

Türkiye Klinikleri

TIBBİ GENETİK

ÖZEL KONULAR

Medical Genetics

SPECIAL TOPICS

GEN VE HÜCRE TEDAVİSİNDE GÜNCEL GELİŞMELER

CURRENT DEVELOPMENTS IN GENE AND CELL THERAPY

İÇİNDEKİLER CONTENTS

Ön Söz - Preface

Gülseren BAĞCI

1

Gen ve Hücre Tedavisinde Genom Düzenleme (CRISPR/Cas9) Teknolojisinin Rolü

The Role of Genome Editing (CRISPR/Cas9) Technology in Gene and Cell Therapy

Haydar BAĞIŞ

14

Pluripotent Kök Hücrelerin Klinikte Kullanımı

Clinical Applications of Pluripotent Stem Cells

Burcu ÖZÇİMEN, Tamer ÖNDER

20

Gen Tedavisinde Kullanılan Viral Olmayan Taşıyıcı Sistemler

Non-Viral Delivery Systems for Gene Therapy

Devrim DEMİR-DORA

27

Hematopoetik Kök Hücrelerde Gen Düzenleme Teknolojileri

Gene Editing Technologies in Hematopoetic Stem Cells

Medine KARADAĞ ALPASLAN, Fatih KOCABAŞ

33

İnsülin Gen Naklinin Geçmiş ve Geleceği

Past and Future Perspectives in Insulin Gene Therapy

Fulya ERENDOR, Yunus Emre EKŞİ, Salih ŞANLIOĞLU

45

Diyabette Gen ve Hücre Tedavisi: TNF-İlişkili Apoptoz İndükleyici Ligand (TRAIL) ve Potansiyel Uygulamaları

Gene and Cell Therapy in Diabetes: TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL)-Mediated Potential Strategies

Ahter Dilşad ŞANLIOĞLU

- 51 **Beta Hücre Heterojenitesinin Tip 1 Diyabet Tedavisinde Kullanılması**
Harnessing Beta Cell Heterogeneity in Type 1 Diabetes
Ercüment DİRİCE
- 55 **Genetik Olarak Modifiye Edilmiş Dendritik Hücrelerle İmmün Tolerans İndüksiyonu**
Induction of Immune Tolerance by Genetically Modified Dendritic Cells
İzel YILMAZ, Haluk Barbaros ORAL
- 61 **Mezenkimal Kök Hücre Biyolojisi ve Klinik Kullanım Potansiyeli**
Biology of Mesenchymal Stem Cell and Potential of Clinical Utility
Erdal KARAÖZ, Olga Nehir ÖZTEL
- 69 **Atopik Hastalıklarda Hücre İmmünoterapi ve Mezenkimal Kök Hücre Uygulamaları**
Cellular Immunotherapy and Mesenchymal Stem Cell Applications in Atopic Diseases
Tunç AKKOÇ, Deniz GENÇ
- 75 **Spinal Kord Yaralanmalarında Kök Hücre ve Hücre İmmünoterapiler**
Stem Cell and Cellular Therapies in Spinal Cord Injuries
Serdar KABATAŞ, Furkan DİREN, Halil CAN
- 80 **Kemik-Kartilaj Doku Hasarında Rejeneratif Hücre İmmünoterapiler**
Regenerative Cell Therapies in Bone-Cartilage Tissue Loss
Zeynep Burçin GÖNEN, Yusuf ÖZKUL
- 86 **Epitelial Kanserler İçin Kannabinoid Temelli Tedaviler ve Bunların Genetik Temeli**
Cannabinoid Based Therapies in Epithelial Cancers and Their Genetic Basis
Elif BİLGİÇ, Petek KORKUSUZ
- 93 **Yaşlanma ve Kanserde Telomer Dinamikleri**
Telomere Dynamics in Aging and Cancer
İlgen MENDER, Z.Günnur DİKMEN
- 99 **Genetiği Değiştirilmiş Hücreler ile Adaptif İmmünoterapi: CAR T ve CAR NK Hücre Tedavileri**
Adoptive Immunotherapy with Genetically Modified Cells: CAR T and CAR NK Cell Therapy
Koray YALÇIN, Ercüment OVALI
- 107 **Kanserde Monoklonal Antikor Tedavilerine Güncel Yaklaşımlar**
Current Approaches to Monoclonal Antibody Treatments in Cancer
Gülperi ÖKTEM, Seda BAYKAL KÖSE, Eda AÇIKGÖZ
- 113 **Genetik Olarak Modifiye Edilmiş Doğal Öldürücü Hücrelerle Kanser İmmünoterapisi**
Cancer Immunotherapy Using Genetically Modified Natural Killer Cells
Elif ÇELİK, Tolga SÜTLÜ
- 124 **Tümör Aşısında Nereye Gelindi, Kanser Tedavisinde Tümör Aşısı**
Current Approaches to Monoclonal Antibody Treatments in Cancer
Ali ÜNAL, Serhat ÇELİK
- 131 **Kişisel Tıp İçin Çipte Doku/Organ Sistemleri**
Tissue/Organ-on-a-Chip Systems for Personalized Medicine
Y. Murat ELÇİN

TIBBİ GENETİK

ÖZEL KONULAR

Medical Genetics

SPECIAL TOPICS

EDITÖR - EDITOR




Prof. Dr. Gülseren BAĞCI (Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik ABD, DENİZLİ)

YAZARLAR - AUTHORS

- Dr. Eda AÇIKGÖZ (Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embryoloji ABD, VAN)
- Prof. Dr. Tunç AKKOÇ (Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk İmmünolojisi ve Alerji Hastalıkları BD, İSTANBUL)
- Prof. Dr. Haydar BAĞIŞ (Adıyaman Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik ABD, ADIYAMAN)
- Dr. Seda BAYKAL KÖSE (Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ABD, İZMİR)
- Dr. Öğr. Üyesi Elif BİLGİÇ (Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embryoloji ABD, ANKARA)
- Dr. Öğr. Üyesi Halil CAN (Biruni Üniversitesi Tıp Fakültesi, Beyin ve Sinir Cerrahisi Kliniği, İSTANBUL)
- Yük. Müh. Elif ÇELİK (Sabancı Üniversitesi Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Moleküler Biyoloji, Genetik ve Biyomühendislik Bölümü, İSTANBUL)
- Uzm. Dr. Serhat ÇELİK (Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Hematoloji BD, KAYSERİ)
- Dr. Öğr. Üyesi Devrim DEMİR DORA (Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji ABD, ANTALYA)
- Prof. Dr. Z. Günnur DİKMEN (Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya ABD, ANKARA)
- Uzm. Dr. Furkan DİREN (Sağlık Bilimleri Üniversitesi Gaziosmanpaşa Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Beyin ve Sinir Cerrahisi Kliniği, İSTANBUL)
- Dr. Öğr. Üyesi Ercüment DİRİCE (New York Tıp Fakültesi, Farmakoloji Bölümü, Valhalla, NY, ABD)
- Dr. Yunus Emre EKŞİ (Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik ABD, ANTALYA)
- Prof. Dr. Y. Murat ELÇİN (Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Biyokimya ABD, ANKARA)
- Dr. Fulya ERENDOR (Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik ABD, ANTALYA)
- Dr. Öğr. Üyesi Deniz GENÇ (Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi, Hemşirelik Bölümü, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hemşireliği ABD, MUĞLA)
- Doç. Dr. Zeynep Burçin GÖNEN (Erciyes Üniversitesi Betül Ziya Eren Genom ve Kök Hücre Merkezi, Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi ABD, KAYSERİ)
- Doç. Dr. Serdar KABATAŞ (Sağlık Bilimleri Üniversitesi Gaziosmanpaşa Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Beyin ve Sinir Cerrahisi Kliniği, İSTANBUL)
- Dr. Medine KARADAĞ ALPASLAN (Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik ABD, SAMSUN)
- Prof. Dr. Erdal KARAÖZ (İstinye Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embryoloji ABD, İSTANBUL)
- Doç. Dr. Fatih KOCABAŞ (Yeditepe Üniversitesi Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, İSTANBUL)
- Prof. Dr. Petek KORKUSUZ (Petek KORKUSUZ Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embryoloji ABD, ANKARA)
- Biyolog İlgen MENDER (Texas Southwestern Üniversitesi, Hücre Biyolojisi Bölümü, Dallas, ABD)
- Prof. Dr. Haluk Barbaros ORAL (Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, İmmünoloji ABD, BURSA)
- Prof. Dr. Ercüment OVALI (Acibadem Labcell Hücre Laboratuvarı ve Kordon Kanı Bankası, İSTANBUL)
- Prof. Dr. Gülperi ÖKTEM (Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embryoloji ABD, İZMİR)
- Doç. Dr. Tamer ÖNDER (Koç Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ABD, İSTANBUL)
- Dr. Burcu ÖZÇİMEN (Koç Üniversitesi Translasyonel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi (KUTTAM), İSTANBUL)
- Prof. Dr. Yusuf ÖZKUL (Erciyes Üniversitesi Betül Ziya Eren Genom ve Kök Hücre Merkezi, Tıbbi Genetik ABD, KAYSERİ)
- Dr. Olga Nehir ÖZTEL (İstinye Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü, İSTANBUL)
- Dr. Öğr. Üyesi Tolga SÜTLÜ (Boğaziçi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, İSTANBUL)
- Prof. Dr. Ahter Dilşad ŞANLIOĞLU (Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ABD, ANTALYA)
- Prof. Dr. Salih ŞANLIOĞLU (Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik ABD, ANTALYA)
- Prof. Dr. Ali ÜNAL (Erciyes Üniversitesi Mehmet Kemal Dedeman Hematoloji-Onkoloji Hastanesi, Hematoloji BD, KAYSERİ)
- Uzm. Dr. Koray YALÇIN (Medical Park Göztepe Hastanesi, Çocuk Hematolojisi Onkolojisi Kliniği, İSTANBUL)
- Dr. Izel YILMAZ (Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, İmmünoloji ABD, BURSA)

İnsülin Gen Naklinin Geçmiş ve Geleceği

Past and Future Perspectives in Insulin Gene Therapy

 Fulya ERENDOR^a,
 Yunus Emre EKŞİ^a,
 Salih ŞANLIOĞLU^a

^aAkdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Tıbbi Genetik ABD,
Antalya, TÜRKİYE

Yazışma Adresi/Correspondence:
Salih ŞANLIOĞLU
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Tıbbi Genetik ABD,
Antalya, TÜRKİYE
ssanlioglu@icloud.com

ÖZET Diyabet, tek gen defektine bağlı olmayıp multifaktöriyel mekanizmaların etkisiyle pankreatik beta hücrelerinin fonksiyonel yetmezliği veya kaybı sonucu ortaya çıkan bir hastalıktır. Günümüzde Tip 1 diyabet (T1DM) hastalarında temel tedavi yöntemi insülin enjeksiyonudur. Bu yaklaşımla hastaların görme bozukluğu, nöronal ve böbrek komplikasyonları geliştirmeleri geçici de olsa bir süreliğine önlenbilmesine rağmen, hastaların zaman zaman hipoglisemi, havale geçirmeleri ve hatta komaya girmeleri engellenememektedir. Bugün için diyabete karşı birçok farklı insülin analogunun geliştirilmiş olmasına karşın, yakın tarihli yapılan bir meta-analize göre, hızlı ve uzun etki süreli insülin analoglarının, glikemik kontrol açısından konvansiyonel insülinlere göre çok az miktarda yarar sağladığı belirlenmiştir. Bu nedenle, diyabetik hastalarda doğal endojen insülin sentez profilinin geri kazandırılması amacıyla yeni deneysel gen tedavi metodları geliştirilmektedir. Ayrıca, insan insülin ve insülin analoglarının tersine, insülin gen terapisi hastalarda sadece insülin eksikliğini değil aynı zamanda C-peptid eksikliğini de gidermeyi amaçlar.

