



ACIBADEM MEHMET ALİ AYDINLAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DUCHENNE MÜSKÜLER DİSTROFİSİ (DMD), GENETİK KAS
ZAYIFLIĞI HASTALIĞINDA GEN TERAPİSİ**

SELEN ABANUZ
DOKTORA TEZİ

BİYOKİMYA VE MOLEKÜLER BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Ahmet Tarık Baykal

İSTANBUL-2023



ACIBADEM MEHMET ALİ AYDINLAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DUCHENNE MÜSKÜLER DİSTROFİSİ (DMD), GENETİK KAS
ZAYIFLIĞI HASTALIĞINDA GEN TERAPİSİ**

SELEN ABANUZ
DOKTORA TEZİ

BİYOKİMYA VE MOLKÜLER BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Ahmet Tarık Baykal

İSTANBUL-2023

Anabilim Dalı:	Tıbbi Biyokimya ve Moleküler Biyoloji
Program:	Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Doktora
Tez Başlığı:	Duchenne Musküler Distrofisi, genetik kas zayıflığı hastalığında gen terapisi
Öğrencinin Adı-Soyadı:	Selen Abanuz
Savunma Sınavı Tarihi:	21/03/2023

Bu tez çalışması jürimiz tarafından Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Üye (Jüri Başkanı)	Prof., Aysel Özpınar Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi	İmza
Üye (Tez Danışmanı)	Prof., Ahmet Tarık Baykal Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi	İmza
Üye	Dr. Öğr. Üyesi, Ceyda Açılan Koç Üniversitesi	İmza
Üye	Prof., Fehime Aksungar Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi	İmza
Üye	Dr. Öğr. Üyesi, Cihan Taştan Üsküdar Üniversitesi	İmza

BEYAN

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

14.03.2023

Selen Abanuz Eren

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Doktora tez çalışmam süresince yardımları, desteği ve bilgisiyle yanımda olan sanayi danışmanım Prof. Dr. Ercüment Ovalı'ya, tez çalışması boyunca görüşlerini ve katkısını esirgemeyen akademik danışmanım Prof. Dr. Ahmet Tarık Baykal'a teşekkür ederim. Tüm çalışmalardaki bilgisini ve desteğini asla esirgemeyen Cihan Taştan'a ve tüm Acıbadem Labcell ekibine çok teşekkür ederim. Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi Biyokimya Ana Bilim Dalındaki değerli hocalarıma teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamı destekleyen Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonuna (Karar No: 2021/04/03) ve TÜBİTAK 2244 üniversite-sanayi iş birliği (118C082) doktora programına teşekkür ederim. Tezimde immünohistokimya deneylerine verdikleri destek ve özenden ötürü Mustafa Öztatlıcı'ya teşekkür ederim.

Doktora yıllarımı birlikte geçirdiğim ve her zaman desteklerini esirgemeyen canım arkadaşlarım Zelal Zuhal Kaya, Sevdican Üstün Yılmaz ve Kevser Buse Karadeniz'e ve tüm eğitim süresince her zaman maddi ve manevi destekleriyle yanımda olan canım ailem ve canım eşim Uğurcan Eren'e teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	iii
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR.....	iv
KISALTMA VE SİMGELER LİSTESİ	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	X
ÖZET.....	1
ABSTRACT	2
1 GİRİŞ VE AMAÇ.....	3
2 GENEL BİLGİLER	6
2.1 Duchenne Müsküler Distrofisi.....	6
2.1.1 Etiyoloji.....	6
2.1.2 Distrofin ve distrofinle ilişkili glikoprotein kompleksindeki rolü	7
2.1.3 Distrofin geni ve mutasyonlar	10
2.1.4 İnsidans	12
2.1.5 Semptom ve teşhis	13
2.1.6 Doğum öncesi tanı	15
2.1.7 Türleri	15
2.1.8 Tedavi.....	16
2.2 Gen Terapi.....	19
2.2.1 DMD gen terapisi	19
2.2.2 DMD gen tasarımı.....	21
2.3 DMD Fare Modeli.....	23
3 GEREÇ VE YÖNTEM	26
3.1 Gereç	26
3.2 Yöntem.....	29
3.2.1 Lv-HSA-µDys/eGFP lentivirus üretimi ve etkinlik testleri	29
3.2.1.1 Plazmid tasarımı	29
3.2.1.2 Tranformasyon ve plazmid izolasyonu	31
3.2.1.3 Jel elektroforez	32
3.2.1.4 Transfeksiyon ve lentivirüs üretimi.....	32
3.2.1.5 Lentivirüs titre hesaplama	33
3.2.1.6 Replikatif kompetan lentivirüs tayini	34

3.2.1.7	In vitro HSA promotör testi.....	35
3.2.1.7.1	PKMH izolasyonu.....	35
3.2.1.7.2	HSA promotör testi	35
3.2.1.8	In vitro sitotoksisite testi.....	35
3.2.1.9	Transdüksiyon.....	36
3.2.1.9.1	Yöntem 1.....	36
3.2.1.9.2	Yöntem 2.....	36
3.2.2	Deney hayvanlarının temini ve bakımı	36
3.2.2.1	Hayvan deneylerinin planlanması	37
3.2.2.1.1	Güç (Power) analizi	37
3.2.2.2	Dmd-mdx-4Cv farelerin doğrulanması.....	38
3.2.2.3	Lv-HSA-µDys/eGFP enjeksiyon için grupların belirlenmesi.....	38
3.2.2.3.1	18 aylık dmd-mdx-4cv farelere uygulama.....	39
3.2.2.3.2	4 haftalık dmd-mdx-4cv farelere uygulama.....	40
3.2.2.3.3	10 aylık dmd-mdx-4cv farelere uygulama.....	41
3.2.2.4	Motor performans analizi	42
3.2.2.4.1	Kavrama gücü testleri.....	42
3.2.2.4.2	Rotarod testi (Rotarod Running).....	43
3.2.2.4.3	Ayak izi analiziyle yürüyüş testi (Footprint).....	43
3.2.2.4.4	Tracking testi	43
3.2.2.5	Sonlandırma	44
3.2.2.6	Kan analizi	44
3.2.2.7	İmmünohistokimyasal analizler.....	45
3.2.2.7.1	Kalp ve iskelet kası dokularının alınması ve parafin doku takibi	45
3.2.2.7.2	Kalp ve iskelet kası dokularından kesitlerin alınması ve morfolojik analizi	46
3.2.2.7.3	Kalp ve iskelet kası dokularının immünohistokimyasal analizi.....	46
3.2.2.8	Toksisite analizi	47
3.2.2.9	Protein ekspresyonunun incelenmesi	47
3.2.2.9.1	LC-MS/MS ile protein analizi	48
3.2.2.9.2	Protein ekstraktlarının diyalizi	48
3.2.2.9.3	Triptik peptitlerin hazırlanması	48
3.2.2.9.4	Kromatografik ayrıştırma	48
3.2.2.9.5	MS ve MS/MS deney kurulumu	49
3.2.2.10	RT-qPCR.....	49
3.2.3	İstatistiksel analizler	50

4 BULGULAR..... 52

4.1	Lv-HSA-µDys/eGFP Lentivirus Üretimi ve Etkinlik Testleri Sonuçları....	52
4.1.1	In vitro HSA promotör testi sonucu.....	55
4.1.2	Sitotoksisite testi sonucu	56
4.1.3	2 farklı yöntem ile transdüksiyon denemesini sonuçları	57
4.2	In Vivo Deney Hayvanları	59
4.2.1	18 aylık dmd-mdx-4Cv farelerin gen terapisi sonuçları.....	59
4.2.1.1	Motor performans analizi	59
4.2.1.2	Tedavi sonrası kandan serum analizi.....	62
4.2.1.3	Karaciğer ve dalağın fizyolojik ve histopatolojik incelenmesi.....	62

4.2.2	4 haftalık dmd-mdx-4cv farelerin gen terapisi sonuçları.....	64
4.2.2.1	Motor performans analizi	64
4.2.2.2	Tedavi sonrası kandan serum analizi.....	66
4.2.2.3	Distrofin ifadesinin q-RT-PCR ile incelenmesi	67
4.2.2.4	Karaciğer ve dalağın fizyolojik ve histopatolojik incelenmesi.....	68
4.2.2.5	LC-MS/MS ile kastaki proteinlerin tanımlanması	70
4.2.3	10 aylık dmd-mdx-4cv sonuçları.....	82
4.2.3.1	Motor performans analizi	83
4.2.3.2	Tedavi sonrası kandan serum analizi.....	84
4.2.3.3	Distrofin ifadesinin q-RT-PCR ve immünohistokimya ile incelenmesi	85
4.2.3.4	Karaciğer ve dalağın fizyolojik ve histopatolojik incelenmesi.....	87
5	TARTIŞMA.....	92
6	SONUÇ	101
7	KAYNAKLAR.....	103
8	EKLER	116
EK 1:	Mezankimal Kök Hücre Donör Onam Formu	116
EK 2:	ATADEK Etik Kurul Kararı.....	118
EK 3:	ACU-HADYEK Etik Kurul Kararı.....	121
9	ÖZGEÇMİŞ	123

KISALTMA VE SİMGELER LİSTESİ

α	Alfa
β	Beta
BBB	Kan-Beyin Bariyeri
BMD	Becker Müsküler Distrofi
CK	Kreatin Kinaz
CNS	Merkezi Sinir Sistemi
CT	C-Terminal
CR	Sistein Açısından Zengin
$^{\circ}\text{C}$	Derece Santigrat
DAB	Diaminobenzidin
Dbr	Distrobrevin
DEHAM	Deney Hayvanları Merkezi
DGC	Distrofin ile İlişkili Glikoprotein Kompleksi
δ	Delta
Δ	Delta
dk	Dakika
DMD	Duchenne Müsküler Distrofi
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
DPBS	Dulbecco'nun Fosfat Tuz Çözeltisi
eGFP	Yeşil Floresan Protein
γ	Gama
g	Gravite
HIV-1	İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü-1
HSA	İnsan Alpha-İskelet Aktin
IFU	Infectious Unit
IM	İntramüsküler
IP	İntraperitoneal
kb	Kilobaz
kDa	Kilodalton
LC-MS/MS	Likit Kromatografi-Kütle Spektrometresi

μ	Mikro
mA	Miliamper
MKH	Mezankimal Kök Hücre
μl	Mikrolitre
MLPA	Multipleks Ligasyona Bağlı Prob Amplifikasyonu
mRNA	Haberci Ribonükleik Asid
MOI	Multiplicity of Infection
MTT	3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazolyum Bromür
nm	Nanometre
nNOS	Nöronal Nitrik Oksit Sentaz
NT	N-Terminal
OD	Optik Densite
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyon
pDNA	Plazmit DNA
PKMH	Periferik Kan Mononükleer Hücresi
RCL	Replikatif Kompetan Lentivirüs
RNA	Ribonükleik Asid
rpm	Dakikadaki Dönme Sayısı
RT-qPCR	Gerçek Zamanlı-Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu
TAE	Tris Asetik Asit EDTA
TU	Transducing Unit
%	Yüzde

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Distrofin ve distrofin ile ilişkili glikoprotein kompleksinin (DGC) şematik taslağı (35).....	10
Şekil 2. pLv-HSA-μDys/eGFP plazmid.....	30
Şekil 3. psPAX2 plazmid.	30
Şekil 4. pCMV-VSV-G plazmid.	31
Şekil 5. Lentivirüs üretimi.....	33
Şekil 6. Lentivirüs titrasyonu için 96 plaka hücre ekimi.	34
Şekil 7. Örneklem büyüklüğünün (n) ve gücün herhangi bir kombinasyonu için tespit edilebilen ortalama farklılıkları.....	37
Şekil 8. Tedavi uygulanacak dmd-mdx-4Cv fare grupları için enjeksiyon zamanları.	38
Şekil 9. Enjeksiyon sonrası her grupta yapılacak olan motor performans analizleri (Created with BioRender.com).	42
Şekil 10. Sakrifikasyon sonrası A. Serum elde edildikten sonra CK, AST, LDH ölçümü, B. Dokular parafine gömüldükten sonra immunohistokimya/ toksikoloji analizleri, C. Kas dokusunda LC-MS/MS analizi, D. Kas ve Kalp dokusu kullanılarak gerçek zamanlı-kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (RT-qPCR) analizi. (Created with BioRender.com)	44
Şekil 11. LC-MS/MS deneyine hazırlık aşamaları. (Created with BioRender.com).	49
Şekil 12. q-RT-PCR deneyine hazırlık aşamaları. (Created with BioRender.com)... ..	50
Şekil 13. Plazmidlerin jel elektroforez görüntüsü. Gel Doc™ EZ Imager cihazında elde edilmiştir.	53
Şekil 14. Lentivirüs üretimi sonrası Lenti-X™ Gostix™ sonucu.....	53
Şekil 15. Lv-HSA-μDys/eGFP lentivirüs titre hesaplama A. 1. Üretim QuickTiter™ Lentivirus Titer (Lentivirus Associated HIV p24) Elisa kiti sonucu, B. 2. üretim QuickTiter™ Lentivirus Titer (Lentivirus Associated HIV p24) Elisa kiti sonucu C. 72 saat inkübasyon sonrası akım sitometri cihazı ile eGFP ölçümü.....	54
Şekil 16. HSA leakage promotör testi akım sitometri sonuçları. A. HEK293T B. Jurkat C. Vero D. PKMH hücrelerinde akım sitometri sonuçları E. Tüm hücre hatlarını % olarak karşılaştırılması. Sonuçlar ortalama ± SD olarak gösterildi. **p<0,01	55

Şekil 16. HSA leakage promotör testi akım sitometri sonuçları. A. HEK293T B. Jurkat C. Vero D. PKMH hücrelerinde akım sitometri sonuçları E. Tüm hücre hatlarını % olarak karşılaştırılması. Sonuçlar ortalama $\pm$ SD olarak gösterildi. **p<0,01 (Devamı)	56
Şekil 17. Sitotoksite deneyinin absorbans değerleri grafiği. 450 nm’de okutuldu. Sonuçlar ortalama $\pm$ SD olarak gösterildi.	57
Şekil 18. Transdüksiyon sonrası 3. günde eGFP ekspresyon sonuçları A. 1 yöntem ile yapılan transdüksiyon sonrası, B. 2. yöntem ile yapılan transdüksiyon sonrası akım sitometrisindeki yüzdesel değerleri.	58
Şekil 19. Dmd-mdx-4Cv farelerinde yeni nesil dizileme sonuçları. Toplam da 3 erkek ve 6 dişi dmd-mdx-4Cv faresi kullanıldı.	59
Şekil 20. Lentivirüs kodlayan mikro-distrofın uygulamasından sonra motor performans analizi. A. IM/IP grubu kavrama gücü testi. B. IM grubu askı testi. C. IP grubu askı testi. D. 12. hafta ayak izi testi. E. 24. hafta ayak izi testi. F. Hız testi. G. Hareket edilen mesafeyi izleme testi. H. Hareketi testi. I. Hareket etmeme testi. J. 6. hafta tracking testi Ethovision XT9 programındaki görüntüler. Ethovision XT9 programı kullanıldı. Test bağımsız olarak üç kez tekrarlandı. Sonuçlar ortalama $\pm$ SD olarak gösterildi. *p <0,05, ***p<0,001	60
Şekil 20. Lentivirüs kodlayan mikro-distrofın uygulamasından sonra motor performans analizi. A. IM/IP grubu kavrama gücü testi. B. IM grubu askı testi. C. IP grubu askı testi. D. 12. hafta ayak izi testi. E. 24. hafta ayak izi testi. F. Hız testi. G. Hareket edilen mesafeyi izleme testi. H. Hareketi testi. I. Hareket etmeme testi. J. 6. hafta tracking testi Ethovision XT9 programındaki görüntüler. Ethovision XT9 programı kullanıldı. Test bağımsız olarak üç kez tekrarlandı. Sonuçlar ortalama $\pm$ SD olarak gösterildi. *p <0,05, ***p<0,001 (Devamı).	61
Şekil 21. 18 aylık farelerde 3. ayın sonundaki serum Kreatinin Kinaz seviyesini gösteren çubuk grafik. Sonuçlar ortalama $\pm$ SD olarak gösterildi. *p <0,05	62
Şekil 22. Tedavi öncesi ve sonrası in vivo fizyolojik değerlendirme. 0, 12 ve 24. haftalardaki toplam vücut ağırlığını gösteren çubuk grafik. Sonuçlar ortalama $\pm$ SD olarak gösterildi.	63
Şekil 23. Kontrol, IM/IP, IM, IP ve tedavi edilmemiş dmd-mdx-4Cv fare grubunun karaciğer ve dalağının histopatolojik incelemesi. A. Karaciğer organlarını temsil eden	

çubuk grafik. B. Dalak organlarını temsil eden çubuk grafik. Sonuçlar ortalama $\pm$ SD olarak gösterildi. C. Fare gruplarının histopatolojik analizi. Dalak ve karaciğer parafilm bölümü H&E ile boyanmıştır. Tüm resimler 100x büyütmede gösterildi. bp: beyaz pulpa sv: santral ven, sa: santral arter, kp: kırmızı pulp, t: trabekül, yıldız: interstisyel kanama, ok: hepatosit.	64
Şekil 24. Lentivirüs kodlayan mikro-distrofin uygulamasından sonra motor performans analizi. A. 8. haftadaki kavrama gücü testi, B. Doz 1 grubunda tedavi öncesi ve sonrası, C. Doz 2 grubunda tedavi öncesi ve sonrası, D. 8. haftadaki Rotarod testi, E. 8. haftadaki ayak izi testi, F. Hız testi, G. Hareket edilen mesafeyi izleme testi, H. Hareketi testi, I. Hareket etmeme testi. Ethovision XT9 programı kullanıldı. Test bağımsız olarak üç kez tekrarlandı. Sonuçlar ortalama $\pm$ SD olarak gösterildi. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$	65
Şekil 24. Lentivirüs kodlayan mikro-distrofin uygulamasından sonra motor performans analizi. A. 8. haftadaki kavrama gücü testi, B. Doz 1 grubunda tedavi öncesi ve sonrası, C. Doz 2 grubunda tedavi öncesi ve sonrası, D. 8. haftadaki Rotarod testi, E. 8. haftadaki ayak izi testi, F. Hız testi, G. Hareket edilen mesafeyi izleme testi, H. Hareketi testi, I. Hareket etmeme testi. Ethovision XT9 programı kullanıldı. Test bağımsız olarak üç kez tekrarlandı. Sonuçlar ortalama $\pm$ SD olarak gösterildi. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ (Devamı)	66
Şekil 25. 4 haftalık farelerde serum Kreatinin Kinaz (CK) seviyesini gösteren çubuk grafik. Sonuçlar ortalama $\pm$ SD olarak gösterildi. * $p < 0,05$	67
Şekil 26. İskelet ve kalp kasında distrofin ekspresyonu. A. İskelet kasının mRNA ifadesi. B. Kalp kasının mRNA ifadesi. Sonuçlar ortalama $\pm$ SD olarak gösterildi. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ **** $p < 0,0001$	68
Şekil 27. Tedavi öncesi ve sonrası in vivo fizyolojik değerlendirme. A. 8. Haftada sakrifikasyondan önceki toplam vücut ağırlığını gösteren çubuk grafik. B. Her grubun tedaviden önce ve sonra tartım sonuçları. 0. hafta tedavinin başlangıcını ve 8. hafta tedavi sonrasını temsil eder. Sonuçlar ortalama $\pm$ SD olarak gösterildi. * $p < 0,05$	69
Şekil 28. 4 haftalık kontrol, doz grubu ve tedavi edilmemiş DMD fare grubunun karaciğer ve dalağının histopatolojik incelemesi. A. Karaciğer organlarını temsil eden çubuk grafikler. B. Dalak organlarını temsil eden çubuk grafikler tartıldı. Sonuçlar ortalama $\pm$ SD olarak gösterildi. C. Fare gruplarının histopatolojik analizi. Dalak ve	

karaciğer parafilm bölümü H&E ile boyandı. Tüm resimler 100x büyütmede gösterildi. bp: beyaz pulpa sv: santral ven, kp: kırmızı pulp, yıldız: interstisyel kanama, ok: hepatosit.	70
Şekil 29. SDS-PAGE jel elektroforez görüntüleri. Jel 70 Volt, 110 mA ve 25 dakika süresince yürütüldü.	71
Şekil 30. Doz 2 ve dmd-mdx-4Cv gruplarının PCA ve trendline grafikleri.	72
Şekil 31. Dmd-mdx-4Cv, kontrol ve doz 2 gruplarının PCA ve trendline grafikleri.	72
Şekil 32. Kontrol ve doz 2 gruplarının PCA ve trendline grafikleri.	73
Şekil 33. Kontrol ve dmd-mdx-4Cv gruplarının PCA ve trendline grafikleri.	73
Şekil 34. Doz 2 ve dmd-mdx-4Cv gruplarında bulunan anlamlı 19 proteinin yolak analizi. String programı kullanılarak yapılmıştır.	74
Şekil 35. Kontrol ve doz 2 gruplarında bulunan anlamlı 51 proteinin yolak analizi. String programı kullanılarak yapılmıştır.	75
Şekil 36. Dmd-mdx-4Cv ve kontrol grupların bulunan anlamlı 37 proteinin yolak analizi. String programı kullanılarak yapılmıştır.	76
Şekil 37. Kontrol grubuna kıyasla up-regüle olan proteinler. A. Kontrol grubuna göre up-regüle olan proteinlerin Venn diagramı B. Sadece doz 2’de eksprese eden proteinlerin yolak analizi. C. Doz 2 ve dmd-mdx-4Cv grubunda ortak olarak eksprese eden proteinlerin yolak analizi. D. Sadece dmd-mdx-4Cv’de eksprese eden proteinlerin yolak analizi. String programı kullanılarak yapılmıştır.	80
Şekil 38. Doz 2 ve tedavi verilmeyen dmd-mdx-4Cv grubunun heatmap görüntüsü.	81
Şekil 39. 7 tane proteinin boxplot grafikleri. A. Q60854, B. Q91X72, C. P07724, D. P20029, E. Q00897, F. P13020, G. P10126 proteinlerin kontrol, doz 2 ve dmd-mdx-4Cv gruplarındaki ekspresyonlarını gösteren boxplot grafikleri.	82
Şekil 40. Lentivirüs kodlayan mikro-distrofin uygulamasından sonra motor performans analizi. A. Kavrama gücü testi, B. Rotarod testi, C. Ayak izi testi, D. Hız testi, E. Hareket edilen mesafeyi testi, F. Hareket testi, G. Hareket etmeme testi. Ethovision XT9 programı kullanıldı. Test bağımsız olarak üç kez tekrarlandı. Sonuçlar ortalama $\pm$ SD olarak gösterildi. *p <0,05	84

Şekil 41. 10 aylık farelerde serum Kreatinin Kinaz (CK) seviyesi. Doz gruplarında CK düşüşünü gösteren çubuk grafik. Sonuçlar ortalama $\pm$ SD olarak gösterildi. *p <0,05	85
Şekil 42. İskelet ve kalp kasında distrofin ekspresyonu. A. İskelet kası görelî mRNA ifadesi. B. Kardiyak kas görelî mRNA ifadesi. Sonuçlar ortalama $\pm$ SD olarak gösterildi. ****p <0,0001	86
Şekil 43. Distrofin antikoru ile boyandıktan sonra iskelet ve kalp kasının immünohistokimya sonuçları. A. Her gruptan iskelet ve kalp kasından elde edilen kriyomatriks kesit görüntüsü. B. İskelet kasının immünohistokimya analizi (OD skoru). C. Kalp kasının immünohistokimya analizi (OD skoru). Sonuçlar ortalama $\pm$ SD olarak gösterildi. ****p <0,0001	87
Şekil 44. Tedavi öncesi ve sonrası in vivo fizyolojik değerlendirme. A. Sakrifikasyondan önceki toplam vücut ağırlığını gösteren çubuk grafik. B. Her grubun tedaviden önce ve sonra tartım sonuçları. 0. hafta tedavinin başlangıcını ve 4. hafta tedavi sonrasını temsil eder. Sonuçlar ortalama $\pm$ SD olarak gösterildi.	88
Şekil 45. Kontrol, doz grubu ve tedavi edilmemiş DMD fare grubunun karaciğer ve dalağının histopatolojik incelemesi. A. Karaciğer organlarının ağırlığını temsil eden çubuk grafikler. B. Dalak organlarının ağırlığını temsil eden çubuk grafikler. Sonuçlar ortalama $\pm$ SD olarak gösterildi. C. Fare gruplarının histopatolojik analizi. Parafilm içerisine gömülü olan dalak ve karaciğer H&E ile boyanmıştır. Tüm resimler 100x büyütmede gösterildi. bp: beyaz pulpa, sv: santral ven, sa: santral arter, kp: kırmızı pulp, t: trabekül, yıldız: interstisyel kanama, ok: hepatosit.....	89
Şekil 46. Kontrol, doz grubu ve tedavi edilmemiş DMD fare grubunun beyin ve böbrek dokularının histopatolojik incelemesi. Fare gruplarının, A. hipokampus B. cerebellum C. Böbrek histopatolojik analizi. Parafilm içerisine gömülü olan dokular H&E ile boyanmıştır. Hipokampus ve böbrek resimleri 100x büyütmede gösterildi. Cerebellum kesitleri 200x büyütmede gösterildi. PL: Purkinje tabakası, ML: Moleküler tabaka, GL: Granüler katman.	91

TABLÖLER LİSTESİ

Tablo 1. Kullanılan hücre hatlarının listesi.	26
Tablo 2. Kit, solüsyon ve antikorların listesi.	26
Tablo 3. Ana ekipmanların listesi	28
Tablo 4. 18 aylık dmd-mdx-4cv farelere uygulama. Çalışma aşağıdaki tabloda ayrıntıları verilmiş olan gruplar üzerinde test edilecektir.	39
Tablo 5. 4 haftalık dmd-mdx-4cv farelere uygulama. Çalışma aşağıdaki tabloda ayrıntıları verilmiş olan gruplar üzerinde test edilecektir.	40
Tablo 6. 10 aylık dmd-mdx-4cv farelere uygulama. Çalışma aşağıdaki tabloda ayrıntıları verilmiş olan gruplar üzerinde test edilecektir.	41
Tablo 7. Parafin doku takibi protokolü.	45
Tablo 8. Plazmid izolasyon sonrası Nanodrop ölçüm sonuçları	52
Tablo 9. Lv-HSA-µDys/eGFP lentivirüs üretiminin kalite kontrol analizi.....	54
Tablo 10. Duchenne kas distrofininin tedavi uygulanan mdx-4cv modelinde (Doz 2) up-regüle edilmiş kas proteinlerinin proteomik tanımlanması.....	77
Tablo 11. Duchenne kas distrofininin tedavi uygulanan mdx-4cv modelinde down-regüle edilmiş kas proteinlerinin proteomik olarak tanımlanması.	78
Tablo 12. Duchenne kas distrofininin mdx-4cv modelinde up-regüle olan kas proteinlerinin proteomik tanımlanması.	78

ÖZET

Duchenne Müsküler Distrofisi (Dmd), Genetik Kas Zayıflığı Hastalığında Gen Terapisi

Duchenne Müsküler Distrofisi (DMD) genetik bir hastalık olup X kromozomundaki Xp21 bölgesinde gerçekleşen mutasyonlar sonucunda oluşur. Distrofin geninde oluşan bu mutasyonlar ile Distrofin proteini işlevini kaybederek kas fonksiyonlarının bozulmasına sebep olmaktadır. DMD kas bozulması kas büyümesini etkilediğinden, erken ölüm genellikle 30 yaşından önce olmaktadır. DMD tedavisinde gerçekleştirilen birçok terapötik müdahale ile hastalar iyileştirilmeye ve yaşam kaliteleri arttırılmaya çalışılmıştır: hücre tabanlı yaklaşımlar, çeşitli ilaç ve gen terapi metotları. Ancak DMD hastalığının tedavisinde henüz tatmin edici standart bir protokol geliştirilememiştir. Doğal fenotip fonksiyonel Distrofin gen dizisinin kas hücrelerine transferi, tüm DMD'li hastaların tedavisini sağlayabilir. mikro-Distrofin kodlayan lentivirüs kullanılarak, viral transfer yoluyla, kas hücrelerinin genomuna işlevsel mikro-Distrofin gen dizilimi entegre edilip distrofik patolojinin azaltılması hedeflenmektedir. Projemizde, lentiviral-mikro-Distrofin gen terapi yönteminin histopatolojik ve fizyolojik-fonksiyonel rejenerasyon etkinliği, zamansal Distrofin ekspresyonundaki değişim ve işlevsellikleri, toksisite, immun tepkime düzeyleri, gen ekspresyonun ve peptid ifadeleri karşılaştırıldı. Mikro-distrofinin viral gen transferi, DMD fare modelinde intramüsküler ve intraperitoneal olarak uygulandı. Vektörümüzle gen terapisi tedavisi uygulandıktan sonra Distrofinin iskelet ve kalp kasında eksprese edildiği geç evre dmd-mdx-4cv farelerinde gösterildi. Sonuç olarak, çalışmamız, lentivirüslerin, distrofik kasın işlev ve patolojisinde önemli bir gelişme sağlayan DMD hastalığı için etkili bir tedavi üreten mikro-distrofin gen terapisi için kullanabileceğine dair ikna edici kanıtlar göstermektedir.

Anahtar Sözcükler: Duchenne Müsküler Distrofi, DMD, distrofin, gen tedavisi, lentivirüs

ABSTRACT

Gene Therapy in a Genetic Muscle Weakness Disease, Duchenne Muscular Dystrophy (DMD)

Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) is a genetic disease resulting from mutations in the Xp21 region of the X chromosome; with these mutations in the Dystrophin gene, Dystrophin protein loses its function and causes disruption of muscle functions. Because DMD muscle impairment affects muscle growth, early death is usually seen before the age of 30 years. With many therapeutic interventions in the treatment of DMD, patients have tried to improve and increase their quality of life: cell-based approaches, various drugs, and gene therapy methods. However, a satisfactory standard protocol has not yet been developed for the treatment of DMD. The transfer of wild-type functional Dystrophin gene sequence to muscle cells can provide treatment for all DMD patients. Therefore, we planned to integrate the micro-Dystrophin gene sequence into the genome of muscle cells by viral transfer, using micro-Dystrophin-encoding lentivirus to reduce the dystrophic pathology. In our project, the histopathological and physiological-functional regeneration activities of the lentiviral-micro-Dystrophin gene therapy methods will be compared along with changes in temporal Dystrophin expression and their functionality, toxicity, and immune reaction levels, gene, and peptide expression level. Micro-dystrophin's viral gene transfer was administered intramuscularly and intraperitoneally in the DMD mouse model. We have shown gene therapy treatment with our vector by restoring dystrophin expression in late-stage dmd-mdx-4cv mice, where dystrophin is expressed in the skeletal and cardiac muscle. Consequently, our work displays convincing proof that lentiviruses can use for micro-dystrophin gene therapy producing an effective treatment for DMD disease, which presents a significant improvement in function and pathology of the dystrophic muscle.

Keywords: Duchenne Muscular Dystrophy, DMD, dystrophin, gene therapy, lentivirus

1 GİRİŞ VE AMAÇ

Duchenne Müsküler Distrofisi (DMD) genetik bir hastalık olup X kromozomundaki Xp21 bölgesinde gerçekleşen mutasyonlar sonucunda oluşur (1). Distrofin geninde oluşan bu mutasyonlar ile Distrofin proteini işlevini kaybederek kas fonksiyonlarının bozulmasına sebep olmaktadır. DMD kas bozulması kas büyümesini etkilediğinden, erken ölüm genellikle 30 yaşından önce olmaktadır (2,3). DMD tedavisinde gerçekleştirilen birçok terapötik müdahale ile hastalar iyileştirilmeye ve yaşam kaliteleri arttırılmaya çalışılmıştır: hücre tabanlı yaklaşımlar, çeşitli ilaç ve gen terapi metotları (4–6). Ancak DMD hastalığının tedavisinde henüz tatmin edici standart bir protokol geliştirilememiştir (7).

Distrofin gen diziliminde gerçekleşen mutasyonlar rastgele bir dağılım profili gösterdiğinden, işlevini kaybetmiş Distrofin geni tamirinin hastaya özgü olması gerekmektedir. Bu sebeple, mutasyona sahip Distrofin geni tamirine alternatif olarak, doğal fenotip fonksiyonel Distrofin gen dizisinin kas hücrelerine transferi, tüm DMD'li hastaların tedavisini sağlayabilir. Böylelikle, spesifik hasta mutasyonlarını hedef alan gen tamir stratejilerine kıyasla daha basit ve standart bir protokol olarak klinikte uygulanabilir. Bu nedenlerden dolayı, işlevsel Distrofin gen aktarım terapileri, klinik uygulama için en umut verici yaklaşımlar olarak değerlendirilmektedir.

Günümüzde mevcut tedavilerinin yetersizliğinden dolayı DMD hastalarının hayat standartları oldukça düşük ve erken ölümle sonuçlanmaktadır. Çocuklarda genellikle 3 ila 5 yaş arasında teşhis edildiği göz önüne alındığında; DMD gen terapi yöntemi erken ve geç dönem gruplar olarak özel DMD modeli (Dmd-mdx-4Cv) farelerde gerçekleştirilecek ve Distrofin'in zamansal ekspresyonu ve işlevselliği, dokularda oluşabilecek toksisite ve immun tepkime düzeyi özel DMD modeli farelerde test edilip karşılaştırılacaktır. Bu çalışmada hedef kas dokusunda %3'ten fazla Distrofin ekspresyonu sağlanması hedeflenmektedir. Böylelikle, kas dokularının yenilenmesi, tedavi edilmesi ve hasta sağ kalımlarının artması öngörülmektedir. Yürüme, rotarod, ön ayak tutuş gücü testi gibi davranış deneyleri ile kas rejenerasyonu ve gelişimi incelenecektir. Bununla birlikte, gen transferi yapılan kaslardan doku kesiti alınarak

distrofin gen anlatım seviyesinin kontrolü hispatolojik, gen ve proteomiks tabanlı yaklaşımlarla incelenmesi hedeflenmektedir.

