografi olarak bilinen klinik tekniğe benzer bir yöntem olan retrograd pankreas intraduktal aktarım stratejisi ile, intraperitoneal ve intravenöz aktarıma kıyasla daha yüksek transdüksiyon sağlanmıştır. Bu tekniğin fareler gibi küçük hayvanlarda uygulanması oldukça zor olduğundan, retrograd pankreas intraduktal gen aktarım yönteminin intraperitoneal injeksiyona kıyasla, klinik uyumluluk ve fizibilite açısından değerlendirilebilmesi için deneysel testlerde sıçanların kullanılması daha iyi bir seçenek olabilir. Gen aktarımı için hangi yöntemin seçileceği bir kenara bırakılırsa, insülin üreten pankreas beta hücrelerine spesifik yüksek transgen ekspresyonu sağlamak ve özellikle pankreasın asiner hücrelerine transgen ekspresyonunu engellemek için insülin promotörünün kullanımı gereklidir. Son olarak, pankreas adacıklarına, karaciğer dolaşımının geçici blokajı sağlanarak, intravenöz dsAAV vektör gen aktarımının etkinliği, C57BL10 farelerde test edilmiştir⁴⁷. dsAAV vektörler kullanılarak pankreas adacıklarına yapılan intravenöz gen aktarımının etkinliği saptanamamış olsa da, karaciğer blokajı yaklaşımı, pankreas adacıklarına yapılan gen transferini 15 kat arttırmış ve çoğu adacıkta eşdağılımlı transgen ekspresyonu sağlanmıştır. Bu çalışmada, ayrıca farklı AAV vektör serotipleri test edilmiş ve dsAAV

serotipine bağlı olarak pankreasta çeşitli seviyelerde doku transdüksiyonu gözlenmiştir.

Depo dokular: Hastalık gelişiminde pankreas beta hücrelerinin yıkımı sırasında, pankreasın dışında ektojik GLP-1 ekspresyonu ile farklı bir tedavi seçeneği söz konusudur. Ekspresyon için potansiyel bölgelerin arasında, erişim kolaylığı, yüksek transdüksiyon oranları ve dolaşıma yüksek miktarda terapötik protein salgılaması açısından, ilk olarak karaciğer GLP-1 gen aktarımı için en iyi hedef organ olarak değerlendirilmektedir. Ayrıca, glukoz duyarlılığı ve yanıtından sorumlu enzimler, Glukoz taşıyıcı protein 2 (GLUT2) ve glukokinaz, esas olarak karaciğerde sentezlendiğinden, karaciğere dolaşımda bulunan glukoz seviyelerini algılama yeteneği kazandırmaktadır⁹². Bu karakteristik özellik, ayrıca adacık hücre transplantasyonunda da karaciğerin hedef organ olarak tercih edilmesinin nedenlerindedir⁹³. Bununla birlikte, intestinal L hücreleri gibi endokrin dokularda var olan kontrollü sekreteruar sistemin karaciğerde bulunmaması, GLP-1'in başarılı bir şekilde karaciğerde sentezlenip salınması açısından GLP-1'in daha detaylı modifikasyonlarını gerektirmektedir. Posttranslasyonel modifikasyonlar sonrasında GLP-1'in sekreteruar yollara yönlendirilmesini sağlayan bir sinyal peptidin dahil edilmesiyle, karaciğerde GLP-1 sentezi ile ilgili problemlerden biri çözülmüştür. Karaciğer ayrıca, furin endopeptidazların sentezlendiği iki organdan biridir, dolayısıyla sekreteruar sinyal peptidinden sonra eklenen furin tanıma sekansı ile GLP-1'in serbest kalması, karaciğerden GLP-1 üretimini arttırmıştır⁹⁴. Son zamanlarda yapılan birçok çalışmada, yukarıda bahsedilen özelliklerin birkaçını veya hepsini bir arada bulunduran vektörlerle deneysel gen terapisi çalışmaları yürütülse de (Şekil 73.3), GLP-1 sekresyonu için etkili insan sekreteruar sinyal peptidlerinin tasarlanması için Markov modelinin kullanımı faydalı olabilir⁹⁵.

Glukagon benzeri peptid-1 sentezi için hedef depo organı olarak, tükürük bezleri de, yüksek miktarlarda protein sentez kapasitesi ve kan dolaşımına sekresyon yapabilme özellikleri dolayısıyla sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır. Tükürük bezlerinin bir kapsülle çevrili olması dolayısıyla, yapılacak uygulama sonrasında vektör yayılımının bu organla sınırlı kalması sağlanabilir. Dolayısıyla, hedef organ olarak tükürük bezlerinin kullanımı, oluşabilecek potansiyel yan etkilerin minimize edilebilmesi açısından fayda sağlayabilir. Eğer gen aktarımı sonrasında herhangi bir ters etki oluşursa, tükürük bezlerinin alınması hem yaşamsal önem taşımadığından hem de kolay bir prosedür olması açısından güvenlidir. Bu karakteristik özellikleri dolayısıyla, tükürük bezleri birçok kalıtsal monogenetik endokrin bozuklukların düzeltilmesi için kullanılacak gen terapi uygulamalarında endokrin bez yerine geçecek bir organ olarak değerlendirilmektedir⁵³. Tüm hücre tiplerinde, ana sekreteruar yolak (CSP) bulunurken, endokrin, nöroendokrin ve ekzokrin hücrelerde peptid hormonların stimülasyon sonrası salınımının gerçekleştiği kontrollü sekreteruar yolak (RSP) bulunmaktadır⁹⁶. Bu bakımdan tükürük bezleri her iki sekreteruar yolağı da barındıran