Anahtar Kelimeler: Diabetes mellitus; insülin; insülin analogları; genetik tedavi

ABSTRACT Diabetes is not caused by a single gene defect but rather is caused by functional loss of pancreatic beta cells due to multifactorial mechanism. Today, insulin injection is the mainstream treatment modality for patients with Type 1 diabetes (T1DM). Although this approach is considered to be pretty effective in delaying of visual impairment, and appearance of neuronal and renal complications, patients may still experience occasional hypoglycemia, convulsion or even coma. Despite many different insulin analogs have been developed against diabetes, a recent meta-analysis has shown that fast and long-acting insulin analogs manifested little or no benefit in terms of glycemic control compared to conventional insulin. Therefore, new experimental gene therapy methods are under developed in order to restore the natural endogenous insulin synthesis and secretion profile in diabetic patients. In addition, unlike using human insulin and insulin analogs, insulin gene therapy aims to address not only insulin shortage but also C-peptide deficiency in diabetic patients.

Keywords: Diabetes mellitus; insulin; insulin analogs; genetic therapy

Diyabet; bağışıklık ve genetik mekanizmaların birlikte rol oynadığı metabolik abnormaliteler ile karakterize pandemik bir hastalıktır. Langerhans adacıklarındaki beta hücrelerinin otoimmün yıkımıyla karakterize insülin bağımlı şeker hastalığı Tip 1 diyabet (T1DM) olarak bilinir. T1DM tedavisinde insülin enjeksiyonu oldukça yaygın olarak kullanılmasına rağmen bu tedavi metodu ideal kan şekeri kontrolünü tam olarak sağlayamadığı için hastaların nefropati, nöropati ve retinopati gibi kronik komplikasyonları zamanla geliştirmelerini engelleyemez. T1DM tedavisinde uygulanan pankreas organ nakli ve pankreas adacık transplantasyonunun klinik yaygınlığı, pankreas organ donörü bulma güçlüğü sebebiyle ciddi oranda kısıtlanmıştır. Bu nedenle pek çok insan hastalığı için umut vaat eden yeni bir tedavi şekli olan gen tedavisinin alternatif bir terapi metodu olarak T1DM tedavisi için geliştirilmesi gündeme gelmiştir.

KAYNAK GÖSTERMEK İÇİN:
Erendor F, Ekşi YE, Şanlıoğlu S. İnsülin gen naklinin geçmiş ve geleceği. Bağcı G, editör. Gen ve Hücre Tedavisinde Güncel Gelişmeler. 1. Baskı. Ankara: Türkiye Klinikleri; 2021. p.33-44.

Nitekim, Tip 1 diyabet hastalarının hepsi, Tip 2 diyabet (T2DM) hastalarının çoğunluğu, hastalığın ilerleyen dönemlerinde beta hücre kaybına bağlı olarak zaman içinde insüline bağımlı hale gelir. Gen transfer vektörleri aracılığıyla insülin gen aktarımı; diyabetik hastalarda endojen insülin sentez profilini taklit edebilecek potansiyel terapötik bir yaklaşımdır. Bu nedenle, insülin gen terapisinin ana hedefleri, hedef dokularda insülin gen ekspresyonunun sağlanabilmesi, periferik dokulara glukoz alımının artırılması, glukagon sekresyonunun baskılanması ve hipergliseminin azaltılabilmesi için hepatik glukoz üretiminin inhibe edilmesi olarak tanımlanabilir.¹ Dolayısıyla insülin gen terapisi, hastalarda en azından bazal plazma insülin gereksiniminin karşılanabilmesi için gerekli çözümü sağlayabilir.² Bunun yanında insülin gen nakli ile, T1DM hastalarında metabolik stabilite için esansiyel olan rezidüel beta hücre fonksiyonunun korunması ve zamanla artırılması da mümkün olabilir. Ayrıca, diyabetik hastalarda C-peptid yararlı etkiler göstermesine rağmen, regüler insan insülini ve insülin analoglarında C-peptid olmadığından, Tip 1 diyabet hastalarında C-peptidin insülin preparatlarına dahil edilip edilmemesi gerekliliği konusunda bilim camiasında bir kargaşa yaşanmaktadır. Tip 2 diyabet hastalarının erken evrelerinde C-peptid seviyesinde bir artış gözlenmesi başlarda bu konuda bir tereddüt doğmasına sebebiyet vermişti. Bugün için C-peptidin bir insülin belirtici olmaktan öte, diyabetik hastalarda böbrek ve sinir fonksiyonlarını arttırdığı, esansiyel organlara kan akışını sağladığı belirlenmiştir. Dolayısıyla insülin gen nakli yalnızca insülin ihtiyacını karşılamak için değil, aynı zamanda şu anda T1DM hastalarının insülin preparatlarında olmayan C-peptid gereksinimini karşılayarak diyabet komplikasyonlarının gelişiminin engellenebilmesi açısından gerekli olabilir.

İNSÜLİN VE DİYABET

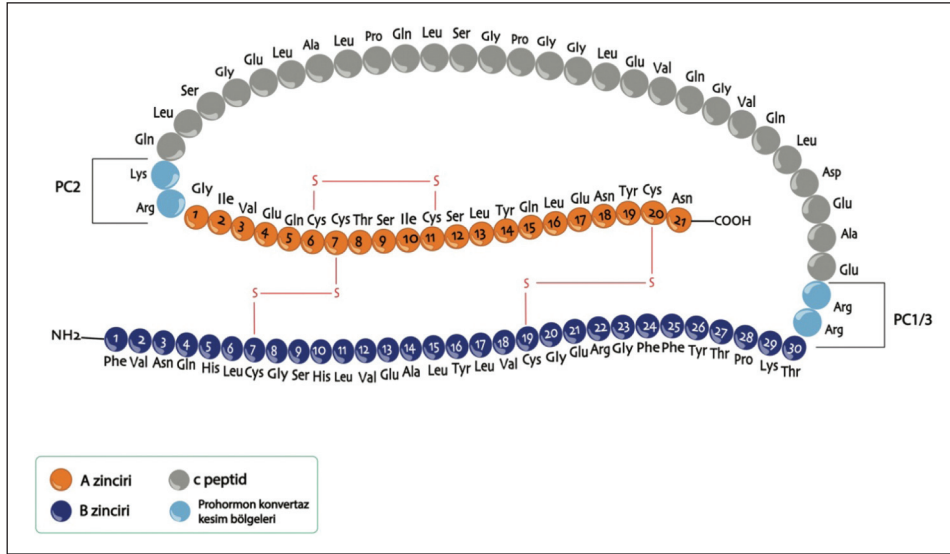
Diyabet; insülin yetmezliği ve/veya karaciğerden glukoz sekresyon artışına bağlı olarak gelişen kan şekerinin yüksekliği ile kendini gösteren metabolik bir hastalıktır. Uluslararası Diyabet Federasyonu (İDF) verilerine göre 2017 yılı itibarıyla diyabetli hasta sayısı 425 milyona ulaşmıştır.³ Diyabetli hasta sayısının 2045 yılında 630 milyona ulaşması öngörülmektedir. Bu da bir sonraki jenerasyonda diyabetli hasta sayısında %55 artış olacağına işaret eder. Tüm bunların dışında 352 milyon kişide de glukoz tolerans bozukluğu tespit edilmiştir. Bu kişiler gerçekte diyabet hastalığını geliştirmeye yatkın bireyleri temsil eder. Diyabetli hastalar genelde 40-59 yaş aralığında olup, bunların %80'i düşük ya da orta gelirli ülkelerde yaşamaktadır. Sadece

2017 yılında 5.1 milyon kişi, diyabet hastalığı sebebiyle hayatını kaybetmiştir. Bu da her 6 saniyede bir kişinin ölümü demektir. 2017 yılı itibarıyla diyabet hastalığına karşı yapılan sağlık harcamaları 727 milyar doları bulmuştur.³ Bu nedenle diyabet aynı zamanda ciddi bütçe kayıplarına sebebiyet veren bir hastalıktır.