Kas dokusunda, omiks teknolojileri kullanılarak protein profillemenin ve iyileşmenin kantitatif olarak gösterilmesini sağlayacaktır. Proteomiks, nihai olarak protein ekspresyon seviyelerinin doğrudan ölçümlerini ve ilgili proteinlerin aktivite durumuna ilişkin öngörü sağlayan, protein ekspresyonu ve etkileşiminin global analizini amaçlar (8). DMD, monogenik bir hastalık olduğundan ve hastalıklı dokunun üst yapısı, biyokimyası ve fizyolojisi son birkaç on yılda kapsamlı bir şekilde çalışıldığı için proteomik yaklaşım için mükemmel bir adaydır (9,10). Literatür içinde bir ilk olan özellikle gen tedavisi sonrası kasta protein profillemenin belirlenmesi; likit kromatografi-kütle spektrometresi (LC-MS/MS) tabanlı yaklaşım ile gösterilmesi hedeflenmektedir. Ayrıca, literatürde de DMD kas dejenerasyonunun kas dokularında hastalık ve tedavi sonrası durumlarda hangi moleküler yolları tetiklediğiyle ilgili fazla çalışmalar mevcut değildir.

Bunun sonucunda, klinik DMD gen terapisi için ideal doz intervali belirlenecektir. Bu sebeple, sunulan tez projemiz, zayıflamış kasların rejenerasyonunun ve normal işlevlerinin kazanılmasının hedeflendiği bir seri biyoteknolojik yaklaşımı içermektedir.

Projenin başarı ile tamamlanması, hastaların yaşam kalitesinin ve işlevselliğinin artmasına, iş gücü kaybı ve maliyet oranının azalmasına yol açacaktır. Geliştirilecek bu gen terapi modeli, hastaların iyileşme ve hastanede yatış sürelerinin kısılmasını da sağlayacaktır.

Günümüzde kullanılmakta olan ilaç ve kök hücre gibi tedavi yöntemlerinde hali hazırda açıklanamamış tedavi sürecindeki belirsizliklere alternatif bir çözüm yolu sağlayacaktır. Bu sayede DMD tedavilerinde günlük ihtiyaçların giderilmesindeki zorlukların azaltılması, hayat kalitesinin artırılması ve ailelerin önemli bir sorununa çözüm olması beklenmektedir. Geliştireceğimiz bu yenilikçi metodumuz ile diğer gen terapisi tedavilerinin de önü açılacaktır. Son yıllarda hızla artan gen terapisi pazarında,

DMD vakalarının tedavisi başlangıç alınarak, katma değeri yüksek diğer genetik tedavi ürünlerinin ve yeni yaklaşımlarının geliştirilmesine de cesaret verecektir.



2 GENEL BİLGİLER

2.1 Duchenne Müsküler Distrofisi

DMD, X bağımlı çekinik olarak kalıtıldığından dolayı sadece erkek çocuklarda görülen prevalansı yüksek nöromusküler bir hastalıktır. Etkilenen erkek çocuklar genellikle 3 ila 5 yaş arasında teşhis edilir (3). 12 yaşına gelindiğinde, neredeyse tüm hastalar tekerlekli sandalye kullanmakta ve çoğunda şiddetli skolyoz gelişmektedir (3). DMD hastalığında kas zarında bulunan distrofin proteininin eksikliği, iskelet kası, diyafram ve kalp de dâhil olmak üzere, kas dokusunun kademeli dejenerasyonuna yol açarak, sakatlık ve genellikle 30 yaşından önce erken ölüm ile sonuçlanır (2,3). DMD, distrofin adlı bir gendeki mutasyonun neden olduğu, zamanla kötüleşen, ciddi prognozlu ve şu anda tedavisi olmayan bir hastalıktır.

2.1.1 Etiyoloji

İlk olarak DMD 1860'larda klinik olarak tanımlandı, ancak gen 1986'ya kadar ve bir sonraki yıl protein ürünü olan distrofin'e kadar tanımlanamadı (11,12).

Distrofin geninin büyüklüğü 2.1 MB'dir ve bu gendeki mutasyonlar DMD ve Becker müsküler distrofisine (BMD) yol açar. Bozukluk, X'e bağlı, çekinik bir düzende kalıtılır ve dünya çapında yaklaşık 3.500-4.000 yenidoğan erkekten birini etkiler ve bu da onu en yaygın kas distrofisi formu haline getirir. DMD tipik olarak distrofin proteininin ekspresyonunu önleyen boş allel mutasyonlarından kaynaklanırken, BMD ekspresyonu azaltan veya azaltılmış stabilite veya fonksiyonel kapasiteye sahip dahili olarak *truncated* bir proteinin birikmesine yol açan mutasyonlardan kaynaklanır. Distrofin eksikliği, artan yağ ve bağ dokusunun eşlik ettiği ilerleyici iskelet kası kaybına yol açarken, kalp kası artan fibrozis ve ilerleyici genişletilmiş kardiyomiyopati sergiler. Çoğu DMD hastası, yaşamlarının 3. ila 4. on yıllarında solunum veya kalp yetmezliğine yenik düşer. BMD daha geç bir yaşta başlar ve daha yavaş ilerlemeye sahiptir (3). DMD/BMD'nin çekinik doğası ve yavaş

ilerlemesi, onları etkilenen dokularda distrofin üretimini geri getirebilecek gen terapileri için çekici adaylar haline getirir.

2.1.2 Distrofin ve distrofinle ilişkili glikoprotein kompleksindeki rolü

Distrofin, miyofiberler içindeki hücre içi iskeletin γ -aktin filamentlerini bazal lamina ve hücre dışı matrise bağlayan distrofin-glikoprotein kompleksinin veya distrofinle ilişkili glikoprotein kompleksinin (DGC) kritik bir bileşenidir (Şekil 1). Distrofin, kalp ve iskelet kası dokularında sarkolemmanın sitoplazmik tarafında lokalize olan ve çubuk şeklinde (*rod-shaped*) bir hücre içi proteindir. Büyüklüğü 427 kDa'dır (11,13,14).

Tam uzunluktaki distrofin 24 spektrin benzeri tekrara sahiptir ve dört fonksiyonel alandan oluşur: (i) F-aktine bağlanan N-terminal bölgesi, (ii) ek bir aktin-bağlama bölgesi içeren orta çubuk alanı yanı sıra bir nöronal nitrik oksit sentaz (nNOS) bağlanma bölgesi, (iii) sistein açısından zengin alan ve (iv) C-terminal alanı. Dört daha kısa kas olmayan izoform da aşağı akış promotörlerinden gelen distrofin geninden eksprese edilir ve en azından tam uzunluktaki protein ile sistein açısından zengin ve COOH terminal alanlarını paylaşır. Moleküler ağırlıklarına göre isimlendirilen Dp260 (260 kDa distrofin proteini) retinanın dış pleksiform tabakasında bulunur. Dp140 böbrek, retina ve beyinde bulunur ve Dp116 esas olarak omurilikteki Schwann hücrelerinde eksprese edilir. Kalp ve iskelet kasında bulunan tam uzunluktaki distrofin izoformu Dp427 ile gösterilir. En kısa izoform olan Dp71, kalp kası, retina, böbrek, karaciğer, akciğer ve beyinde genel olarak ifade edilir. DMD'de kısa izoformlardaki mutasyonlar, kas dışı sendromlara katkıda bulunur; ancak DMD'nin birincil etiyolojisi tam uzunluktaki distrofinin bozulmasıdır.

Tam uzunluktaki proteinin dört fonksiyonel alanı vardır: N-terminali (NT), çubuk, sistein açısından zengin (CR) ve C-terminali (CT) alanları. Distrofin, sarkolemmada birkaç transmembran (dystroglikan, sarkoglikan, sarkospan) ve sitozolik (syntrophin, dystrobrevin (Dbr) ve nNOS) proteinlerini bir DGC halinde birleştirir (15).

Distrofin, NT, orta çubuk, CR ve CT alanlarını içerir. Orta çubuk alanı, 24 spektrin benzeri tekrardan (çizgideki sayısal sayılar, pozitif yüklü tekrarlar beyaz renkle işaretlenmiştir) ve dört menteşeden (hinge) (H1, H2, H3 ve H4) oluşmaktadır.

Distrofin, iki tane aktin bağlama bölgesine sahiptir ve bunlar sırasıyla NT'de ve 11-15 tekrar bölgede yer almaktadır. 1-3 tekrarları, negatif yüklü lipid çift tabakası ile etkileşime girmektedir. Tekrarlar 16 ve 17, (nNOS)-bağlanma alanını oluşturmaktadır. Distrofin, 20-23 tekrarları yoluyla mikrotübül ile etkileşime girmektedir. H4'ün bir kısmı ve CR alanı, distroglikanın (β DG) β -alt birimine bağlanmaktadır. Distrofinin CT alanı, syntrophin ve Dbr ile etkileşime girmektedir. Distrofin, hücre iskeletinin bileşenlerini (aktin ve mikrotübül) hücre dışı matristeki laminin'e bağlar. Sarkoglikanlar ve sarkospan, distrofin ile doğrudan etkileşime girmezler, ancak distrofin, DG, sarkoglikanlar, sarkospan, syntrophin, Dbr ve nNOS'tan oluşan tüm DGC'yi güçlendirmektedir.

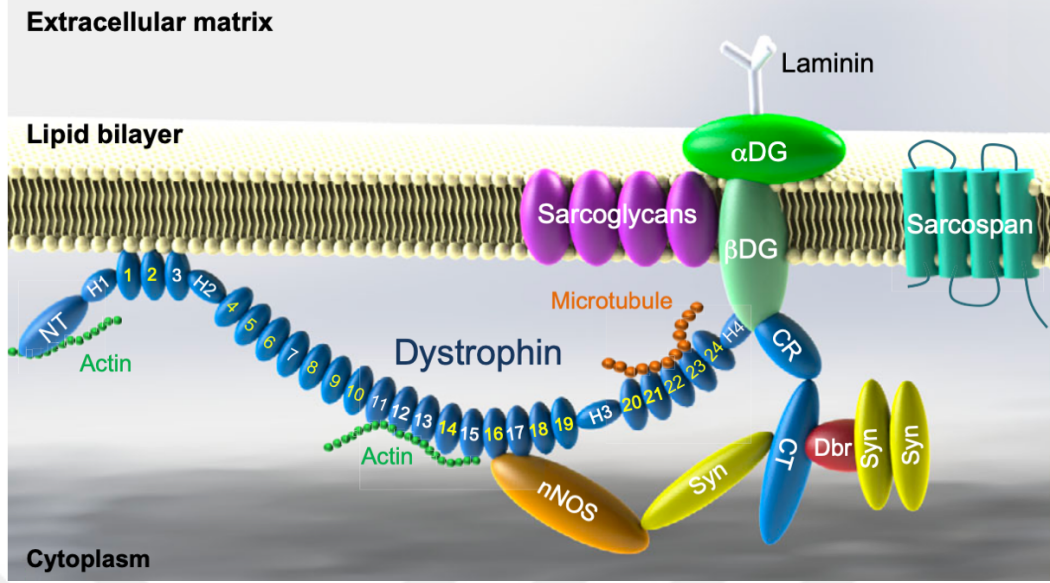
Sarkoglikan kompleksi, DGC ve sarkolemmaya ek mekanik destek sağlar. Bu transmembran protein kompleksi, sarkospan'ın (16,17) yanı sıra sarkoglikan α , β , γ ve δ 'den oluşur (18). Sarkoglikanların herhangi birinde yapısal kusurlara neden olan mutasyonlar, tüm kompleksin kararsızlaşmasına, sarkolemmanın zayıflamasına ve sarkoglikanopati adı verilen bir dizi *limb-girdle* müsküler distrofisine yol açar (19–21). δ -sarkoglikan nakavt fareler, vasküler düz kastaki sarkoglikan sarkospan kompleksinin bozulmasına bağlı olarak kardiyomiyopati geliştirir (22).

Bir distrofin homologu olan utrofin, distrofin ile çok yüksek amino asit dizisi benzerliğine sahiptir ve distrofin gibi sarkolemmayı hücre iskeletine bağlamaktadır. Distrofinden farklı olarak; utrofin RNA, kalp ve iskelet kasının yanı sıra beyin, böbrek, karaciğer, akciğer, dalak ve mide dahil olmak üzere yetişkin dokusunda eksprese edilir. Normalde doğumdan sonra iskelet kasında down-regüle edilen protein, sürekli yenilenen mdx kasının sarkolemmasında birirmektedir (23).

Utrofin, distrofine benzer bir yapıya ve işleve sahiptir, ancak kritik nNOS bağlama bölgesinin yanı sıra iki spektrin benzeri tekrardan yoksundur (24,25). Hem farelerde

hem de insanlarda fetal gelişim sırasında öncelikle iskelet kasında eksprese edilir ve doğumdan önce normal kasta down-regüle edilir (26). Distrofin yokluğunda, utrofin genellikle up-regüle edilir, ancak proteindeki fonksiyonel farklılıklar nedeniyle insan DMD'sindeki distrofini tam olarak telafi edemez (27). Hem DMD hem de BMD hastalarında yenilenen miyofiberler yüksek seviyelerde utrofin gösterir. Ek olarak, bazı Duchenne hastalarında utrofin ekspresyonu artmıştır. Utrofinin distrofini kısmen telafi etme yeteneğinin altını çizerek, bu tür daha yüksek utrofin ekspresyonu, hastalık şiddetinin azalmasıyla ilişkilendirilmiştir (28,29).

Hücredeki DGC'ye ek olarak, integrinler; miyofiberlerin hücre iskeleti ile hücre dışı matris arasındaki etkileşimler için kritik öneme sahiptir. Integrinler, α ve β zincirlerinden oluşan heterodimerler olarak var olan transmembran glikoproteinlerdir. Bugüne kadar tanımlanmış 18 α ve 8 β zinciri vardır. Hücre tipleri arasında var olan büyük bir hücre yüzeyi adhezyon reseptörleri ailesini oluştururlar. $\alpha6\beta4$ hariç tüm integrinler hücre iskeletindeki aktin filamentlerine bağlanır (30). Bir dizi integrin alt birimi, miyogenez ve gelişim boyunca iskelet kasında ifade edilir: $\alpha1$, $\alpha3$, $\alpha4$, $\alpha5$, $\alpha6$, $\alpha7$, $\alpha9$, αv , $\beta1$ ve $\beta3$ (31,32). $\alpha1$, $\alpha3$, $\alpha6$, $\alpha7$ ve $\alpha9$ integrin alt birimleri, laminin bağlayıcı integrinler oluşturmak için $\beta1$ ile dimerleşir. Yetişkinlerin kasında sarkolemmada sadece $\alpha7\beta1$ bulunur. DGC gibi, $\alpha7\beta1$ integrin de iskelet ve kalp kası için bir laminin-2 reseptörüdür ve miyotüplerin terminal farklılaşması üzerine up-regüle edilir. Benzer şekilde, $\alpha7\beta1$ integrin, miyofiber sarkolemmasının stabilitesini korumak için kritik öneme sahiptir ve DGC işlevsizse bu açıdan kısmen telafi edebilir (33). Hem DMD hastalarının hem de mdx farenin iskelet kasında, distrofin eksikliğini ve bunun sonucunda DGC'nin kararsızlığını telafi etmek için $\alpha7\beta1$ integrin up-regüle edilir (34).



Şekil 1. Distrofin ve distrofin ile ilişkili glikoprotein kompleksinin (DGC) şematik taslağı (35)

2.1.3 Distrofin geni ve mutasyonlar

Duchenne kas distrofisinde mutasyona uğramış Distrofin geni, insan hücrelerindeki en uzun genlerden biridir, yaklaşık 11.200 baz. DMD hastalığına sebep olan Distrofin gen diziliminde görülen mutasyonların %65'i delesyonlardan, %6-10'u duplikasyonlardan ve %10'u diğer küçük mutasyonlardan oluşabilmektedir (36,37). Bunun yanı sıra, delesyonların genellikle 44 ila 55. eksonlarda değişkenlik göstermesi DMD hastalığının karakteristik bir mutasyon özelliğine sahip olmadığını gösterir (38). Bozukluğun daha hafif bir versiyonu olan BMD, genellikle çerçeve içi delesyonlardan kaynaklanır ve bu da kesilmiş distrofin sentezine neden olur (1).

Delesyon ve duplikasyon mutasyonlarının sonucu iki yönlü olabilir. Silinen veya kopyalanan eksonlardaki nükleotid sayısı 3'e bölünebiliyorsa, okuma çerçevesi bozulmayacaktır. Bu, haberci ribonükleid asitin (mRNA), merkezde biraz daha kısa veya daha uzun olmasına rağmen, aktin hücre iskeletini hücre dışı matrise bağlamak için çok önemli olan NT ve CT alanlarını içeren bir distrofin proteinine çevrilmesine izin verecektir. Bu durumda distrofinler bir dereceye kadar işlevini korur ve BMD'li hastalarda görülür. Buna karşılık, silinen veya kopyalanan eksonların nükleotitlerinin sayısı 3'e bölünemediğinde, okuma çerçevesi kaydırılır ve translasyon sırasında

anormal amino asitlerin proteine dahil edilmesine yol açar. Çoğu zaman ise yanlış bir okuma çerçevesi birçok durdurma kodonu içerir, bu da translasyonun erken sonlandırılmasına ve kesilmiş bir proteinin üretilmesine yol açar. Ortaya çıkan distrofinler, ekstraselüler matrikse bağlanan kritik alandan yoksundur ve bu nedenle işlevsel değildir ve genellikle stabil olmazlar. Bu mutasyonlar DMD ile ilişkilidir (39,40).

Nokta mutasyonları, bir amino asit kodonunu bir durdurma kodonuna dönüştürebilir, bu da protein translasyonunun erken sonlanmasına neden olur. Son olarak, nokta mutasyonları veya küçük silmeler ve/veya eklemeler ekleme bölgesini bozabilir. Ekleme işlemi sırasında, intronlar, ekleme donörünün (intronun ilk iki nükleotidi GU) ve ekleme alıcısının (intronun son iki nükleotidi AG) tanınmasının çok önemli olduğu ekleme mekanizması tarafından çıkarılır. Genel olarak, alıcı veya verici ekleme bölgesinin mutasyona uğradığı bir ekzon, artık ekleme mekanizması tarafından tanınmayacak ve eksonun mRNA'dan dışlanmasına yol açacaktır. Bu nedenle, splice-site mutasyonları genellikle mRNA düzeyinde tek ekson silinmesine neden olur, bu da atlanan eksonun çerçeve içi veya çerçeve dışı olmasına bağlı olarak kısmen işlevsel veya işlevsel olmayan bir distrofine yol açar.

Hastaların %1'inden azında diğer mutasyon türleri bulunur. Örneğin; derin intronik mutasyonlar, bir intronik bölgenin ekleme mekanizması (kriptik) veya psödo-eksonlar) tarafından bir ekson olarak tanınmasına ve bunun mRNA'ya dahil edilmesine yol açabilir (39,40). Kriptik ekzonlar okuma çerçevesini bozabilir ve/veya fonksiyonel distrofinin üretimini engelleyen durdurma kodonları içerebilir. Yanlış anlamlı (*missense*) mutasyonlar DMD'li hastalarda nadir görülür. Bildirilen birkaçı distrofinin sisteinden zengin alanında bulunur ve hücre dışı matrise bağlanan β -distroglikan'a bağlanmayı ortadan kaldırır (40,41). Bu nedenle, aslında bu yanlış anlamlı mutasyonlar, aktin hücre iskeleti ile hücre dışı matris arasındaki bağlantıyı da bozdukları için diğer DMD'ye neden olan mutasyonlara benzemektedir. Son olarak, DMD genini içeren translokasyonların neden olduğu bir kısım vaka da bildirilmiştir. Bu mutasyonlar, genin bir bölümünü diğerinden ayırarak tam bir transkript

üretilmesini engellemektedir. Özellikle, DMD genini içeren translokasyon mutasyonları, kadınlarda bir DMD fenotipine neden olacaktır (42,43).

Normalde taşıyıcı kadınlar, mutasyona uğramış veya normal DMD genini taşıyan kromozomların rastgele X inaktivasyonu nedeniyle %50'si pozitif distrofin kas lifleri ile doğarlar. Bununla birlikte, translokasyon mutasyonları ile, translokasyona dahil olan otozomun daha düşük bir dozajı nedeniyle, transloke edilmiş DMD geninin inaktive edildiği hücreler hayatta kalamaz. Böylece etkilenmemiş DMD geni her zaman inaktive olur ve distrofin üretilemez.

DMD'ye, DGC ayrılmaz bir parçasını oluşturan büyük 79-ekson genindeki 427-kDa protein distrofini kodlayan mutasyonlar neden olur (44). DGC kompleksinin en iyi rolü, F-aktin hücre iskeleti ile hücre dışı matris arasında mekanik bir sinyal bağlantısı oluşturmaları ve kas zarında kasılma kaynaklı hasardan korumasıdır. DMD'de tanımlanan mutasyonların çoğu, tam bir distrofin kaybı ve buna eşlik eden DGC kompleksinin diğer proteinlerinde bir azalma ile sonuçlanan çerçeve kayması mutasyonlarıdır (45,46). Bu nedenle, membran bütünlüğünün kaybı ile DMD patolojisinin evriminde önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir.

Bununla birlikte, DGC kompleksinin bozulmasının, muhtemelen DGC ile nöronal nNOS gibi çeşitli moleküller arasındaki yakın ilişkiden dolayı, bir dizi sinyalleşme süreci için yaygın etkileri vardır ve bu da her zamankinden daha karmaşık bir DMD patolojisi tablo oluşturur (47–49).

2.1.4 İnsidans

Duchenne Müsküler Distrofisi 3600-6000 canlı erkek doğumda 1'ini etkileyen X'e bağlı bir hastalıktır. Çeşitli kalıtsal nöromüsküler hastalıkların popülasyon sıklıklarına ilişkin 150'den fazla rapor edilmiş çalışmayı içeren dünya literatürünün bir araştırması yapılmıştır. Veriler, yaygın görülen müsküler distrofisinin (Duchenne, Becker), miyotonik distrofi ve konjenital miyotonilerin, proksimal spinal müsküler atrofilerin ve kalıtsal motor ve duyuşal nöropatilerin biçimleri için sunulmuştur.

Her iki cinsiyet arasındaki genel prevalansın tahmini, yaklaşık 286×10^{-6} , yani popülasyonun 3500'ünden 1'inin, çocuklukta veya sonraki yaşlarda ortaya çıkan ve sakat bırakan kalıtsal bir nöromusküler hastalığa sahip olması beklenebilir. Şiddetli bozukluklar sadece bebeklik ve erken çocukluk döneminde ortaya çıkarsa (örneğin Werdnig-Hoffmann hastalığı ve şiddetli konjenital müsküler distrofi) ve nadir görülen distrofi ve miyopati formları da dahil edilirse, genel prevalans 3000'de 1'i geçebilir (50).

Ülkemizde tahmini 10.000 erkek çocuğun (görülme sıklığı, 3500 erkek çocukta 1) DMD hastalığına sahip olduğu düşünülmektedir.

2.1.5 Semptom ve teşhis

Etkilenen bireyler de hafif derecede gecikmiş motor kilometre taşlarına sahip olabilir ve çoğu proksimal kas zayıflığı nedeniyle düzgün koşamaz ve zıplayamaz. Bu da yerden kalkarken klasik Gowers manevrasının kullanılmasına neden olur. Çoğu hastaya, fiziksel yetenekleri yaşlarına kıyasla belirgin şekilde farklılaştığından yaklaşık 5 yaşında teşhis konur. Tedavi edilmediğinde kas gücü giderek bozulur. Erkek çocuklar, ergenlik çağına gelmeden tekerlekli sandalye kullanmaya ihtiyaç duyarlar. Solunum, ortopedik ve kardiyak komplikasyonların ortaya çıkmasıyla müdahale olmaksızın ortalama ölüm yaşı 19 civarındadır. İlerleyici olmayan bilişsel işlev bozukluğu da mevcut olabilir (51,52).

Doktorlar, genç erkek çocuklar da bozulmuş kas fonksiyonu, sık sık düşmeler ve Gower's belirtisi ile başvurduğunda DMD'den şüphelenmektedir (53,54). DMD'li genç erkeklerde konuşmada gecikme muhtemelen beyin distrofin izoformunun yokluğundan dolayı sıklıkla gözlenir. Serum analizi ile yüksek kas enzimlerinin varlığını kan dolaşımına sızmasına bağlı olarak ortaya çıkaracaktır (en dikkat çeken kreatin kinaz (CK), ayrıca aspartat transaminaz ve alanin transaminaz gibi transaminazlar). Bu bulgular üzerine (gecikmiş kas fonksiyonu, konuşma da gecikme ve yüksek CK), hastalar genellikle hastanın DMD'ye sahip olup olmadığını

doğrulamak için DMD geninde genetik analizini talep eden nöromusküler uzmanlara yönlendirilir.

Hasta ve yakınları açısından, ailede kaygıyı en aza indirmek ve hastalığın tekrarlama riskini azaltmak için tanı koyma hızı son derece önemlidir. Bu nedenle, bazı durumlarda hızlı ve kesin bir tanı koymak için immünohistokimya ile bir kas biyopsisi ve distrofin analizi gerekebilir. Aileye uygun genetik danışmanlık, hastadaki tanının bilgisine bağlıdır. İzlenecek uygun prosedürler ve yöntemler belirlenirken bu akılda tutulmalıdır ve yaklaşım, farklı testlerin ve tesislerin mevcudiyetine ve ekonomik faktörlere bağlı olarak farklı merkezlerde değişkenlik gösterebilir (54).

Hastaların çoğunda (%70) bir veya daha fazla ekzonun silinmesi ve kopyalanmasının bulunduğu göz önüne alındığında, ilk önce bu mutasyonları kontrol etmek hem maliyet etkin ve emek açısından verimlidir. Multipleks ligasyona bağlı prob amplifikasyonu (MLPA) analizi, tam olarak hangi ekzonların silme veya tekrarlamalara dahil olduğunu belirlemek için en güvenilir testtir (55).

MLPA, hastalarda ve taşıyıcılarda hem delesyonları hem de tekrarları tespit edebilir. Bir ekson içerisindeki küçük mutasyonlar, probun o ekzona bağlanmasını önleyebilir ve bu nedenle, bu mutasyonlar MLPA yöntemi kullanılarak tek ekson (*single-exon*) silmelerini ortaya çıkabilir (56).

Distrofinopatinin genetik tanısı için multipleks polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) önerilmez. Fakat, silmeleri tespit etmek için alternatif, daha ucuz bir yaklaşım sağladığı için hala çok sayıda laboratuvarında kullanılmaktadır (57,58). Bu yaklaşım genellikle 1, 3, 4, 6, 8, 12, 13, 17, 19, 43, 44, 45, 47, 48, 50, 51, 52 ve 60 ekzonlarının varlığını veya yokluğunu saptamak için iki primer seti kullanır. Bu nedenle, DMD ve BMD'li hastalarda delesyon mutasyonlarının çoğunu yakalayabilir.

Bu nedenle, iyi doğum öncesi tanı araçları ve bilinen vakalar için aile danışmanlığı ile bile yeni vakalar ortaya çıkacaktır. Bu yüksek mutasyon oranı, DMD'li hastalar için tanımlanan geniş mutasyon varyasyonunun da temelini oluşturur (39).

2.1.6 Doğum öncesi tanı

DMD/BMD için doğum öncesi tanı sadece erkek gebeliklerde yapılmalıdır. Şu anda, bir DMD mutasyonu için dişi bir heterozigotun, bozukluğun herhangi bir belirtisini gösterip göstermeyeceğini tahmin etmek mümkün değildir ve bu nedenle, bir dişi fetus için doğum öncesi tanı önermek uygun olmaz.

Ailesel mutasyon söz konusu ise tercihen erkek hamileliğinde doğum öncesi test yapılarak doğrulanmalıdır veya probandin DNA'sını bir kontrol olarak kullanarak fetüsün test edilmesine paralel olarak doğrulanabilir. Probanddaki mutasyonu tanımlamak veya doğrulamak için kullanılanla aynı teknik ile mutasyonu test etmek için kullanılabilir. Varlığı önemli düzeyde fetal sonucun yorumlanmasını etkileyebileceğinden, fetal DNA'nın maternal hücre kontaminasyonu kontrolü yapılmalıdır. Bu, örneğin erkek fetüsün delesyon için test edilmesini kantitatif olmayan bir PCR tabanlı tahlil kullanılması sırasında özel bir problem olabilir, çünkü herhangi bir maternal DNA'nın varlığı, etkilenen erkek fetüsteki bir delesyonun varlığını maskeleyecek ve bu da yanlış bir sonuçla sonuçlanacaktır. Bu şekilde sonuçlanmaya negatif tanı denir. Maternal hücre kontaminasyonu kontrolü, distrofin gen bölgesinden gelen belirteçlerle veya laboratuvarında rutin olarak kullanılan herhangi bir polimorfik belirteç seti ile yapılabilir. Doğum öncesi numunelerde maternal hücre kontaminasyonunu kontrol etmek için daha fazla ayrıntı ve öneri En İyi Uygulama Kılavuzlarında mevcuttur (59).

2.1.7 Türleri

Becker hastalığı, distrofin proteinini kodlayan gendeki mutasyonların neden olduğu, niceliksel ve/veya niteliksel protein işlev bozukluğuna ve bunun sonucunda kas dejenerasyonuna yol açan kalıtsal bir kas distrofisidir. BMD, kas dokusunun ilerleyici dejenerasyonu ve nekrozu ile karakterizedir. Kasların yerini fibro-adipoz hücreler alır.

Daha hafif olan BMD çok daha geniş bir ciddiyet aralığına sahiptir. Semptomlar, ikinci on yılın sonlarında ambulasyon kaybına yol açan uzuv-eklem zayıflığından, gençlik ve genç erişkinlikteki miyaljilerden oluşan nadir sendromlara kadar değişebilir. Ancak geç yetişkinliğe kadar ambulasyon üzerinde çok az etkisi olabilir (60). Hem DMD hem de BMD, X'e bağlı DMD'deki mutasyonlardan kaynaklanır ve mutasyonun okuma çerçevesini kesip kesmediği, protein ürünü olan distrofinin yokluğuyla sonuçlanıp sonuçlanmadığı veya kısmen işlevsel bir distrofinin ekspresyonuna izin veren bir okuma çerçevesini sürdürüp sürdürmediğine bağlıdır.

Hafif distrofinopatilerde prognostik indeksler ayrıca 3 farklı hastalık seyrinin tanımlanmasına izin verir: stabil, yavaş ve hızlı ilerleme (61). Özellikle, hastalarda hızlı seyrinde önemli ölçüde daha düşük distrofin ve immünohistokimyasal skor gözlenir ve genin 5' ucundaki delesyonlar veya duplikasyonlar kötü prognoz ile ilişkilidir.

Klinik öncesi verilere dayanarak, bir bisiklet ergometresinde veya bir koşu bandında, kalp atış hızı maksimum oksijen alımlarının <65'inde egzersiz yapan BMD olan hastalarda yapılan mevcut çalışmalar, aerobik egzersizin fiziksel bozulmayı ve fonksiyonel kaybı önlediğini göstermiştir. Bu bulgular, kas hasarı ilerlemesinin hızlanmasına dair önemli bir kanıt olmaksızın, kas gücü, yorgunluk direnci ve el becerisi kapasitelerinde bir artış yoluyla fiziksel performansta bir iyileşme olduğunu göstermektedir (62).

2.1.8 Tedavi

Farmakolojik müdahaleler DMD'nin doğal seyrini değiştirmeye başlamıştır. DMD'nin altında yatan patoloji sebebiyle daha etkili tedavi potansiyel sahip küçük molekül ve gen terapileri dahil olmak üzere daha iyi bir seyir sunmaya devam etmelidir. DMD'nin en yıkıcı ve bariz etkisi, iskelet kas sisteminde güç ve fonksiyon kaybıyla sonuçlanmasıdır. Birçok panel, glukokortikoidler gibi farmakolojik müdahaleleri ve hafif egzersiz ve aktivite kullanımını içeren fizik tedavileri ve kontraktür ve deformiteyi önlemek yada en aza indirmek için kas-iskelet sisteminin

yönetimini içeren gücü ve işlevi optimize etmeyi amaçlayan tedaviler ele alınmaktadır (53) .

Glukokortikoidler, DMD'de kas gücü ve işlevindeki düşüşü yavaşlatan şu anda mevcut olan tek ilaçtır. Bu da skolyoz riskini azaltır ve akciğer fonksiyonunu stabilize eder. Bugüne kadarki sınırlı verilere dayanarak kalp fonksiyon bozukluğunda ekokardiyografik ölçümlerde daha yavaş bir gerilemeye işaret etmesi kardiyak fonksiyonlarında iyileşmeye işaret edebilir. Ancak bu ölçümler ile kardiyak semptomlarını, belirtilerini veya kardiyak ilişkili mortalitedeki gecikmeyi mutlaka öngörmeyebilir (63,64).