bir ekzokrin bezdir. Salınan proteinlerin sekresyonu, genel olarak kan dolaşımında CSP aracılığıyla gerçekleşirken (endokrin); RSP, proteinlerin tükürük içine salınımını gerçekleştirir (ekzokrin). Bununla birlikte, CSP bulunduran fakat prohormon konvertazlar gibi işleme sürecinde görevli uygun enzimlere sahip olmayan hücrelerde gerçekleşecek prohormon (proglukagon) sentezi, sürekli olarak biyolojik aktiviteden yoksun işlenmemiş prohormon sekresyonuna yol açar⁹⁷. Dolayısıyla, terapötik etkinlik gösterecek biyoaktif peptid (GLP-1₇₋₃₇) sekresyonunun CSP tarafından gerçekleştirilebilmesi için proteaz kesim bölgesini içeren sekreter bir sinyale gereksinim vardır. Fare büyüme hormonunun sinyal sekansının ardından bir furin kesim bölgesi yerleştirilmiş, adenoviral GLP-1 vektörünün aktarımı ile, diyabetik hayvanlarda alloksan ile indüklenmiş hipergliseminin düşürülmesi sağlanmıştır⁴⁰. Bu yaklaşımla gerçekleştirilen vektör transferi, tükürük bezlerine lokalize olmasına rağmen, kontrol vektör ile transdükte edilmiş farelere kıyasla dolaşımdaki GLP-1 miktarında üç kat artış gözlenmiştir.

73.4.1 Pankreas Hedefli GLP-1 Gen Terapisiyle Oluşan Moleküler Değişimler

Streptozotosin ile indüklenmiş diyabetik farelerden izole edilen pankreas adacıklarında global gen ekspresyon profili yöntemleri ile GLP-1 aracılı adacık hücre koruma mekanizması araştırılmıştır⁹⁸. Kısa dönemli, düşük dozlu STZ uygulaması sonucunda, p53'e yanıt veren genlerin güçlü indüksiyonu ve geniş çaplı diyabet ilişkili genlerin supresyonu gözlenmiştir. GLP-1 gibi REG3 ailesi proteinleri, adacık neogenezi aracılığıyla, STZ ile indüklenmiş hiperglisemiyi iyileştirme potansiyeline sahip beta hücre besleyici faktörler gibi davranmaktadır⁹⁹. Diyabetik farelerde maksimum beta hücre besleyici etkiyi oluşturmak amacıyla, REG3B-GLP-1 füzyon protein ekspresyonu sağlayan AAV9 tabanlı beta hücre hedefli gen transfer sistemi tasarlanmıştır. REG3B-GLP-1'in yüksek ekspresyonu beta hücre kütlelerini koruyucu etki göstermiş ve farelerde STZ ile indüklenmiş diyabete karşı koruma sağlamıştır⁹⁸. REG3B-GLP-1 gen terapisi, global gen ekspresyon profillerinde tanımlandığı üzere, adacıklarda STZ ile indüklenmiş değişimlerde şiddetli bir farklılık yaratmamıştır. Ancak, REG3B-GLP-1 gen terapisi, beta hücre sağkalımıyla ilişkili genlerin ekspresyonunu arttırarak, adacık hücre apoptozunun baskılanmasında etkili olmuştur.

73.4.2 Deneysel Hayvan Modelleri

Glukagon benzeri peptid-1, gen aktarımı ile ilgili deneysel gen terapisi çalışmalarının çoğu, *ob/ob*, *db/db* ve Zucker diyabetik sıçanlar gibi, genetik olarak modifiye edilmiş kemirgen obezite modellerinde gerçekleştirilmiştir^{31,33,39,100}. Bu modeller, iştahı (leptin (*ob/ob*) veya leptin reseptörleri (*db/db*, Zucker diyabetik *fa/fa* sıçanlar) etkileyen genlerde mutasyonlar taşıdığından, genetik olarak modifiye edilmiş