Hiperglisemi ile kendini gösteren insülin yetmezliği hem T1DM hem de T2DM hastalığının ortak özelliği olmasına rağmen, tek bir gen mutasyonuna bağlı olmayıp birbirinden farklı mekanizmalarla pankreatik beta hücrelerinin fonksiyon kaybı sonucu gelişir.⁴ T1DM hastalarının pankreatik beta hücreleri otoimmün reaksiyon sonucu tahrip edildiğinden bu hastalara günlük insülin enjeksiyonu gerekir. Diğer taraftan insülin dirençliliği sonrasında gözlenen beta hücre fonksiyon bozukluğu ve beta hücre kaybı T2DM hastalığının karakteristik özelliklerindedir. Bu sebeple T2DM hastalarının çoğu da zaman içinde gelişen insülin yetmezliğine bağlı olarak insülin tedavisi gerektirir. Erken insülin tedavisinin diyabetin makrovasküler (koroner arter hastalığı, periferik arter hastalığı ve inme) ve mikrovasküler (diyabetik nefropati, nöropati ve retinopati) komplikasyonlarını hafiflettiğine dair deliller olsa da, insülin tedavisinin nasıl başlanıp nasıl yoğunlaştırılacağı konusunda hekimler arasında halen yoğun bir kargaşa söz konusudur. İnsülin molekülü, B zincirlerinin C-terminaleri arasında oluşan H bağı nedeniyle, solüsyonda dimerler oluşturma eğilimindedir (Şekil 1). Ortamda çinko iyonlarının varlığı ise, insülin dimerlerini hegzamerler oluşturmaya zorlar. İnsülin monomer ve dimerlerinin kana kolaylıkla karışması, hegzamerlerin ise penetrasyonunun zayıf olması, diyabet tedavisi açısından oldukça önemlidir. Örneğin, çinko molekülüne bağlı hegzamer içeriği yüksek olan insülin preparatları gerektiği gibi emilemediğinden regüler insan insülini kullanarak (örneğin Humulin R, Novolin R, Velosulin BR, Actrapid) yeterli glisemik kontrol sağlamak çok zordur.

İNSÜLİN ANALOGLARI VE ETKİ MEKANİZMASI

Subkutan enjeksiyon sonrası, insülin hegzamerlerinin kanda emilim için dimer ve monomerlerine ayrılması 60 ile 90 dakika sürer.⁵ Diyabetik hastalar insülin enjeksiyonlarının zamanlamasını her zaman doğru yapamayabildiğinden, kan glukozu ile insülin konsantrasyonu arasında kolaylıkla uyumsuzluk gelişebilir. Sonuçta yetersiz glukoz kontrolü, hastaları hipoglisemi ve uzun dönemde nöropati, nefropati ve retinopati gibi diyabet ile ilişkili komplikasyonlara yatkın hale getirir. Buna dayanılarak, bir dizi rekombinant insülin analogu geliştirilmiştir.⁶ Bu çalışmalarda insan insülin dizisinde küçük değişiklikler gerçekleştirile-

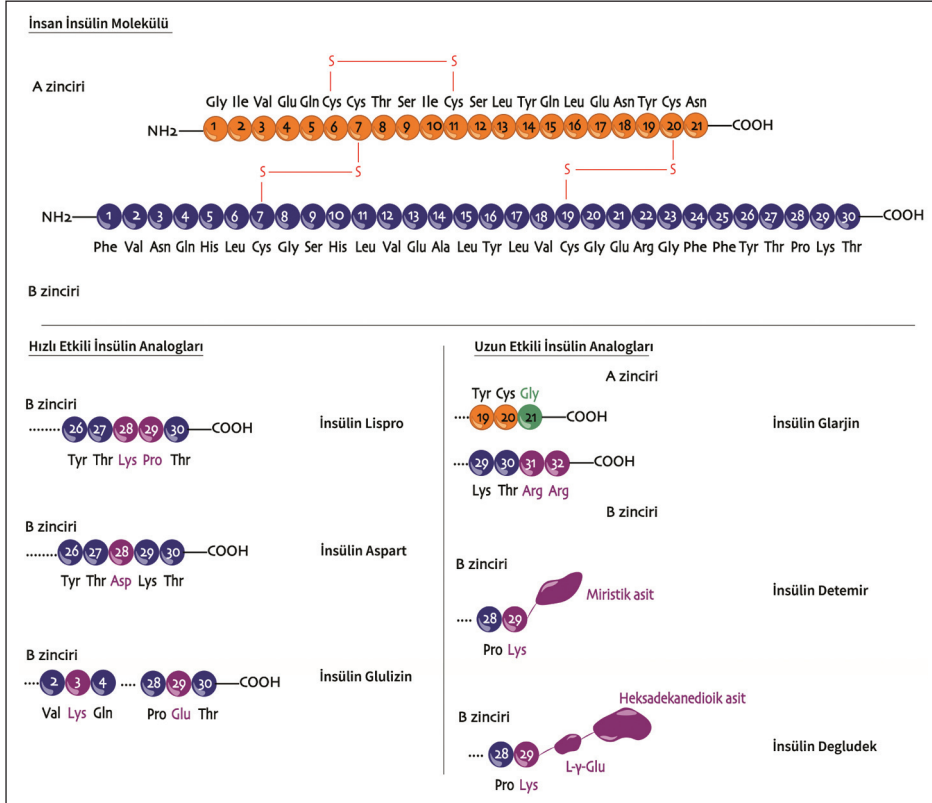


ŞEKİL 1: İnsan insülin molekülünün moleküler yapısı. PC: Prohormon Konvertaz kesim bölgeleri.

rek rekombinant insülinin ilgili reseptörüne bağlanma ve glukoz kontrol özellikleri iyileştirilmiştir (Şekil 2).⁷

Bu avantajlarına rağmen, mevcut insülin analogları özellikle yüksek dozlarda kullanıldıklarında fizyolojik bazal insülin sekresyon profilini oluşturmada yetersiz kal-

maktadırlar.⁸ Alternatif olarak, bu ajanlar düşük dozlarda kullanıldıklarında, diyabetik hastalarda 24 saat yeterli insülin düzeyi sağlanamaz.⁹ Bireyler arasındaki metabolik değişkenlik düşünüldüğünde, insülin analogları kullanan diyabet hastalarında halen optimum düzeyde postprandial



ŞEKİL 2: Hızlı (Lispro, Aspart, Glulizin) ve uzun etkili (Glargin, Detemir ve Degludek) insülin analoglarının moleküler yapısı.

insülin seviyelerinin de sağlanabilmesi gerekmektedir. Bu hastalarda optimum glisemik kontrole ulaşılmasında en önemli sorunun tekrarlayan insülin indüklü hipoglisemi olduğu belirlenmiştir. Buna ek olarak, uzun etki süreli glarjinin, insan osteosarkom hücre hattının mitotik hızını arttırdığı belirlenen insülin-benzeri büyüme faktörü (IGF) reseptörüne afinitesi olduğu saptanmıştır.¹⁰ Dolaşımdaki yüksek IGF-1 seviyeleri, solid tümör ve lösemi riski ile ilişkilendirildiğinden, bazı yeni insülin analoglarını kullanan hastalarda kanser riskinin artabileceğinden endişe duyulmaktadır.¹¹ Avrupa Tıp Ajansı (EMA), insülin analogları ve kanser arasındaki potansiyel riski doğrulamamış olmakla birlikte, böyle bir ihtimalin olmadığını da dışlayamamıştır. İnsülin replasman tedavisi ile ilişkili temel problemlerden biri, dışarıdan insülin enjeksiyonu ile endojen olarak pankreatik beta hücrelerinden üretilen doğal insülin salınımına tamamen uyan bir insülin sekresyon profili oluşturmanın neredeyse mümkün olmamasıdır. Bu kısmen, ekzojen olarak verilen insülinin hepatik arter aracılığıyla karaciğere ulaşmadan önce ilk olarak venöz ve pulmoner dolaşıma girme gerekliliğinden kaynaklanır. Bunun aksine, pankreatik beta hücrelerinden salınan insülin portal ven aracılığıyla direkt olarak karaciğere gider. İnsülinin fizyolojik etkilerinin açığa çıkmasının ve en azından insülin dinamiğinin, uygulanış şekline göre farklılık gösterebileceği barizdir.

Günümüzde birçok insülin analogu üretilmesine rağmen yakın tarihli bir meta-analiz, hızlı ve uzun etkili insülin analoglarının glisemik kontrol açısından beklenen aksine konvansiyonel insüline oranla oldukça az yarar sağladığını göstermiştir. Diyabet bir tek gen hastalığı olmasa da, diyabetin temel sekeli olarak bilinen insülin yetersizliğinin ortadan kaldırılabilmesi için insülin gen transferinin gerçekleştirilmesi, oldukça cazip bir tedavi yaklaşımı olarak ortaya çıkmaktadır.¹²

■ DİYABETTE İNSÜLİN GEN TEDAVİSİNİN YERİ VE ÖNEMİ

Günümüzde diyabet hastalarının tedavisi için kullanılan insülin analoglarının dışında bunlara alternatif olarak deneysel insülin gen terapi yaklaşımları geliştirilmektedir.¹³ Gen aktarımları ex vivo ve in vivo olmak üzere iki farklı yolla yapılabilmektedir. Ex vivo yöntemde hastadan alınan hücreler vücudun dışında laboratuvar ortamında gen nakliyle modifiye edildikten sonra tekrar hastalara nakledilir. In vivo yöntemde ise, gen transfer vektörlerinin farklı yollarla hastalara direkt enjeksiyonu söz konusudur (intravenöz, subkutan, vb.). Basit ve daha uygun olması sebebiyle, in vivo gen terapisi, gen aktarımlarında oldukça tercih edilen

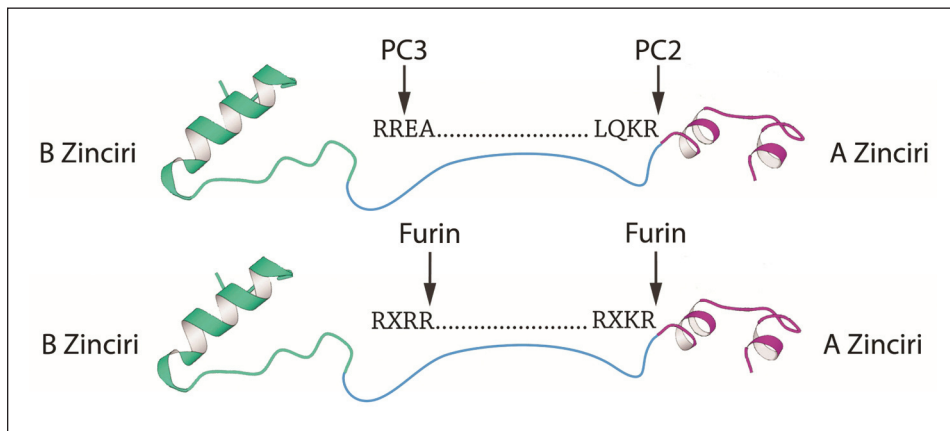
bir metottur. Bunun yanı sıra kan glukozunu düşürmeyi hedefleyen gen tedavi yaklaşımları genel olarak glukoz kullanımını kolaylaştırırken eş zamanlı olarak hepatik glukoz üretimini de inhibe etmeyi amaçlar. Son zamanlarda dışarıdan verilen ekzojen insülin ihtiyacını azaltacak yeni insülin tedavi metodlarının geliştirilmesine büyük önem verilmektedir. Bir beta hücre tipi olmayan fare pituitar kortikotropik hücrelerinde (AdT20) proinsülin sentezlemesi, sekretuar granüllerde depolanması ve stimülasyonla insülin salgılaması bu konuda yapılan ilk çalışmalardandır.¹⁴ Nöroendokrin hücreler prohormon konvertaz sentezi (PC1/3 and PC2) ve regüle edilebilir sekretuar yolak içermeleri itibarıyla beta hücrelerine çok benzeseler de, glukokinaz (GK) ve glukoz taşıyıcı-2 (GLUT2) moleküllerini sentezlemediklerinden pankreatik beta hücreleri gibi bir glukoz yanıtı veremezler. Dahası insülinin etkisini inhibe eden adrenokortikotropik hormon sentezlemeleri nedeniyle bu yaklaşımın diyabet tedavisinde ileri zamanlarda kullanımı uygun görülmemiştir.