Prednizolon, Avrupa'da prednizon yerine sıklıkla kullanılır. Deflazacort, benzer bir glukokortikoid birçok ülkede mevcuttur, ancak şu anda ABD Gıda ve İlaç Dairesi veya ABD'de Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi tarafından kullanımı onaylanmamıştır, günlük 0.9 mg/kg dozda benzer bir etkinliğe sahip olduğu gösterilmiştir ve hafif farklı kronik risk profiline sahiptir (65,66). Ayakta tedavi edilebilen çocuklarda glukokortikoid kullanımının amacı, kronik glukokortikoid uygulamasıyla ilişkili iyi tanımlanmış riskleri hesaba katarak, ambulasyonun korunması ve sonraki solunum, kardiyak ve ortopedik komplikasyonların en aza indirilmesidir.

Koenzim Q10, karnitin, aminoasitler (glutamin, arginin), anti-inflamatuarlar/anti-oksidanlar (balık yağı, E vitamini, yeşil çay özü) ve diğerleri gibi takviyeler bazı ebeveynler tarafından kullanılmaktadır ve bazıları doktorlar tarafından onaylanmaktadır.

Uzman panelleri ayrıca pentoksifilin veya çeşitli bitkisel veya botanik ajanlar gibi potansiyel hastalık değiştirici ilaçların değerini de tam olarak değerlendirilmemiştir. Bu, ek araştırmaya ihtiyaç duyulan bir alan olarak belirlenmiştir. Ailelerin, hasta kayıtları ve klinik deneyler gibi DMD hakkındaki bilgilerin geliştirilmesine yardımcı olan faaliyetlere aktif katılımı teşvik edilmektedir (53).

DMD'li bir hastanın ve ailesinin tıbbi bakımı, psikososyal iyilikleri için destek almadan tamamlanmış sayılmaz. Birçok ebeveyn için, çocuklarının psikososyal sorunlarının neden olduğu stres, hastalığın fiziksel yönleriyle ilişkili stresi aşıyor. İhtiyaçlar, hastanın yaşı ve hastalığın evresine göre değişkenlik göstermektedir (67–69). DMD'de gözlenen psikososyal zorluklar, genel popülasyonda kullanılan aynı etkili, kanıta dayalı müdahalelerle, önleme ve erken müdahaleye güçlü bir vurgu yapılarak tedavi edilmelidir, çünkü bu potansiyel sonucu en üst düzeye çıkaracaktır (70).

Genel olarak, DMD'li erkek çocukların psikososyal uyumu, diğer kronik tıbbi hastalıkları olan çocukların durumlarıyla benzerdir. Bununla birlikte, bazı spesifik risk alanları özellikle endişe vericidir. Sosyal işlevsellikteki zorluklar, sosyal yargılama ve duygusal ayrımcılık gibi belirli bilişsel becerilerdeki biyolojik temelli eksikliklerden kaynaklanabilmektedir. DMD'nin sonuçları (yani fiziksel sınırlamalar) sosyal izolasyon, sosyal olarak geri çekilme ve sosyal aktivitelere erişimin azalması ile sonuçlanabilir. Dil gelişimi, kısa süreli sözlü bellek ve fonolojik işleme dahil olmak üzere konuşma ve dil açıklarının örüntüsü ve ayrıca bozulmuş zeka ve özel öğrenme bozuklukları dahil olmak üzere bilişsel gecikmeler iyi belgelenmiştir (71–73).

Bu hastalıkta, protein distrofinin kusurlu ekspresyonunun neden olduğu nispeten yaygın bir kalıtsal bozukluktur. Bu hastalığı tedavi etmek için en doğrudan yaklaşım, kastaki distrofin üretimini eski haline getirmek olacaktır. Son yapılan çalışmalar, DMD'nin başarılı gen tedavisi için beklentileri büyük ölçüde artırdı. DMD ve BMD'yi tedavi etmek için izlenen birçok yaklaşımdan, adeno-ilişkili virüs (AAV) aracılı mikrodistrofinin verilmesine dayanan gen tedavisi, bozukluğun nedenini tedavi etmek için en doğrudan ve umut verici yöntemdir. Bu yaklaşımın en büyük zorlukları, mikrodistrofinin bir bağışıklık tepkisi ortaya çıkarmadan güvenli ve verimli bir şekilde iletilmesini sağlamaktır (74). Bu durum, geniş bir mutasyon profiline sahip DMD hastalığının standart tedavisi için bütün hastaları kapsayıcı genel bir gen terapisi yöntemine ihtiyaç duyulduğunu göstermektedir.

2.2 Gen Terapi

Spesifik patojenik varyantları olan hastalar için alternatif Ribonükleik asid (RNA) bazlı stratejiler kullanılmış olsa da gen değiştirme tedavisi, DMD için en umut verici potansiyel tedavi olarak ortaya çıkmıştır. Zorluklar devam etse de bu yeni terapötik yaklaşımların çoğu hastalığın tedavisi için umut vaat ediyor (75).

Gen değiştirme tedavisi, mikro veya mini distrofin genlerini iletmek için viral vektörler kullanır. DMD'li hastaların tedavisinde farklı AAV serotiplerini kullanan klinik denemeler, erken denemede distrofin ekspresyonunda güçlü bir artış ve iyileştirilmiş motor fonksiyonu sonucu ile umut vaat etmiştir.

Ataluren, mRNA durdurma kodonlarına karşı ribozomal duyarlılığı azaltmayı, böylece anlamsız mutasyonları olan hastalarda devam eden distrofin translasyonunu teşvik etmeyi amaçlayan küçük moleküllü bir tedavidir.

Ekzon atlama stratejileri, silinen diğerlerine bitişik ekzonları maskeleymeye çalışır. Bu, okuma çerçevesinin yenilenmesi ile sonuçlanır ve biraz daha küçük distrofin ürününün translasyonuna izin verir. Bu kategorideki terapiler, eteplirsen (ekson 51), casimersen (ekson 45), golodirsen (ekson 53), viltolarsen (ekson 53) ve ayrıca daha verimli ve dayanıklı olma potansiyeline sahip U7 küçük nükleer RNA'ları (snRNA) içerir (75).

Başka bir genom düzenleme stratejisi ise CRISPR/Cas9 platformu kullanılmasıdır. DMD genindeki spesifik patojenik varyantları hedefleme potansiyeline sahiptir ancak hedef dışı etkiler riski taşımaktadır (76).

2.2.1 DMD gen terapisi

Bu boyut, AAV veya lentivirüsler gibi popüler viral vektörler ile gen terapilerinde çalışmak için çok büyüktür. Bundan ötürü, plazmid DNA ile aktarılabilen tam uzunluktaki (~11 kb) ve viral yolla entegre edilebilen modifiye edilmiş rekombinant

mini veya mikro (6-8 kb) Distrofin gen dizilimlerinin distrofik fare veya köpek kas dokularına aktarılmasıyla, distrofik patolojinin dramatik bir seviyede iyileştiği birçok çalışmada rapor edilmiştir (77–79). Tedavi edici tam uzunluktaki Distrofin genini kas hücrelerinde ifade etmek için viral olmayan plazmid DNA (pDNA) ile aktarılması, kas hastalıklarını viral yöntemlere kıyasla daha güvenli tedavi etmek için kullanılan bir yaklaşımdır (78,80). Uzun süre stabil kalarak fonksiyonel özelliklerini koruyabilecek şekilde donuk saklanabilen Distrofin kodlayan plazmid DNA, aynı zamanda büyük miktarlarda üretilmesi ve viral üretime nispeten ucuz olmasından ötürü daha avantajlı görünmektedir (81).

Viral vektörlerden farklı olarak, pDNA'nın vücutta bağışıklık tepkisi oluşturma seviyesi oldukça azdır ve böylece DMD tedavisi için tekrarlı dozlarla hastaya transferi mümkündür (82,83). Kas distrofisi için ilk klinik deneme 2004 yılında yayınlandı. Bu deneme, MyoDys adı verilen tam uzunluktaki Distrofin kodlayan viral olmayan bir plazmid DNA kullanılarak yapıldı. Araştırmacılar, DMD hastalarında plazmid DNA'yı doğrudan kas içine enjekte ettiler. Herhangi bir immunojenisite veya toksisiteye neden olmamasına karşın ne yazık ki bu klinik çalışmada düşük seviyede ve etkinlikte Distrofin ekspresyonu sağlanabildi (82). Tam uzunluktaki Distrofin geni içeren pDNA'nın, intramüsküler enjeksiyon veya elektroporasyon ile, fare veya primatların iskelet kasına lokal olarak verilmesiyle, kas liflerinde tutulduğu ve aylarca farklılaşmış iskelet miyofiberlerinde Distrofin üretmeye devam ettiği rapor edilmiştir (84–86).

Diğer yandan, insan immün yetmezlik virüsü-1 (HIV-1)'den türetilen lentiviral vektör ile iskelet kası dâhil olmak üzere birçok bölünen ve bölünmeyen hücrelerde uzun süreli mini/mikro Distrofin ekspresyonunu sağlanabilmiştir (75,79,87). Distrofin gen diziliminin son ekzonlarının çıkarılmasıyla oluşturulan mikro-Distrofin diziliminden üretilen proteininin, pre-klinik DMD hayvan modellerinde eksprese edildiğinde, distrofik fenotipi kurtarmakta yeterli olduğu gösterilmiştir (87,88). Neonatal Dmd-mdx-4Cv fare kaslarına lentiviral-mikro-Distrofin virüs enjeksiyonu ile en az iki yıl yaygın ve stabil Distrofin ekspresyonunun sağlanabildiği rapor edilmiştir (87). Ancak, mini- ve mikro-Distrofin genleri ile yapılan fare çalışmalarında

önemli bir işlev sergiledikleri halde, tam uzunluktaki Distrofin protein fonksiyonlarını yeterince sergileyemedikleri rapor edilmiştir (89). Bununla birlikte, düşük doz pDNA ile aktarılan tam uzunluktaki Distrofin geninin, mini/mikro Distrofin ekspresyonunun oluşturduğu toksisite ve immunojenisiteye kıyasla daha az bir yan etki oluşturduğu belirtilmiştir (86). Bu nedenlerden dolayı, tam uzunluktaki Distrofin kodlama dizisinin gen terapilerde kullanılmasının daha avantajlı olabileceği öngörülmektedir. DMD tedavisinde gerçekleştirilen birçok terapötik müdahale ile hastalar iyileştirilmeye ve yaşam kaliteleri arttırılmaya çalışılmıştır: hücre tabanlı yaklaşımlar, çeşitli ilaç ve gen terapi metotları (4–6). Ancak DMD hastalığının tedavisinde henüz tatmin edici standart bir protokol geliştirilememiştir (7).

Düşünülen gen terapi metodu ile ülke ekonomisine büyük oranda katma değer sağlayacak yenilikçi bir gen terapi modelinin geliştirilmesi, hastaların yaşam kalitesini ve ömrünü arttıracakları öngörülmektedir. Gen terapi modeli, hastaların iyileşme ve hastanede yatış sürelerinin kısılmasını da sağlayacaktır. Günümüzde kullanılmakta olan ilaç ve kök hücre gibi tedavi yöntemlerinde hali hazırda açıklanamamış tedavi sürecindeki belirsizliklere alternatif bir çözüm yolu sağlayacaktır. Bu sayede DMD tedavilerinde günlük ihtiyaçların giderilmesindeki zorlukların azaltılması, hayat kalitesinin arttırılması ve ailelerin önemli bir sorununa çözüm olması beklenmektedir.

2.2.2 DMD gen tasarımı

Lentiviral, Lv-HSA- μ Dys/eGFP (lentiviral-mikro-Distrofin) vektöründe, mikro-Distrofin ekspresyonunu düzenleyen insan alpha-iskelet aktin geninden (HSA) türetilmiş güçlü, iskelet kaslarına özgü bir promotör/güçlendirici (enhancer) eleman kullanmıştır (87). Lv-HSA- μ Dys/eGFP lentivirüsü ile transdükte olan kas dokusundaki miyofiblerin veya miyotüplerin takibi için ayrıca, markör gen olarak eGFP'yi (Green fluorescent protein) kodlayan dizi Distrofin geni C-terminal ucuna eklenerek füzyon protein oluşturulmuştur. Böylelikle kas hücrelerinde mikro-Distrofin proteininin varlığı ve pozisyonu eGFP aracılığıyla belirlenebilecektir.

İskelet alfa-aktin, memeli kalp dokusunda da eksprese edilir (90,91). Fetal gelişimin geç evresinde alfa-kardiyak aktin ana izoform haline gelir, ancak alfa-iskelet aktin hala toplam çizgili kas aktin içeriğinin neredeyse yarısını oluşturabilir (92). Tavuk kalbinde de benzer sonuçlar gösterilmiştir (93). Amfibi *Xenopus laevis* embriyolarının somit gelişiminde ayrıca hem alfa-iskelet hem de alfa-kardiyak aktin koordineli bir şekilde artmaktadır (94). Bununla birlikte, amfibi olmayanlar çizgili kasta ifade edilen en az üç farklı izoform ve düz kasta ifade edilen sadece bir izoform gibi görünmektedir (95–97).

Bu gelişim paradigması, alfa-düz kas izoaktininin çeşitli miyofibroblast benzeri hücrelerde erken kalp ve iskelet kası gelişimi sırasında da eksprese edildiğini gösteren çalışmalarla daha da karmaşık hale getirilmiştir (98,99). Şimdiye kadar, bu ortak ifadenin gerçekten düzenlenmiş bir ifadeyi yansıtır yansıtmadığı veya daha doğrusu erken miyogenez sırasında ilk yüksek ifadede kalıcı bir "sızıntının" (*leakage*) bir sonucu olup olmadığı tartışmalı soruyu yanıtlayacak önemli bir kanıt bulunamamıştır. "Sızıntı" da olabilir, çünkü hücrel veya çevresel uyaranlara çapraz yanıt vermeyle sonuçlanan, kısmen farklı düzenleyici öğelerden oluşur. Kalpte yüksek alfa-iskelet aktini eksprese eden bir mutant fare modelinde yüksek dizi benzerliği ve patolojinin olmamasına dayanarak, en azından bu iki aktin izoformunun işlevsel olarak fazla olduğu varsayılır. Bu iki aktinin işlevi, muhtemelen protein kodlama bilgisinden çok uzay ve zamandaki farklı düzenlemeleriyle ilgilidir (100).

Distrofin transgeni, transgenik mdx farelerinde test edildiğinde veya sistemik olarak AAV vektörleri aracılığıyla mdx farelerine verildiğinde oldukça işlevsel olduğu ve distrofik patolojiyi iyileştirebildiği gösterilen daha önce tarif ettiğimiz $\Delta R4-R23$ μ Dys'e dayanıyordu. Son olarak, dönüştürülmüş miyofiberlerin veya miyotüplerin verimli bir şekilde izlenmesine izin vermek için, distrofinin C-terminal alanını eGFP'yi kodlayan dizilerle değiştirdik. Böyle bir ikamenin, aksi takdirde tam uzunluktaki veya mini-distrofin füzyon proteinlerinin işlevselliğini etkilemediği daha önce gösterilmişti.

Son olarak, α -iskelet aktin promotörü ve güçlendirici (*enhancer*) kullanımı, transgenin sadece farklılaşan miyositlerde, miyotüplerde ve miyofiberlerde eksprese

edilmesine izin vererek, vektör tarafından dönüştürülebilecek miyojenik olmayan hücrelerde gen ekspresyonunu önledi (101).

μ Dys/eGFP füzyon proteini, rAAV vektörü tarafından verilen mikrodistrofinleri takiben elde edilene benzer bir şekilde histopatolojik anormallikleri düzeltme yeteneği gösterdi (rAAV vektörleri tarafından taşınan mikrodistrofinlerin, mevcut durumda tutulan karboksi-terminal alanından yoksundur) (101,102).

2.3 DMD Fare Modeli

Hastalığın temel biyolojisini daha iyi anlamak için çok sayıda fare modeli geliştirilmiştir. Mdx genotipini, ek mutasyonlarla birleştirerek ciddi bir fenotip eksikliği giderilmeye çalışıldı ve böylece araştırmalar için en yaygın kullanılan hayvan modeli mdx faresi olmuştur. 1980'lerin başında, C57BL/10ScSn faresi kolonisinde yüksek CK ve histolojik miyopati keşfedilmiştir (103). Distrofin eksikliğine rağmen, mdx fareleri minimal klinik semptomlara sahiptir ve yaşam süreleri sadece ~%25 oranında kısalmaktadır (104,105).

Mdx faresi birkaç farklı genetik geçmişe sahip olan farelerle çaprazlanmaktadır. Bunların bazıları; albino, BALB/c, C3H, C57BL/6, DBA/2 ve FV ve çeşitli bağışıklık eksikliği olan suşlardır. Farklı arka planlarda fenotipik varyasyonlar gözlenmiştir.

Çalışmaların çoğu, distrofinde mutasyon bulunan fare modellerinde yapılmıştır. DMD'nin ilk fare modeli, bir C57BL/10ScSn kolonisinde kendiliğinden ortaya çıkan Dmdmdx (mdx) çizgisiydi (106). Glikolitik enzim aktivitesi mutantları keşfetmek için tasarlanmış bir ekranda tanımlandı ve kanda 3 kat daha yüksek seviyede piruvat kinaz aktivitesine sahip olduğu gösterildi (107). Moleküler analizler, bu dizinin ekson 23'te anlamsız bir mutasyon taşıdığını ve bunun erken bir sonlandırma kodonu ve kesilmiş (truncated) bir protein ile sonuçlandığı gösterildi (108,109).

Burada açıklanan *double* nakavt fare modellerinin yanı sıra çoğu çalışma, aksi belirtilmediği sürece mdx hayvanını kullanmaktadır. İnsanlardaki gibi, mdx'de iskelet

kasları da aktif miyofiber nekrozu, hücrel infiltrasyon, çok çeşitli miyofiber boyutları ve çok sayıda merkezi çekirdekli yenileyici miyofiber sergilemektedir. Bu fenotip aynı zamanda, kas izometrik gücünde yaklaşık 5 kat azalma ile sonuçlanan ilerleyici dejenerasyon ve miyofiber kaybına uğrayan diyaframda geliştirilmiştir (110).

Bununla birlikte, iskelet ve kalp kaslarında distrofin olmamasına rağmen, yetişkin mdx fareleri, insan DMD'sinin patojenik ilerleme özelliğini sergilemez. Arka uzuv kaslarında nekroz ve rejenerasyon 3-4 haftalıkken zirve yapar, ancak daha sonra ilerleme yavaşlar (111).

Distrofinin iskelet dışı ve kardiyak izoformlarının rolünü araştırmak için alternatif genetik modeller kullanılmıştır. Mdx ve mdx^{cv} aksine, mdx52, mdx^{βgeo} ve Dmd-null hatları, kalp ve iskelet kası dışında bulunan daha kısa distrofin izoformlarını etkileyen mutasyonlara sahiptir. Mdx52 faresi, ekson 52'nin silinerek bir neomisin kaseti ile değiştirme yolu kullanılarak oluşturulmuştur (112).

İlk sistemik gen terapisi tedavisi, Gregoreviç ve arkadaşları tarafından mdx farelerinde gerçekleştirilmiştir (113). Ardından utrofin/distrofin ve myoD/distrofin dko farelerinde gerçekleştirildi (114,115). Bu çalışmalarda, mikro-distrofin gen tedavisi ile kas distrofisinde histolojik ve fizyolojik belirtilerini önemli ölçüde iyileştirdi, CK seviyesini düşürdü ve yaşam süresini uzattı.

Mdx fare ve double nakavt modellerinde yıllarca süren kapsamlı araştırmalar, hastalığın iskelet kası bileşeni hakkındaki anlayışı büyük ölçüde artırmıştır. Utrophin mdx/utr^{-/-} nakavt, birçok DMD hastasında up-regüle edilen distrofine gelişimsel bir homolog olan utrophinin telafi edici rolünü göstermiştir. Ayrıca DGC'yi hedefleyen α-dystrobrevin mdx/dtna^{-/-} double nakavt, bu yapısal kompleksin sinyallemeye bileşeninin önemini, özellikle nNOS lokalizasyonunun rolünü göstermektedir (23).

Projede sunulmaktan olan DMD gen terapi modelinde testlerinin yapılacağı dmd-mdx-4Cv faresi, kimyasal mutagenез ile geliştirilmiştir ve C57BL/6 suşuna geri çaprazlanmıştır. DMD-mdx-4Cv fareleri, distrofin geninin ekzon 53'ünde bir erken

sonlandırma kodonuna sahiptir. Bu suşun MDX-10ScSn suşuna göre 10 kat daha az dönüşebilen miyofiberi vardır (116).

Fare fenotipinde DMD modeli, insanlara göre daha hafif distrofik patoloji göstermektedir. Çünkü genç DMD farelerinde hastalığın şiddetini azaltan telafi edici mekanizmalar bulunmaktadır. Utrofin ve integrin ekspresyonu Distrofin yokluğunda artarak regülasyon ve böylelikle kas rejenerasyonu yavaş da olsa devam etmektedir (117). Bundan dolayı, genç DMD-mdx fareleri, DMD çocuklarının aksine, başarılı bir kas rejenerasyonu sergiler ve geniş bir fibroz fenotipi göstermez. Dmd-mdx farelerde yapılacak fonksiyonel egzersiz testleri, bir tedavinin etkili olup olmadığını belirlemek için dmd-mdx-4Cv fare kaslarını zorlamak ve hastalığı şiddetlendirmek için kullanılmaktadır (118). 18 aylık DMD-mdx farelerde, rejenerasyon kapasitesi giderek azalmakta ve hastalığın ciddiyetinde eşzamanlı bir artış meydana gelmektedir. Bu nedenle, 18. ayı takiben yaşlı DMD-mdx fareleri tarafından sergilenen musküler distrofi, insan DMD'nin miyopatisine daha çok benzemektedir (119).

3 GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Gereç

Tablo 1. Kullanılan hücre hatlarının listesi.

Hücre Hatları	Katalog numarası, Markası
HEK293T- İnsan böbrek embriyonik hattı	CRI-3216, ATCC
Jurkat- Akut T hücre lösemisi	TIB-152, ATCC
MKH-Mezankimal kök hücre	Göbek bağından elde edilmiştir
Vero-Afrika yeşil maymun böbrek epitel hücresi	ATCC

Tablo 2. Kit, solüsyon ve antikorların listesi.

Kit, solüsyon ve antikorlar	Katalog numarası, Markası
RPMI 1640 medyum	01-101-1A, Biological Industries
DMEM medyum	11965084, Gibco
Isı inaktivasyonlu fetal sığır serum (FBS)	10500064- Gibco
Penisilin-streptomisin (10X)	03-031-5B, Biological Industries
DPBS (no calcium, no magnesium)	02-023-1A, Biological Industries
İsopropanol	A3928, PanReac Appli chem
MTT solüsyonu	CT01, MercMillipore
Tripan mavisi	T8154, Sigma Aldrich
BX-795	Sigma Aldrich
Vectofusin-1	130-111-163, Miltenyi
QIAfilter Plamid Giga kit	12291, QIAgen
Lenti-X konsentrator	PT4421-2, Takara
Lenti-X™ Gostix™ Plus	631281, Takara
Fugene HD transfeksiyon reaktifi	E2312, Promega

Tablo 2. Kit, solüsyon ve antikorların listesi (Devamı).

Optimem	31985070, Gibco
MSC NutriStem® XF medyum	05-200-1A, Biological Industries
MSC NutriStem® XF Suppl. Mix	05-201-1U, Biological Industries
İnsan serum albumin	Octapharma CSL Behring
Ficoll-Paque Plus	17-1440-02, Cytiva
LB agar	110283.0500, Merck
LB broth	110285.0500, Merck
Ampisilin 100mg/ml	A5354, Sigma Aldrich
Trypsin EDTA solüsyon C	03-053-1B
Etanol	K50322786826, Millipore
Steril Distile su	21175005, OSEL
Magnezyum kloride, 25mM	157039999, QIAGEN
Direct-zol RNA MiniPrep Plus	R2072, Zymo Research
High capacity cDNA reverse transcription kit	01079060, Appliedbiosystems
QuantiTect® SYBR® green PCR kit	204143, QIAGEN
UltraPure™ Agarose	16500100, Invitrogen
1 Kb plus DNA ladder	01105205, Invitrogen
50X TAE buffer	1610773, Biorad
Xpert Green DNA Stain Direct	GS020001, GRISP
Formalin solüsyon, neutral buffered, 10%	SLBT7772, SIGMA
Fare anti-distrofin antikor	NCL-DYS-1, LEICA
QuickTiter™ Lentivirus Titer Kit, Lentivirus Associated HIV p24 Elisa kiti	120720147, Cell Biolabs
Deksametason 21-fosfat 8mg/2ml	İbrahim Etem
FASP Protein Digestion Kit	Ab270519, Abcam
SDS page	Biorad
Asetonitril hypergrade for LC-MS	51101, Thermo scientific

Tablo 3. Ana ekipmanların listesi

Ana ekipmanlar	Katalog numarası, Markası
Sınıf II biyolojik güvenlik kabini	MN120, Nüve
Işık mikroskopu	Leica
İnkübatör	IC0150med, Memmert
FLUOstar Omega, Elisa okuyucu	BMG LABTECH
Akış sitometrisi	Cytoflex, Beckman Coulter
Su banyosu	NB20, Nüve
Santrifüj	Allegra X-30R, Beckman Coulter
Otomatik hücre sayıcı	T20, Biorad
Pipette aid	Pipetus, Hirschmann
Pipet (10, 100, 200, 1000 ul)	Axygen
Buzdolabı (+4°C ve -20°C)	1060TY, Arçelik
Dondurucu (-80°C)	DW-86L628, Haier
Sıvı azot tankı, LABS-40K	Worthington Industries
Nanodrop	NanoDrop one, Thermo
Gel Doc™ EZ Imager	Biorad
Lightcycler® 96	Roche Life Science
T100™ Thermal Cycler	Biorad
GentleMACS™ Dissociator, Doku parçalayıcı	Miltenyi Biotec
gentleMACS™ C-tube	5200427237, Miltenyi Biotec
Ultrasonik homojenizatör UP200St	Hielscher
INCUB-Line inkübatör	VMR
Bilyalı öğütücü, MM400	Retsch
Stericup quick release durapore 0.45µm PVDF, 1000 ml	S2HVU11RE, Millipore
Microfuge 200 centrifuge	Beckman Coulter

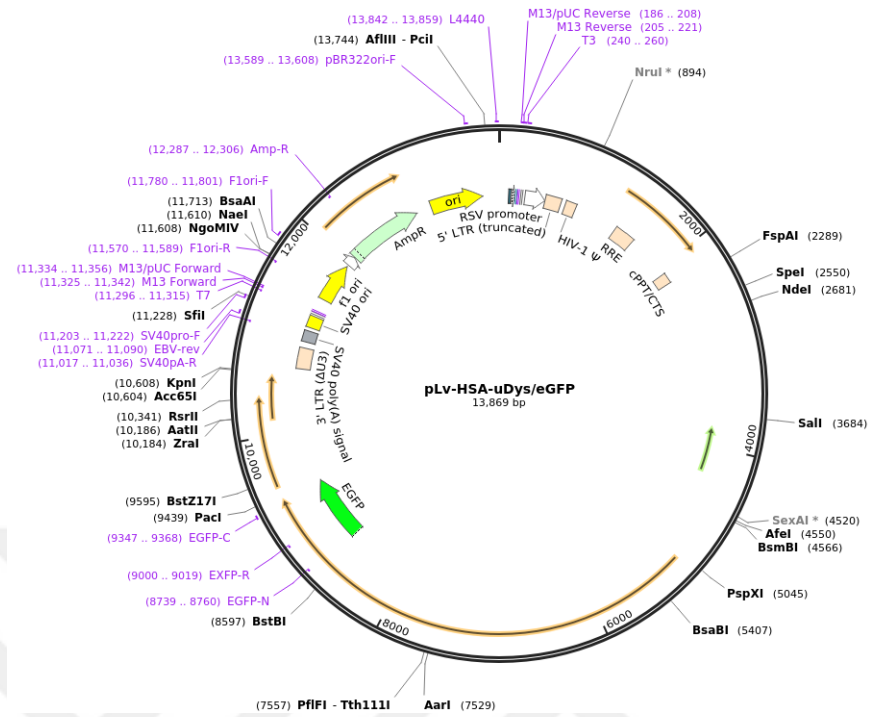
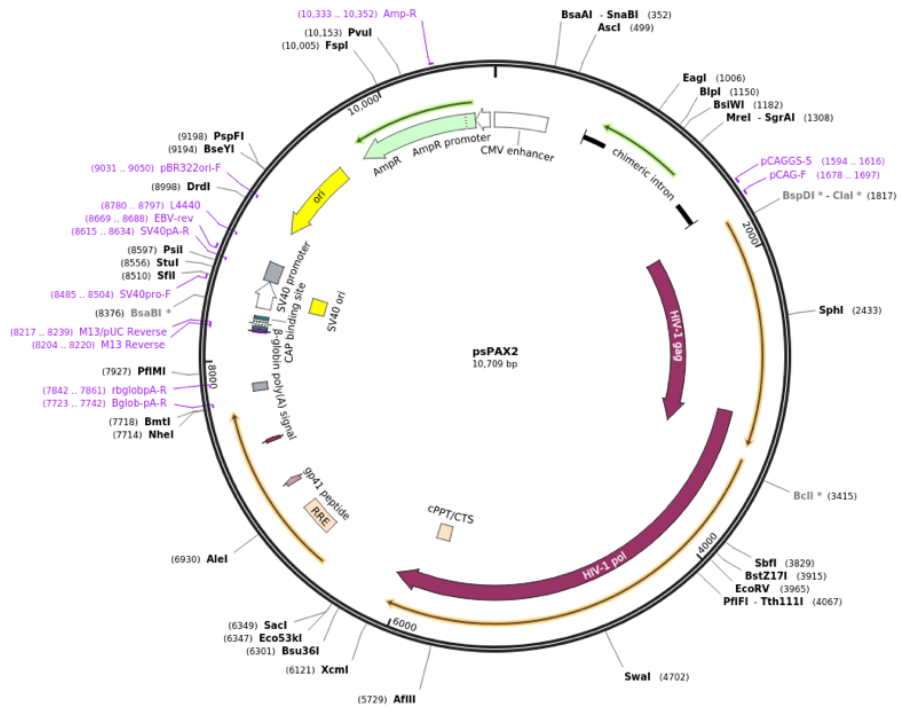
3.2 Yöntem

3.2.1 Lv-HSA-μDys/eGFP lentivirus üretimi ve etkinlik testleri

3.2.1.1 Plazmid tasarımı

Lentiviral, Lv-HSA-μDys/eGFP (lentiviral-mikro-Distrofin) vektöründe, mikro-Distrofin ekspresyonunu düzenleyen insan alpha-iskelet aktin geninden (HSA) türetilmiş güçlü, iskelet kaslarına özgü bir promotör/güçlendirici (enhancer) eleman kullanıldı (87). Lv-HSA-μDys/eGFP lentivirüsü ile transdükte olan kas dokusundaki miyofiblerin veya miyotüplerin takibi için ayrıca, markör gen olarak eGFP'yi (Green fluorescent protein) kodlayan dizi Distrofin geni C-terminal ucuna eklenerek füzyon protein oluşturuldu. Böylelikle kas hücrelerinde mikro-Distrofin proteininin varlığı ve pozisyonu eGFP aracılığıyla belirlendi. Projede kullanılacak plazmidler Addgene'den temin edildi.

- Lv-HSA-μDys/eGFP (Addgene #26810) (120)
- pCMV-VSV-G (Addgene #8454) (121)
- psPAX2 (Addgene #12260) (*psPAX2 was a gift from Didier Trono*)

Şekil 2. pLv-HSA- μ Dys/eGFP plazmid.

Şekil 3. psPAX2 plazmid.