diyabet hayvan modellerinin kullanımı, metabolik değişimler ile ilgili uzun dönemli çalışmalar için ideal olmayabilir¹⁰¹. İnsan hastalıkları için en uygun deneysel hayvan modeli, ilgilenilen insan hastalığının fizyopatolojisini en iyi şekilde taklit edebilecek olan modeldir. Ek olarak, model standardizasyonu, sürekliliği, maliyeti, klinik faydaları ve geniş çapta araştırmacıların erişimi gibi faktörler, karar aşamasını etkileyen faktörlerdir. İnsanlarda T2DM, genler ve çevre ile etkileşim sonucu ortaya çıkan bir hastalık olduğundan, DIO ile birlikte düşük doz STZ injeksiyonu uygulaması (beta hücre kaybını ve hiperglisemiyi indüklemek için) ile oluşturulan model, hastalığın gerçek sürecini en iyi taklit eden model gibi görünmektedir. Dolayısıyla, GLP-1 aracılı gen terapisi yaklaşımlarının gerçek antidiyabetik potansiyellerinin, üçüncü nesil HIV-tabanlı lentiviral vektörler kullanılarak; yüksek yağlı diyet, düşük doz STZ indüklü diyabet modellerine GLP-1 aktarımı ile test edilmesi ve tedavi etkinliğinin belirlenmesi gerekmektedir. Bununla birlikte, obez farelerde artmış vücut ağırlığının kompanse edilebilmesi için, hedef dokuları transdükte etmek amacıyla ek virus dozlarına ihtiyaç duyulabilir⁵¹.

73.5 SONUÇ

Leber'in konjenital amarozi, X'e bağlı şiddetli bağışıklık yetmezliği (SCID), ADA-SCID, adrenolökodistrofi, kronik lenfositik lösemi, akut lenfositik lösemi, çoklu miyelom, hemofili, Parkinson ve talasemi gibi genetik hastalıklara karşı başarılı klinik gen terapi uygulamaları geliştirilmiştir¹⁰². Bunlar arasında ailesel lipoprotein lipaz yetmezliğine karşı geliştirilmiş Alipogene tiparvovec (Glybera), Avrupa onaylı ilk gen tedavi ilacı olarak tarihe geçmiştir^{103,104}. İşin ilginç diyabet komplikasyonları (diyabetik nöropati-NCT01002235-NCT00056290) ve diyabetik yara iyileşmesi (NCT00065663) konularında diyabetle ilgili ancak sınırlı sayıda klinik gen terapi denemeleri yapılmıştır.

İlk olarak 1992 yılında T2DM tedavisinde kullanılabilecekleri önerilen inkretinlerin ticari olarak kullanımlarının onaylanması (Eksenatid) Birleşik Devletler Gıda ve İlaç Dairesi (US FDA) tarafından ancak 2005 yılında gerçekleştirilmiştir^{105,106}. Akabinde inkretin etki arttırıcıları olarak da bilinen DPP-4 inhibitörleri, Sitagliptin (2006), Vildagliptin (European Medicines Agency; EMA onaylı-2007) ve Saksagliptin (2009) geliştirilmiştir. İlk uzun etkili GLP-1 analogu olan Liraglutid de US FDA tarafından 2010 yılında onaylanarak piyasaya sürülmüştür¹⁰⁷. 2010 yılından bu yana inkretin bazı tedavi stratejileri üzerine yoğun çalışmalar yapılmış, bu bağlamda birçok GLP-1 agonisti (Bydureon-2012, Liksisenatid-EMA onaylı-2013, Albiglutid) ve inkretin etki çoğaltıcıları geliştirilerek (Linagliptin-2011, Alogliptin-2013) piyasaya sürülmüş, diğerlerinin de (Taspoglutid, Anagliptin-Japonya onaylı, Gemigliptin-Kore onaylı, Teneligliptin-Japonya onaylı) yakın bir gelecekte piyasaya sürülmesi beklenmektedir. Her yeni geliştirilen ilaç grubunda olduğu gibi inkretin tabanlı

tedavi ajanlarının da yararlarının yanında bir takım yan etkileri mevcuttur¹⁰⁸. Örneğin, Eksenatid ve Liraglutid'in T2DM hastalarında gastrointestinal yakınmalara sebebiyet vermelerinin yanında, pankreatit ve pankreas kanseri gelişimi üzerindeki muhtemel etkileriyle ilgili çalışmalar halen sürdürülmektedir¹⁰⁹⁻¹¹¹. FDA ve EMA, inkretin tabanlı ilaçlar üzerindeki yan etkilerle ilgili uyarıların güncel bilgileri yansıttığı kanısında olsa da, inkretin tabanlı ilaçların uzun sürede kardiyovasküler etkilerini açığa çıkarmaya yönelik yapılan ve şu anda devam eden klinik çalışmalardan elde edilecek verilerle yapılacak meta-analizler, pankreatit ve pankreas kanseri riskini değerlendirmede daha yararlı olacaktır¹¹². Bunların dışında Eksenatid (günde iki kez) ve Liraglutid'in (günde bir kez) terapötik etki göstermesi için hastalara günlük enjeksiyon yapılması gereklidir. Bu sebeple diyabet tedavisinde etkili olabilecek sürekli inkretin sentezi ve salınımı yapabilecek gen terapisi gibi yeni tedavi yöntemlerine ihtiyaç vardır.