Viral vektörleri içeren deneysel ilk insülin gen nakli denemeleri yaklaşık 20 yıl önce yapılmıştır. Sıçan preproinsülin 1 cDNA kodlayan moloney murine leukemia virus (MMLV) tabanlı retroviral vektörün kısmi hepatotektomi yapılmış (%70) sıçan karaciğerine intraportal nakli, %5-10 karaciğer transdüksiyonuna sebebiyet vererek 6 ay boyunca insülin gen sentezi sağlamıştır. Bu yöntemde hepatik insülin gen sentezi oldukça az olsa da, gen nakliyle açlık hiperglisemisi, glukojen yıkımı, trigliserid depozisyonu, ketoasidozis ve streptozotosin (STZ)-indüklü diyabetik ölümler hipoglisemiye sebebiyet verilmeden önlenmiştir. Ancak karaciğerde sentezlenen insülin, bu organda proinsülini işleyen bir mekanizmanın olmaması sebebiyle daha az aktivite göstermiştir. Ayrıca, PC2 ve PC3 kodlayan adenovirusların karaciğere verilmesi kas hücrelerinde gözlemlenen verilerin tersine karaciğerde etkin proinsülin kırılımına sebebiyet vermemiştir.¹⁵ Bu durum, PC2 ve PC3 enzim aktivitelerinin karaciğerdeki daimi sekretuar yollarda mevcut proteazlar tarafından baskılanmış olmasından kaynaklanabileceğini düşündürmüştür. Prohormonların aktif formlarına dönüşümünü sağlayan konvertaz enzimlerinden yoksun hepatositlerin aksine, akciğer dokusu prohormon konvertazları doğal olarak sentezleyen bol miktarda nöroendokrin sekretuar hücrelere sahiptir. Bu vesileyle cytomegalovirus (CMV) promotörülü sıçan insülin geninin lipozom aracılı gen nakli metoduyla akciğer hücrelerine verilmesi, alveolar epitelyal hücrelerinde belirgin düzeyde insülin gen sentezi ve sekresyonu sağlayarak, STZ-indüklü diyabetik farelerde hiperglisemi ve ketoasidozu önleyebilmiştir.

Daimi sekretuar yolları aktif olan hücreler, sekretuar peptitleri fürin endopeptidazlar aracılığıyla spesifik amino asitlerinden kırarlar.¹⁶ Bu sebeple, insülin molekülünün BC ve CA birleşim yerlerine yerleştirilen dibazik amino asit sekansları (Arg-X-Lys-Arg) fürin endopeptidazlar tarafından proinsülinin işlenmiş olgun insüline dönüşmesini sağlar (Şekil 3). Örneğin, fürin tanıma bölgesi içeren insan insülin cDNA'sıyla geçici olarak transfekte edilen HEK293 ve myoblast hücre hatlarında biyolojik olarak aktif insülin oluşturulması; proinsülinin posttranslasyonel olarak başarılı bir şekilde işlendiğini gösterdi.¹⁷ Bu bağlamda, rekombinant adenovirus aracılı PC2 veya PC3 aşırı sentezinin sıçan insülinoma hücrelerinde proinsülinin insüline dönüştürmesini kolaylaştırması bu sonuçları destekler niteliktedir. Hepatositlerin sürekli proinsülin sentezleyerek bunları işlenmiş insüline dönüştürebildiklerini göstermek için H4-II-E hepatosit hücre hattı, dibazik prohormon konvertaz tanıma bölgesinin tetra bazik fürin kesim bölgesine dönüştürüldüğü insan proinsülin cDNA'sı taşıyan replikasyon özüllü adenoviruslarla enfekte edildi. Bu viral vektörün farelere enjeksiyonu başlıca karaciğerde insülin gen sentezine yol açarak geçici de olsa diyabet gelişimini durdurdu. Benzer şekilde insan elongasyon faktör 1-alfa (EF1- α) promotörüne takılı rat proinsülin geni taşıyan adenovirusların STZ-indüklü diyabetik sıçanların karaciğerine enjeksiyonu diyabetik hayvanlarda plazma glukagon ve glukoz seviyelerini bariz bir biçimde düşürdü. Ancak, gen nakli yapılan hayvanlar aç bırakıldıklarında sürekli insülin gen sentezine bağlı olarak bu hayvanların tümünde ciddi düzeyde bir hipoglisemi geliştiği de raporlandı.

Birinci ve ikinci jenerasyon adenoviruslara oranla Adeno Assosiyasyon Virus (AAV) vektörler çok daha uzun süreli

transgen sentezi sağladığından; uzun süreli AAV aracılı insülin gen naklinin etkinliği, CMV promotörlü fürin tanımalı insan insülin geni taşıyan rAAV vektörler kullanılarak test edildi. AAV'nin portal venaya enjeksiyonu STZ indüklü diyabetik sıçanlarda 90 günün üzerinde bir normoglisemi sağladı. Bunlara ilave olarak sürekli insülin sentezinin HbA1c seviyesini düşürerek glukoz toleransını da geliştirdiği bildirildi. Ancak kontrolsüz insülin gen sentezi, tıpkı gen nakliyle insan insülin salınımı yaptırılan fibroblastlarının implantasyon çalışmasında gösterildiği gibi ciddi hipoglisemi geliştirme riski taşır. Bunu önlemenin bir yolu, insülin gen naklini glukoz kontrollü hücreye özgün promotörler kullanılarak gerçekleştirmektir. Bu durumda, CMV promotörlü daimi insülin gen sentezi deneklerde hipoglisemiden dolayı ölümlere sebebiyet verirken, glukoz kontrollü-karaciğere özgün promotör kullanımının deneklerde yalnızca hafif hipoglisemi oluşturması beklenir. Nitekim, glukozun pankreatik beta hücrelerinde ve hepatositlerde pek çok genin sentezini kontrol etmesi, onu insülin gen sentezinde etkili olabilecek aday (regülatör) moleküllerden biri yapar. Zaten, beta hücreleri ve hepatositler bu hücrelerin farklı kan şekeri düzeylerine yanıt vermelerini sağlayan GLUT2 ve GK aktivitelerine de sahiptir. Bunların dışında, glukagon ve siklik AMP (cAMP) moleküllerinin karaciğerde fosfoenolpiruvat karboksilaz (PEPCK) promotör aktivitesini indüklerken, insülinin PEPCK promotör aktivitesini baskılaması; PEPCK promotörlü fürin kesim bölgesi içeren proinsülinin, hepatositlerde glukoz kontrollü insülin gen sentezini sağlamak amacıyla kullanılabileceğini göstermiştir. Sonuçta, bu şekilde tasarlanan genin rekombinant adenovirus aracılı sıçan primer hepatosit kültür hücrelerine nakli bu hücrelerde iş-



ŞEKİL 3: İnsan proinsülin kodlayan peptitler. Üstteki peptit yalnızca beta hücrelerinde, barsak K, L hücreleri ve bazı endokrin hücrelerde sentezlenen prohormon konvertazlar (PC) tarafından kırılabilen insan proinsülin sekansını içerir. Alttaki peptit ise tetra bazik fürin endopeptidaz kesim bölgelerini içeren sonradan değiştirilmiş insan proinsülin sekansını temsil eder.

lenmiş (olgun) insan insülin üretimini sağlamıştır.¹⁸

Bunların dışında karaciğer hedefli insülin gen nakli çalışmalarında HNF-1, C/EBP ve GIRE DNA elementlerinin kombinasyonlarını içeren yapay promotörlerin kullanılması, STZ indüklü diyabetik NOD-SCID farelerde glukoz toleransı oluşturarak hipergliseminin düzelmesini sağlamıştır.¹⁹ Ancak glukoz tolerans testlerinde normogliseminin sağlanmasında bir gecikme yaşanması, negatif regülatör cevabın yeterli düzeyde sağlanabilmesi için vektör tasarımının daha da iyileştirilmesi gerektiğini göstermiştir. Diğer bir çalışmada PEPCCK ve L-PK promotörlerine alternatif olarak kullanılan üzerinde S14 glukoz yanıt elementi (GIRE) taşıyan karaciğere özgün albümin promotörlü füren kesim bölgesi insülin geninin adenovirus aracılı olarak karaciğere nakledilmesi; deneklerin açlık kan şekerinde bir düzelmeye sebebiyet vermesine karşın, insülin sentez ve salınımındaki uzun gecikme sebebiyle tokluk hiperglisemisini düzeltmediği bildirilmiştir.²⁰ Karaciğerde aktif olup ancak insülinle baskılanabilen glukoz yanıtı yeni bir promotör oluşturabilmek için, L-PK geninin karbonhidrat regülatör elementlerinin insülin benzeri büyüme faktörü protein-1 (rIGFBP-1) bazal promotörü önüne yerleştirildiği adenovirus aracılı gen naklini konu alan diğer bir çalışmada; diyabetik sıçanların hem glukoz toleransının ve hem de insülin duyarlılığının artırıldığı, adipokin profilinin de düzeltiltiği bildirilmiştir.