3.2.1.2 Tranformasyon ve plazmid izolasyonu

31

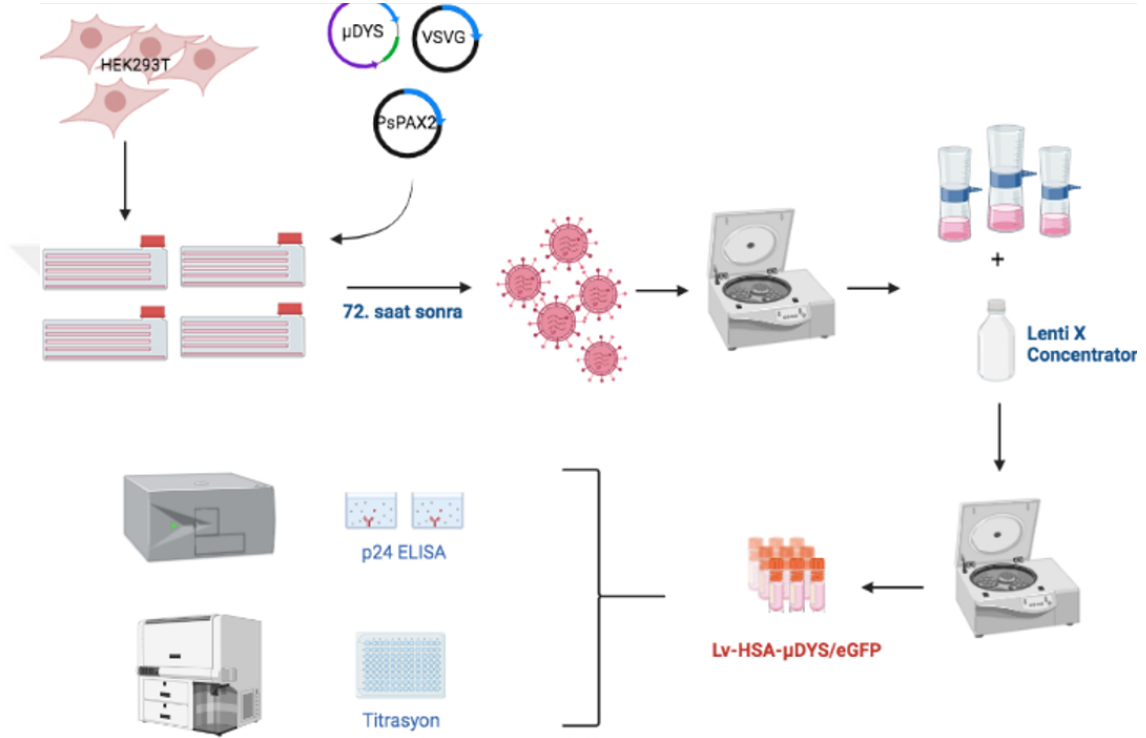
3.2.1.3 Jel elektroforez

%1'lik Tris Asetik asit EDTA (TAE) tampon çözeltisi içinde hazırlanmış %0.8'lik agaroz jele yüklenen Xpert Green DNA Stain Direct ile boyanan ortalama 40 ng DNA örnekleri ve 1kb DNA merdiveni (DNA *ladder*) 60 dakika, 100 volt ve 60 mA ile yürütülerek bakteriyel DNA kontaminasyonunun varlığı ve plazmid DNA'ların büyüklüğüne göre varlığı değerlendirildi. Görüntüleme Gel Doc™ EZ Imager cihazında alındı.

3.2.1.4 Transfeksiyon ve lentivirüs üretimi

HEK293T hücreleri %10 ısı inaktivasyonlu fetal sığır serum (FBS) ve %1 Penisilin-Streptomisin takviyesi ile hazırlanan DMEM high glucose (Gibco) besiyerinde çoğaltıldı. HEK293T hücreleri her lot öncesinde mikoplazma ve sterilit (endotoksin, mikrobiyal yük) kalite kontrol testlerine tabi tutuldu. 21 çok katlı flasklara 60×10^6 HEK293T hücresi 100 ml HEK293T besiyeri içerisinde ekildi ve 24 saat sonra hücreler flaskın %80'ini kapladıktan sonra her flaskın medyumunu döküldü ve 75 ml OPTIMEM (%1 penisilin-streptomisin) tüm flasklara eklendi. 1-2 saat 37°C'de inkübe edildikten sonra Promega marka FuGENE® HD Transfeksiyon reaktifi, VSVG, psPAX2 ve Lv-HSA- μ Dys/eGFP plazmidleri kullanılarak HEK293T hücrelerinin transfeksiyonu üretici firmanın talimatlarına göre gerçekleştirildi. 16 saat inkübasyon sonrası flasklardaki besiyer dökülerek, 75 ml OPTIMEM (%1 penisilin-streptomisin) eklendi. 48 ile 72 saat sonra süpernatantlar 45 μ m ile filtre edildikten sonra Lenti-x konsentrator (Toplam hacmin 3'te 1'i kadar) eklendi ve 4°C'de muhafaza edildi. Toplanan süpernatantlar 1500xg 45 dakika 4°C'de santrifüj edilerek pelletler OPTIMEM (%1 Penisilin-Streptomisin) besiyeri ile çözündü (Şekil 5). 500,000 IFU'dan yüksek olduğu Lenti-X™ Gostix™ Plus kullanılarak, 10 dakika içerisinde üretici talimatına uyarak test edildi. Toplanan lentivirüs solüsyonu kalite kontrol analizleri için ayrılan numune farklı vialer alındıktan sonra -80°C'de muhafaza edildi. Lv-HSA- μ Dys/eGFP titre testinin ardından sterilit, saflık ve replikatif kompetan lentivirüs (RCL) analizleri dahil olmak üzere diğer kalite kontrol testleri yapıldı. Üretilen plazmid ve lentivirüsün tüm kalite kontrol testleri Acıbadem Labmed

Laboratuvarı'nda akredite protokollerle gerçekleştirildi. Kabul kriterleri (122) ile tabloda sunulan yöntemlere göre kalite kontrol testleri (Tablo 9) gerçekleştirildi. BACTEC kan kültürü şişelerinde BACTEC™ FX kan kültürü şişesiyle birlikte sterillik test edilmiştir. Mikoplazma analizi, Mycoplasma türü 500 PCR kiti ve GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems) ile belirlendi.



Şekil 5. Lentivirüs üretimi.

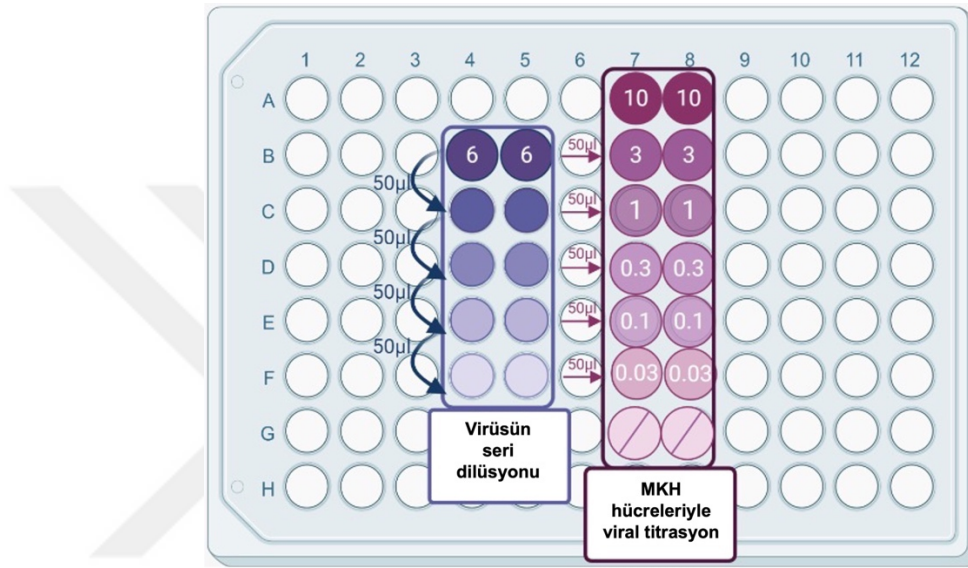
3.2.1.5 Lentivirüs titre hesaplama

Lentivirüs titre hesabı akım sitometri ve QuickTiter™ Lentivirus Titer (Lentivirus Associated HIV p24) Elisa kiti kullanılarak iki doğrulama yapılarak hesaplandı.

10,000 mezankimal kök hücre (MKH) 96 kuyucuklu plakaya 100 μ l MKH besiyeri içerisinde ekildi. MKH besiyeri olarak MSC NutriStem® XF medyum (MSC NutriStem® XF Suppl. Mix ve %1 Penisilin-Streptomisin) kullanıldı. Seri dilüsyon yapılarak lentivirüs 10 μ l'den başlayarak en son 0.03 μ l olarak Şekil 6'da gösterildiği gibi eklendi. Sadece MKH grubuna virüs eklenmedi. 96 kuyucuklu plaka 3 gün

boyunca 37°C’de inkübe edildi. 3 gün sonrasında kuyucuklar iyice karıştırılarak 50 µl cam tüplere aktarılarak akım sitometri cihazında okutuldu.

Virüslerin titrasyonu 1:10 ve 1:100 dilüsyon yapılarak viral QuickTiter™ Lentivirus Titer Kit, (Lentivirus Associated HIV p24 Elisa) kiti kullanılarak hesaplandı. Kit üreticinin talimatlarına uyarak yapıldı.



Şekil 6. Lentivirüs titrasyonu için 96 plaka hücre ekimi.

3.2.1.6 Replikatif kompetan lentivirüs tayini

Lentivirüsün transdükte edilen hücrelerde kendini kopyalama olasılığını test etmek amacıyla Lv- HSA-µDys/eGFP enfekte edilmiş MKH hatlarına ait süpernatant örneği MKH hücrelerini eklenerek 21 gün kültür sonunda akım sitometrisinde eGFP ekspresyonu kontrol edildi (123). Beklenti $\leq 1\%$ şeklindedir (124). MKH besiyeri olarak MSC NutriStem® XF besiyerinin içerisine MSC NutriStem® XF Suppl. Mix ve 1% Penisilin-streptomisin eklenerek hazırlandı.

3.2.1.7 In vitro HSA promotör testi

3.2.1.7.1 PKMH izolasyonu

30 ml periferik kan (Etik komite izni ve onay formu EK 2'ye eklendi.) sitratlı kan tüpüne alındı. Periferik kan mononükleer hücresi (PKMH) ficoll-plaque kullanılarak santrifüj yapıldı. Tüp 800 xg 25 dakika 21°C'de santrifüj yapıldı. PBMC kısmı pipet yardımıyla çekilerek 50 ml falkon tüpe aktarıldı. Yıkama işlemi için Dulbecco'nun fosfat tuz çözeltisi (DPBS) eklenerek 400xg 10 dakika 21°C'de santrifüj yapıldı. Süpernatantı uzaklaştırarak, tüpün dibindeki pellet DMEM high glucose besiyeri içerisine (%10 FBS ve %1 Penisilin-streptomisin) kullanılarak çözündürülüp, kültüre alındı.

3.2.1.7.2 HSA promotör testi

HEK293T, Vero ve PKMH hücrelerinin kültürü için DMEM high glucose besiyeri, %10 FBS ve %1 Penisilin-streptomisin kullanıldı. Jurkat hücrelerinin kültürü için RPMI1640 besiyerinin içerisine %10 FBS ve %1 Penisilin-streptomisin, %1 mem vitamin, %1 mem nonessential aa ve %1 sodium pyruvate eklendi. 10,000 HEK293T, Jurkat, Vero ve PKMH hücreleri duplike ve ayrı ayrı olacak şekilde 96 kuyucuklu plakaya 100 µl besiyer içerisinden ekildi. 10 µl lentivirüs eklendi. Kontrol olarak sadece hücre grubuna virüs eklenmedi. 96 kuyucuklu plaka 3 gün boyunca 37°C'de inkübe edildi. 3 gün sonrasında kuyucuklar iyice karıştırılarak 50 µl cam tüplere aktararak akım sitometri cihazında okutuldu.

3.2.1.8 In vitro sitotoksite testi

96 kuyucuklu plaka (F) kullanılarak 10,000 MKH, 100 µl MKH besiyeri içerisinden ekildi. MKH besiyeri olarak MSC NutriStem® XF besiyerinin içerisine MSC NutriStem® XF Suppl. Mix ve %1 Penisilin-streptomisin eklenerek hazırlandı. 24 saat sonra kuyucuklardaki besiyer çekilip, atıldı. 100 µl yeni besiyer içerisinden 3, 5, 7, 10 ve 15 MOI Lv-HSA-µDys/eGFP eklendi. Sadece MKH grubuna lentivirüs

eklenmedi. Bütün gruplar duplike olacak şekilde hazırlandı. 37°C’de 72 saat boyunca inkübe edildikten sonra, besiyer kuyucuklardan uzaklaştırıldı ve tüm kuyucuklara 100 µl MTT solüsyonu (%10 FBS’li DMEM besiyeri ile 10’da 1 dilüsyon yapıldıktan sonra kullanıldı) eklendi. 4 saat sonrasında ise 100 µl isoproponol eklendi. 96 kuyucuklu plaka 200 rpm’de 10 dakika çalkalayıcının üzerinde durduktan sonra Elisa okuyucusunda 570 nm okutuldu.

3.2.1.9 Transdüksiyon

3.2.1.9.1 Yöntem 1

24 kuyucuklu plaka içerisine 200,000 MKH hücresi 500 µl MKH besiyeri kullanılarak ekildi. 3 MOI ve 5 MOI Lv-HSA-µDys/eGFP, BTX795 ile birlikte eklendi. 6 saat boyunca 37°C’de inkübe edildikten sonra 300xg 10 dakika santrifüj yapıldı. Daha sonra 24 kuyucuklu plakada 5 gün boyunca çoğaltıldı. eGFP ekspresyonu akım sitometri cihazıyla ölçüldü.

3.2.1.9.2 Yöntem 2

24 kuyucuklu plaka içerisine 200,000 MKH hücresi 500 µl MKH besiyeri kullanılarak ekildi. 3 MOI ve 5 MOI Lv-HSA-µDys/eGFP eklendi. 400xg 60 dakika 34°C’de santrifüj yapıldıktan sonra 16 saat boyunca 37°C’de inkübe edildi. Daha sonra 24 kuyucuklu plakada 5 gün boyunca çoğaltıldı. eGFP ekspresyonu akım sitometri cihazıyla ölçüldü.

2 farklı transdüksiyon yöntemiyle elde edilen ekspresyon sonuçları karşılaştırıldı.

3.2.2 Deney hayvanlarının temini ve bakımı

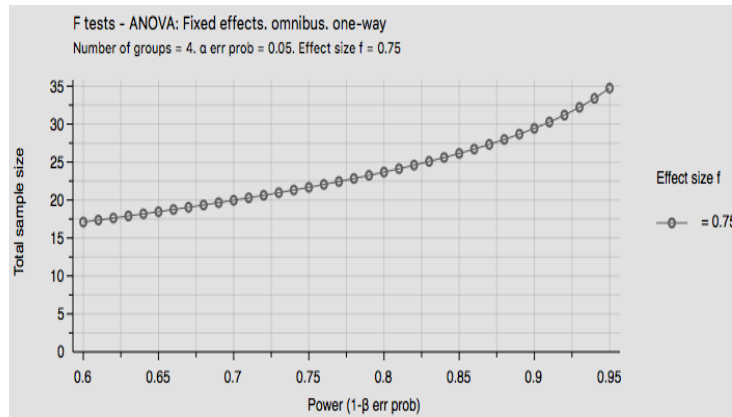
Araştırmada, 18 aylık/ 4 haftalık/ 10 aylık C57Bl/6 ve dmd-mdx-4Cv fare kullanıldı. C57Bl/6 ve dmd-mdx-4Cv fareleri Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi Kerem Aydınlar Kampüsü’nde faaliyetlerini sürdüren ACU-Deney Hayvanları Merkezi’nden (DEHAM) tedarik edildi. Tüm hayvanlar IVC (Bireysel

havalandırılmalı kafesler) kafeslerde yaşamakta olup, kafes içi sıcaklık ($22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$), nem ($50 \pm 15\%$) ve hava sirkülasyonu elektronik olarak düzenlenip takip edildi. Merkezde aydınlık/karanlık periyodu 12/12 saat şeklinde ayarlandı. Farelerin kafes temizliği en az haftada iki kez DEHAM'da çalışan uzmanlar tarafından yapıldı. Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan (ACU-HADYEK) onay alınmıştır (EK-3 eklenmiştir). Deney planının uygulanmasından sonra, farelere servikal dislokasyon yoluyla ötenazi yapıldı.

3.2.2.1 Hayvan deneylerinin planlanması

3.2.2.1.1 Güç (Power) analizi

Deney planında kullanılacak fare sayısının belirlenmesi için güç analizi G-Power v3.1.9.2 yazılımı kullanılarak yapıldı. Kantitatif analiz kullanılan deneysel yaklaşımlarda gücün minimum %80 olması gerekmektedir. 4 grubunun birbiri ile karşılaştırılması, tek yönlü ANOVA ($\alpha=0,05$) kullanılarak yapılacaktır. G-Power programında yapılan güç analizine göre, %80 güç ve 0,75 etki büyüklüğü ile tasarlanan deney planı için 4 grubun her grubunda $n=6$ olacak şekilde örneklem büyüklüğü belirlenmiştir. Şekil 7'de örneklem büyüklüğünün (n) ve gücün herhangi bir kombinasyonu için tespit edilebilen ortalama farklılıkları verilmiştir. Sonuç olarak; Grup başına 6 fare ile testin gücü 0.80, toplam fare 24 olarak hesaplandı.



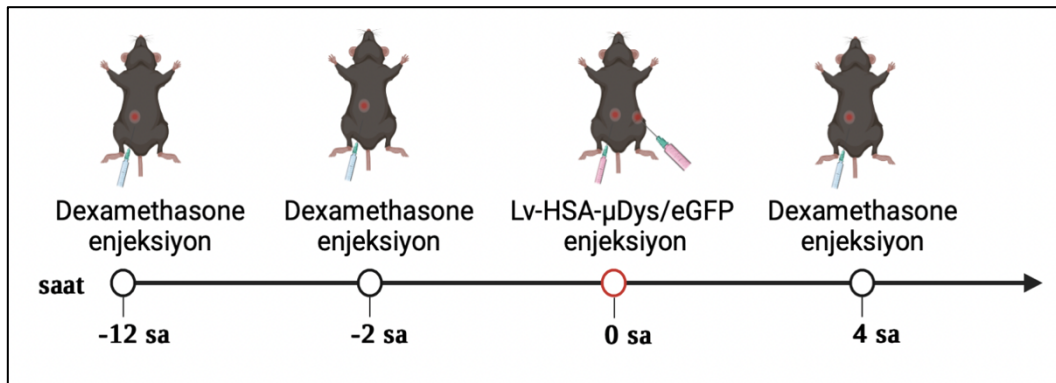
Şekil 7. Örneklem büyüklüğünün (n) ve gücün herhangi bir kombinasyonu için tespit edilebilen ortalama farklılıkları.

3.2.2.2 Dmd-mdx-4Cv farelerin doğrulanması

Sekanslama için 3 erkek ve 6 dişi dmd-mdx-4Cv farelerin kulaklarından parça alındı ve 53. ekzon bölgesi PCR ile çoğaltıldı. İleri (*forward*) primer ‘tttccactgtcttctcttgagt’ ve geri (*reverse*) primer için ‘ggcactcatctgtagtcttga’ kullanıldı. İleri primerin Tm sıcaklığı 55.7°C ve geri primerin ise 55.4°C. Yeni nesil dizileme çalışması Acıbadem Labgen tarafından gerçekleştirildi.

3.2.2.3 Lv-HSA-μDys/eGFP enjeksiyon için grupların belirlenmesi

DMD gen terapisi için aşağıda belirtilen yöntemler; bakteriyel transformasyon, plazmid DNA izolasyonu, lentivirüs üretimi ve titrasyonu, mikrobiyolojik ve etkinlik kalite kontrol testleri tamamlandı ve etik kurul onaylı pre-klinik fare test çalışmaları ve farklı yaş gruplarında olan dmd-mdx-4cv farelerde DMD gen tedavisi test edildi. Tedavi öncesi 12. ve 2. saate ve tedavi sonrası 4. saatte 5 mg/kg Dexamethasone Lv-HSA-μDys/eGFP uygulanan dmd-mdx-4cv farelerine ve pozitif kontrol grubuna intraperitoneal (IP) olarak enjekte edildi (Şekil 8) (125). Lv-HSA-μDys/eGFP gen tedavisi IP ya da intramüsküler (IM) olarak gruplarda belirtildiği üzere enjeksiyon gerçekleştirildi. Pozitif kontrol grubu için sağlıklı C57BI/6 fareleri kullanıldı. Negatif kontrol grubu DMD’li dmd-mdx-4Cv farelerine hiçbir tedavi uygulanmamıştır.



Şekil 8. Tedavi uygulanacak dmd-mdx-4Cv fare grupları için enjeksiyon zamanları.

3.2.2.3.1 18 aylık dmd-mdx-4cv farelere uygulama

Dmd-mdx-4Cv farelere 18 aylıkken 3 farklı enjeksiyon (IP/IM, IM, IP) ile gen transferi yapılmıştır ve aylar içerisindeki Distrofin gen ekspresyonu değişimleri takip edildi. 18 aylık Dmd-mdx-4Cv farelerindeki 1. gruba IP ve IM enjeksiyon, 2. gruba sadece IM enjeksiyon ve 3. gruba sadece IP enjeksiyon olarak gen tedavisi uygulandı. Lv- HSA- μ Dys/eGFP, grup 1, 2 ve 3'e 5×10^5 TU/ 200 μ l DPBS şeklinde verildi. Tedavi öncesi -12. ve -2. saatte ve tedaviden 4 saat sonra 100 μ g Dexamethasone IP olarak enjekte edildi (125). Her grupta 4 fare mevcuttur ve takip süresi 6 ay olarak belirlendi. 3. ayın sonunda her gruptan 2 fare kurban edildi, geri kalan farelere 2. Doz olarak Lv- HSA- μ Dys/eGFP 5×10^5 TU/ 200 μ l DPBS Lv- HSA- μ Dys/eGFP enjekte edildi. 6.ayın sonunda geri kalan farelerin kurbanasyonu gerçekleştirildi (Şekil 8) (Tablo 4).

Tablo 4. 18 aylık dmd-mdx-4cv farelere uygulama. Çalışma aşağıdaki tabloda ayrıntıları verilmiş olan gruplar üzerinde test edilecektir.

GRUPLAR	UYGULAMALAR	N
IM/IP	* Dmd-mdx-4Cv farelerine, 5×10^5 TU IM/IP Lv- HSA- μ Dys/eGFP enjeksiyon * Tedavi öncesi ve sonrası IP yolla Dexamethasone	4
IM	* Dmd-mdx-4Cv farelerine, 5×10^5 TU IM Lv- HSA- μ Dys/eGFP enjeksiyon * Tedavi öncesi ve sonrası IP yolla Dexamethasone	4
IP	* Dmd-mdx-4Cv farelerine, 5×10^5 TU IP Lv- HSA- μ Dys/eGFP enjeksiyon * Tedavi öncesi ve sonrası IP yolla Dexamethasone	4
Kontrol	* C57Bl/6 farelerine, IP yolla Dexamethasone uygulanacaktır * Lv- HSA- μ Dys/eGFP uygulaması yapılmayacaktır	4
Dmd-mdx-4Cv	* Dmd-mdx-4Cv farelerine, hiçbir uygulama yapılmayacaktır	4

3.2.2.3.2 4 haftalık dmd-mdx-4cv farelere uygulama

4 haftalık erkek Dmd-mdx-4Cv farelere IP ve intramüsküler IM olarak 2 farklı doz verildi (Tablo 5). Lv-HSA- μ Dys/eGFP, Doz 1 grubuna 5×10^5 TU/200 μ l DPBS ve Doz 2 grubuna 1.5×10^6 TU/200 μ l DPBS IP/IM olarak enjekte edildi. Tedavi öncesi 12. ve 2. saate ve tedavi sonrası 4. saatte 100 μ g Dexamethasone IP olarak Doz 1, Doz 2 ve pozitif kontrol grubuna enjekte edildi (Şekil 8) (125). Her grupta 6 fare mevcuttur ve takip süresi 2 ay olarak belirlenmiştir. 2. ayın sonunda sakrifikasyon gerçekleştirildi.

Tablo 5. 4 haftalık dmd-mdx-4cv farelere uygulama. Çalışma aşağıdaki tabloda ayrıntıları verilmiş olan gruplar üzerinde test edilecektir.

GRUPLAR	UYGULAMALAR	N
Doz 1	* Dmd-mdx-4Cv farelerine, 5×10^5 TU IP/IM Lv-HSA- μ Dys/eGFP enjeksiyon * Tedavi öncesi ve sonrası IP yolla Dexamethasone	6
Doz 2	* Dmd-mdx-4Cv farelerine, 1.5×10^6 TU IP/IM Lv-HSA- μ Dys/eGFP enjeksiyon * Tedavi öncesi ve sonrası IP yolla Dexamethasone	6
Kontrol	* C57BI/6 farelerine, IP yolla Dexamethasone uygulanacaktır * Lv-HSA- μ Dys/eGFP uygulaması yapılmayacaktır	6
Dmd-mdx-4Cv	* Dmd-mdx-4Cv farelerine, hiçbir uygulama yapılmayacaktır	6

3.2.2.3.3 10 aylık dmd-mdx-4cv farelere uygulama

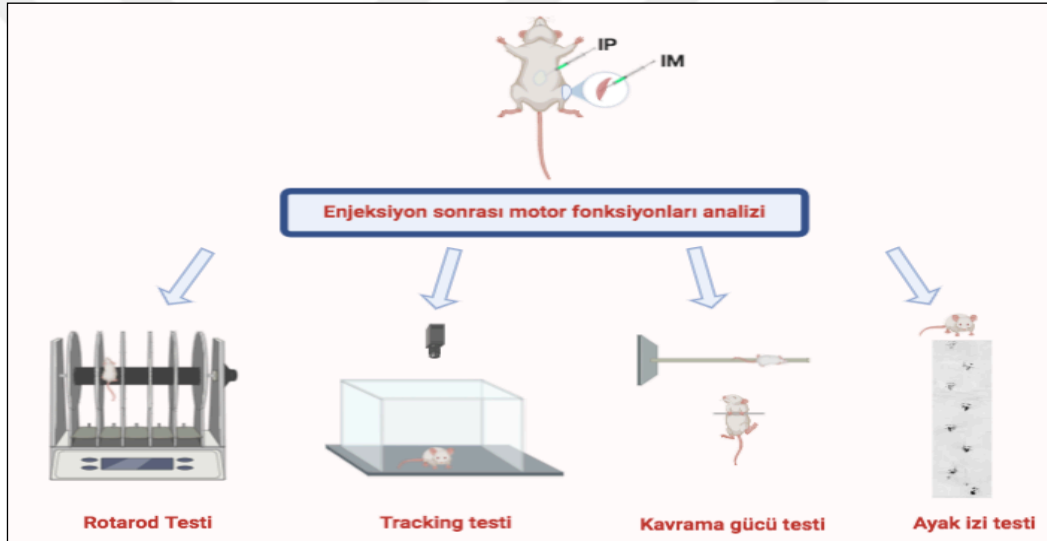
Erkek 10 aylık dmd-mdx-4Cv farelere IP ve intramüsküler IM olarak 2 farklı doz verildi (Tablo 6). Lv-HSA- μ Dys/eGFP, Doz 1 grubuna 5×10^5 TU/200 μ l DPBS ve Doz 2 grubuna 1.5×10^6 TU/200 μ l DPBS IP/IM olarak enjekte edildi. Tedavi öncesi 12. ve 2. saate ve tedavi sonrası 4. saatte 100 μ g Dexamethasone IP olarak Doz 1, Doz 2 ve pozitif kontrol grubuna enjekte edildi (Şekil 8)(125). 2 hafta sonra 2. Doz olarak Doz 1 grubuna 5×10^5 TU/200 μ l DPBS ve Doz 2 grubuna 1.5×10^6 TU/200 μ l DPBS IP/IM olarak enjekte edildi. Tedavi öncesi 12. ve 2. saate ve tedavi sonrası 4. saatte 100 μ g Dexamethasone IP olarak Doz 1, Doz 2 ve pozitif kontrol grubuna enjekte edildi. Her grupta 5 fare mevcuttur ve takip süresi 1 ay olarak belirlendi. 1. ayın sonunda sakrifikasyon gerçekleştirildi.

Tablo 6. 10 aylık dmd-mdx-4cv farelere uygulama. Çalışma aşağıdaki tabloda ayrıntıları verilmiş olan gruplar üzerinde test edilecektir.

GRUPLAR	UYGULAMALAR	N
Doz 1	* Dmd-mdx-4Cv farelerine, 5×10^5 TU IM/IP Lv-HSA- μ Dys/eGFP enjeksiyon * Tedavi öncesi ve sonrası IP yolla Dexamethasone	5
Doz 2	* Dmd-mdx-4Cv farelerine, 1.5×10^6 TU IM/ IP Lv-HSA- μ Dys/eGFP enjeksiyon * Tedavi öncesi ve sonrası IP yolla Dexamethasone	5
Kontrol	* C57BI/6 farelerine, IP yolla Dexamethasone uygulanacaktır * Lv- HSA- μ Dys/eGFP uygulaması yapılmayacaktır	5
Dmd-mdx-4Cv	* Dmd-mdx-4Cv farelerine, hiçbir uygulama yapılmayacaktır	4

3.2.2.4 Motor performans analizi

Kas görünümünde histolojik iyileşmeler değerlendirilebilmesine rağmen fizyolojik ve fonksiyonel bir iyileşmenin de pre-klinik çalışmamızın klinik insan çalışmasına geçmeden önce tespit etmeyi amaçlamaktayız. Bu nedenle Dmd-mdx-4Cv farelerde kas fonksiyonunu değerlendirmek için birtakım teknikler kullanıldı. Gen transferinin ardından, pre-klinik gelişim testleri olarak, fonksiyonel kas gelişiminin incelenmesi için ön ayak tutuş gücü testi, bir tel ya da bir ızgara ile asma testi, yürüme (tracking) testi gibi davranış deneylerinin uygulanması 4 haftada bir olacak şekilde planlandı (Şekil 9).



Şekil 9. Enjeksiyon sonrası her grupta yapılacak olan motor performans analizleri (Created with BioRender.com).

3.2.2.4.1 Kavrama gücü testleri

Gen transferini takiben DMD modeli farelerde denge, koordinasyon ve kas durumu, askı testleri (*Hanging Test*) ile değerlendirilmesi planlandı. Bu prosedüre göre; ilk olarak askı aparatı kurulumu yapıldı. Aparat kurulumu için 2 mm kalınlığındaki metal bir askı bir rafa sıkıca sabitlenerek yaklaşık 37 cm mesafe bırakıldı (126). Fare ızgaraya yerleştirilerek ve dört pençeleriyle kavraması sağlandı ve zamanlayıcıyı başlatıldı. Güçsüz olan farelerin normalin dışında olarak telin

üzerinde durmak veya kasıtlı olarak atlamak gibi asılmaktan kaçış davranışları sergilemesi beklenmektedir. Eğer fare telden düşüyorsa zamanlayıcı durdurularak asılı kaldığı süre kaydedildi. Maksimum asılı kalma süresi kaydedildi.

3.2.2.4.2 Rotarod testi (Rotarod Running)

Kas gücü, koordinasyon, denge ve durum belirlenebilmesi için Rotarod testi (*Rotarod Running*) uygulanması amaçlanmaktadır. Bunun için ilk olarak aparat kurulumu yapılacaktır: farelerin dönen bir tüp üzerinde çalışması gerekecektir. Sabit hızın dakika başına 5 rpm ayarlandığından ve hız başladığında ilk 15 saniyede 5-45 rpm'den arttırıldı. Bu artış sonrasında hız sabitlendi. Rotarod tüpü 5 rpm'lik yavaş sabit bir hız dönüşüne ayarlandığı zaman fareler tüp üzerine yerleştirildi. Fareler konumlandırıldıktan sonra koşu başlatıldı. İlk 15 saniyede, tüpün hızı 5-45 rpm'e kadar hızı arttırıldı. Fareler koşu süresince gözlemlendi. Çalışma süresi sürekli olarak kaydedildi. Fare düştüğünde çalışma süresi otomatik olarak durduruldu. Farelerin maksimum koşu süresi olan 500 sn dolduğunda test oturumunu sonlandırıldı.

3.2.2.4.3 Ayak izi analiziyle yürüyüş testi (Footprint)

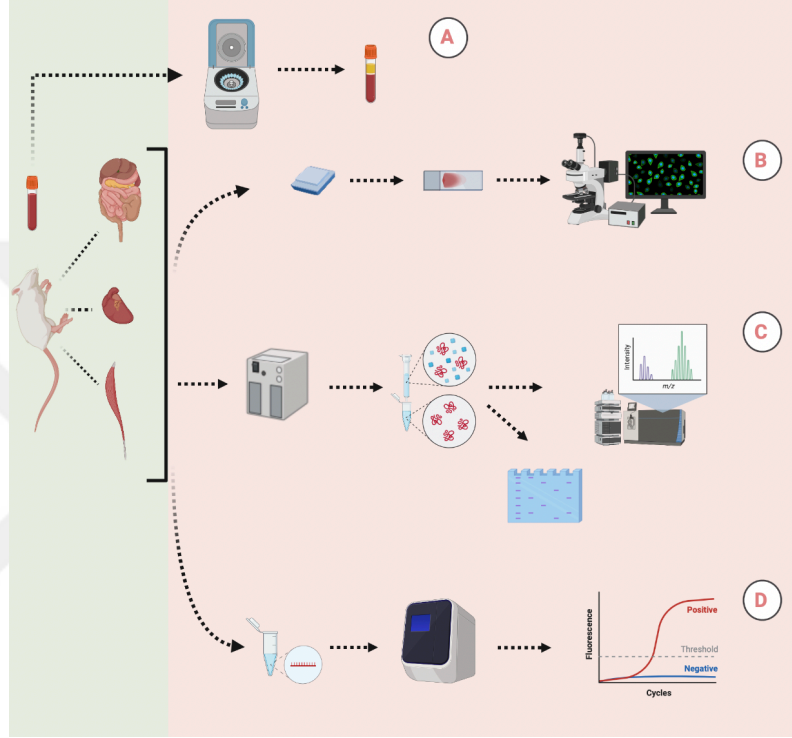
47 cm lik yürüyüş mesafesi baz alınarak farelerin arka sol ve sağ ayakları farklı renklerde boyanıp (mor/yeşil), bir kağıt üstünde yürütüldü. Cetvel ile iki adım arası mesafesi ölçülerek, sağ ve sol taraf olarak cm cinsinden kayıta geçildi (127).