Gen nakliyle uzun süreli GLP-1 sentezi ve sekresyonu sağlanabilmiş olsa da, en etkin GLP-1 gen transfer tekniği halen geliştirilme aşamasındadır. Bu bağlamda çift zincirli adeno asosiyasyon vektörleri (dsAAV) ile bazı başarılarla imza atılmış olmakla birlikte, pankreası hedefleyen glukoz kontrollü gen sentezi sağlayan lentiviral vektörlerle daha etkili sonuçların alınabileceği kanısında yız¹¹³. Ancak bu şekilde GLP-1'in uzun süreli sinirleri ve kalbi koruyucu etkilerinin ortaya çıkartılması mümkün olabilir. GLP-1 gen naklinin hem prediyabetik hem de diyabetik hayvanlarda terapötik etki göstermesi, bu yöntemin GLP-1 peptid infüzyonu veya günlük enjeksiyonlara alternatif bir yöntem olabileceğini göstermektedir. Durum böyle iken, başarılı GLP-1 gen nakli çalışmalarının henüz küçük deney hayvanlarında (sıçan, fare) gerçekleştirildiğini, klinik çalışmalara geçişi hızlandırmak için bu yöntemin diyabetik büyük hayvan modellerinde (kediler, köpekler, domuzlar ve primatlar) denenmesi gerektiğini vurgulamak isteriz.

Teşekkür

Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Komisyonu ve Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK-1125114)'nın yardımlarıyla desteklenmiştir. M. Hale Taşyürek'e bu yazının hazırlanması sırasında katkılarından dolayı özel teşekkür sunulur.

KAYNAKLAR

1. Vilsboll T, Holst JJ. Incretins, insulin secretion and type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia*, 47: 357-66, 2004.
2. Russell S. Incretin-based therapies for type 2 diabetes mellitus: a review of direct comparisons of efficacy, safety and patient satisfaction. *Int J Clin Pharm*, 35: 159-72, 2013.
3. Kieffer TJ, Habener JF. The glucagon-like peptides. *Endocr Rev*, 20: 876-913, 1999.
4. Roberge JN, Brubaker PL. Regulation of intestinal proglucagon-derived peptide secretion by glucose-dependent insulinotropic peptide in a novel enteroendocrine loop. *Endocrinology*, 133: 233-40, 1993.
5. Sanlioglu AD, Karacay B, Balci MK, Griffith TS, Sanlioglu S. Therapeutic potential of VIP vs PACAP in diabetes. *J Mol Endocrinol*, 49: R157-R167, 2012.

6. Drucker DJ, Philippe J, Mojsov S, et al. Glucagon-like peptide I stimulates insulin gene expression and increases cyclic AMP levels in a rat islet cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84: 3434-8, 1987.
7. Kreyman B, Williams G, Ghatei MA, et al. Glucagon-like peptide-1 7-36: a physiological incretin in man. *Lancet*, 2: 1300-4, 1987.
8. Thorens B, Porret A, Buhler L, et al. Cloning and functional expression of the human islet GLP-1 receptor. Demonstration that exendin-4 is an agonist and exendin-(9-39) an antagonist of the receptor. *Diabetes*, 42: 1678-82, 1993.
9. Gribble FM. The gut endocrine system as a coordinator of postprandial nutrient homeostasis. *Proc Nutr Soc*, 71: 456-62, 2012.
10. Tolhurst G, Reimann F, Gribble FM. Intestinal sensing of nutrients. *Handb Exp Pharmacol*, 209: 309-35, 2012.
11. Wang Y, Perfetti R, Greig NH, et al. Glucagon-like peptide-1 can reverse the age-related decline in glucose tolerance in rats. *J Clin Invest*, 99: 2883-9, 1997.
12. Abraham EJ, Leech CA, Lin JC, et al. Insulinotropic hormone glucagon-like peptide-1 differentiation of human pancreatic islet-derived progenitor cells into insulin-producing cells. *Endocrinology*, 143: 3152-61, 2002.
13. Tourrel C, Bailbe D, Lacorne M, et al. Persistent improvement of type 2 diabetes in the Goto-Kakizaki rat model by expansion of the beta-cell mass during the prediabetic period with glucagon-like peptide-1 or exendin-4. *Diabetes*, 51: 1443-52, 2002.
14. Wettergren A, Schjoldager B, Mortensen PE, et al. Truncated GLP-1 (proglucagon 78-107-amide) inhibits gastric and pancreatic functions in man. *Dig Dis Sci*, 38: 665-73, 1993.
15. Zhao TC. Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) and protective effects in cardiovascular disease: a new therapeutic approach for myocardial protection. *Cardiovasc Diabetol*, 12: 90, 2013.
16. Knop FK, Vilsboll T, Hojberg PV, et al. Reduced incretin effect in type 2 diabetes: cause or consequence of the diabetic state? *Diabetes*, 56: 1951-9, 2007.
17. Toft-Nielsen MB, Damholt MB, Madsbad S, et al. Determinants of the impaired secretion of glucagon-like peptide-1 in type 2 diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab*, 86: 3717-23, 2001.
18. Nauck MA, Heimesaat MM, Orskov C, et al. Preserved incretin activity of glucagon-like peptide 1 [7-36 amide] but not of synthetic human gastric inhibitory polypeptide in patients with type-2 diabetes mellitus. *J Clin Invest*, 91: 301-7, 1993.
19. Kjemis LL, Holst JJ, Volund A, et al. The influence of GLP-1 on glucose-stimulated insulin secretion: effects on beta-cell sensitivity in type 2 and nondiabetic subjects. *Diabetes*, 52: 380-6, 2003.
20. Bell GI, Santerre RF, Mullenbach GT. Hamster proglucagon contains the sequence of glucagon and two related peptides. *Nature*, 302: 716-8, 1983.
21. Novak U, Wilks A, Buell G, et al. Identical mRNA for proglucagon in pancreas and gut. *Eur J Biochem*, 164: 553-8, 1987.
22. Holst JJ, Bersani M, Johnsen AH, et al. Proglucagon processing in porcine and human pancreas. *J Biol Chem*, 269: 18827-33, 1994.
23. Ugleholdt R, Zhu X, Deacon CF, et al. Impaired intestinal proglucagon processing in mice lacking prohormone convertase 1. *Endocrinology*, 145: 1349-55, 2004.
24. Alhadeff AL, Rupprecht LE, Hayes MR. GLP-1 neurons in the nucleus of the solitary tract project directly to the ventral tegmental area and nucleus accumbens to control for food intake. *Endocrinology*, 153: 647-58, 2012.
25. Skibicka KP. The central GLP-1: implications for food and drug reward. *Front Neurosci*, 7: 181, 2013.
26. Zhao S, Kanoski SE, Yan J, et al. Hindbrain leptin and glucagon-like-peptide-1 receptor signaling interact to suppress food intake in an additive manner. *Int J Obes (Lond)*, 36: 1522-8, 2012.
27. Hayes MR, Bradley L, Grill HJ. Endogenous hindbrain glucagon-like peptide-1 receptor activation contributes to the control of food intake by mediating gastric satiation signaling. *Endocrinology*, 150: 2654-9, 2009.
28. Huo L, Maeng L, Bjorbaek C, et al. Leptin and the control of food intake: neurons in the nucleus of the solitary tract are activated by both gastric distension and leptin. *Endocrinology*, 148: 2189-97, 2007.
29. Vilsboll T, Krarup T, Madsbad S, et al. No reactive hypoglycaemia in Type 2 diabetic patients after subcutaneous administration of GLP-1 and intravenous glucose. *Diabet Med*, 18: 144-9, 2001.