Bilindiği üzere, glukoz 6 fosfatın glukoz 6 dönüşümünü katalize eden glukoz 6 fosfataz (G6Ptaz) enzimi aynı zamanda karaciğerden glukoz salınımına sebebiyet veren enzimdir. Diyabet hastalarında karaciğerden aşırı glukoz salınımına sebebiyet vererek açlık hiperglisemisine neden olan G6Ptaz geninin promotörü sıçan hepatosit hücre hatlarında insülin gen sentezini yönlendirebilmek amacıyla denendi. Diyabetik şartlarda oldukça aktif olan ancak insülin tarafından baskılanan G6Ptaz promotörlü insan insülin geninin adenovirus aracılı nakli, insülinin baskılayıcı etkisinden dolayı karaciğerde oldukça düşük insülin gen sentezine sebebiyet verdi.²¹ Bu sebeple G6Ptaz promotora aldolaz B geninin intronik enhansırları eklenerek oluşturulan hibrit promotörün kullanıldığı diğer bir çalışmada, insülin geninin adenovirus aracılı gen nakli STZ indüklü diyabetik sıçanlarda açlık hipoglisemisine yol açmadan tokluk hiperglisemisini düşürdüğü bildirildi.²¹

Buna karşın, duodenum ve jejunumda bulunan K hücrelerinin, aynen beta hücrelerindeki gibi GK, GLUT2 ve prohormon konvertaz sentez etmeleri dolayısıyla, glukoz kontrollü insülin sentezi ve sekresyonu için ideal hedef hücreler olduğu düşünülmektedir.²² K hücrelerine spesifik promotörler aracılığıyla insan proinsülin gen sentezinin

sağlandığı transgenik hayvanların STZ uygulamasına dirençli olması, bu deneklerde beta hücrelerinin yokluğuna rağmen glukoz homeostazının başarılı bir şekilde kontrol edilebileceğini göstermiştir.²³ Ancak, intestinal epitel hücrelerinin hızlı devinimi dolayısıyla, uzun süreli gen sentezini gerçekleştirebilmek için K hücre progenitör hücreleri hedef alınmalıdır. İntestinal epitel hücre popülasyonunun sadece %1 kadarının enteroendokrin hücrelerden oluşması nedeniyle insülin üretimi için hedeflenebilecek enteroendokrin hücreler henüz izole edilememiş ve tanımlanamamıştır. Bununla beraber, viral vektörlerin kullanıldığı çalışmalarda bu engelin aşılabilmesi yolunda umut verici öncül sonuçlar elde edilmiştir. Örneğin, rAAV2 vektörü, in vitro ortamda enteroendokrin L-hücrelerini (NCI-H716) başarılı bir şekilde transdüksiyona uğratmış ve genetik yapılarını değiştirmiştir. Bu hücreler, bir ko-kültür ortamında çok sayıda enterositin varlığına rağmen (Caco-2 or T84) kontrol edilebilir insülin cevabı sergilemiştir. İnsan insülin geninin kitosan nanopartikülleri içinde lavaj yoluyla gastrointestinal hücrelerine aktarılmasının STZ ile indüklenen diyabetik ratların açlık kan şekerini düşürmesi, bu bulguları destekler niteliktedir.

PANKREATİK BETA HÜCRELERİNE GEN NAKLİNDE UYGULANAN YÖNTEMLER

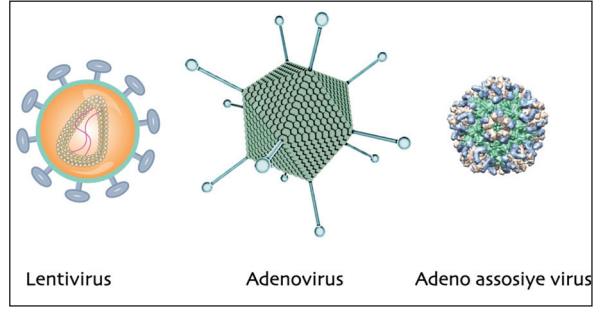
Son zamanlarda diyabette gen terapi yaklaşımları genel olarak, transplantasyon için pankreatik adacıkların ex vivo modifikasyonuna yönelmektedir.²⁴ Bunun dışında, beta hücre farklılaşmasını veya insülin gen ekspresyonunu indüklemek amacıyla, ilgili terapötik genin ekspresyonu için genelde karaciğer ve kas dokusu gibi pankreatik olmayan dokular, hedef organ olarak seçilmiştir.¹² Bununla birlikte pankreatik beta hücrelerine gen transferinde uygulanabilecek birkaç strateji vardır. Lipofeksiyon ve elektroporasyon gibi viral olmayan vektör aktarım sistemlerinde, pankreatik adacıklarda düşük seviyede gen nakil başarısı gözlenirken, viral vektörler kullanıldığında adacıklara oldukça etkin şekilde gen nakli gerçekleştiği belirlenmiştir (Şekil 4).²⁵

Adenoviral vektörler, yüksek titrelere üretilip oldukça iyi transdüksiyon etkinliği gösterirlerken, adacıklardaki endokrin hücrelerin kümelenmiş yapısı dolayısıyla, pankreatik adacıkların iç kısmındaki hücrelere adenovirus aracılı gen aktarımında zorluklar yaşanmaktadır.²⁴ Buna ilaveten, pankreatik adacıklara ortak safra kanalından uygulanan adenovirus vektör aracılı in vivo gen transferi işlemleri ile sınırlı ölçüde gen aktarımı sağlandığı bildirilmiştir.^{26,27} Ancak, adenovirus vektörlerine karşı konakçının immün yanıtı sonucu oluşan pankreatit dolayısıyla kalıcı gen ekspresyonunun sağlanması zaten mümkün

olamamıştır. Hepatik dolaşımın blokajı sonrası gerçekleştirilen sistemik adenovirus enjeksiyonuyla da pankreatik beta hücrelerinin transdüksiyona uğradığı saptanmıştır.²⁸ Bunun yanı sıra hepatik arter, portal ven ve dalak arterinin ligasyonu sonrasında çölyak arterine enjeksiyonun fare pankreatik adacıklarının yüksek düzeyde ve etkin biçimde transdüksiyonunu sağladığı ileri sürülmüştür.

Pankreas beta hücrelerini transdüksiyona uğratabilen vektörler arasında AAV vektörü de vardır (Şekil 2.4). Ancak pankreasa ssAAV'nin direkt enjeksiyonu ile, terapötik etki gösterecek kadar yeterli pankreatik adacık transdüksiyonu gerçekleştirilememiştir.²⁹ Diğer yandan, dsAAV vektörleri, ssAAV vektörlerine kıyasla daha yüksek transdüksiyon etkinliğine sahiptir. C57BL10 farelerin pankreatik adacıklarında, uzun süreli ve güçlü bir gen ekspresyonu sağlamak amacıyla, dsAAV vektörleri kullanılarak üç farklı aktarım yolu (intraperitoneal, intraduktal ve intravenöz) etkinlik açısından birbirleriyle karşılaştırılmıştır.³⁰ İntravenöz olarak aktarılan dsAAV vektörlerinin birçoğu karaciğer tarafından süzülüşünden, bu aktarım yönteminde intraperitoneal enjeksiyonla yapılan aktarıma göre 5-10 kat daha az pankreatik transdüksiyon etkinliği gözlenmiştir. Buna rağmen, viral partiküllerin adacık içerisine difüzyonunda kısıtlamalar sebebiyle, intraperitoneal enjeksiyon ile yapılan aktarımda bile, merkezdeki hücrelere kıyasla adacığın periferik bölgesindeki hücrelerin primer olarak transdüksiyona uğradığı belirlenmiştir. İlginç bir şekilde, endoskopik retrograd kolanjiyopankreatografi olarak bilinen klinik tekniğe benzer bir yöntem olan retrograd pankreatik intraduktal aktarım stratejisi ile, intraperitoneal ve intravenöz aktarıma kıyasla pankreasta daha yüksek transdüksiyon etkinliği sağlanmıştır. Bu tekniğin fareler gibi küçük hayvanlarda uygulanması oldukça zor olduğundan, retrograd pankreatik intraduktal gen aktarım yönteminin intraperitoneal enjeksiyona kıyasla klinik uyumluluk ve fizibilite açısından değerlendirilebilmesi için deneysel testlerde sıçanların kullanılması daha iyi bir seçenek olacağı ileri sürülmüştür. Son olarak, pankreatik adacıklara, karaciğer dolaşımının geçici blokajı sağlanarak, intravenöz dsAAV vektör gen aktarımının etkinliği, C57BL10 farelerde test edilmiştir.³⁰ dsAAV vektörler kullanılarak pankreatik adacıklara yapılan intravenöz gen aktarımında pankreatik adacıklarda eşdağılımlı transgen ekspresyonu sağlandığı belirlenmiştir.

AAV ve adenovirusların dışında, retroviruslara oranla lentiviral vektörlerin in vitro kültür ortamında pankreas beta hücrelerini daha iyi transdüksiyona uğrattıkları bildirilmiştir (Şekil 4).^{31,32} Ayrıca lentiviral vektörlerle ex vivo ortamda transdüksiyona uğrattıkları pankreatik adacıkların in



ŞEKİL 4: Gen tedavi klinik denemelerinde başarıyla kullanılan viral vektörler.

vivo transplantasyon sonrasında transgen ekspresyonunu uzun süre muhafaza ettikleri de gösterilmiştir. Veziküler Stomatit Virus G protein (VSV-G) psödoproteinleştirilmiş HİV tabanlı lentiviral vektörlerin murine lökemi virusu, Ebola, kuduz ve Mokola virus glikoproteinleri ile psödoproteinleştirilmiş lentiviral vektörlere oranla in vitro kültür ortamında insan adacıklarına daha iyi gen nakli yapabildikleri belirlenmiştir.³³ Bunlara ek olarak, ex vivo lentivirus transdüksiyonunun pankreatik adacıkların yapısına ve fonksiyonuna zarar vermediği de saptanmıştır. Tüm bunlara rağmen pankreas adacıklarını hedefleyen lentivirus aracılı in vivo deneysel gen nakil çalışmaları adenoviruslar ve AAV vektörlerinde yapıldığı gibi henüz denenmemiş olup, bu deneylerin bir an önce başlatılması gerekmektedir.