3.2.2.4.4 Tracking testi

Klinik öncesi testlerin önemli bir kategorisi, kas distrofisinin murin modellerinde sıklıkla değiştirilen bir parametre olan istemli hareketin ölçülmesidir ve genellikle açık alan aktivitesinde izlemeye dayalı testler ile test edilir. Ethovision XT9 programı ile 6 dakika boyunca sessiz bir odada, açık alanda uzunluğu 80 cm x 80 cm ve 40 cm yüksekliği olan kutu içerisinde yukarıya monte edilen kamera ile kaydedildi. Her fare tek tek kayıt altına alındı. Hız (cm/s), hareket (s) ve hareket edilen mesafe (cm) sonuçları karşılaştırıldı (128).

3.2.2.5 Sonlandırma

Her şeyin yolunda gitmesi durumunda belirtilen haftalarda sonlandırma yapılarak, organ histopatolojik ve proteomiks analizlerin de değerlendirilmesi çalışma fazına geçildi (Şekil 10).



Şekil 10. Sakrifikasyon sonrası A. Serum elde edildikten sonra CK, AST, LDH ölçümü, B. Dokular parafine gömüldükten sonra immunohistokimya/ toksikoloji analizleri, C. Kas dokusunda LC-MS/MS analizi, D. Kas ve Kalp dokusu kullanılarak gerçek zamanlı-kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (RT-qPCR) analizi. (Created with BioRender.com)

3.2.2.6 Kan analizi

Gen terapi metotlarını takiben oluşabilecek kas hasarını değerlendirmek için, farelerden alınacak kandan 800 xg 25 dakika santrifüj edilerek serum elde edildi ve serum içerisindeki CK, aminotransferaz (AST) ve laktat dehidrogenaz (LDH) ölçüldü (81). Kan parametreleri için serum örnekleri VETLAB veteriner teşhis laboratuvarı tarafından bakıldı.

3.2.2.7 İmmunohistokimyasal analizler

3.2.2.7.1 Kalp ve iskelet kası dokularının alınması ve parafin doku takibi

Fareler sakrifiye edildikten sonra hemen çıkarılan kalp ve iskelet kası dokuları DPBS içerisine alındı. İskelet kasları bistrü ile transvers şekilde kesilip bir parçası frozen kesit için Cryomatrix (Thermo) jeli içerisine gömüldü diğer parçası ise %10 'luk formalin içerisine alınarak fikse edildi. Kalp dokuları ise longitudinal olarak kesilip yine bir parçası Cryomatrix (Thermo scientific) jeli içerisine diğer parçası ise %10 'luk formalin içerisine alınarak fikse edildi.

%10 'luk formalin ile fikse edilen kalp ve iskelet kası dokuları 48 saat sonunda fiksatifin uzaklaştırılması için dokular 1 gece akar çeşme suyu altında yıkandı. Dokular, suyun uzaklaştırılması için artan konsantrasyonlardaki alkol serilerinden geçirildi. Ksilen (16446, Sigma-Aldrich) ile şeffaflaştırma yapılarak tüm dokular parafine gömüldü. Ayrıntılı parafin doku takibi protokolü Tablo 7'de verildi.

Tablo 7. Parafin doku takibi protokolü.

Kullanılan kimyasal madde	Süre (saat)
%10'luk formalin	48
%60 alkol	1
%70 alkol	1
%80 alkol	1
%90 alkol	1
%100 alkol	1
%100 alkol	1
Ksilen-alkol (1:1)	1/2
Ksilen	1
Ksilen	1
Ksilen-Parafin (1:1)	1/2
Parafin	1

Tablo 7. Parafin doku takibi protokolü (Devamı).

Parafin	1
Parafine gömme	

3.2.2.7.2 Kalp ve iskelet kası dokularından kesitlerin alınması ve morfolojik analizi

Kalp ve iskelet kası dokularından Cryostat cihazında (CM1900, Leica) 5 µm kalınlığında kesitler alındı ve kesitler immünohistokimyasal boyama yapılmaya kadar -20°C 'de saklandı. Parafin bloklardan ise mikrotom (RM2245, Leica) ile 10 µm kalınlığında kesitler alındı. İmmünohistokimyasal boyama yapılacak kesitler lizinli lam üzerine alındı.

3.2.2.7.3 Kalp ve iskelet kası dokularının immünohistokimyasal analizi

Kalp ve iskelet kası dokularından Cryostat cihazında 5 µm kalınlığında alınan kesitler 5 dakika DPBS ile yıkandı. Doku geçirgenliğini sağlamak için 37°C 'de 10 dakika Tripsin (TA-125-TR, Thermo scientific) ile muamele edildi. Kesitler 3 defa 5'er dakika DPBS ile yıkandı. Endojen peroksidaz aktivitesini inhibe etmek için kesitler 5 dakika %3'lük H₂O₂'de (K31355100303, Merckmillipore) oda sıcaklığında bekletildi. Tekrar 3 kez 5'er dakika DPBS ile yıkandı. Ticari olarak satın alınan kitte hazır olarak gelen bloklama solüsyonunda (TA-060-UB, Thermo scientific) kesitler 1 saat oda sıcaklığında bekletildi. Ardından primer antikor boyaması için anti-Distrofin (NCL-DYS1, Leica) eklenerek 1 gece +4°C 'de bekletildi. Daha sonra kesitler 3 defa 5'er dakika DPBS ile yıkandı. Ticari kit ile gelen biotinli sekonder antikor (TP-060-BN, Thermo scientific) ile 30 dakika oda sıcaklığında muamele edildi ve ardından tekrar 3 kez 5'er dakika DPBS ile yıkandı. Yine ticari kit ile gelen Streptavidin peroksidaz (TS-060-HR, Thermo scientific) ile 30 dakika oda sıcaklığında muamele edildi ve kesitler 3 defa 5'er dakika DPBS ile yıkandı. İmmünoreaktivitenin görünürlüğünü sağlamak için Diaminobenzidin (DAB) boyası (TA-125-HD, Thermo scientific) ile 5 dk boyama işlemi yapıldı. Kesitler 5 dakika DPBS ve 5 dakika distile su ile yıkandıktan sonra artalan boyaması olarak Mayer's Hematoksilen (05-M06002,

Bio-Optica) ile 5 dakika boyandı. Kesitler 3 defa 5'er dakika distile suda yıkanarak %80'lik alkolde 2 dakika, %90'lık alkolde 2 dakika bekletildikten sonra 1 saat ksilende tutuldu ve son olarak entellan (1079610500, Merckmillipore) ile kapatıldı. Kamera entegreli ışık mikroskobu (Olympus DP26-CU; Leica MD750) ile fotoğraflandı.

İmmünohistokimya boyamalarındaki yoğunluklar Image J (Software, version 2.0.0- Beta4) analiz yöntemi ile değerlendirildi. Bu yöntemde her grup için rastgele 10 farklı alan seçildi. DAB pozitif boyanma, kahverengi renkli hücre görünümü ile kanıtlandı. Elde edilen Optik Densite (OD) değerleri istatistiksel analizler ile karşılaştırıldı.

3.2.2.8 Toksisite analizi

Distrofin gen terapi metodunun klinik testler için uygunluğunu sağlamak üzere toksisite takibi açısından bütün farelerin davranış değişiklikleri, kilo değişimi, karaciğer ve dalak biyopsileri histolojik analizleri yapıldı. Karaciğer ve dalak tartılarak, kayıt altına alındı. Karaciğer, dalak, böbrek ve beyin numuneleri, histopatolojik inceleme için %10 nötral formalin solusyonunda tespit edildi. Karaciğer dokusunun doku takip prosedürünü takiben parafinde bloklandı. Bu bloklar 5 mikron kalınlığında mikrotom ile kesilerek hematoksil-eosin (H&E) ile boyanıp ışık mikroskobuyla (Zeiss) incelendi.

3.2.2.9 Protein ekspresyonunun incelenmesi

Kas dokusundaki distrofin ekspresyon profillerine etkisi farklı proteomik yaklaşımlar kullanılarak araştırıldı (Şekil 11). Buna göre, yüksek çözünürlüklü ve geniş spektrumda protein profillerinin araştırılmasına imkan tanıyan LC-MS/MS yöntemi kullanıldı. LC-MS/MS için direk olarak taze kas dokuları -80°C 'de saklandıktan sonra kullanıldı. Bu sayede, kapsamlı bir proteomik analiz gerçekleştirildi.

3.2.2.9.1 LC-MS/MS ile protein analizi

Kas dokuları 50 mM amonyum bikarbonat içinde, sonikasyon ile parçalandı. Homojenizatlar, lizis çözeltisi ile 1 saat +4°C 'de çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi. Ardından 30 dk +4°C 'de 14000 rpm'de santrifüj edilerek, süpernatant protein ekstraktı olarak alınacaktır. Protein konsantrasyon tayini mikro BCA yöntemi ile gerçekleştirildi.

3.2.2.9.2 Protein ekstraktlarının diyalizi

Örnekler 2 kDa PES moleküler kütle membran zarlı 0,5 ml tüplerde gece boyu +4°C 'de inkübe edildi. İnkübasyon, 50mM amonyum bikarbonat çözeltisi içerisinde gece boyu manyetik karıştırıcı üzerinde gerçekleştirildi.

3.2.2.9.3 Triptik peptitlerin hazırlanması

50 µg protein karışımı alınarak, triptik peptitlerin elde edilmesi için, lizis tampon çözeltisi içerisindeki DTT ile disülfid bağları kırılmış olan proteinler, 6 M üre ile 30 kDa cut-off tüplerde yıkanacak ve 10 mM iodoacetamid ile karanlıkta 30 dk inkübe edilerek alkilasyonu tamamlandı. Yaklaşık 16-18 saat boyunca 37°C'deki etüvde, 50 mM amonyum bikarbonat içinde 1:100 (tripsin:protein) oranında tripsin ile inkübe edilerek proteinlerden triptik peptitlerin elde edilmesi sağlandı. İnkübasyondan sonra elde edilen triptik peptitlerin konsantrasyonları, kolorimetrik peptit konsantrasyon kitleri kullanılarak ölçüldü ve 100 ng/ul olacak şekilde %0,1 formik asit ile muamele edilerek, 200 µl'lik PTFE LC viyaline konuldu.

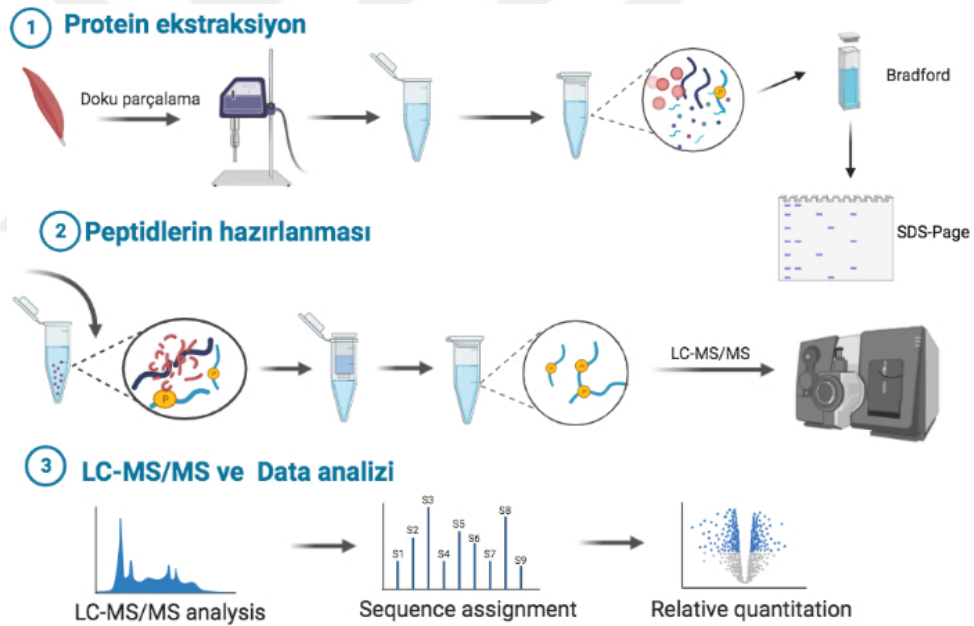
3.2.2.9.4 Kromatografik ayırıştırma

Peptit örnekleri C18 tuzak kolonunda alıkonur ve ardından asetonitril gradienti ile tuzak kolondan ayrılan peptitler C18 analitik kolonunda hidrofobik etkileşimler ile ayırıştırıldı. Peptit karışımının karmaşıklık derecesi göz önüne alınarak, farklı uzunlukta nano kolonlar kullanıldı. 300 nL/dk akış hızında 120 dk'lık ters faz

kromatografisi, 1,7 μ m BEH C18 75 μ m x 250 mm nano LC kolonu kullanılarak gerçekleştirildi.

3.2.2.9.5 MS ve MS/MS deney kurulumu

Asetonitril yüzdesi 3-40 aralığında artırılarak kolondan ayrılması sağlanacak peptitler, ESI iyonlaşması sonucu kütle spektrometrisinde analiz edildi. Xevo G2-Xs QToF (Waters,UK) kütle spektrometrisi sistemi kullanılarak yapılacak analizlerde m/z 50-1900 aralığında tanımlanabilecek peptitler için veri toplandı. 0,7 sn kadar MS analizi ile peptitin bütünü ve miktarı hakkında toplanan bilgiyi takiben 0,7 sn kadar gerçekleştirilecek MS/MS analizi ile de peptitin parçalanması ve sekans bilgisinin elde edilmesi sağlandı.

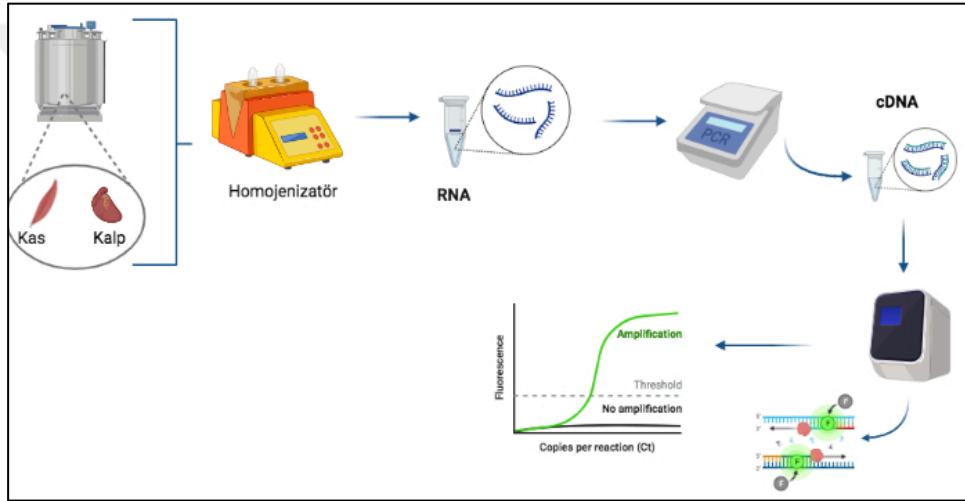


Şekil 11. LC-MS/MS deneyine hazırlık aşamaları. (Created with BioRender.com)

3.2.2.10 RT-qPCR

Distrofin gen ekspresyonunu ölçmek adına bacak kas dokularında ve kalp dokusundan RNA izolasyonu (Zymo Research Direct-zol™ RNA Miniprep Plus) kiti kullanılarak gerçekleştirildi. Kas ve kalp dokusu C-tube'leri (Miltenyi Biotec)

kullanılarak homojenizatör (GentleMACS™ Dissociator, Miltenyi Biotec) ile lizat haline getirilerek, daha sonra kit protokülüne uygun şekilde RNA izolasyonuna devam edildi. RNA'dan cDNA (QuantiTect Reverse Transcription Kit) elde edildikten sonra, tasarlanan distrofin primeri (5'→3'); mikrodistrofin: aacaaagtgccctacta (*forward*) ve aggttgctgtgtcca (*reverse*) ve ribozomal RNA 18S: ttgacggaag ggcaccaccag (*forward*) ve gcaccaccaccacggaatcg (*reverse*) (Sentromer) ve SYBR Green Master karışımı (Qiagen) ile RT-qPCR yapılarak Roche Light Cycler 96 cihazıyla Cq değerleri elde edildi (129). Her bir örnek iki tekrarlı çalışıldı. Distrofin ekspresyonu gruplar arasında karşılaştırıldı (Şekil 12).



Şekil 12. q-RT-PCR deneyine hazırlık aşamaları. (Created with BioRender.com)

3.2.3 İstatistiksel analizler

Farelerin CK ölçümündeki her bir değer bağımsız örneklerin t-test'i ile kontroller arası incelendi. İstatistiksel anlamlılık için $p < 0,05$ değeri kabul edildi. Gruplar arasındaki istatistiksel anlamlılığı; 2 farklı tedavi grubu (Doz 1 & Doz 2) ve kontrol grubuyla istatistiksel olarak SPSS Statistics programıyla tek yönlü ANOVA testiyle (varyans analizi) karşılaştırıldı. Tedavi verilen grup ve tedavi verilmeyen gruptaki her bir değer bağımsız örneklerin t-test'i ile incelendi. Tedavi öncesi ve sonrası karşılaştırma paired-t test ile SPSS Statistics programıyla yapıldı. İstatistiksel program olarak Graphpad Prism ve SPSS Statistics kullanıldı.

LC-MS/MS ile elde edilen proteinlerin analizinde, örneklerden ekstrakte edilen proteinlerdeki ekspresyon farklılıklarının analizi için Progenesis QI-P (Nonlinear Dynamics) modülü kullanıldı. Bu biyoinformatik yazılımlar ile her bir örnek gurubundaki proteinler tanımlanacak ve istatistiksel olarak anlam ifade eden proteinler belirlendi. Her bir numune için üç teknik tekrar yapıldı. Anlamli farklılıklar gözlenen proteinlerin etki ettiği yolların tespitini sağlamak için yolak analizi programları kullanıldı. Projede elde edilen sonuçların güvenilirliğinin test edilebilmesi, yüzlerce örneğin aynı anda karşılaştırılabilmesi ve anlamli bilgilere ulaşılabilmesi için çeşitli istatistiksel hesaplamalar kullanıldı.



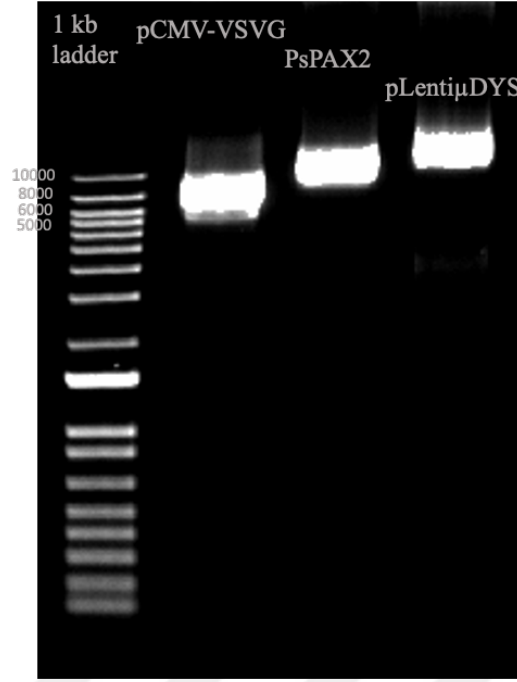
4 BULGULAR

4.1 Lv-HSA-μDys/eGFP Lentivirus Üretimi ve Etkinlik Testleri Sonuçları

Lv-HSA-μDys/eGFP lentivirus üretimi için pLenti-μDYS, PsPAX2 ve pCMV-VSV-G plazmidleri kullanılmıştır. Her üç plazmid transformasyon sonrası LB Broth besiyeri içerisinde 37°C’de çoğaltıldı. Plazmid izolasyon sonrası ng/μl, A260/280 ve A260/230 değerleri Tablo 8’de belirtildi. Plazmidlerin %0,8 agaroz jelde yürütülen band görüntüsü ise Şekil 13’de verildi. Kullanılan plazmid büyüklüğü şu şekildedir; pLenti-μDys 10,709 bp, PsPAX2 10,709 bp ve pCMV-VSVG 6507 bp. jel elektroforez görüntüsü verilen plazmid büyüklükleriyle uyushmaktadır.

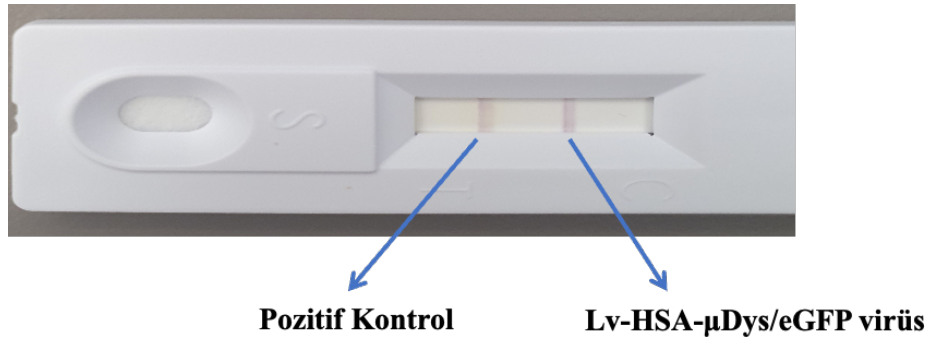
Tablo 8. Plazmid izolasyon sonrası Nanodrop ölçüm sonuçları

Plazmid		ng/μl	A260/A280	A260/A230
pLenti μDYS	1. ölçüm	1850,7	2,0	2,49
	2. ölçüm	1843,2	2,0	2,48
psPAX2	1. ölçüm	509,8	1,89	2,34
	2. ölçüm	570,0	1,90	2,36
pCMV-VSV-G	1. ölçüm	1262,1	1,91	2,38
	2. ölçüm	1275,7	1,90	2,38

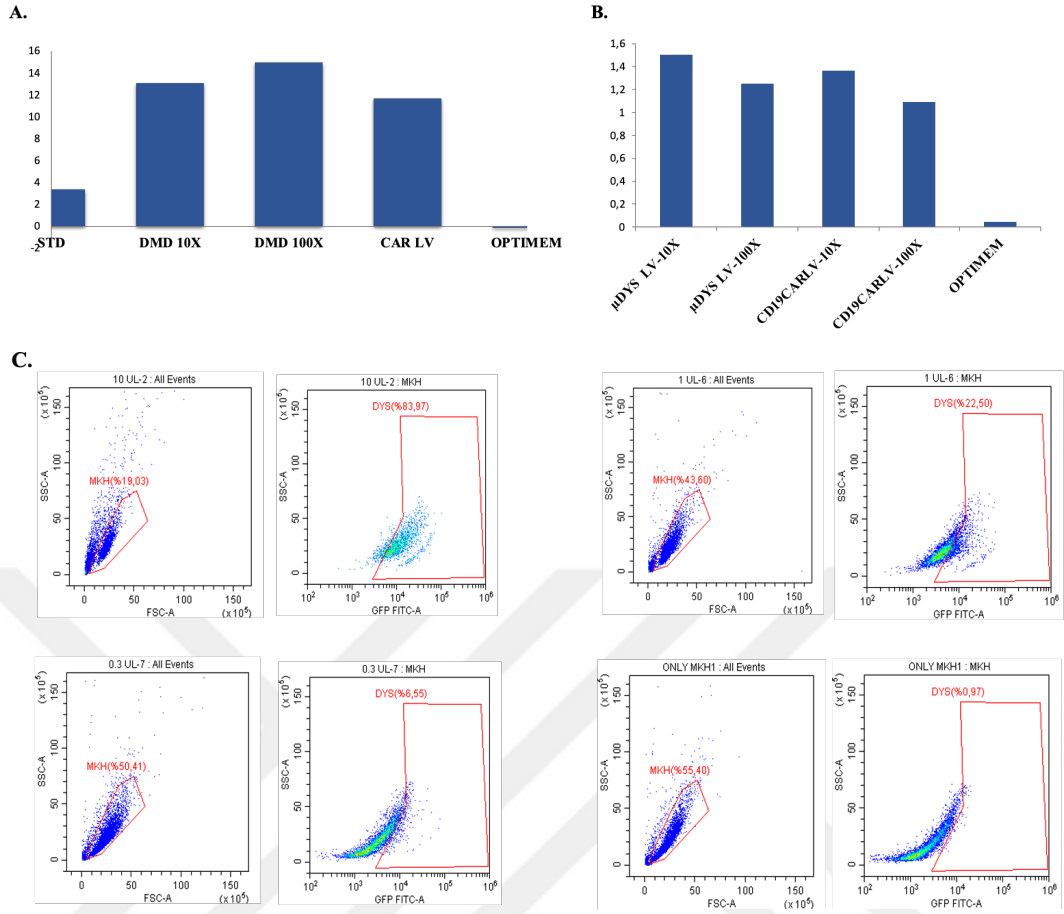


Şekil 13. Plazmidlerin jel elektroforez görüntüsü. Gel Doc™ EZ Imager cihazında elde edilmiştir.

HEK293T hücresi ile Lenti-μDYS, psPAX2 ve pCMV-VSV-G plazmidleri, transfeksiyon FuGene reaktif kullanılarak transfeksiyon gerçekleştirildi. 72 saat sonucunda süpernatant toplandıktan sonra lentivirüslerin 500,000 IFU'dan yüksek olduğu Lenti-X™ Gostix™ Plus ile test edildi (Şekil 14). Titre hesabı p24 Elisa ve akım sitometri kullanılarak hesaplandı (Şekil 15). Akım sitometri değerlerine göre $1,9 \times 10^6$ IFU/ml olarak hesaplandı. Lentivirüs kalite kontrol-sterilite sonuçları ise Tablo 9'da belirtildi.



Şekil 14. Lentivirüs üretimi sonrası Lenti-X™ Gostix™ sonucu.



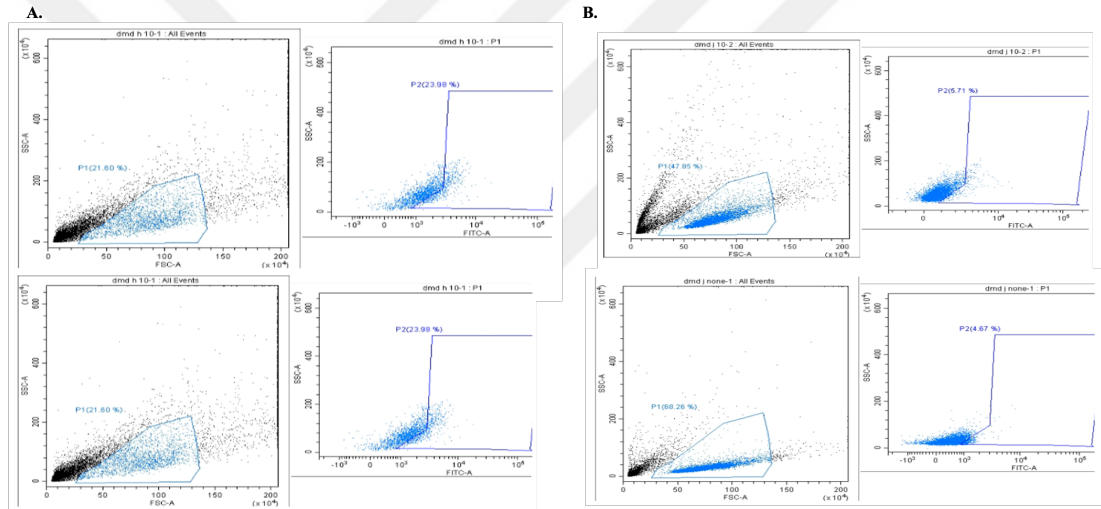
Şekil 15. Lv-HSA-µDys/eGFP lentivirüs titre hesaplama A. 1. Üretim QuickTiter™ Lentivirus Titer (Lentivirus Associated HIV p24) Elisa kiti sonucu, B. 2. üretim QuickTiter™ Lentivirus Titer (Lentivirus Associated HIV p24) Elisa kiti sonucu C. 72 saat inkübasyon sonrası akım sitometri cihazı ile eGFP ölçümü.

Tablo 9. Lv-HSA-µDys/eGFP lentivirüs üretiminin kalite kontrol analizi.

Parametre	Metot	Kabul Kriteri	Sonuç
Görünüm	Göz ile	Bulanık	Bulanık
Viral Titre	p24 Elisa	$>1.0 \times 10^6$	2.25×10^6 TU/ml
Sterilite	Mikrobik büyüme	Steril	Steril
Mikoplazma	PCR	Yok	Yok
RCL	MKH ile 3 hafta boyunca kültür	Yok, akış sitometri cihazı ile	Yok

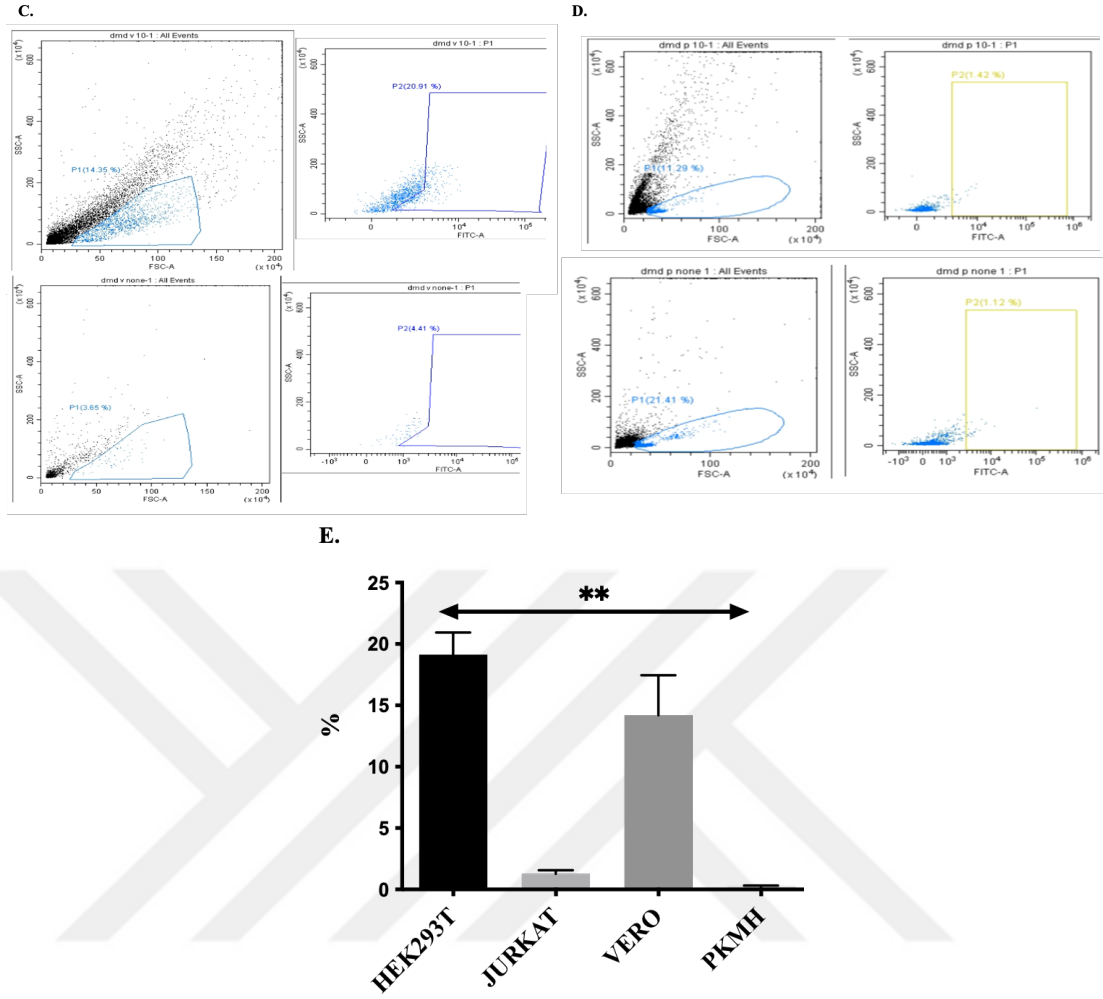
4.1.1 In vitro HSA promotör testi sonucu

Lv-HSA-μDys/eGFP lentiviral gen tedavimizin HSA promotörünün leakage özelliğini test etmek için farklı hücre hatlarına ihtiyaç duyulmaktadır. HEK293T (İnsan böbrek embriyonik hattı), Jurkat (Akut T hücre lösemisi), Vero (Afrika yeşil maymun böbrek epitel hücresi) ve PKMH hücre hatlarını kullanılması planlandı. 72 saat inkübasyon sonrasında akım sitometri cihazı kullanılarak eGFP takibi yapıldı. Sırasıyla en fazla HEK293T, Vero ve Jurkat hücre hatlarında HSA promotörünün leakage özelliği tespit edildi (Şekil 16). Oysaki, PKMH hücrelerinde %1 olarak sonuç elde edildi (Şekil 16-D).



Şekil 16. HSA leakage promotör testi akım sitometri sonuçları. A. HEK293T B. Jurkat C. Vero D. PKMH hücrelerinde akım sitometri sonuçları E. Tüm hücre hatlarını % olarak karşılaştırılması. Sonuçlar ortalama $\pm$ SD olarak gösterildi.