30. Rowzee AM, Cawley NX, Chiorini JA, et al. Glucagon-like peptide-1 gene therapy. *Exp Diabetes Res*, 2011: 601047, 2011.
31. Oh S, Lee M, Ko KS, et al. GLP-1 gene delivery for the treatment of type 2 diabetes. *Mol Ther*, 7: 478-83, 2003.
32. Choi S, Oh S, Lee M, et al. Glucagon-like peptide-1 plasmid construction and delivery for the treatment of type 2 diabetes. *Mol Ther*, 12: 885-91, 2005.
33. Kumar M, Hunag Y, Glinka Y, et al. Gene therapy of diabetes using a novel GLP-1/IgG1-Fc fusion construct normalizes glucose levels in db/db mice. *Gene Ther*, 14: 162-72, 2007.
34. Dash PR, Read ML, Barrett LB, et al. Factors affecting blood clearance and in vivo distribution of polyelectrolyte complexes for gene delivery. *Gene Ther*, 6: 643-50, 1999.
35. Thibault M, Nimesh S, Lavertu M, et al. Intracellular trafficking and decondensation kinetics of chitosan-pDNA polyplexes. *Mol Ther*, 18: 1787-95, 2010.
36. Jean M, Alameh M, Buschmann MD, et al. Effective and safe gene-based delivery of GLP-1 using chitosan/plasmid-DNA therapeutic nanocomplexes in an animal model of type 2 diabetes. *Gene Ther*, 18: 807-16, 2011.
37. Jean M, Alameh M, De Jesus D, et al. Chitosan-based therapeutic nanoparticles for combination gene therapy and gene silencing of in vitro cell lines relevant to type 2 diabetes. *Eur J Pharm Sci*, 45: 138-49, 2012.
38. Kim PH, Lee M, Kim SW. Delivery of two-step transcription amplification exendin-4 plasmid system with arginine-grafted bioreducible polymer in type 2 diabetes animal model. *J Control Release*, 162: 9-18, 2012.
39. Parsons GB, Souza DW, Wu H, et al. Ectopic expression of glucagon-like peptide 1 for gene therapy of type II diabetes. *Gene Ther*, 14: 38-48, 2007.
40. Voutetakis A, Cotrim AP, Rowzee A, et al. Systemic delivery of bioactive glucagon-like peptide 1 after adenoviral-mediated gene transfer in the murine salivary gland. *Endocrinology*, 151: 4566-72, 2010.
41. Liu MJ, Shin S, Li N, et al. Prolonged remission of diabetes by regeneration of beta cells in diabetic mice treated with recombinant adenoviral vector expressing glucagon-like peptide-1. *Mol Ther*, 15: 86-93, 2007.
42. Lee Y, Kwon MK, Kang ES, et al. Adenoviral vector-mediated glucagon-like peptide 1 gene therapy improves glucose homeostasis in Zucker diabetic fatty rats. *J Gene Med*, 10: 260-8, 2008.
43. Bastard JP, Maachi M, Lagathu C, et al. Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. *Eur Cytokine Netw*, 17: 4-12, 2006.
44. Lee YS, Park MS, Choung JS, et al. Glucagon-like peptide-1 inhibits adipose tissue macrophage infiltration and inflammation in an obese mouse model of diabetes. *Diabetologia*, 55: 2456-68, 2012.
45. Usui C, Asaka M, Kawano H, et al. Visceral fat is a strong predictor of insulin resistance regardless of cardiorespiratory fitness in non-diabetic people. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, 56: 109-16, 2010.
46. Samson SL, Gonzalez EV, Yechoor V, et al. Gene therapy for diabetes: metabolic effects of helper-dependent adenoviral exendin 4 expression in a diet-induced obesity mouse model. *Mol Ther*, 16: 1805-12, 2008.
47. Wang Z, Zhu T, Rehman KK, et al. Widespread and stable pancreatic gene transfer by adeno-associated virus vectors via different routes. *Diabetes*, 55: 875-84, 2006.
48. Riedel MJ, Gaddy DF, Asadi A, et al. DsAAV8-mediated expression of glucagon-like peptide-1 in pancreatic beta-cells ameliorates streptozotocin-induced diabetes. *Gene Ther*, 17: 171-80, 2010.
49. Lopez-Talavera JC, Garcia-Ocana A, Sipula I, et al. Hepatocyte growth factor gene therapy for pancreatic islets in diabetes: reducing the minimal islet transplant mass required in a glucocorticoid-free rat model of allogeneic portal vein islet transplantation. *Endocrinology*, 145: 467-74, 2004.
50. Gaddy DF, Riedel MJ, Bertera S, et al. dsAAV8-mediated gene transfer and beta-cell expression of IL-4 and beta-cell growth factors are capable of reversing early-onset diabetes in NOD mice. *Gene Ther*, 19: 791-9, 2012.
51. Gaddy DF, Riedel MJ, Pejawar-Gaddy S, et al. In vivo expression of HGF/NK1 and GLP-1 From dsAAV vectors enhances pancreatic β -cell proliferation and improves pathology in the db/db mouse model of diabetes. *Diabetes*, 59: 3108-16, 2010.