VİRUS ARACILI İNSÜLİN GEN NAKLİ STRATEJİSİ

İnsülin gen tedavisinin esas amacı; hücreleri genetik olarak manipüle ederek insülinin sentezlenmesini, depolanmasını ve sekresyonunu sağlamak olsa da, mevzu bahis insülin gen transfer sistemi; tedavinin başarısını arttıracak bir takım anahtar özelliklere de sahip olmalıdır. İlk olarak sistem hedef organa etkin bir biçimde gen aktarımı yapabilmelidir. İkincisi, hedef organ GLUT2 ve GK gibi glukoz duyarlılık sistemini içermeli ve proinsülini insüline dönüştüren gerekli biyokimyasal enzimleri (prohormon konvertazları) içinde barındırmalıdır. Üçüncüsü, hedef hücreler depolama özelliğinin yanında glukoz ile regüle edilebilir sekretuar bir yolağa sahip olmalıdır. Dördüncüsü ve en sonuncusu da, insülin transgeninin transkripsiyonu hiperglisemiyle başlamalı ve hipoglisemiyle sonlandırılmalıdır. Etkili bir gen transfer metodu için gerekli şartlar düşünüldüğünde, insülin gen transfer denemelerinde hem viral hem de viral olmayan gen nakil metodlarının test edildiğini görmekteyiz.

Plazmid gibi viral olmayan vektörler viral vektörlere oranla çok daha düşük immünojenik yanıt oluşturmaları sebebiyle daha az yan etkilere sahip olmalarına rağmen, terapötik etkinliğin devamı için tekrarlayan uygulamalar ge-

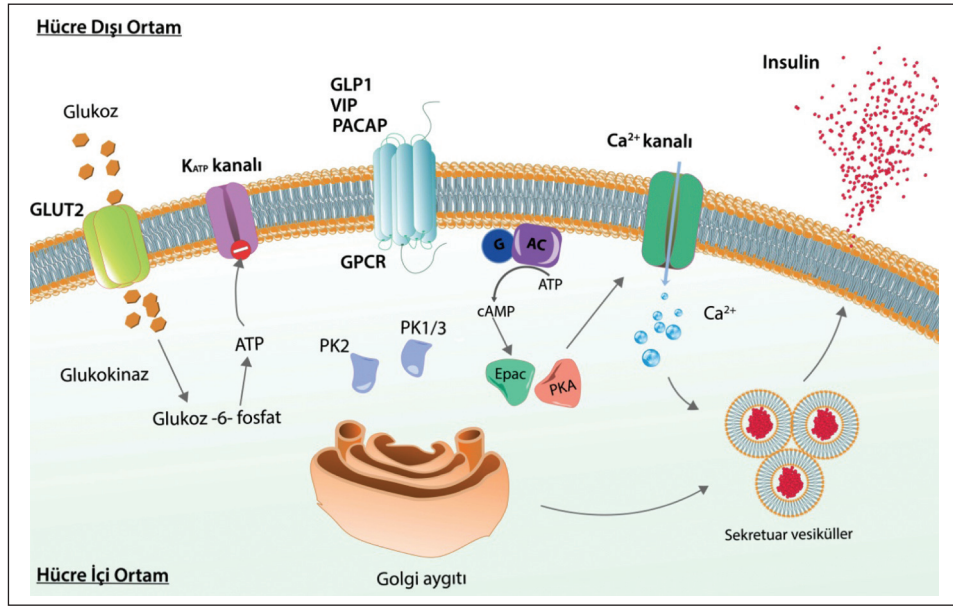
rektirir. Viral vektörlerin (Resim 4) viral olmayan vektörlere oranla gen transfer etkinlikleri tartışmasız çok daha yüksektir.³⁴ Bunlar arasında Adeno Assosiyatör Virus (AAV) en popüler vektörler arasında yer almaktadır. Özellikle yüksek dozlarda oldukça immünojenik ve toksik olan ilk jenerasyon adenoviruslara oranla AAV toksisiteye sebebiyet vermeden uzun süreli gen sentezi sağlama açısından yararlıdır.³⁵ Ancak rekombinant AAV (rAAV), yabancıl tip AAV gibi kendini 19. insan kromozomundaki spesifik bir bölgeye entegre edebilen bölgeye özgü entegrasyon özelliğinden yoksundur.^{36,37} Ayrıca 4.7 kb' den daha büyük transgenleri taşıma özelliğine sahip değildir.^{38,39} rAAV'nin karaciğer transdüksiyon etkinliği oldukça düşük olduğundan, rAAV aracılı insülin gen naklinin karaciğerdeki etkinliğini arttıran pek çok farklı yöntemler denenmiştir. Örneğin, kalsiyum fostat veya polietilenimin (PEI) ajanlarının rAAV vektörleriyle karışımı rAAV aracılı insülin gen naklinin karaciğerdeki etkinliğini arttırmasına rağmen, bu ajanlar membran hasarına yol açarak hücrelerde apoptoza sebebiyet verdikleri belirlenmiştir.⁴⁰ Ayrıca rAAV tarafından kodlanan transgenler vücuda verilmiş yoluna bağlı olarak immünojenik olabilirler. Bu sebeple tedavi etkinliğini kısıtlayacak AAV vektörlerine karşı gelişebilecek immün yanıtı kontrol altına alabilmek için hastaların ayrıca immün baskılayıcı ilaç kullanmaları da gerekebilir. Diğer taraftan yardımcı bağımlı ya da gutless adenoviruslar olarak bilinen 4. jenerasyon adenoviruslar üzerlerinde hiçbir viral gen taşımadıkları için antijenik özellikleri düşük olup büyük genleri üzerlerinde rahatlıkla taşıyacak kapasiteye sahiptirler.⁴¹ Bu vektörlerin in vivo transdüksiyon etkinlikleri oldukça iyi olup, uzun süreli transgen sentezi yapabilirler. Ancak yüksek dozda (titrede) üretilememeleri ve üretilmelerinin oldukça zor olması bu vektörlerin klinik kullanımlarını kısıtlayacak niteliktedir.

Mevcut viral vektörler arasında güvenlik, etkinlik ve uzun süreli gen sentezi düşünüldüğünde lentiviral vektörler en uygun gen nakil araçları gibi görünmektedir.^{42,43} Sadece bölünen hücreleri enfekte edebilen ve kanser oluşturma potansiyeli olan retroviruslara oranla hem bölünen hem de bölünmeyen hücreleri enfekte edebilme özellikleri ve güvenli olmaları nedeniyle lentiviruslar aslında bir tercih sebebidir. Lentivirus aracılı insülin gen nakli çalışmaları henüz başlangıç aşamasındadır. Örneğin, CMV promotörlü fürin kesim bölgesi insan insülini taşıyan lentivirusların terapötik etkinliği otoimmün diyabetik ve STZ-diyabetik ratlarda test edilmiştir.⁴⁴ Düşük doz lentivirus uygulanan hayvanlarda bir yıl kadar normogliseminin sağlanması, somatik gen nakli yoluyla endokrin olmayan hücrelerden (karaciğer) salınan insülinin

diyabeti geri dönüştürebileceğine işaret etmektedir. İnsülin gen naklinde kaydedilen bu gelişmeler en azından bu yöntemin hastaların bazal insülin ihtiyacını uzun süre karşılayabilecek düzeye geldiğini göstermektedir. Bu çalışmada olduğu gibi fürin kesim bölgeleri kullanarak beta hücresi olmayan hücrelerde (karaciğer) proinsülinin insüline dönüştürülmesi başarılı da, insülin gen sentezini ve sekresyonunu gün içerisinde sürekli değişen metabolik ihtiyaca göre ayarlayabilmek halen başlı başına halledilmesi gereken en önemli sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. Ayrıca bu çalışmada olduğu gibi insülin gen sentezi için CMV gibi sürekli aktif viral orijinli promotörler kullanmak deneklerde insüline bağlı hipoglisemi riskini ciddi düzeyde arttıracaktır. Nitekim söz konusu çalışmada insülin sentezi için seçilen hedef organ karaciğer olduğundan pankreas beta hücrelerine yönelik bir hedefleme de söz konusu olmamıştır.

Proinsülinin kontrollü transkripsiyonu ve translasyonu, regüle edilebilir bir sekretuar yol ve endüktif sekresyon, pankreatik beta hücrelerinin belirgin en temel özelliklerindedir (Şekil 5).⁴⁵ Hepatositlerde GK ve GLUT2'den oluşan bir glukoz algılama mekanizması bulunsa da, bu hücrelerde regüle edilebilir sekretuar bir yolak bulunmamaktadır. Buna ek olarak, nöro-endokrin hücrelerin sekretuar granüllerde insülin depolama yeteneği ve regüle edilebilir bir sekretuar yolağı olmasına rağmen glukoz algılama mekanizmalarından yoksundurlar. Bu nedenle, ne hepatositler ne de nöroendokrin hücreler, beta hücrelerinin yerine geçebilecek, onların fonksiyonlarını taklit edebilecek hücreler değildir. Ayrıca, beta hücresi yerine geçebilecek hücrenin ideal olarak, glukoz varlığında postprandial insülin sekresyon yanıtında önemli olan GLP-1 reseptörlerini sentez etmesi de beklenmektedir.⁴⁶ Bunun dışında, metabolik stres altında glukoz metabolizmasının PACAP ve VIP tarafından indüklenen metabolik yollar aracılığıyla kontrolü için nöronal bir girdi de gereklidir.⁴⁷ En önemlisi, insülinin, sitoplazmada mevcut olan sekretuar granüllerin boşaltılması ile, beta hücrelerinin stimülasyonunu takiben dakikalar içinde salınması gereklidir. Dolayısıyla, insülin sekresyon kinetiğinin çok hızlı olduğu açık ortadadır.