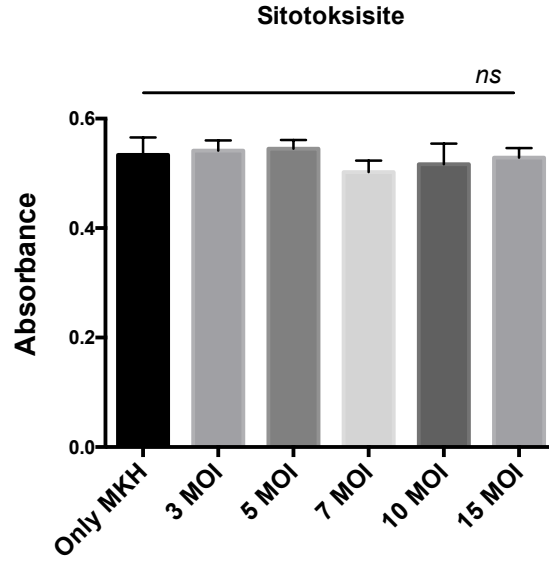
**p<0,01



Şekil 17. HSA leakage promotör testi akım sitometri sonuçları. A. HEK293T B. Jurkat C. Vero D. PKMH hücrelerinde akım sitometri sonuçları E. Tüm hücre hatlarını % olarak karşılaştırılması. Sonuçlar ortalama $\pm$ SD olarak gösterildi. ** $p < 0,01$ (Devamı)

4.1.2 Sitotoksosite testi sonucu

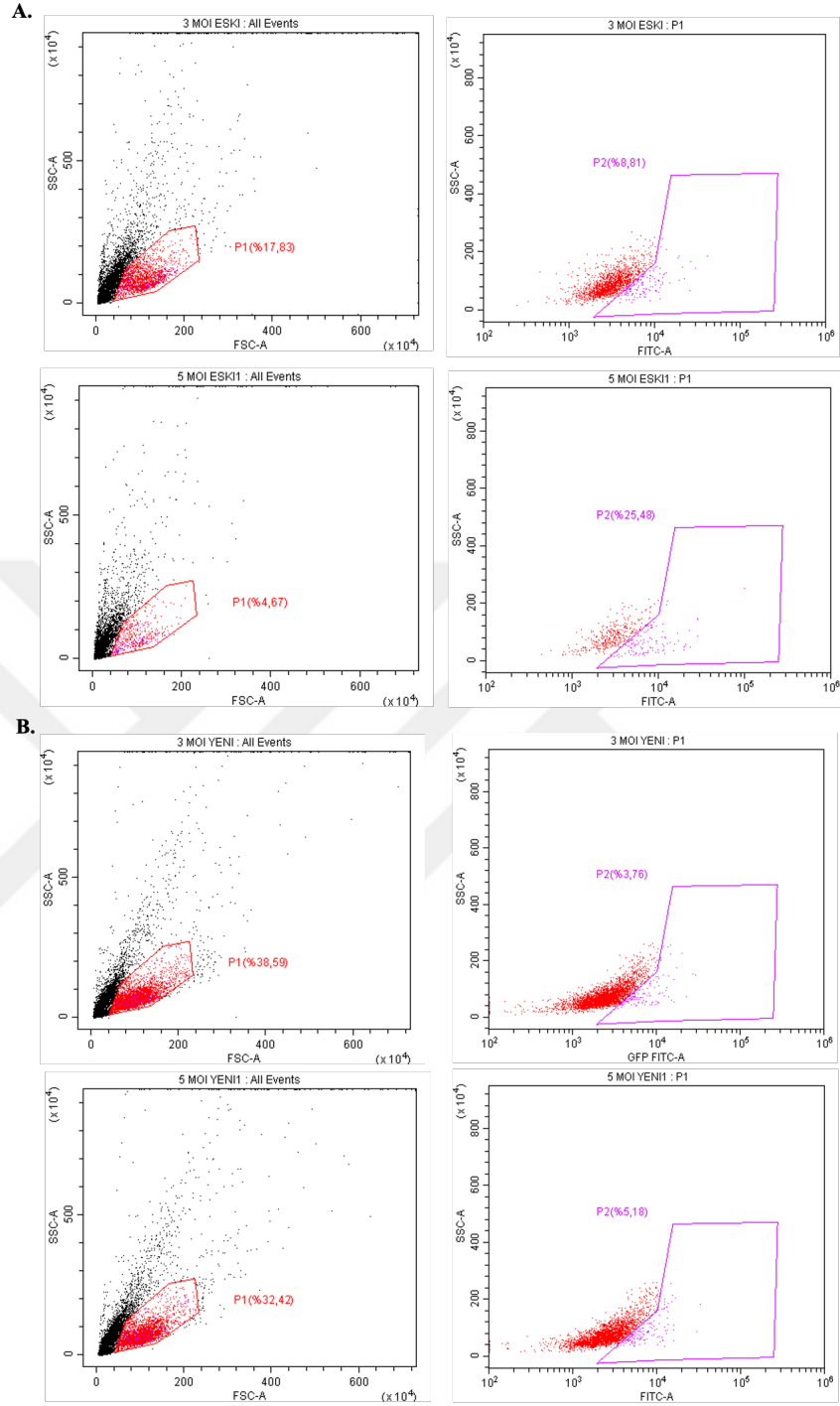
Sitotoksosite testi için MKH hücreleri üzerine 3, 5, 7, 10 ve 15 MOI olacak şekilde Lv-HSA- μ Dys/eGFP lentivirüs eklendi ve inkübasyona bırakıldı. Sadece MKH olan grubuna kıyasla MOI arttırdıkça istatistiksel olarak anlamlı bir sitotoksosite tespit edilmedi (Şekil 17). Sonuç olarak, yüksek MOI virüs kullanımı sağlıklı hücreler için toksik bir etki yapmamaktadır.



Şekil 18. Sitotoksite deneyinin absorbans değerleri grafiği. 450 nm’de okutuldu. Sonuçlar ortalama $\pm$ SD olarak gösterildi.

4.1.3 2 farklı yöntem ile transdüksiyon denemesini sonuçları

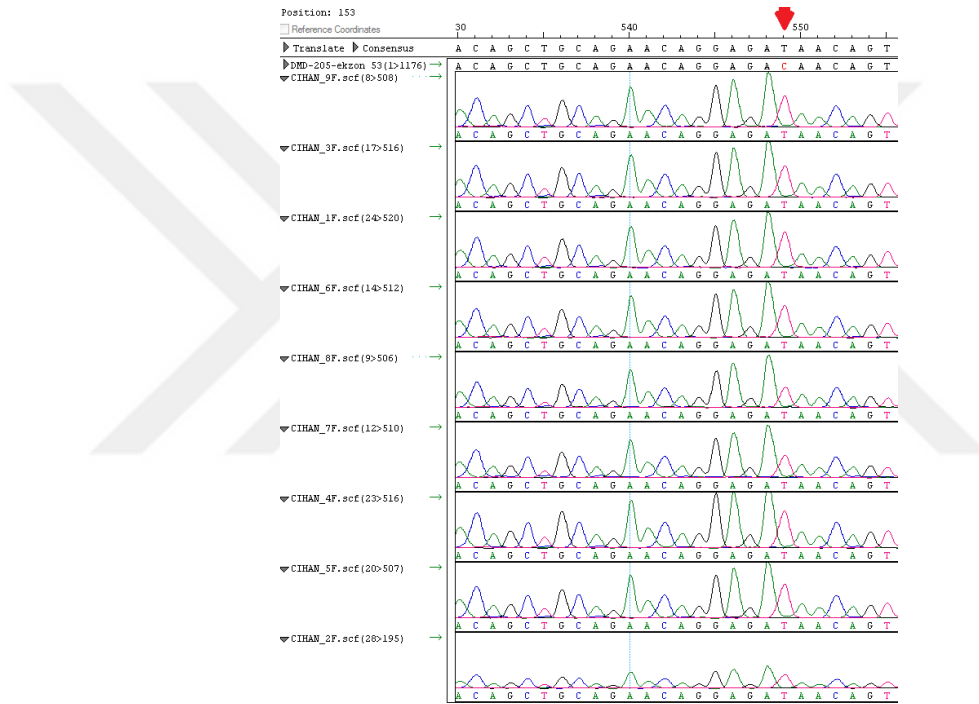
İskelet kaslarıyla aynı türden olan MKH hücrelerine 3 MOI ve 5 MOI lentivirus eklendi. 1. yöntemde transdüksiyon sırasında BX795 kullanılarak 6 saat boyunca 37°C’de inkübasyon yapıldı. 3. Günde sonucunda, 3 MOI transdüksiyon ile %8,81, 5 MOI transdüksiyon ile %25,48 elde edildi (Şekil 18-A). 2. yöntemde BX795 reaktifi kullanılmadan 1 saat 400 g 37°C santrifüj yapılarak 16 saat inkübasyona bırakıldı. 3. Günde sonucunda, 3 MOI transdüksiyon ile %3,76, 5 MOI transdüksiyon ile %5,18 elde edildi (Şekil 18-B). 1. yöntem olarak yapılan transdüksiyon daha etkili sonuç elde edilmesini sağlamıştır.



Şekil 19. Transdüksiyon sonrası 3. günde eGFP ekspresyon sonuçları A. 1 yöntem ile yapılan transdüksiyon sonrası, B. 2. yöntem ile yapılan transdüksiyon sonrası akım sitometrisindeki yüzdesel değerleri.

4.2 In Vivo Deney Hayvanları

In vivo hayvan deneylerine başlamadan önce, kullanılacak olan dmd-mdx-4Cv farelerine Acıbadem Labgen tarafından yeni nesil dizileme yapıldı. Sekanslama için 3 erkek ve 6 dişi farelerin kulaklarından parça alındı ve 53. ekzon bölgesi PCR ile çoğaltıldı. Tüm dmd-mdx-4Cv farelerde nokta mutasyonu olan Sitozin (C) nükleotidinden Timin (T) nükleotidine değişme tespit edildi (Şekil 19). Kullanılan farelerin mutasyonun doğrulanmış oldu.



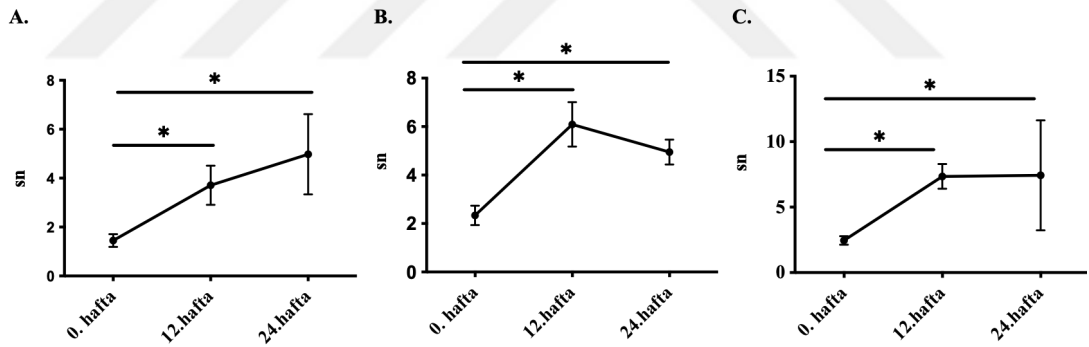
Şekil 20. Dmd-mdx-4Cv farelerinde yeni nesil dizileme sonuçları. Toplam da 3 erkek ve 6 dişi dmd-mdx-4Cv faresi kullanıldı.

4.2.1 18 aylık dmd-mdx-4Cv farelerin gen terapisi sonuçları

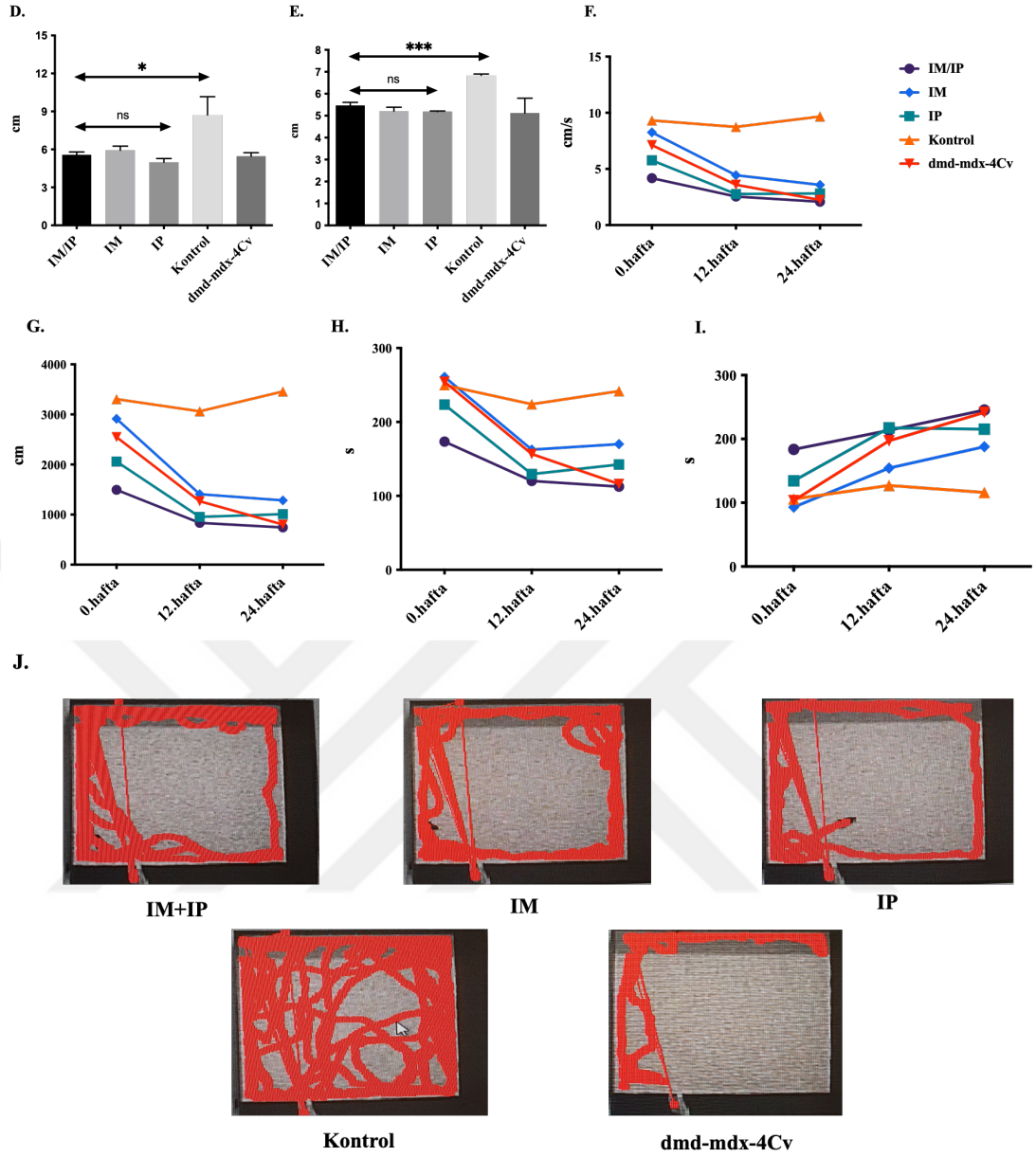
4.2.1.1 Motor performans analizi

Daha önceki çalışmalar, mdx'de 9 ayda belirgin fibrozis ile distropatolojinin ilerlemesinin rapor edildiği gösterilmişti (130,131). 18 aylık vahşi tip, kontrol, IM/IP, IM, IP ve dmd-mdx-4cv (tedavi edilmemiş) fare grupları, gen terapisinin

enjeksiyonundan önce ve sonra kas fonksiyonunu değerlendirmek için çeşitli tekniklerle incelendi. Tedavi grupları arasındaki tek fark enjeksiyon yöntemidir. Tedaviden sonra 6 ay boyunca gruplar takip edilmiştir. Tedavi edilmemiş dmd-mdx-4cv farelerine enjeksiyon süresi boyunca sadece DPBS uygulandı. Deneysel enjeksiyon zaman dilimi Şekil 8'de belirtilmiştir. Kavrama gücü testinde, 3 enjeksiyon yöntemiyle de 24. haftaya kadar istatistiksel olarak anlamlı bir ilerleme kaydedilmiştir (Şekil 20-A,B,C). 12. hafta ve 24. haftadaki yapılan ayak izi testinde enjeksiyon grupları arasında bir fark olmasada, kontrol grubuyla aralarındaki fark tespit edildi (Şekil 20-D,E). Ethovision XT9 programı kullanılarak analizleri yapılan tracking testinin sonuçlarına bakıldığında ise, hız, hareket, kat ettiği mesafe ve hareket etmeme oranları karşılaştırıldı (Şekil 20-F,G,H,I). IM ve IP grupları tedavi verilmeyen dmd-mdx-4Cv grubuna göre daha etkili çıksada istatistiksel olarak anlamlı sonuç elde edilmedi. 6. haftadaki tracking görüntülerine bakıldığında IM/IP, IM ve IP grupları dmd-mdx-4Cv grubuna kıyasla daha çok hareket ettiği ve bütün gruplar arasında en çok sağlıklı kontrol grubunun hareket ettiği görselde belirtildi (Şekil 20-J).



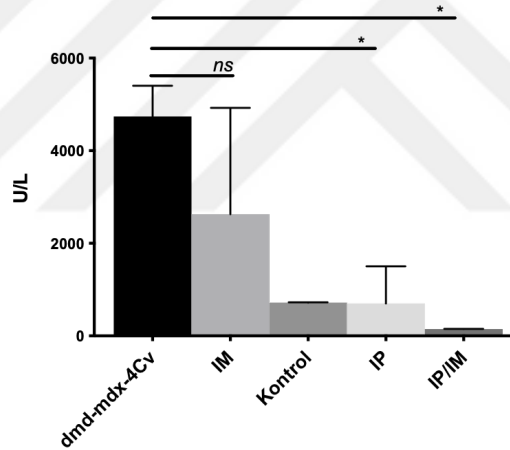
Şekil 21. Lentivirüs kodlayan mikro-distrofün uygulamasından sonra motor performans analizi. A. IM/IP grubu kavrama gücü testi. B. IM grubu askı testi. C. IP grubu askı testi. D. 12. hafta ayak izi testi. E. 24. hafta ayak izi testi. F. Hız testi. G. Hareket edilen mesafeyi izleme testi. H. Hareketi testi. I. Hareket etmeme testi. J. 6. hafta tracking testi Ethovision XT9 programındaki görüntüler. Ethovision XT9 programı kullanıldı. Test bağımsız olarak üç kez tekrarlandı. Sonuçlar ortalama $\pm$ SD olarak gösterildi. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$



Şekil 22. Lentivirüs kodlayan mikro-distrofin uygulamasından sonra motor performans analizi. A. IM/IP grubu kavrama gücü testi. B. IM grubu askı testi. C. IP grubu askı testi. D. 12. hafta ayak izi testi. E. 24. hafta ayak izi testi. F. Hız testi. G. Hareket edilen mesafeyi izleme testi. H. Hareketi testi. I. Hareket etmeme testi. J. 6. hafta tracking testi Ethovision XT9 programındaki görüntüler. Ethovision XT9 programı kullanıldı. Test bağımsız olarak üç kez tekrarlandı. Sonuçlar ortalama $\pm$ SD olarak gösterildi. *p < 0,05, ***p < 0,001 (Devamı).

4.2.1.2 Tedavi sonrası kandan serum analizi

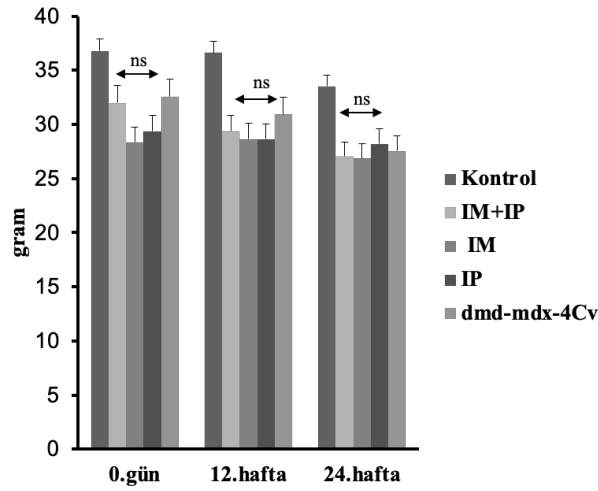
Tüm DMD hastaları doğumdan beri ciddi şekilde yüksek serum CK değerine sahiptir (132). Bu nedenle, en kritik kas bozunma biyobelirteci olan CK serum toplanarak analiz edildi. Tedavi edilmeyen dmd-mdx-4Cv farelerinin serum CK seviyesi, yaklaşık 4600 U/L (n=4) seviyesindeydi. Ancak Lv-HSA- μ Dys/eGFP gen tedavisini aldıktan sonra IM/IP ve IP gruplarına ait farelerde CK seviyeleri tedavi edilmeyen gruba göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha düşüktü (Şekil 21). Bu sonuçlar, tedavi edilen her iki gruptaki CK seviyelerinin, tedavi edilmeyen DMD kontrol fareleriyle ilgili olarak vahşi tip kontrol grubundakine benzer şekilde önemli ölçüde azaldığını gösterdi. Fakat yine tedavi verilen IM grubuyla; tedavi verilmeyen dmd-mdx-4Cv grubuyla aralarında bir fark bulunmadı.



Şekil 23. 18 aylık farelerde 3. ayın sonundaki serum Kreatinin Kinaz seviyesini gösteren çubuk grafik. Sonuçlar ortalama $\pm$ SD olarak gösterildi. * $p < 0,05$

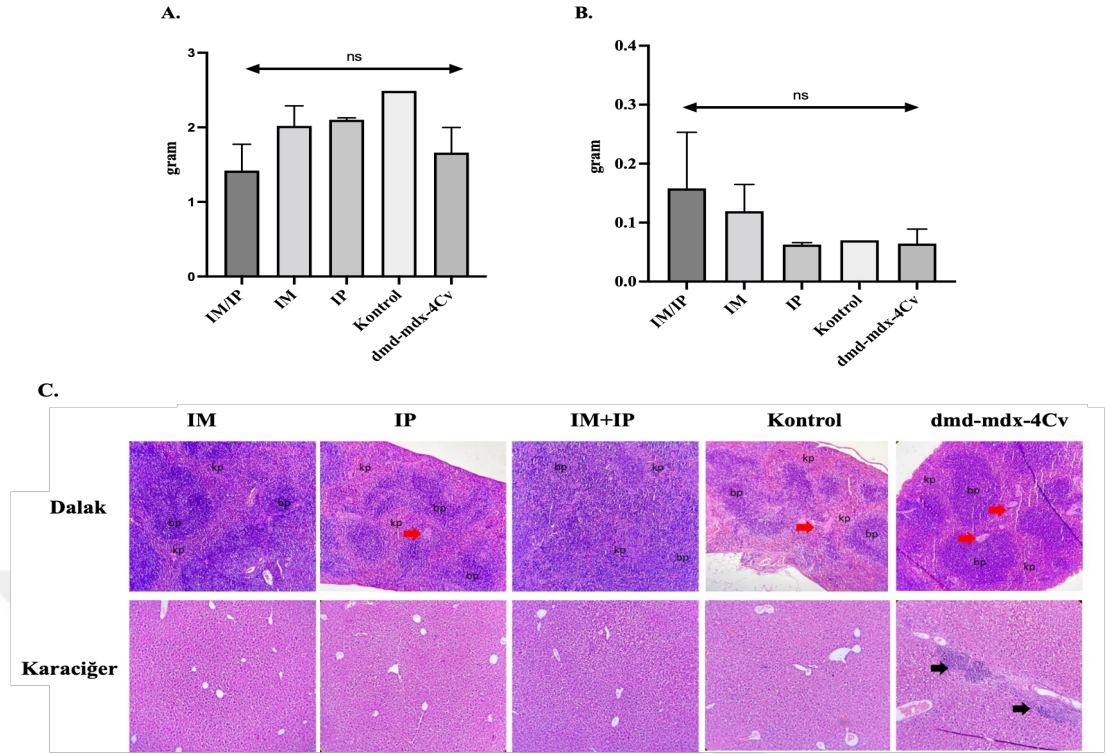
4.2.1.3 Karaciğer ve dalağın fizyolojik ve histopatolojik incelenmesi

Fizyolojik inceleme olarak 6 ay boyunca tedavi öncesi 0. gün ve tedavi sonrası olarak 12. hafta ve 24. hafta kilo ölçüm grafiği Şekil 22'de belirtildi. Tedavi verilen IM/IP, IM ve IP grupları arasında bir fark bulunmadı. IM/IP grubunda haftalar ilerledikçe kilo düşüşü saptandı. Bu düşüş sağlıklı kontrol ve tedavi verilmeyen grupta da gözlemlendi.



Şekil 24. Tedavi öncesi ve sonrası *in vivo* fizyolojik değerlendirme. 0, 12 ve 24. haftalardaki toplam vücut ağırlığını gösteren çubuk grafik. Sonuçlar ortalama $\pm$ SD olarak gösterildi.

Sakrifikasyon edildikten sonra organlar tartıldı ve karaciğer ve dalakta kontrol, tedavi edilmeyen ve doz grupları arasında önemli bir fark gözlenmedi (Şekil 23-A,B). 18 aylık farelerin karaciğer ve dalak numuneleri, histopatolojik inceleme için %10 nötral formalin solusyonunda tespit edildi. Karaciğer dokusunun doku takip prosedürünü takiben parafinde bloklandı. Bu bloklar 5 mikron kalınlığında mikrotom ile kesilerek hematoksilin-eosin ile boyanıp ışık mikroskopuyla (Zeiss) incelendi. Dalak ve karaciğer doku örneklerinin histolojik görünümüne bakıldığında kontrol grubunda karaciğer doku örneklerinin histolojik yönden normal yapıya sahip olduğu, hepatositlerin çoğu hücrelerin yuvarlak, merkezi yerleşimli, düzenli çekirdeğe sahip oldukları gözlemlendi. Sinüzoid duvarlarının genellikle normal yapıda olduğu saptandı. IM, IP ve IM/IP gruplarındaki karaciğer görüntüleri kontrol grubu ile benzer özelliklere sahip idi. Dmd-mdx-4Cv grubunda dokuda infiltrasyon görüldü (siyah ok). Kontrol, IP ve dmd-mdx-4Cv gruplarındaki dalakların IM ve IM/IP gruplarına kıyasla genişlemiş kırmızı pulpa (kp) ve trabeküller (kırmızı ok) gözlemlendi (Şekil 23-C).



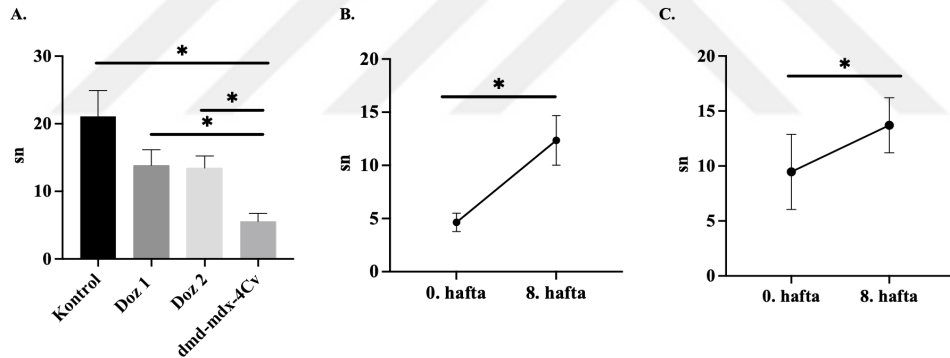
Şekil 25. Kontrol, IM/IP, IM, IP ve tedavi edilmemiş dmd-mdx-4Cv fare grubunun karaciğer ve dalağının histopatolojik incelemesi. A. Karaciğer organlarını temsil eden çubuk grafik. B. Dalak organlarını temsil eden çubuk grafik. Sonuçlar ortalama $\pm$ SD olarak gösterildi. C. Fare gruplarının histopatolojik analizi. Dalak ve karaciğer parafilm bölümü H&E ile boyanmıştır. Tüm resimler 100x büyütmede gösterildi. bp: beyaz pulpa sv: santral ven, sa: santral arter, kp: kırmızı pulpa, t: trabekül, yıldız: interstisyel kanama, ok: hepatosit.

4.2.2 4 haftalık dmd-mdx-4cv farelerin gen terapisi sonuçları

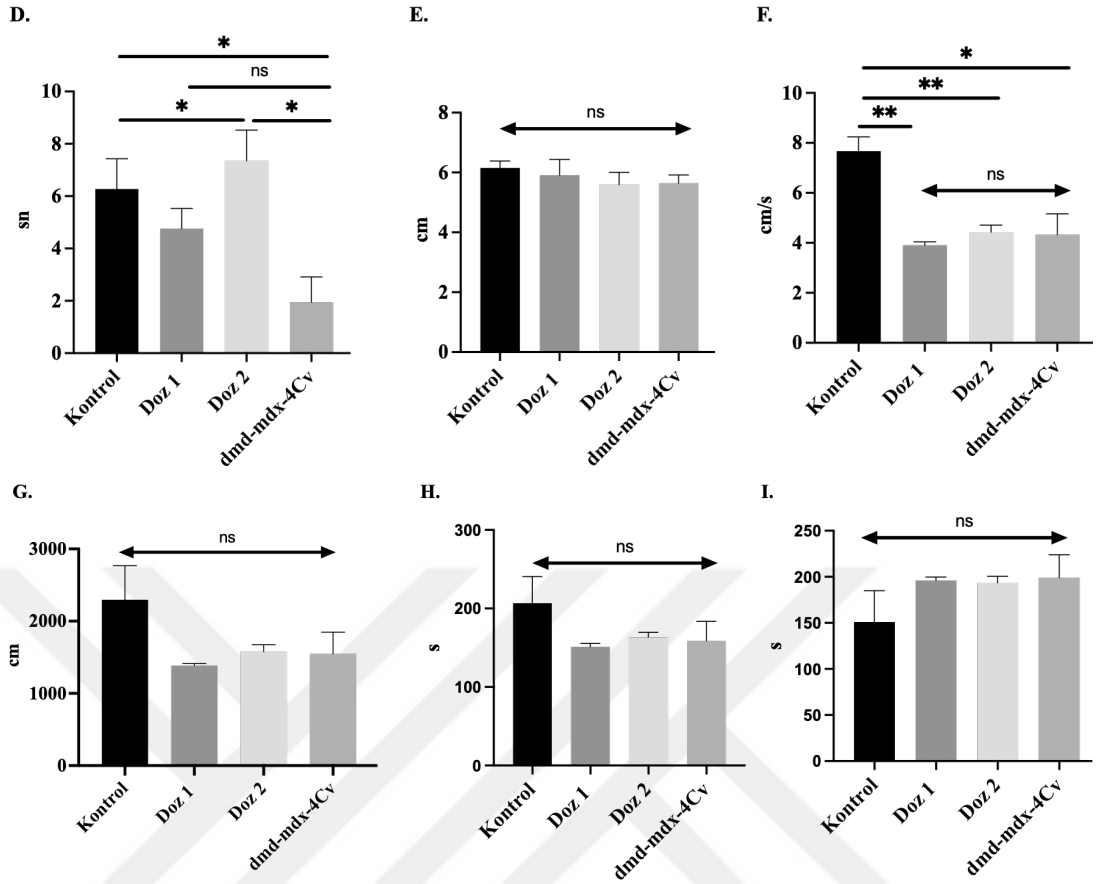
4.2.2.1 Motor performans analizi

Farklı tek doz gen terapisi tedavisinden sonra, kavrama testinde doz grupları dmd-mdx-4cv farelerinden daha yüksek saniye asılı kaldı. Doz grubunun süresi karşılaştırıldığında, iki grupta yaklaşık olarak aynı saniye askıda kalabildi. Tedavi edilmeyen dmd-mdx-4Cv fareleri, kontrol grubu kadar asılı kalamadı (Şekil 24-A). Doz gruplarının tedavi öncesi ve sonrası karşılaştırıldığında 8 hafta içerisinde kavrama gücünde anlamlı bir gelişme saptandı (Şekil 24-B,C). Rotarod testi sırasında doz 2 grubu, kontrol grubunda bile daha fazla koşabildi. Tedavi edilmeyen dmd-mdx-4Cv grubuna göre doz 2 grubunda anlamlı bir farklılık saptanırken; doz 1 grubunda fark

bulunmadı (Şekil 24-D). Ayak izi testinden sonra, iki adım arasındaki mesafe ölçüldü ve herhangi bir farklılık gözlemlenmedi (Şekil 24-E). Hız, hareket edilen mesafe, hareket ve hareket etmeme parametreleri bir tracking testi ile değerlendirildi. Tedaviden sonra, doz 1, doz 2 ve tedavi edilmeyen grup arasında fark saptanmadı. Sağlıklı grup olan kontrol grubu en hızlı grup oldu (Şekil 24-F). Kontrol grubu diğer gruplara kıyasla daha fazla hareket edilen mesafeye ve hareketine ulaşsa bile istatistiksel olarak fark bulunmadı (Şekil 24-G,H). Tedavi edilmeyen dmd-mdx-4Cv grubu; kontrol ile doz 1 ve doz 2 farelere göre zamana bağlı olarak şekilde daha az hareket gösterdi (Şekil 24-I). Kavrama gücü, rotarod ve hız testleri sırasında kontrol ve tedavi edilmeyen farklılıklar belirgin bir şekilde tespit edildi. Tedavi edilen gruplar, tedavi edilmeyen dmd farelere göre kavrama gücü ve rotarod testlerinde önemli ölçüde daha iyiydi. Bu sonuçlar, lentiviral doz tedavi grubunun her ikisinin de dmd model mdx farelerinin motor işlevlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir gelişme gösterdiğini göstermektedir.