52. Choi SH, Lee HC. Long-term, antidiabetogenic effects of GLP-1 gene therapy using a double-stranded, adeno-associated viral vector. *Gene Ther*, 18: 155-63, 2011.
53. Voutetakis A, Bossis I, Kok MR, et al. Salivary glands as a potential gene transfer target for gene therapeutics of some monogenetic endocrine disorders. *J Endocrinol*, 185: 363-72, 2005.
54. Katano H, Kok MR, Cotrim AP, et al. Enhanced transduction of mouse salivary glands with AAV5-based vectors. *Gene Ther*, 13: 594-601, 2006.
55. Di Pasquale G, Dicembrini I, Raimondi L, et al. Sustained exendin-4 secretion through gene therapy targeting salivary glands in two different rodent models of obesity/type 2 diabetes. *PLoS One*, 7: e40074, 2012.
56. Sanlioglu AD, Altunbas HA, Balci MK, et al. Insulin gene therapy from design to beta cell generation. *Expert Rev Mol Med*, 14: e18, 2012.
57. Doerschug K, Sanlioglu S, Flaherty DM, et al. First-generation adenovirus vectors shorten survival time in a murine model of sepsis. *J Immunol*, 169: 6539-45, 2002.
58. Raper SE, Chirmule N, Lee FS, et al. Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. *Mol Genet Metab*, 80: 148-58, 2003.
59. Vetrini F, Ng P. Gene therapy with helper-dependent adenoviral vectors: current advances and future perspectives. *Viruses*, 2: 1886-917, 2010.
60. Muhammad AK, Xiong W, Puntel M, et al. Safety profile of gutless adenovirus vectors delivered into the normal brain parenchyma: implications for a glioma phase 1 clinical trial. *Hum Gene Ther Methods*, 23: 271-84, 2012.
61. Vetrini F, Ng P. Liver-directed gene therapy with helper-dependent adenoviral vectors: current state of the art and future challenges. *Curr Pharm Des*, 17: 2488-99, 2011.
62. Sanlioglu S, Monick MM, Luleci G, et al. Rate limiting steps of AAV transduction and implications for human gene therapy. *Curr Gene Ther*, 1: 137-47, 2001.
63. Sanlioglu S, Duan D, Engelhardt JF. Two independent molecular pathways for recombinant adeno-associated virus genome conversion occur after UV-C and E4orf6 augmentation of transduction. *Hum Gene Ther*, 10: 591-602, 1999.
64. Wang Z, Ma HI, Li J, et al. Rapid and highly efficient transduction by double-stranded adeno-associated virus vectors in vitro and in vivo. *Gene Ther*, 10: 2105-11, 2003.
65. Wang AY, Peng PD, Ehrhardt A, et al. Comparison of adenoviral and adeno-associated viral vectors for pancreatic gene delivery in vivo. *Hum Gene Ther*, 15: 405-13, 2004.
66. Sanlioglu S, Engelhardt JF. Cellular redox state alters recombinant adeno-associated virus transduction through tyrosine phosphatase pathways. *Gene Ther*, 6: 1427-37, 1999.
67. Sanlioglu AD, Karacay B, Benson PK, et al. Novel approaches to augment adeno-associated virus type-2 endocytosis and transduction. *Virus Res*, 104: 51-59, 2004.
68. Sanlioglu S, Benson PK, Yang J, et al. Endocytosis and nuclear trafficking of adeno-associated virus type 2 are controlled by rac1 and phosphatidylinositol-3 kinase activation. *J Virol*, 74: 9184-96, 2000.
69. Sanlioglu S, Benson P, Engelhardt JF. Loss of ATM function enhances recombinant adeno-associated virus transduction and integration through pathways similar to UV irradiation. *Virology*, 268: 68-78, 2000.
70. Mukai E, Fujimoto S, Sakurai F, et al. Efficient gene transfer into murine pancreatic islets using adenovirus vectors. *J Control Release*, 119: 136-41, 2007.
71. Rosas LE, Grieves JL, Zaraspe K, et al. Patterns of scAAV vector insertion associated with oncogenic events in a mouse model for genotoxicity. *Mol Ther*, 20: 2098-110, 2012.
72. Russell DW. AAV vectors, insertional mutagenesis, and cancer. *Mol Ther*, 15: 1740-3, 2007.
73. Yap IS, Giddings G, Pocock E, et al. Lack of islet neogenesis plays a key role in beta-cell depletion in mice infected with a diabetogenic variant of coxsackievirus B4. *J Gen Virol*, 84: 3051-68, 2003.
74. Dan M, Chantler JK. A genetically engineered attenuated coxsackievirus B3 strain protects mice against lethal infection. *J Virol*, 79: 9285-95, 2005.