Hepatositlerde sürekli olarak protein sekresyonu gerçekleştirildiğinden, postprandial glukoz yükselmeleri ile baş edebilmek için yeterli miktarlarda ani insülinin salınımını sağlayabilmek oldukça zordur. Bu nedenle, postprandial glukoz seviyelerini düzenlemek için dizayn edilen rekombinant insülin, sinyal tanınmasını takiben, beta hücrelerinden atımlar halinde (havai fişek patlaması gibi) hızlı bir şekilde salınmalıdır. Ancak, yukarıda genel bilgiler kıs-



ŞEKİL 5: Pankreatik beta hücrenin yerine geçebilecek ideal hücrenin özellikleri. GLUT2 ve glukokinaz hücrenin glukoz sensörü olarak fonksiyon görür. Bunun yanında, beta hücre taklitçisinin regüle edilebilir bir sekretuar yolak içermesi, sitoplazmada insülin depolaması ve uyarımla bunu salması gerekmektedir. Glukagon Benzeri Peptid 1 (GLP-1), Vazoaktif İntestinal Peptid (VIP) ve Pitiüiter Adenilat Siklaz Aktive Edici Polipeptid (PACAP) yanıt verebilmek için ilgili reseptörleri sentez edebilmelidir. Resimde ayrıca glukoz indüklü insülin salınımına aracılık eden anahtar moleküller de gösterilmiştir. Kısaca özetlemek gerekirse, kan şekeri seviyesi 5,5 mM ve üzeri olduğunda glukoz beta hücrelerine GLUT2 taşıyıcıları aracılığıyla girerek, GK tarafından fosforillenir. Glikoliz ATP/ADP oranını artırarak K kanallarının (K Ch) aktivasyonunu sağlar ve sonuçta membran depolarizasyonu gerçekleşir. Kalsiyum kanallarının açılması (Ca Ch) hücre içine kalsiyum dolmasına sebebiyet verir ve böylece insülin salınımı gerçekleşir. İncretin etkili moleküller (GLP-1, VIP ve PACAP), G protein interaktif reseptörler (GPCR) aracılığıyla glukoz indüklü insülin sekresyonunu artırır.

mında bahsedildiği gibi pankreas dışı organlarda (karaciğer vb.) farklı promotörler kullanılarak yapılan insülin gen nakli çalışmalarında transkripsiyonel aktivasyona bağlı insülin sekresyonu, dakikalar değil saatler sonra gerçekleşmektedir. İnsülin, salınmadan önce beta hücreleri içindeki sekretuar granüllerde depolandığından, gen aktarımı yoluyla fizyolojik olarak kontrol edilen insülin üretiminin başarılması için, bu granüllerden insülin sekresyonunun regülasyonu da gereklidir. Dolayısıyla, insülin sekresyonunun direkt kontrolü, transkripsiyonel yolla kan glukozunun kontrolünden daha hızlı bir ayar sağlar.⁴⁸ Bu da şu an için başlıca pankreas beta hücrelerinde var olan bir mekanizmadır.

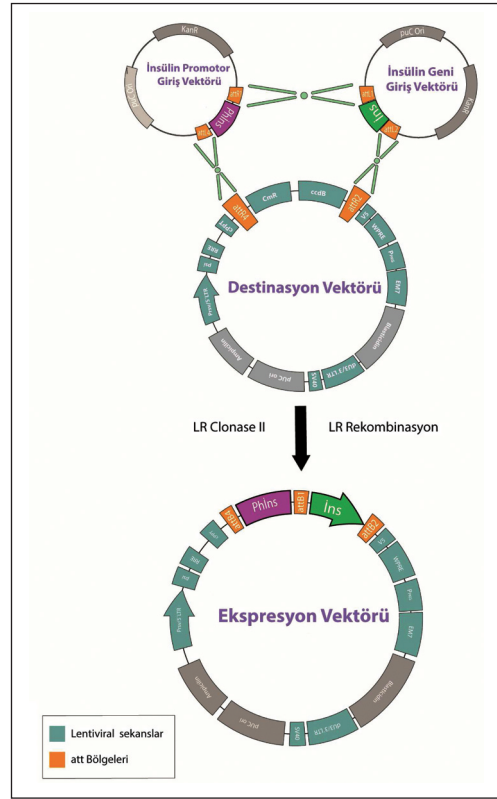
Bunun dışında, preproinsülin mRNA'sının yarı ömrü, gerçek beta hücrelerinde 24 saat, beta hücrelerinin yerine geçme potansiyeli olan temsili hücrelerde ise 6 saat kadardır. Benzer şekilde transkripsiyonel inhibisyonla insülin sentezinin sonlandırılması yine oldukça yavaş gerçekleşen bir süreçtir. Her halükarda sinyalin sonlanmasını takiben insülin sekresyonunun da dakikalar içinde durması beklenmektedir. Preproinsülin mRNA'sının stabilitesi ve işlenmesinin kontrolünde beta hücrelerine spesifik faktörler rol aldığından, preproinsülin cDNA'sı kodlayan gen tedavi vektörleri, beta hücrelerinin yerine geçme potansiyeli olan

temsili hücrelerde arzu edilen düzeyde regülatör kontrolün gerçekleşebilmesi için yukarıda belirtilen tüm durumlar göz önüne alınarak dikkatlice tasarlanmalıdır.

Şimdiye kadar gerçekleştirilen deneysel insülin gen nakli çalışmalarının çoğunda insülin gen sentezi için seçilen hedef organlar başta karaciğer olmak üzere genelde pankreas dışı organlar olmuştur. Bunun ana gerekçesi olarak Tip 1 diyabet hastalığında beta hücrelerine karşı gelişen özellikle hücre immün yanıtın varlığı gösterilse de pankreasın hassas bir organ olması ve pankreas gen nakli konusundaki çalışmaların azlığı da bu duruma neden olan faktörler arasında sayılabilir. Diğer taraftan deneysel insülin gen nakli çalışmalarında genelde karaciğerin seçilmesinin asıl sebebi, kolayca ulaşılabilir olması, intravenöz enjeksiyondan sonra hepatositlerin viral vektörler tarafından kolayca transdüksiyona uğratılmaları, ayrıca terapötik proteinlerin üretilip sistemik dolaşıma salınabilmesi sayılabilir. Unutmamak gerekir ki vücudumuzda glukoz duyarlı iki organdan biri pankreas diğeri ise karaciğerdir. Nedeni ne olursa olsun gerçekleştirilen deneysel insülin gen nakli çalışmalarında yukarıda sayılan sebeplerle (gerek gen naklinde kullanılan vektörün uygunsuzluğu gerekse seçilen hedef organın beta hücre özelliklerini taşıyamaması sebebiyle) istenen başarı bir türlü yakalanamamıştır.

İnsan insülin promotörünün transkripsiyon faktörleri ile etkileşiminde glukoz düzeyinin anahtar rol oynadığı bilinmektedir. Bu sayede HIP kontrolündeki bir genin sentez seviyesi ortamdaki glukoz miktarına cevap olarak arttırılabilmekte ya da azaltılabilmektedir. 1980 yılında Bell ve arkadaşları tarafından insan insülin geni sekanslanmış ve promotör bölgesi de dahil olmak üzere bir plazmidde kopyalanmıştır.⁴⁹ Sonrasında birçok farklı grup tarafından yapılan çalışmalar insülin promotörünün fonksiyonel kısımlarının belirlenebilmesini sağlamıştır ve nitelik fonksiyonel insan insülin promotör dizisi S99616 erişim kodu ile NCBI veri tabanına kaydedilmiştir.

T1DM hastalarında otoimmün saldırı neticesinde pankreatik beta hücrelerinin yıkımı söz konusudur. Bununla beraber beta hücrelerinin tamamının yok olmadığı, belli bir oranda beta hücre kitlesinin korunduğu bilinmektedir. Bu noktada pankreasa yönlendirilmiş; insan insülin promotörlü (transkripsiyonel hedefleme) doğal proinsülin sekansı taşıyan viral gen nakil vektörlerinin geliştirilmesi tip 1 diyabet tedavisi için etkin sonuçlar sağlayabilir. Oluşturulacak vektörler, sürekli alınması gereken insülin preparatlarının aksine tek doz ile uzun süreli, glukoz kontrollü insülin salınımı sağlarken aynı zamanda insülin preparatlarında bulunmayan C-peptit eksiliğini de giderme potansiyeline sahip olacaktır. Bu vektörler geliştirilirken dikkat edilmesi gereken hususlar, kalıcı gen ekspresyonunun sağlanması, toksisite göstermemesi ve immün yanıt oluşturmaması şeklinde sıralanabilir. Bir vektörün kalıcı gen ekspresyonu sağlaması için hedef hücre genomuna entegre olması gereklidir. Entegrasyon yeteneği olan vektörler arasında hem bölünen hem de bölünmeyen hücreleri enfekte edebilmesi, immünojenik cevap uyandırmaksızın hedef hücreye girebilmesi ve entegrasyon sonrasında mutageneze yol açmaması nedeniyle lentiviral vektörler en cazip aday olarak öne çıkmaktadır. 3. nesil integrasyon sonrası inaktif olan (SIN) lentiviral vektörler, yabancı tip HIV-1 enfeksiyonu sonrasında bile vektör mobilizasyonunun gözlenmediği güvenilir bir gen aktarım aracı olarak görülmekte, bu nedenle in vivo çalışmalarda tercih edilmektedir. Gateway teknolojisi moleküler biyoloji alanında gen klonlama çalışmalarında sıklıkla kullanılan uygulaması kolay, verimliliği yüksek bir yöntemdir. Gateway teknolojisinin avantajlarından faydalanılarak insülin promotörü kontrolünde proinsülin sentezleyen 3. nesil lentiviral vektörler rahatlıkla oluşturulabilir. Bunun için öncelikle insülin promotörünü ve proinsülin sekansını taşıyan giriş vektörleri oluşturulur. Ardından giriş vektörleri multisite gateway teknolojisi ile lentiviral paketleme dizilerine sahip bir destinasyon vektörüne aktarılarak insülin ekspresyon vektörü elde edilir (Şekil 6). Bu noktada geliştirilecek lentivi-



ŞEKİL 6: Multisite Gateway teknolojisi kullanarak 3. jenerasyon lentiviral transfer plazmidlerin oluşturulma mekanizması. Biri insülin promotörü ve diğeri proinsülin sekansı taşıyan giriş vektörlerindeki genler LR Clonase II enzimi varlığında rekombinasyon reaksiyonları ile destinasyon vektörüne aktarılır. Ekspresyon klonu olarak da adlandırılan bu vektörler, transfer plazmidleri olarak paketleme plazmidleriyle birlikte lentivirus üretiminde kullanılır.

ral insülin gen nakil vektörlerinin etkinlikleri, NOD farelerde veya çoklu düşük doz STZ ile geliştirilecek tip 1 diyabetik sıçan modellerinde gözlenebilir.