Şekil 26. Lentivirüs kodlayan mikro-distrofün uygulamasından sonra motor performans analizi. A. 8. haftadaki kavrama gücü testi, B. Doz 1 grubunda tedavi öncesi ve sonrası, C. Doz 2 grubunda tedavi öncesi ve sonrası, D. 8. haftadaki Rotarod testi, E. 8. haftadaki ayak izi testi, F. Hız testi, G. Hareket edilen mesafeyi izleme testi, H. Hareketi testi, I. Hareket etmeme testi. Ethovision XT9 programı kullanıldı. Test bağımsız olarak üç kez tekrarlandı. Sonuçlar ortalama $\pm$ SD olarak gösterildi. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$

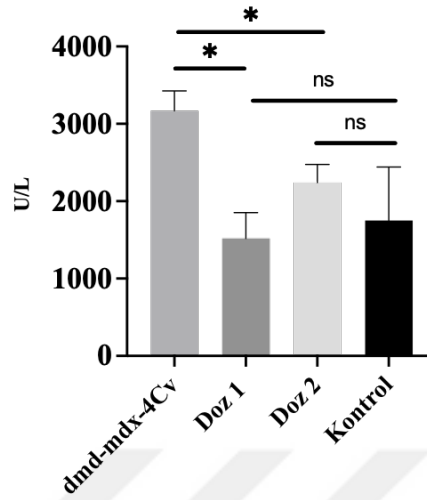


Şekil 27. Lentivirüs kodlayan mikro-distrofin uygulamasından sonra motor performans analizi. A. 8. haftadaki kavrama gücü testi, B. Doz 1 grubunda tedavi öncesi ve sonrası, C. Doz 2 grubunda tedavi öncesi ve sonrası, D. 8. haftadaki Rotarod testi, E. 8. haftadaki ayak izi testi, F. Hız testi, G. Hareket edilen mesafeyi izleme testi, H. Hareketi testi, I. Hareket etmeme testi. Ethovision XT9 programı kullanıldı. Test bağımsız olarak üç kez tekrarlandı. Sonuçlar ortalama $\pm$ SD olarak gösterildi. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ (Devamı)

4.2.2.2 Tedavi sonrası kandan serum analizi

En önemli kas dejenerasyon biyobelirteci olan CK için serum toplanarak analiz edildi. Daha sonra, tedavi edilen fare gruplarındaki CK seviyelerini belirlemek istedik. Tedavi edilmeyen dmd-mdx-4Cv farelerinin serum CK seviyesi, yaklaşık 3000 U/L ($n=6$) seviyesindeydi. Ancak Lv-HSA- μ Dys/eGFP gen tedavisini aldıktan sonra doz 1 ve 2 gruplarına ait farelerde CK seviyeleri tedavi edilmeyen gruba göre oldukça

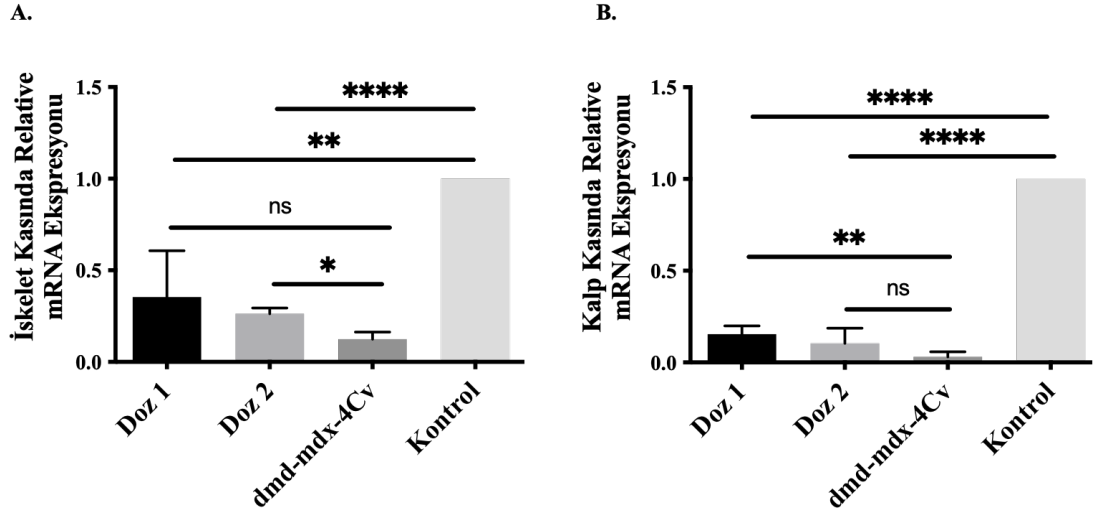
düşüktü (Şekil 25). Sağlıklı kontrol fareyle doz gruplarını kıyasladığımızda farklılık saptanmadı.



Şekil 28. 4 haftalık farelerde serum Kreatinin Kinaz (CK) seviyesini gösteren çubuk grafik. Sonuçlar ortalama $\pm$ SD olarak gösterildi. * $p < 0,05$

4.2.2.3 Distrofin ifadesinin q-RT-PCR ile incelenmesi

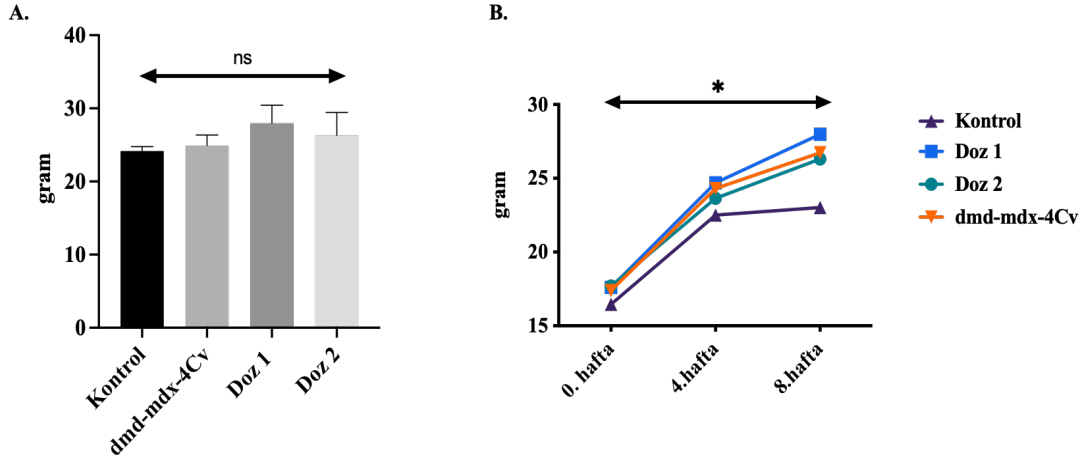
Tedaviden sonra inceleme için dondurulmuş dokulardan distrofin ekspresyonunu belirlemeyi amacıyla sırasıyla RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve q-RT-PCR yöntemleri sırasıyla uygulandı. İskelet ve kalp kasından elde edilen mikro-distrofin mRNA seviyelerinin, DMD ile tedavi edilmeyen kontrol grubuna göre Lv-HSA- μ Dys/eGFP uygulanan her iki grupta arttığını göstermektedir. Tedavi sonrası iskelet ve kalp kasında distrofin ekspresyonu saptanırken, tedavi edilmeyen grupta mRNA ekspresyonu 0'a yakın olarak saptandı (Şekil 26). Doz 1 ve 2 grupları, iskelet kasında kontrolden ve birbirinden önemli ölçüde farklıydı (Şekil 26-A). Düşük doz uygulamasından sonra iskelet kası hücrelerinde yaklaşık %35 distrofin eksprese edildi. Bununla birlikte, daha yüksek doz enjekte edildiğinde, distrofin ifadesi yaklaşık %25'e ulaştı. Kalp kasında ise yaklaşık doz 1 uygulandıktan sonra %15 ve doz 2 grubunda %10 distrofin ekspresyonu saptandı. (Şekil 26-B). 4 haftalık mdx farelerinin iskelet ve kalp kası hücrelerinde anlamlı μ Dys ekspresyonunun elde edildiği gösterildi.



Şekil 29. İskelet ve kalp kasında distrofin ekspresyonu. A. İskelet kasının mRNA ifadesi. B. Kalp kasının mRNA ifadesi. Sonuçlar ortalama $\pm$ SD olarak gösterildi. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ **** $p < 0,0001$

4.2.2.4 Karaciğer ve dalağın fizyolojik ve histopatolojik incelenmesi

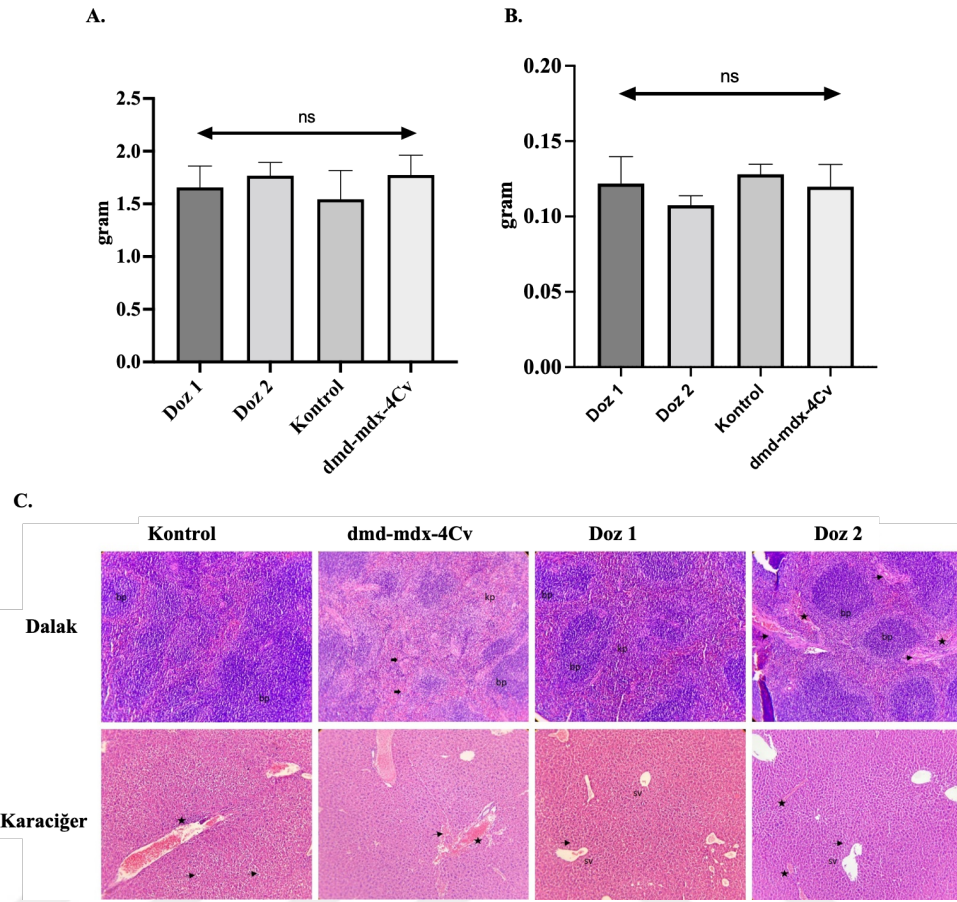
8. haftanın sonunda tüm grupların toplam vücut ağırlığı karşılaştırıldığında anlamlı bir fark saptanmadı (Şekil 27-A). 0., 4. ve 8. haftalarda düzenli olarak tartım işlemi devam etti. Grupların kendi içindeki kilo artışında istatistiksel olarak anlamlılık hesaplandı (Şekil 27-B).



Şekil 30. Tedavi öncesi ve sonrası *in vivo* fizyolojik değerlendirme. A. 8. Haftada sakrifikasyondan önceki toplam vücut ağırlığını gösteren çubuk grafik. B. Her grubun tedaviden önce ve sonra tartım sonuçları. 0. hafta tedavinin başlangıcını ve 8. hafta tedavi sonrasını temsil eder. Sonuçlar ortalama $\pm$ SD olarak gösterildi. * $p < 0,05$

Sakrifikasyondan sonra elde edilen karaciğer ve dalak organlarının histopatolojik inceleme öncesi tartım işlemi gerçekleştirildi. Her iki organda da gruplar arasında bir fark saptanmadı (Şekil 28-A,B).

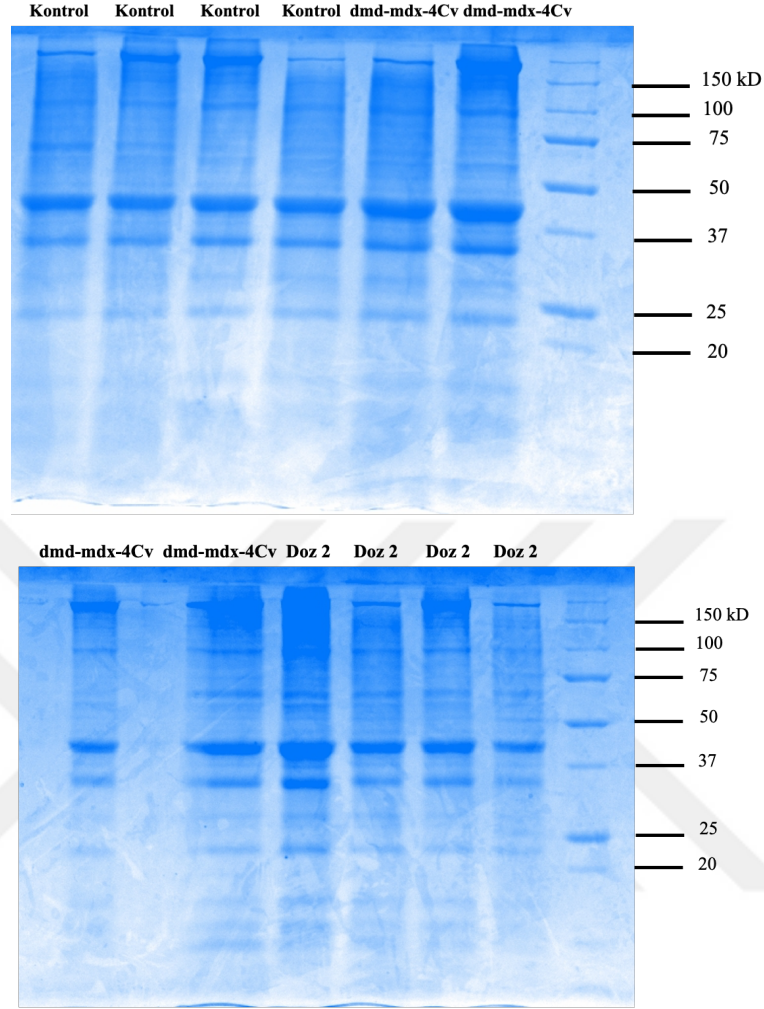
4 haftalık fare gurubunun histopatolojik değerlendirmesinde, kontrol gruplarına ait karaciğer dokusu sinusoidlerin ışınsal yapıda değildi ve damar çevresinde mononukleer infiltrasyon görüldü (yıldız). dmd-mdx-4Cv grubunda vasküler (yıldız) ve interstisyel hemoraji (ince ok) alanları olmak üzere hücresel hasarlar görüldü. Doz 1 ve doz 2 uygulanan gruplarda, lobüller içerisinde vena centralis etrafında ışınsal tarzda dizilmiş hepatositler (ok) yer almaktadır. Hepatositler etrafında karaciğer sinüzoidleri düzgün gözlenmekteydi. Doz 2 uygulanan grupta interstisyel hemoraji hafiflemiş olarak saptandı (yıldız). Kontrol ve doz 1 uygulanan gruplarda kırmızı pulpa ve beyaz pulpa morfolojisinde farklılık görülmedi. Doz 2 grubunda foliküller arasında hemoroji (yıldız) görüldü. Parenşimde trabeküler bağ dokuya, özellikle arterlerin etrafında daha belirgin olarak rastlandı (ok). Dmd-mdx-4Cv grubunda yaygın eritroid precursorleri (yıldız) ve küçülmüş beyaz pulpa (bp) ve genişlemiş kırmızı pulpa (kp) saptandı (Şekil 28-C).



Şekil 31. 4 haftalık kontrol, doz grubu ve tedavi edilmemiş DMD fare grubunun karaciğer ve dalağının histopatolojik incelemesi. A. Karaciğer organlarını temsil eden çubuk grafikler. B. Dalak organlarını temsil eden çubuk grafikler tartıldı. Sonuçlar ortalama $\pm$ SD olarak gösterildi. C. Fare gruplarının histopatolojik analizi. Dalak ve karaciğer parafilm bölümü H&E ile boyandı. Tüm resimler 100x büyütmede gösterildi. bp: beyaz pulpa sv: santral ven, kp: kırmızı pulp, yıldız: interstisyel kanama, ok: hepatosit.

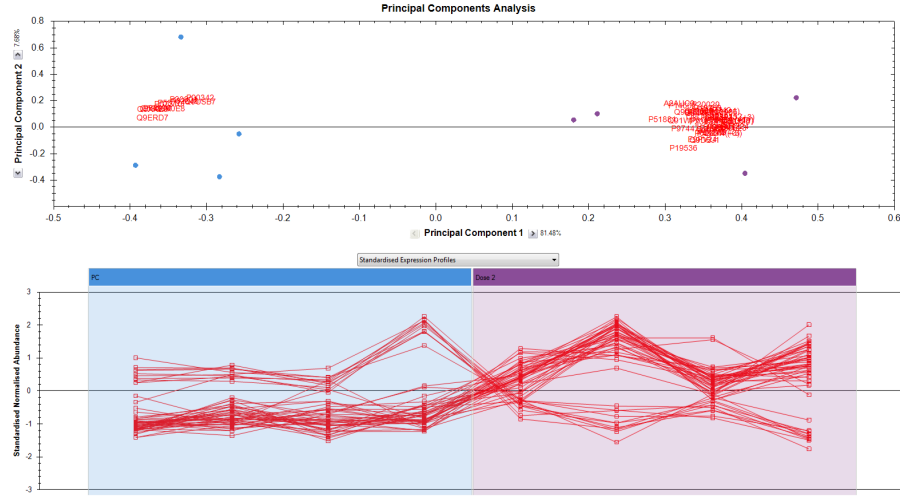
4.2.2.5 LC-MS/MS ile kastaki proteinlerin tanımlanması

Sakrifikasyon sonrası kontrol, doz 2 ve dmd-mdx-4Cv farelerin TA bölgesinde kas dokuları alınıp, -80°C 'de muhafaza edildi. Kas dokuları bilyalı öğütücü yardımıyla parçalandıktan sonra protein izolasyonu gerçekleştirildi. Bradford yöntemi ile protein konsantrasyonu belirlenip, FASP kiti kullanılarak peptid izolasyonu yapıldı. Elde edilen peptidler SDS-page jel elektroforez yöntemi ile kontrol edildi. Kas dokularından izole edilen peptidlerin moleküler kütleleri ve büyüklükleri benzerdir (Şekil 29). Her grubun kendi içerisindeki örneklerin bantları 50 ile 25 kD bölgesinde saptandı.

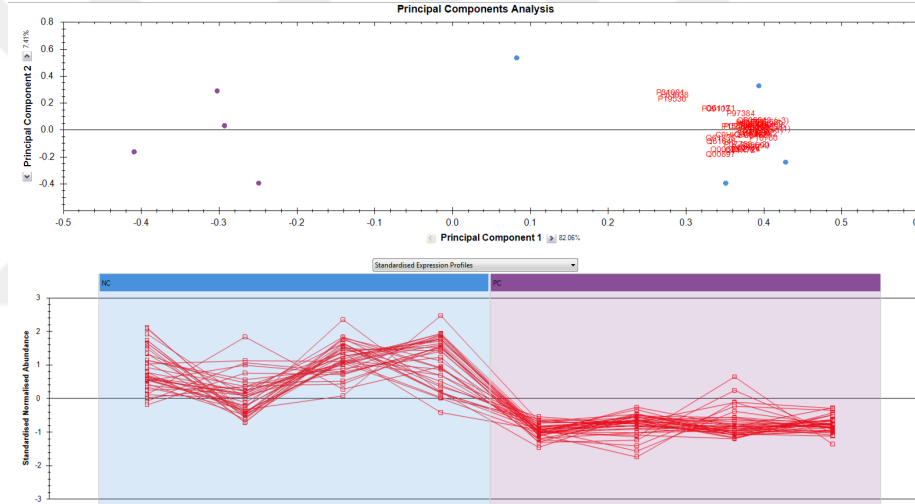


Şekil 32. SDS-PAGE jel elektroforez görüntüleri. Jel 70 Volt, 110 mA ve 25 dakika süresince yürütüldü.

Protein profillemeye için LC-MS/MS cihazında yürütülen örnekler ANOVA kullanılarak $p < 0,05$ 'ten küçük ve maksimum fold change (mfc) 1.5 olan peptidler seçildi. Gruplar ikili ve üçlü olarak Progenesis QI-P programı kullanılarak *principal components analysis* (PCA) grafikleri çizildi. Doz 2 ve dmd-mdx-4Cv grubundaki PCA grafiğinde grupların ayrımı net olarak tespit edilmektedir (Şekil 30). *Principal component 1* %79,08 ve *Principal component 2* %9,28 olarak hesaplandı. Dmd-mdx-4Cv, kontrol ve doz 2 grubundaki PCA grafiğinde dmd-mdx-4Cv ve doz 2 grubundaki ayrım diğer gruplardaki kadar net olmadı (Şekil 31). *Principal component 1* %78,19 ve *Principal component 2* %8,98 olarak hesaplandı. Doz 2 ve sağlıklı kontrol grubundaki PCA grafiğinde grupların ayrımı net olarak tespit edilmektedir (Şekil 32).

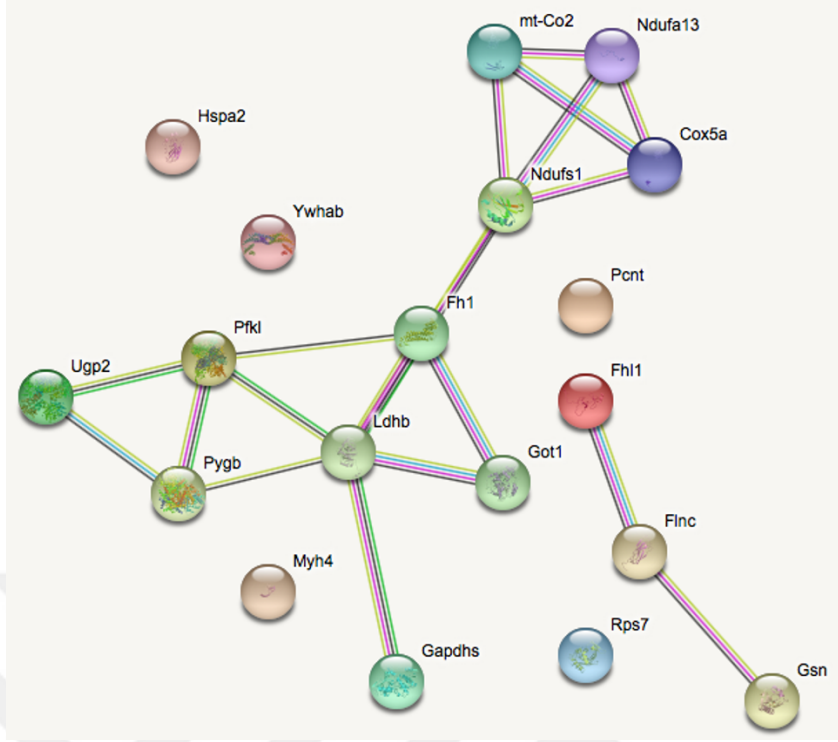


Şekil 35. Kontrol ve doz 2 gruplarının PCA ve trendline grafikleri.



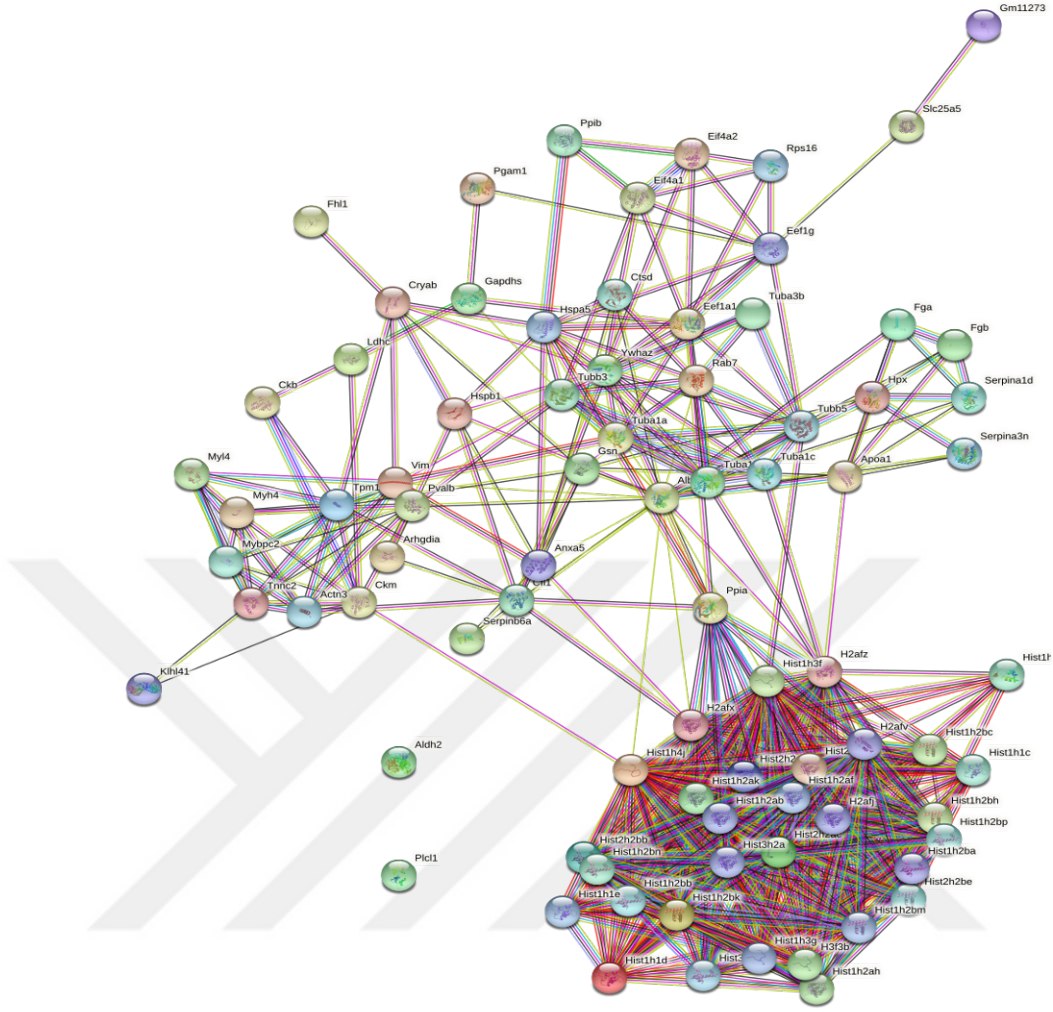
Şekil 36. Kontrol ve dmd-mdx-4Cv gruplarının PCA ve trendline grafikleri.

Tedavi uygulanan doz 2 grubu, dmd-mdx-4Cv grubuyla yapılan analizde istatistiksel olarak anlamlı 19 tane protein bulundu. 7 tanesi dmd-mdx-4Cv grubunda up-regüle olurken, 12 tanesi ise doz 2 grubunda up-regüle olmaktadır. Bu saptanan 19 protein String web kaynağı kullanılarak yolak analizi yapıldı (Şekil 34). Proteinlerin birbiri ile olan ortak fonksiyon ve mekanizmaları saptandı. Başlıca metabolik yollar, glikoliz/glukoneogenez, oksidatif fosforilasyon, termojenez, solunum elektron taşıma, nişasta ve sakaroz metabolizması, elektron transfer aktivitesi gibi biyolojik yollarda görev almaktadır.



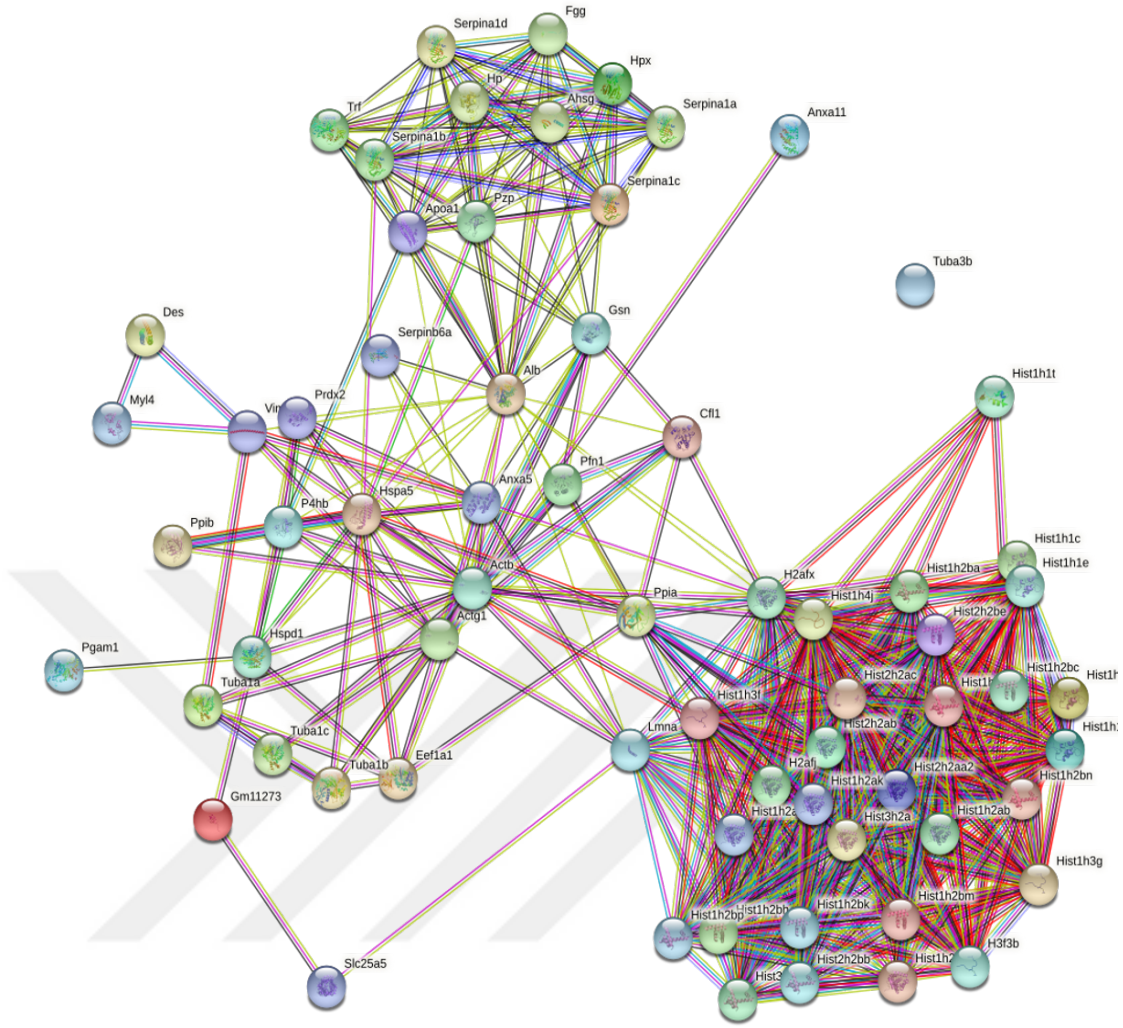
Şekil 37. Doz 2 ve dmd-mdx-4Cv gruplarında bulunan anlamlı 19 proteinin yolak analizi. String programı kullanılarak yapılmıştır.

Tedavi uygulanan doz 2 grubu, sağlıklı kontrol grubuyla yapılan analizde istatistiksel olarak anlamlı 51 tane protein bulundu. 11 tanesi kontrol grubunda down-regüle olurken, 40 tanesi ise doz 2 grubunda up-regüle olmaktadır. Bu saptanan 51 protein String web kaynağı kullanılarak yolak analizi yapıldı (Şekil 35). Başlıca fosfokreatin biyosentetik süreci, kreatin kinaz aktivitesi, kan mikropartikül, translasyon faktörleri, hücre iskeletinin yapısal bileşeni gibi hücresel bileşenlerde ve moleküler fonksiyonlarında yer almaktadır.



Şekil 38. Kontrol ve doz 2 gruplarında bulunan anlamlı 51 proteinin yolak analizi. String programı kullanılarak yapılmıştır.

Tedavi uygulanmayan dmd-mdx-4Cv grubu, sağlıklı kontrol grubuyla yapılan analizde istatistiksel olarak anlamlı 37 tane protein bulundu. 37 tanesi tedavi uygulanmayan dmd-mdx-4Cv grubunda up-regüle olurken, kontrol grubunda hiçbir protein up-regüle olmamıştır. Bu saptanan 51 protein String web kaynağı kullanılarak yolak analizi yapıldı (Şekil 36). Protein domainleri (Histon H2B), nükleozom çekirdeği, aktin hücre iskeletinin düzenlenmesi, postsinaptik aktin hücre iskeletinin yapısal bileşeni, kromatin susturma negatif düzenlenmesi gibi hücresel bileşenlerde ve moleküler fonksiyonlarında yer almaktadır.