75. Dan M, Chantler JK. A novel pancreatropic coxsackievirus vector expressing glucagon-like peptide 1 reduces hyperglycemia in streptozotocin-treated mice. *J Virol*, 85: 12759-68, 2011.
76. Di Nunzio F, Felix T, Arhel NJ, et al. HIV-derived vectors for therapy and vaccination against HIV. *Vaccine*, 30: 2499-509, 2012.
77. Durand S, Cimarelli A. The inside out of lentiviral vectors. *Viruses*, 3: 132-59, 2011.
78. Naldini L, Verma IM. Lentiviral vectors. *Adv Virus Res*, 55: 599-609, 2000.
79. Copreni E, Palmieri L, Castellani S, et al. A VSV-G Pseudotyped last generation lentiviral vector mediates high level and persistent gene transfer in models of airway epithelium in vitro and in vivo. *Viruses*, 2: 1577-88, 2010.
80. Riedel MJ, Lee CW, Kieffer TJ. Engineered glucagon-like peptide-1-producing hepatocytes lower plasma glucose levels in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 296: E936-E944, 2009.
81. McCormack MP, Rabbitts TH. Activation of the T-cell oncogene LMO2 after gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med*, 350: 913-22, 2004.
82. Kotin RM, Linden RM, Berns KI. Characterization of a preferred site on human chromosome 19q for integration of adeno-associated virus DNA by non-homologous recombination. *EMBO J*, 11: 5071-8, 1992.
83. Xu ZX, Chen JZ, Yue YB, et al. A 16-bp RBE element mediated Rependent site-specific integration in AAVS1 transgenic mice for expression of hFIX. *Gene Ther*, 16: 589-95, 2009.
84. Liu R, Li Y, Hu R, et al. A site-specific genomic integration strategy for sustained expression of glucagon-like peptide-1 in mouse muscle for controlling energy homeostasis. *Biochem Biophys Res Commun*, 403: 172-7, 2010.
85. Sanlioglu AD, Griffith TS, Omer A, et al. Molecular mechanisms of death ligand-mediated immune modulation: a gene therapy model to prolong islet survival in type 1 diabetes. *J Cell Biochem*, 104: 710-20, 2008.
86. Dirice E, Sanlioglu AD, Kahraman S, et al. Adenovirus-mediated TRAIL gene (Ad5hTRAIL) delivery into pancreatic islets prolongs normoglycemia in streptozotocin-induced diabetic rats. *Hum Gene Ther*, 20: 1177-89, 2009.
87. Mahato RI, Henry J, Narang AS, et al. Cationic lipid and polymer-based gene delivery to human pancreatic islets. *Mol Ther*, 7: 89-100, 2003.
88. Leibowitz G, Beattie GM, Kafri T, et al. Gene transfer to human pancreatic endocrine cells using viral vectors. *Diabetes*, 48: 745-53, 1999.
89. Raper SE, DeMatteo RP. Adenovirus-mediated in vivo gene transfer and expression in normal rat pancreas. *Pancreas*, 12: 401-10, 1996.
90. Taniguchi H, Yamato E, Tashiro F, et al. beta-cell neogenesis induced by adenovirus-mediated gene delivery of transcription factor pdx-1 into mouse pancreas. *Gene Ther*, 10: 15-23, 2003.
91. Ayuso E, Chillon M, Agudo J, et al. In vivo gene transfer to pancreatic beta cells by systemic delivery of adenoviral vectors. *Hum Gene Ther*, 15: 805-12, 2004.
92. Gould GW, Holman GD. The glucose transporter family: structure, function and tissue-specific expression. *Biochem J*, 295: 329-41, 1993.
93. Shapiro AM, Lakey JR, Paty BW, et al. Strategic opportunities in clinical islet transplantation. *Transplantation*, 79: 1304-7, 2005.
94. Auricchio A, Gao GP, Yu QC, et al. Constitutive and regulated expression of processed insulin following in vivo hepatic gene transfer. *Gene Ther*, 9: 963-71, 2002.