SONUÇ

İnsülin gen naklinin Tip 1 diyabet açısından her ne kadar yararlı etkiler sergilemesi beklense de insülin enjeksiyonunun Tip 1 diyabetik hastalarda hastalığı tedavi etmediği, sadece diyabetik komplikasyonları geciktirdiği bilinir. Aslında tip 1 diyabetin tedavisi için hastalarda otoimmün yanıtın da baskılanması gerekmektedir. Gerek maliyeti ve gerekse yan etkileri sebebiyle bugün için Tip 1 diyabetli hastalara bağımsızlık sistemlerini baskılayıcı ilaç kullanımı önerilmemektedir. Dolayısıyla, insülin gen terapisinin tek başına ana hedefi Tip 1 diyabeti kökünden tedavi etmek değil, hedef dokularda insülin gen ekspresyonu sağlamak, periferik dokulara glukoz alımını arttırmak, glukagon sekresyonunu baskılamak ve hiperglisemiyi düşürmek amacıyla hepatik glukoz üretimini inhibe etmek olarak

tanımlanır.¹ İnsülin aynı zamanda bir büyüme faktörü olduğundan pankreasa özgü insülin gen sentezinin tahribata uğramış beta hücrelerinin rejenerasyonuna ve sağ kalanların da proliferasyonuna sebebiyet vererek diyabet gelişimini yavaşlatacağını beklemekteyiz. Bunun yanı sıra Tip 1 diyabet gelişiminin daha etkili engellenebilmesi amacıyla insülin gen nakline ek olarak beta hücrelerine zarar veren aktif otoimmün sistem hücrelerinin de ilave gen nakli yöntemleriyle baskılanması (durdurulması) gerekebilir. Vazoaktif intestinal peptit (VİP), vücutta regülatör T hücre oluşumuna sebebiyet vererek otoimmün yanıtı baskılayan,

immün tolerans oluşturan bir peptittir.⁵⁰ Lentiviral insülin gen nakil vektörleri ile lentiviral VİP gen nakil vektörlerinin kombine kullanımı insülin ihtiyacının karşılanması ile beraber otoimmün saldırının engellenmesini sağlayarak tip 1 diyabet tedavisi noktasında etkin bir çözüm yolu sunabilmektedir.

Teşekkür

Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Komisyonu ve Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK-215S820)'nun yardımlarıyla desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

- Bansal P, Wang Q. Insulin as a physiological modulator of glucagon secretion. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2008;295: E751-761.
- Marcin JP, Kuppermann N, Tancredi DJ, Glaser NS. Insulin administration for treatment of pediatric diabetic ketoacidosis: are lower rates of infusion beneficial? *Pediatr Crit Care Med.* 2011;12: 217-19
- Federation I. IDF Diabetes Atlas Eighth Edition 2017.
- Pietropaolo M, Barinas-Mitchell E, Kuller LH. The heterogeneity of diabetes: unraveling a dispute: is systemic inflammation related to islet autoimmunity? *Diabetes.* 2007;56:1189-97.
- Ginsberg BH. The role of technology in diabetes therapy. *Diabetes Care.* 1994;17 Suppl 1:50-5.
- Hirsch IB. Insulin analogues. *N Engl J Med.* 2005;352:174-183.
- Sanlioglu AD, Altunbas HA, Balci MK, Griffith TS, Sanlioglu S. Clinical utility of insulin and insulin analogs. *Islets.* 2013;5:67-78.
- Heise T, Pieber TR. Towards peakless, reproducible and long-acting insulins. An assessment of the basal analogues based on isoglycaemic clamp studies. *Diabetes Obes Metab.* 2007;9:648-59.
- Ashwell SG, Gebbie J, Home PD. Twice-daily compared with once-daily insulin glargine in people with Type 1 diabetes using meal-time insulin aspart. *Diabet Med.* 2006;23:879-86.
- Kurtzhals P, et al. Correlations of receptor binding and metabolic and mitogenic potencies of insulin analogs designed for clinical use. *Diabetes.* 2000;49:999-1005.
- Hemkens LG, et al. Risk of malignancies in patients with diabetes treated with human insulin or insulin analogues: a cohort study. *Diabetologia.* 2009;52:1732-44.
- Sanlioglu AD, Altunbas HA, Balci MK, Griffith TS, Sanlioglu S. Insulin gene therapy from de-
- sign to beta cell generation. *Expert Rev Mol Med.* 2012;14:e18.
- Chan L, Fujimiya M, Kojima HJ. In vivo gene therapy for diabetes mellitus. 2003;9:430-5.
- Moore HP, Walker MD, Lee F, Kelly RB. Expressing a human proinsulin cDNA in a mouse ACTH-secreting cell. Intracellular storage, proteolytic processing, and secretion on stimulation. *Cell.* 1983;35:531-8.
- Auricchio A, et al. Constitutive and regulated expression of processed insulin following in vivo hepatic gene transfer. *Gene Ther.* 2002;9:963-71.
- Vollenweider F, Kaufmann J, Irminger JC, Halban PA. Processing of proinsulin by furin, PC2, and PC3 in (co) transfected COS (monkey kidney) cells. *Diabetes.* 1995;44:1075-80.
- Simonson GD, Groskreutz DJ, Gorman CM, MacDonald MJ. Synthesis and processing of genetically modified human proinsulin by rat myoblast primary cultures. *Hum Gene Ther.* 1996;7:71-8.
- Lu D, Tamemoto H, Shibata H, Saito I, Takeuchi T. Regulatable production of insulin from primary-cultured hepatocytes: insulin production is up-regulated by glucagon and cAMP and down-regulated by insulin. *Gene Ther.* 1998;5:888-95.
- Han J, McLane B, Kim EH, Yoon JW, Jun HS. Remission of diabetes by insulin gene therapy using a hepatocyte-specific and glucose-responsive synthetic promoter. *Mol Ther.* 2011;19:470-8.
- Alam T, Sollinger HW. Glucose-regulated insulin production in hepatocytes. *Transplantation.* 2002;74:1781-7.
- Chen R, Meseck M, McEvoy RC, Woo SL. Glucose-stimulated and self-limiting insulin production by glucose 6-phosphatase promoter driven insulin expression in hepatoma cells. *Gene Ther.* 2000;7:1802-9.
- Dong H, Woo SL. Hepatic insulin production for type 1 diabetes. *Trends Endocrinol Metab.* 2001;12:441-6.
- Cheung AT, et al. Glucose-dependent insulin release from genetically engineered K cells. *Science.* 2000;290:1959-62.
- Dirice E, et al. Adenovirus-mediated TRAIL gene (Ad5hTRAIL) delivery into pancreatic islets prolongs normoglycemia in streptozotocin-induced diabetic rats. *Hum Gene Ther.* 2009;20:1177-89.
- Sanlioglu AD, et al. Molecular mechanisms of death ligand-mediated immune modulation: A gene therapy model to prolong islet survival in type 1 diabetes. 2008;104:710-20.
- Raper SE, DeMatteo RP. Adenovirus-mediated in vivo gene transfer and expression in normal rat pancreas. *Pancreas.* 1996;12:401-10.
- Taniguchi H, et al. beta-cell neogenesis induced by adenovirus-mediated gene delivery of transcription factor pdx-1 into mouse pancreas. *Gene Ther.* 2003;10:15-23.
- Ayuso E, et al. In vivo gene transfer to pancreatic beta cells by systemic delivery of adenoviral vectors. *Hum Gene Ther.* 2004;15: 805-12.
- Wang AY, Peng PD, Ehrhardt A, Storm TA, Kay MA. Comparison of adenoviral and adeno-associated viral vectors for pancreatic gene delivery in vivo. *Hum Gene Ther.* 2004;15:405-13.
- Wang Z, et al. Widespread and stable pancreatic gene transfer by adeno-associated virus vectors via different routes. *Diabetes.* 2006;55:875-84.
- Giannoukakis N, et al. Infection of intact human islets by a lentiviral vector. *Gene Ther.* 1999;6:1545-51.
- Leibowitz G, et al. Gene transfer to human pancreatic endocrine cells using viral vectors. *Diabetes.* 1999;48:745-753.

33. Kobinger GP, et al. Transduction of human islets with pseudotyped lentiviral vectors. *Hum Gene Ther.* 2004;15:211-9.
34. Wong MS, Hawthorne WJ, Manolios N. Gene therapy in diabetes. *Self Nonself.* 2010;1:165-75.
35. Sanlioglu S, Monick MM, Luleci G, Hunninghake GW, Engelhardt JF. Rate limiting steps of AAV transduction and implications for human gene therapy. *Curr Gene Ther.* 2001;1:137-47.
36. 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.* 1999;10:591-602.
37. Sanlioglu S, Engelhardt JF. Cellular redox state alters recombinant adeno-associated virus transduction through tyrosine phosphatase pathways. *Gene Ther.* 1999;6:1427-37.
38. 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.* 2000;268:68-78.
39. Sanlioglu S, et al. Endocytosis and nuclear trafficking of adeno-associated virus type 2 are controlled by rac1 and phosphatidylinositol-3 kinase activation. *J Virol.* 2000;74:9184-96.
40. Hsu PY, Yang YW. Effect of polyethylenimine on recombinant adeno-associated virus mediated insulin gene therapy. *J Gene Med.* 2005;7:1311-21.
41. Palmer DJ, Ng P. Helper-dependent adenoviral vectors for gene therapy. *Hum Gene Ther.* 2005;16:1-16.
42. Tasyurek HM, Altunbas HA, Balci MK, Griffith TS, Sanlioglu S. Therapeutic Potential of Lentivirus-Mediated Glucagon-Like Peptide-1 Gene Therapy for Diabetes. *Hum Gene Ther.* 2018;29:802-15.
43. Tasyurek HM, Altunbas HA, Balci MK, Griffith TS, Sanlioglu S. Therapeutic Potential of Lentivirus-Mediated Glucagon-Like Peptide-1 Gene Therapy for Diabetes. 2018;29:802-15.
44. Elsner M, et al. Reversal of diabetes through gene therapy of diabetic rats by hepatic insulin expression via lentiviral transduction. 2012;20:918-26.
45. Tasyurek HM, Altunbas HA, Balci MK, Sanlioglu S. Incretins: their physiology and application in the treatment of diabetes mellitus. *Diabetes Metab Res Rev.* 2014;30:354-71.
46. Tasyurek MH, Altunbas HA, Canatan H, Griffith TS, Sanlioglu S. GLP-1-mediated gene therapy approaches for diabetes treatment. *Expert Rev Mol Med.* 2014;16:e7.
47. Sanlioglu AD, Karacay B, Balci MK, Griffith TS, Sanlioglu S. Therapeutic potential of VIP vs PACAP in diabetes. *J Mol Endocrinol.* 2012;49:R157-67.
48. Rivera VM, et al. Regulation of protein secretion through controlled aggregation in the endoplasmic reticulum. *Science.* 2000;287:826-30.
49. Bell G, et al. Sequence of the human insulin gene. *Nature.* 1980;284:26-32.
50. Sanlioglu A, Karacay B, Balci M, Griffith T, Sanlioglu S. Therapeutic potential of VIP vs PACAP in diabetes. *J Mol Endocrinol.* 2012;49:R157-67.