95. Barash S, Wang W, Shi Y. Human secretory signal peptide description by hidden Markov model and generation of a strong artificial signal peptide for secreted protein expression. *Biochem Biophys Res Commun*, 294: 835-42, 2002.
96. Burgess TL, Kelly RB. Constitutive and regulated secretion of proteins. *Annu Rev Cell Biol*, 3: 243-93, 1987.
97. Sanlioglu AD, Altunbas HA, Balci MK, et al. Clinical utility of insulin and insulin analogs. *Islets*, 5: 67-78, 2013.
98. Tonne JM, Sakuma T, Deeds MC, et al. Global gene expression profiling of pancreatic islets in mice during streptozotocin-induced beta-cell damage and pancreatic Glp-1 gene therapy. *Dis Model Mech*, 6: 1236-45, 2013.
99. Rosenberg L, Lipsett M, Yoon JW, et al. A pentadecapeptide fragment of islet neogenesis-associated protein increases beta-cell mass and reverses diabetes in C57BL/6J mice. *Ann Surg*, 240: 875-84, 2004.
100. Lee YS, Shin S, Shigihara T, et al. Glucagon-like peptide-1 gene therapy in obese diabetic mice results in long-term cure of diabetes by improving insulin sensitivity and reducing hepatic gluconeogenesis. *Diabetes*, 56: 1671-9, 2007.
101. Williams DL, Baskin DG, Schwartz MW. Leptin regulation of the anorexic response to glucagon-like peptide-1 receptor stimulation. *Diabetes*, 55: 3387-93, 2006.
102. Wirth T, Parker N, Yla-Herttuala S. History of gene therapy. *Gene*, 525: 162-9, 2013.
103. Salmon F, Grosios K, Petry H. Safety profile of recombinant adeno-associated viral vectors: focus on alipogene tiparvovec (Glybera→). *Expert Rev Clin Pharmacol*, 7: 53-65, 2014.
104. Yla-Herttuala S. Endgame: glybera finally recommended for approval as the first gene therapy drug in the European union. *Mol Ther*, 20: 1831-2, 2012.
105. Garber AJ. Novel incretin-based agents and practical regimens to meet needs and treatment goals of patients with type 2 diabetes mellitus. *J Am Osteopath Assoc*, 111: S20-S30, 2011.
106. Derosa G, Maffioli P. GLP-1 agonists exenatide and liraglutide: a review about their safety and efficacy. *Curr Clin Pharmacol*, 7: 214-28, 2012.
107. Edwards KL, Stapleton M, Weis J, et al. An update in incretin-based therapy: a focus on glucagon-like peptide-1 receptor agonists. *Diabetes Technol Ther*, 14: 951-67, 2012.
108. Tasyurek HM, Altunbas HA, Balci MK, et al. Incretins: their physiology and application in the treatment of diabetes mellitus. *Diabetes Metab Res Rev*, doi:10.1002/dmrr.2501, 2014.
109. Heine RJ, Fu H, Kendall DM, et al. Comment on: Butler et al. Marked expansion of exocrine and endocrine pancreas with incretin therapy in humans with increased exocrine pancreas dysplasia and the potential for glucagon-producing neuroendocrine tumors. *Diabetes*, 2013; 62:2595-2604. *Diabetes*, 62: e16-e17, 2013.
110. Engel SS, Golm GT, Lauring B. Comment on: Butler et al. Marked expansion of exocrine and endocrine pancreas with incretin therapy in humans with increased exocrine pancreas dysplasia and the potential for glucagon-producing neuroendocrine tumors. *Diabetes*, 2013;62:2595-2604. *Diabetes*, 62: e18, 2013.
111. Elashoff M, Matveyenko AV, Gier B, et al. Pancreatitis, pancreatic, and thyroid cancer with glucagon-like peptide-1-based therapies. *Gastroenterology*, 141: 150-6, 2011.
112. Egan AG, Blind E, Dunder K, et al. Pancreatic safety of incretin-based drugs—FDA and EMA assessment. *N Engl J Med*, 370: 794-7, 2014.
113. Tasyurek MH, Altunbas HA, Canatan H, et al. GLP-1-mediated gene therapy approaches for diabetes treatment. *Expert Rev Mol Med*, 16: e7, 2014.