Şekil 39. Dmd-mdx-4Cv ve kontrol grupların bulunan anlamlı 37 proteinin yolak analizi. String programı kullanılarak yapılmıştır.

Lv-HSA- μ Dys/eGFP gen tedavisi uygulanan doz 2 grubuyla sağlıklı kontrol grubunun ortak istatistiksel olarak anlamlı eksprese olan proteinlerinin regülasyonunu karşılaştırdığımızda; doz 2 grubunda 40 protein up-regüle (Tablo 10), 11 protein down-regüle olarak saptandı (Tablo 11). Proteinlerin sorumlu gen adı, tanım, unique peptid, güven puanı, p değeri ve mfc değerleri detaylı olarak Tablo 10 ve 11’de sunuldu.

Tablo 10. Duchenne kas distrofininin tedavi uygulanan mdx-4cv modelinde (Doz 2) up-regüle edilmiş kas proteinlerinin proteomik tanımlanması.

Accession	Gen adı	Tanım	Unique peptides	Confidence score	Anova (p)	Max fold change
P51150	Rab7a	RAB7A_MOUSE Ras-related protein Rab-7a	3	17,0285	0,00341712	1,93474955
Q9DBJ1	Pgam1	PGAM1_MOUSE Phosphoglycerate mutase 1	1	32,0065	0,00675315	8,82862106
Q91WP6	Serpina3n	SPA3N_MOUSE Serine protease inhibitor A3N	1	19,8149	0,01799303	3,79249089
P14602	Hspb1	HSPB1_MOUSE Heat shock protein beta-1	3	17,798	0,04969416	2,08205208
Q99PT1	Arhgdia	GDIR1_MOUSE Rho GDP-dissociation inhibitor 1	3	18,9082	0,00441798	1,63320902
P47738	Aldh2	ALDH2_MOUSE Aldehyde dehydrogenase mitochondrial	2	17,4872	0,01799841	2,24415329
P18760	Cfl1	COF1_MOUSE Cofilin-1	2	26,0677	0,00646849	6,82264804
P09541	Myl4	MYL4_MOUSE Myosin light chain 4	2	29,6452	0,00020997	15,033542
C0HKE1;C0HKE2;C0HKE3;C0HKE4;C0HKE5;C0HKE6;C0HKE7;C0HKE8;C0HKE9;Q8BFU2;Q8CGP5;Q8CGP6;Q8CGP7;Q8R1M2;Q64523;Q6GSS7;P0C0S6;P27661;Q3THW5;Q64522	H2ac4	H2A1B_MOUSE Histone H2A type 1-B	4	41,1657	0,00190809	2,46504692
P19536	Cox5b	COX5B_MOUSE Cytochrome c oxidase subunit 5B mitochondrial	4	22,4508	0,03429655	1,65119267
P63101	Ywhaz	1433Z_MOUSE 14-3-3 protein zeta/delta	2	27,6009	0,01720932	2,71563699
P14131	Rps16	RS16_MOUSE 40S ribosomal protein S16	4	25,2733	0,00455965	2,23591748
Q9D8N0	Eef1g	EF1G_MOUSE Elongation factor 1-gamma	4	23,9483	0,01411523	2,25393258
E9PV24	Fga	FIBA_MOUSE Fibrinogen alpha chain	4	20,7913	0,02724021	2,68222514
P24369	Ppib	PPIB_MOUSE Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	4	24,2154	0,00054915	2,9642716
P97447	Fhl1	FHL1_MOUSE Four and a half LIM domains protein 1	4	27,0945	0,04951412	2,87621165
P10853;P10854;Q64475;Q64478;Q64525;Q6ZWY9;Q8CGP1;Q8CGP2;Q64524;Q8CGP0;Q9D2U9;P70696	H2bc7	H2B1F_MOUSE Histone H2B type 1-F/J/L	5	49,2543	0,0003559	2,46327742
P60843;P10630	Eif4a1	IF4A1_MOUSE Eukaryotic initiation factor 4A-1	5	29,7058	0,0009892	1,66305206
P48036	Anxa5	ANXA5_MOUSE Annexin A5	5	31,352	0,00115436	3,96712799
P43274;P15864;P43277;Q07133	H1-4	H14_MOUSE Histone H1.4	3	32,1775	0,00471555	2,66816003
P18242	Ctsd	CATD_MOUSE Cathepsin D	4	29,0312	0,00121207	3,73156577
P13020	Gsn	GELS_MOUSE Gelsolin	5	27,0908	0,001904	1,56364526
P02301;P68433;P84228;P84244	H3-5	H3C_MOUSE Histone H3.3C	5	34,8618	0,00114548	2,30107982
Q04447	Ckb	KCRB_MOUSE Creatine kinase B-type	3	35,574	8,54E-06	5,08037025
A2AUC9	Klhl41	KLH41_MOUSE Kelch-like protein 41	6	39,5903	0,02112836	1,70874401
Q00623	Apoa1	APOA1_MOUSE Apolipoprotein A-1	6	44,2034	0,0006109	2,30581346
P23927	Cryab	CRYAB_MOUSE Alpha-crystallin B chain	6	54,9019	0,02727527	2,45971899
Q64467	Gapdhs	G3PT_MOUSE Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase testis-specific	2	51,4448	0,00336542	2,26676032
P17742	Ppia	PPIA_MOUSE Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	7	50,3902	0,00154769	2,50574799
P62806	H4c1	H4_MOUSE Histone H4	7	81,7387	0,00130566	2,24775948
Q00897	Serpina1d	A1AT4_MOUSE Alpha-1-antitrypsin 1-4	1	63,7632	0,00904197	1,97943152
Q91X72	Hpx	HEMO_MOUSE Hemopexin	9	64,3131	0,0026475	3,28293653
P20029	Hspa5	BIP_MOUSE Endoplasmic reticulum chaperone BiP	6	62,8867	0,00389286	2,45256142
Q60854	Serpinb6	SPB6_MOUSE Serpin B6	10	64,8624	2,26E-05	2,99627049
P10126	Eef1a1	EF1A1_MOUSE Elongation factor 1-alpha 1	3	97,1882	6,07E-05	7,20223589
P51881	Slc25a5	ADT2_MOUSE ADP/ATP translocase 2	3	117,2778	0,02990933	2,74305696
P05213;P68369;P68373;P05214	Tuba1b	TBA1B_MOUSE Tubulin alpha-1B chain	4	107,105	0,00035655	5,77284007
P99024	Tubb5	TBB5_MOUSE Tubulin beta-5 chain	1	95,5957	0,00163519	15,7280921
P20152	Vim	VIME_MOUSE Vimentin	13	166,9817	0,00052784	3,60088715
P07724	Alb	ALBU_MOUSE Albumin	28	324,8116	9,48E-05	2,3394938

Tablo 11. Duchenne kas distrofininin tedavi uygulanan mdx-4cv modelinde down-regüle edilmiş kas proteinlerinin proteomik olarak tanımlanması.

Accession	Gene name	Description	Unique peptides	Confidence score	Anova (p)	Max fold change
P00342	Ldhc	LDHC_MOUSE L-lactate dehydrogenase C chain	1	22,9635	0,03885129	1,53103955
Q8K0E8	Fgb	FIBB_MOUSE Fibrinogen beta chain	2	22,1187	0,01199156	1,83991795
Q3USB7	Plcl1	PLCL1_MOUSE Inactive phospholipase C-like protein 1	5	33,6646	0,01916949	1,98127735
P20801	Tnnc2	TNNC2_MOUSE Troponin C skeletal muscle	9	108,6891	0,01590077	1,60741668
Q9ERD7	Tubb3	TBB3_MOUSE Tubulin beta-3 chain	1	84,8788	0,0151708	1,58428772
P32848	Pvalb	PRVA_MOUSE Parvalbumin alpha	13	190,5444	0,01404117	1,66851421
P58771	Tpm1	TPM1_MOUSE Tropomyosin alpha-1 chain	12	354,8674	0,01253852	1,59271209
P07310	Ckm	KCRM_MOUSE Creatine kinase M-type	30	396,5952	0,00710873	1,6172132
Q5XKE0	Mybpc2	MYPC2_MOUSE Myosin-binding protein C fast-type	54	517,4354	0,00376169	1,64649659
O88990	Actn3	ACTN3_MOUSE Alpha-actinin-3	50	691,2282	0,00756456	1,51917119
Q5SX39	Myh4	MYH4_MOUSE Myosin-4	48	2663,0041	0,00774665	1,55614449

Tedavi verilmeyen ve dmd patolojisi gösteren dmd-mdx-4Cv grubu kontrol grubuyla olan ortak eksprese eden proteinler karşılaştırıldığında; 37 tane protein dmd-mdx-4Cv grubunda up-regüle olarak saptandı. Down-regüle olan protein tespit edilmedi. Proteinlerin sorumlu gen adı, tanım, unique peptid, güven puanı, p değeri ve mfc değerleri detaylı olarak tablo'da sunuldu (Tablo 12).

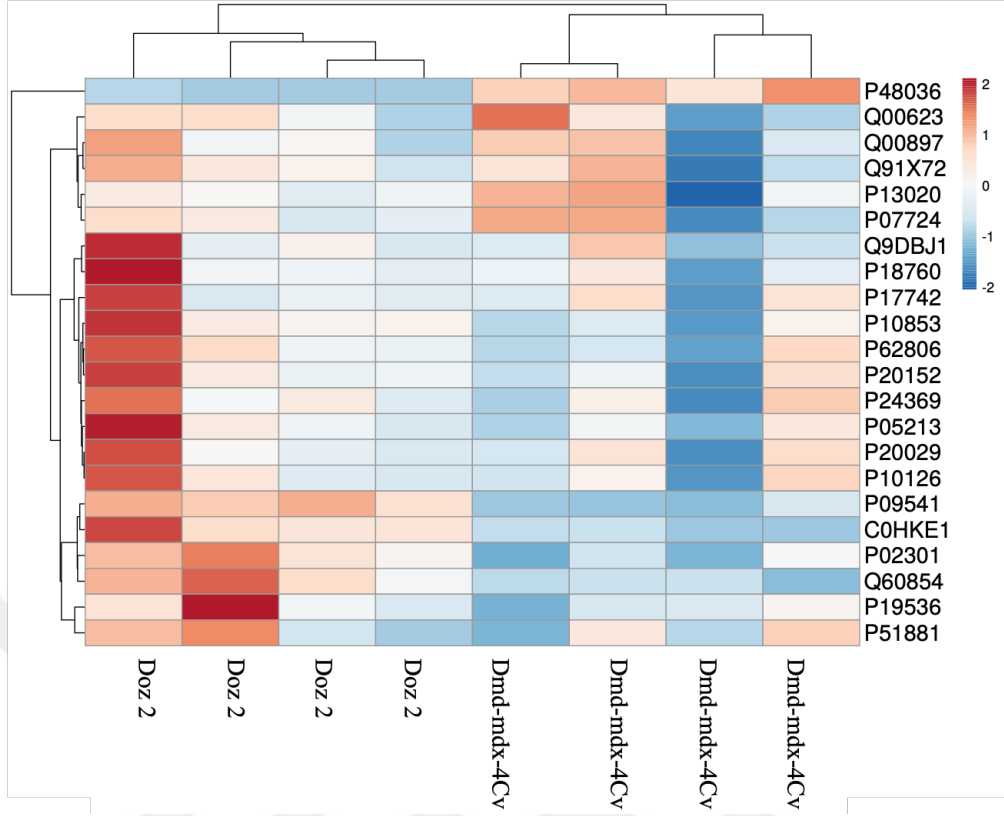
Tablo 12. Duchenne kas distrofininin mdx-4cv modelinde up-regüle olan kas proteinlerinin proteomik tanımlanması.

Accession	Gene name	Description	Unique peptides	Confidence score	Anova (p)	Max fold change
Q8VCM7	Fgg	FIBG_MOUSE Fibrinogen gamma chain	3	25,0925	0,016288	8,596415
P09541	Myl4	MYL4_MOUSE Myosin light chain 4	1	23,9908	0,003431	32,94859
Q9DBJ1	Pgam1	PGAM1_MOUSE Phosphoglycerate mutase 1	1	29,7221	0,005291	6,099182
P15864;P43274;P43277;P43275;Q07133	H1-2	H12_MOUSE Histone H1.2	2	20,8623	0,008094	2,538451
P24369	Ppib	PPIB_MOUSE Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B	3	18,8643	0,000105	4,802764
Q61171	Prdx2	PRDX2_MOUSE Peroxiredoxin-2	3	20,3014	0,011211	1,562619
P29699	Ahsg	FETUA_MOUSE Alpha-2-HS-glycoprotein	3	19,0913	0,009834	3,32404
P62962	Pfn1	PROF1_MOUSE Profilin-1	3	20,576	0,000145	4,468743
P97384	Anxa11	ANX11_MOUSE Annexin A11	4	20,7733	0,000317	1,684041
Q61646	Hp	HPT_MOUSE Haptoglobin	4	21,8348	0,01547	4,168319
P19536	Cox5b	COX5B_MOUSE Cytochrome c oxidase subunit 5B mitochondrial	4	22,218	0,043876	1,509493
P18760	Cfl1	COF1_MOUSE Cofilin-1	3	27,6402	0,005172	6,329903

Tablo 12. Duchenne kas distrofisinin mdx-4cv modelinde up-regüle olan kas proteinlerinin proteomik tanımlanması (Devamı).

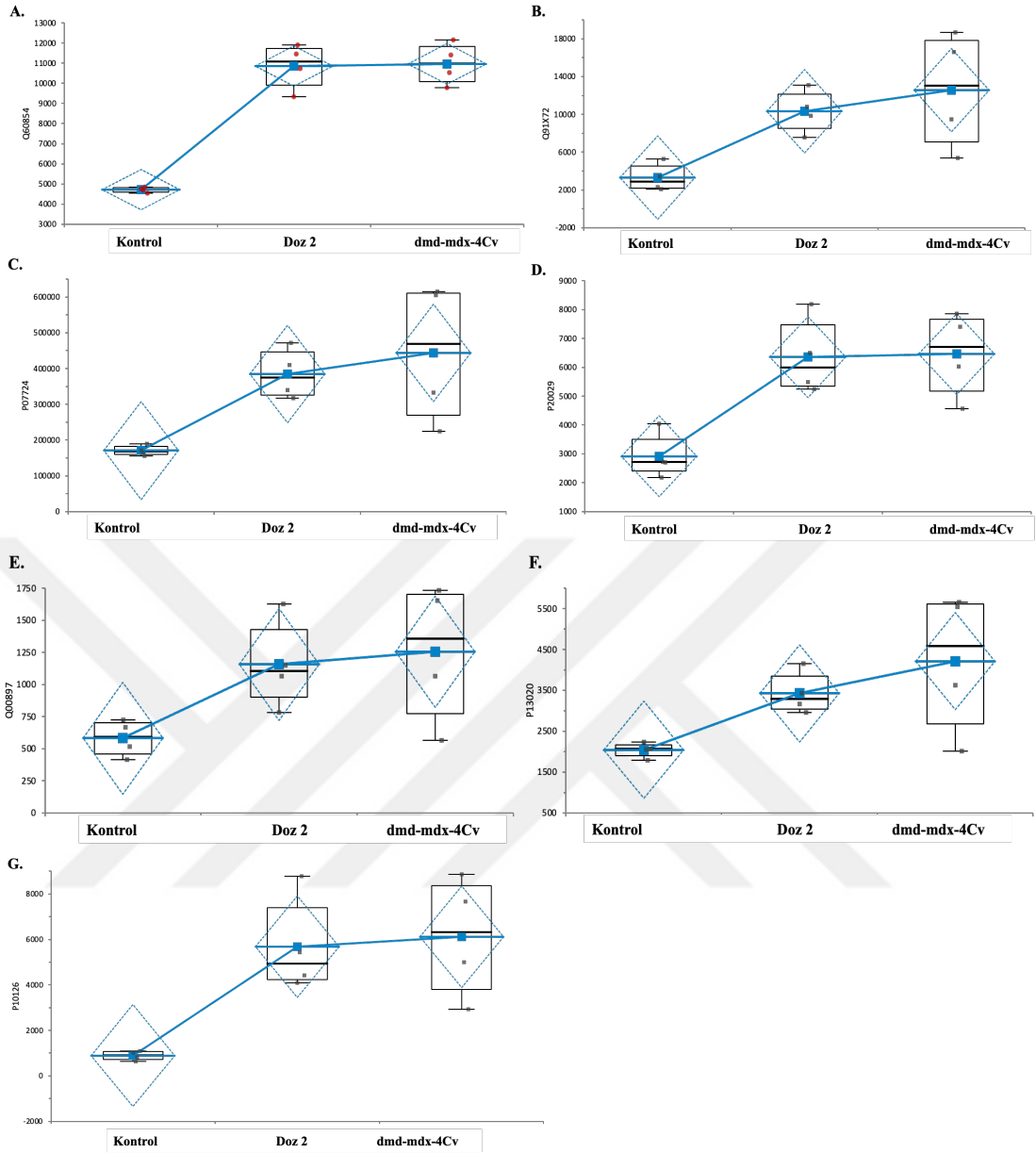
Accession	Gene name	Description	Unique peptides	Confidence score	Anova (p)	Max fold change
P48036	Anxa5	ANXA5_MOUSE Annexin A5	4	25,1688	0,00365	1,593184
P02301;P68433;P84228;P84244	H3-5	H3C_MOUSE Histone H3.3C	4	27,325	0,002645	2,474194
C0HKE1;C0HKE2;C0HKE3;C0HKE4;C0HKE5;C0HKE6;C0HKE7;C0HKE8;C0HKE9;Q8BFU2;Q8CGP5;Q8CGP6;Q8CGP7;Q8R1M2;Q64523;Q6GSS7;P27661;Q64522	H2ac4	H2A1B_MOUSE Histone H2A type 1-B	2	42,2399	0,008877	2,174924
P48678	Lmna	LMNA_MOUSE Prelamin-A/C	4	24,1776	0,000708	2,728864
P09103	P4hb	PDIA1_MOUSE Protein disulfide-isomerase	5	28,1718	0,005774	2,147113
P63038	Hspd1	CH60_MOUSE 60 kDa heat shock protein_mitochondrial	5	28,6326	0,028443	1,602625
Q00623	Apoa1	APOA1_MOUSE Apolipoprotein A-I	6	47,5404	0,023663	2,20087
P13020	Gsn	GELS_MOUSE Gelsolin	7	40,4339	0,018328	5,225323
Q60854	Serpinb6	SPB6_MOUSE Serpin B6	7	45,982	2,01E-07	2,237334
P10853;P10854;Q64475;Q64478;Q64525;Q6ZWY9;Q8CGP1;Q8CGP2;Q64524;Q8CGP0;Q9D2U9;P70696	H2bc7	H2B1F_MOUSE Histone H2B type 1-F/J/L	7	53,9616	0,000532	2,399047
P62806	H4c1	H4_MOUSE Histone H4	8	70,5622	0,002144	2,241463
Q91X72	Hpx	HEMO_MOUSE Hemopexin	8	62,1556	0,011312	3,82981
Q61838	Pzp	PZP_MOUSE Pregnancy zone protein	9	59,4474	0,031681	2,579706
P20029	Hspa5	BIP_MOUSE Endoplasmic reticulum chaperone BiP	7	56,0891	0,00819	1,941568
P05213;P68369;P68373;P05214	Tuba1b	TBA1B_MOUSE Tubulin alpha-1B chain	4	76,6204	0,000321	5,695366
P17742	Ppia	PPIA_MOUSE Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	10	76,9991	0,002494	2,45001
P10126	Eef1a1	EF1A1_MOUSE Elongation factor 1-alpha 1	3	90,1639	0,000423	6,851887
Q00897	Serpina1d	A1AT4_MOUSE Alpha-1-antitrypsin 1-4	2	86,5321	0,04236	2,217409
P07758;Q00896;P22599	Serpina1a	A1AT1_MOUSE Alpha-1-antitrypsin 1-1	1	85,8666	0,008967	3,668319
P51881	Slc25a5	ADT2_MOUSE ADP/ATP translocase 2	4	131,2122	0,001103	3,239313
Q92111	Tf	TRFE_MOUSE Serotransferrin	13	154,4404	0,018059	2,558225
P20152	Vim	VIME_MOUSE Vimentin	12	149,247	0,010461	3,236668
P31001	Des	DESM_MOUSE Desmin	23	214,7936	0,016589	1,60832
P60710;P63260	Actb	ACTB_MOUSE Actin_cytoplasmic 1	8	318,8691	0,004735	2,619967
P07724	Alb	ALBU_MOUSE Albumin	29	328,552	0,010832	2,744302

Sağlıklı kontrol grubuna kıyasla; tedavi uygulanan doz 2 ve tedavi uygulanmayan dmd-mdx-4Cv grubundaki up-regüle olan istatistiksel olarak anlamlı ve ortak proteinler belirlendi. Sadece doz 2 grubunda eksprese olan 18 protein, sadece dmd-mdx-4Cv grubunda bulunan 15 protein tespit edildi. Doz 2 ve dmd-mdx-4Cv grubunda ortak olarak eksprese olan 22 protein bulundu. Bu bilgilerin Venn diagramı Şekil 37-A'da



Şekil 41. Doz 2 ve tedavi verilmeyen dmd-mdx-4Cv grubunun heathmap görüntüsü.

Heathmap ve yolak analizi sonuçlarında belirtilen 22 tane proteinin sadece 6 tanesi doz 2 grubunun ekspresyon seviyesi sağlıklı kontrol grubuna yaklaşımaktadır. Q60854, Q91X72, P07724, P20029, Q00897, P13020 ve P10126 proteinin boxplot grafiği Şekil 39'daki gibidir. Q60854; SerpinB6, Q91X72; Hemopexin, P07724; Albumin, P20029; Endoplazmik retikulum şaperon BiP, Q00897; Alfa-1-antitripsin 1-4, P13020; Gelsolin, P10126; uzama faktörü 1-alfa 1 olarak tanımlanmıştır.



Şekil 42. 7 tane proteinin boxplot grafikleri. A. Q60854, B. Q91X72, C. P07724, D. P20029, E. Q00897, F. P13020, G. P10126 proteinlerin kontrol, doz 2 ve dmd-mdx-4Cv gruplarındaki ekspresyonlarını gösteren boxplot grafikleri.

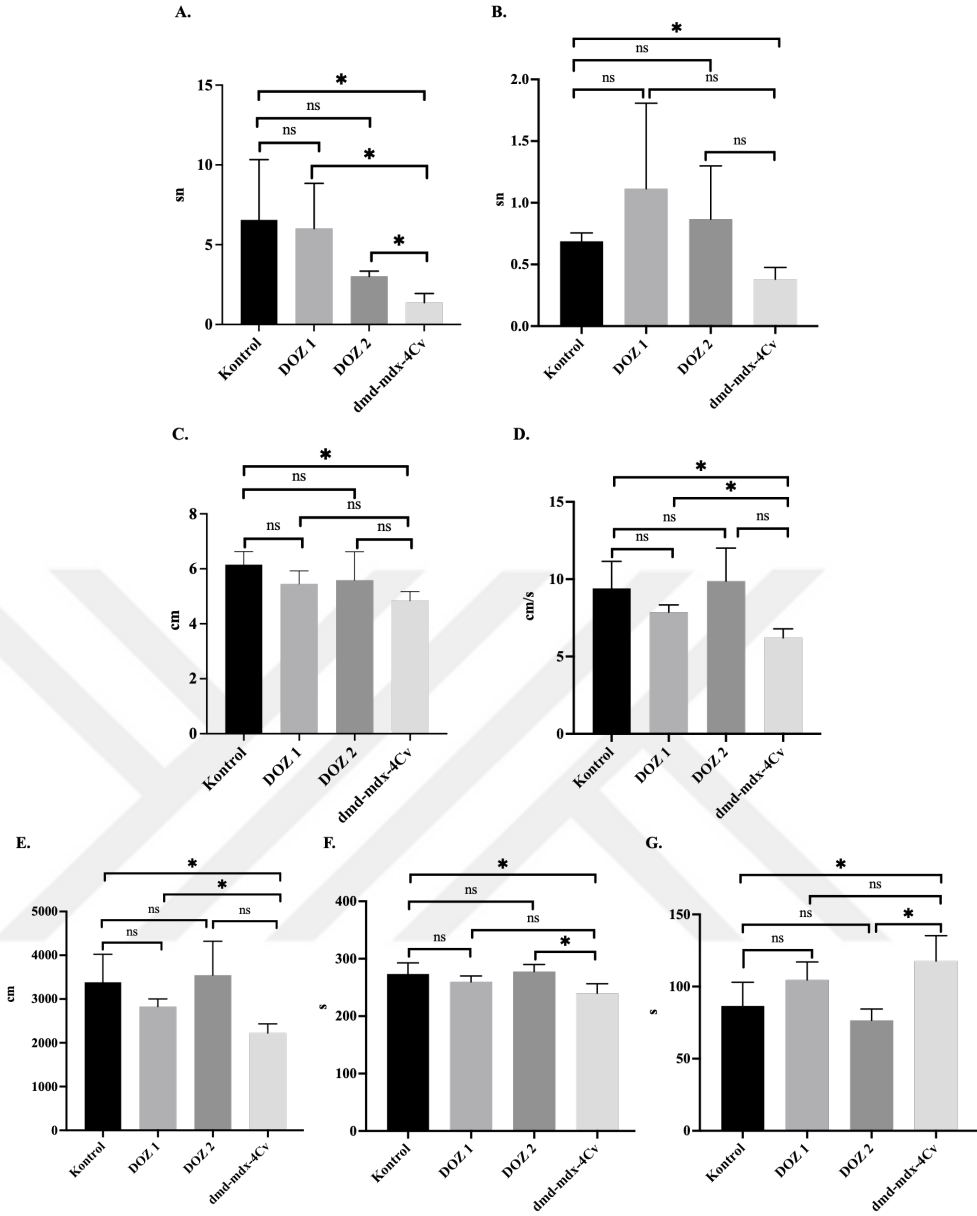
4.2.3 10 aylık dmd-mdx-4cv sonuçları

Daha önceki çalışmalar, mdx'de 9 ayda belirgin fibrozis ile distropatolojinin ilerlemesinin rapor edildiği gösterilmişti (130,131). 10 aylık mdx farelerde DMD patolojisinin ilerlemesini performans testleri ile belirledikten sonra, dört grup olacak şekilde lentiviral mikro-distrofin tedavisine başlandı. 10 aylık vahşi tip kontrol, doz 1,

doz 2 ve dmd-mdx-4cv (tedavi edilmemiş) fare grupları, gen terapimizin enjeksiyonundan önce ve sonra kas fonksiyonunu değerlendirmek için çeşitli tekniklerle incelendi. Doz grupları arasındaki tek fark, doz 2 (1.5×10^6 TU) grubundaki farelere doz 1 (0.5×10^6 TU) grubuna göre 3 kat daha fazla TU enjekte edilmiş olmasıdır. Tedavi edilmemiş dmd-mdx-4cv farelerine enjeksiyon süresi boyunca sadece DPBS uygulandı. Deneysel enjeksiyon zaman dilimi Şekil 8'de belirtilmiştir.

4.2.3.1 Motor performans analizi

İki doz gen terapisi tedavisinden sonra, kavrama testinde doz grupları dmd-mdx-4cv farelerinden daha yüksek saniye asılı kaldı. Doz grubunun süresi karşılaştırıldığında, doz 1 grubu fareleri daha iyi dayanıklıdır. Tedavi edilmeyen dmd-mdx-4Cv fareleri, kontrol grupları kadar asılı kalamadı (Şekil 40-A). Rotarod testi sırasında doz 1 grubu diğer gruplara göre daha fazla koşabilmesine rağmen anlamlı bir değişiklik olmadı (Şekil 40-B). Ayak izi testinden sonra, iki adım arasındaki mesafe ölçüldü ve herhangi bir farklılık gözlemlenmedi (Şekil 40-C). Hız, hareket edilen mesafe, hareket ve hareket etmeme parametreleri bir tracking testi ile değerlendirildi. Tedaviden sonra, doz 2 grubu, tedavi edilmeyen gruptan önemli ölçüde daha hızlıydı. Doz 2 grubunun aksine doz 1 grubunda artış olmadı (Şekil 40-D). Doz 1 grubu dmd-mdx-4cv'ye göre daha yüksek mesafe hareketine ulaştı (Şekil 40-E). Doz 2 grubu, kontrol ile aynı hızda hareket etti (Şekil 40-F). Tedavi edilmeyen dmd-mdx-4Cv grubu; kontrol ile doz 2 farelere göre zamana bağlı olarak gözle görülür şekilde daha az hareket gösterdi (Şekil 40-G). Tüm motor fonksiyon testleri sırasında kontrol ve tedavi edilmeyen farklılıklar belirgin bir şekilde tespit edildi. Tedavi edilen gruplar, tedavi edilmeyen dmd farelere göre kavrama gücü ve tracking testlerinde önemli ölçüde daha iyiydi. Bu sonuçlar, lentiviral doz tedavisi grubunun her ikisinin de dmd model mdx farelerinin motor işlevlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir gelişme gösterdiğini göstermektedir.

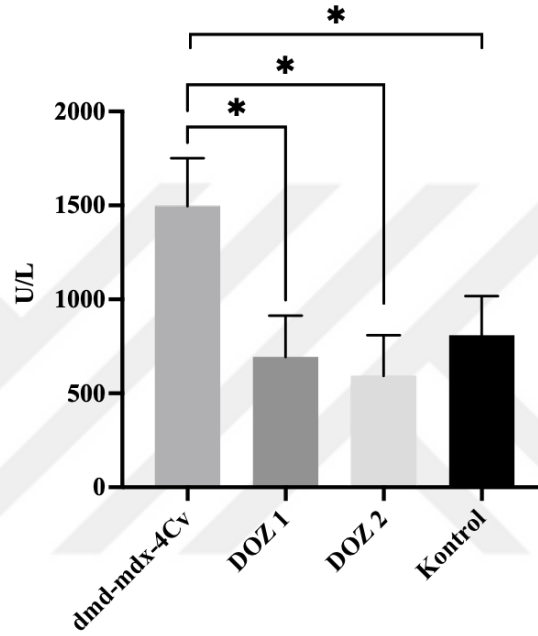


Şekil 43. Lentivirüs kodlayan mikro-distrofin uygulamasından sonra motor performans analizi. A. Kavrama gücü testi, B. Rotarod testi, C. Ayak izi testi, D. Hız testi, E. Hareket edilen mesafeyi testi, F. Hareket testi, G. Hareket etmeme testi. Ethovision XT9 programı kullanıldı. Test bağımsız olarak üç kez tekrarlandı. Sonuçlar ortalama $\pm$ SD olarak gösterildi. *p < 0,05

4.2.3.2 Tedavi sonrası kandan serum analizi

Tüm DMD hastaları doğumdan beri ciddi şekilde yüksek serum CK değerine sahiptir (132). Bu nedenle, en kritik kas bozunma biyobelirteci olan CK serum toplanarak analiz edildi. Daha sonra, tedavi edilen fare gruplarındaki CK seviyelerini

belirlemek istedik. Tedavi edilmeyen dmd-mdx-4Cv farelerinin serum CK seviyesi, yaklaşık 1500 U/L (n=4) seviyesindeydi. Ancak Lv-HSA-μDys/eGFP gen tedavisini aldıktan sonra doz 1 ve 2 gruplarına ait farelerde CK seviyeleri tedavi edilmeyen gruba göre daha düşüktü (Şekil 41). Bu sonuçlar, tedavi edilen her iki gruptaki CK seviyelerinin, tedavi edilmeyen DMD kontrol fareleriyle ilgili olarak vahşi tip kontrol grubundakine benzer şekilde önemli ölçüde azaldığını gösterdi.

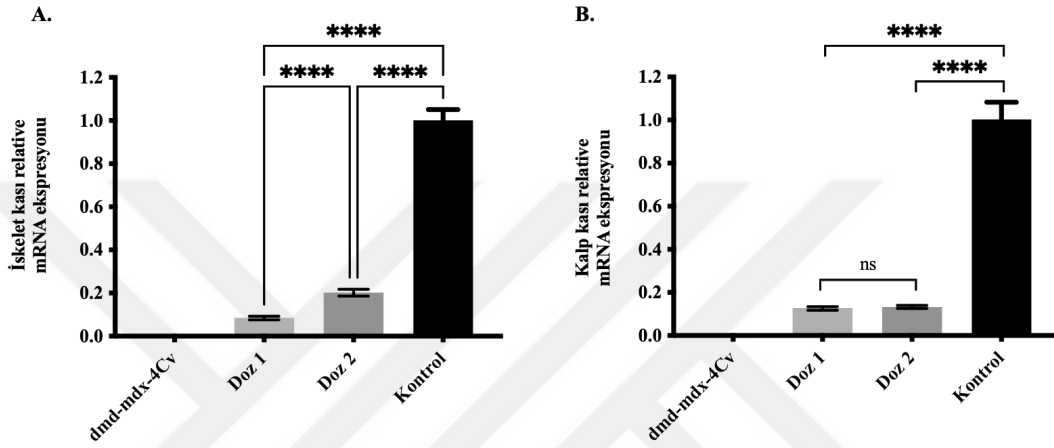


Şekil 44. 10 aylık farelerde serum Kreatinin Kinaz (CK) seviyesi. Doz gruplarında CK düşüşünü gösteren çubuk grafik. Sonuçlar ortalama $\pm$ SD olarak gösterildi. *p <0,05

4.2.3.3 Distrofin ifadesinin q-RT-PCR ve immünohistokimya ile incelenmesi

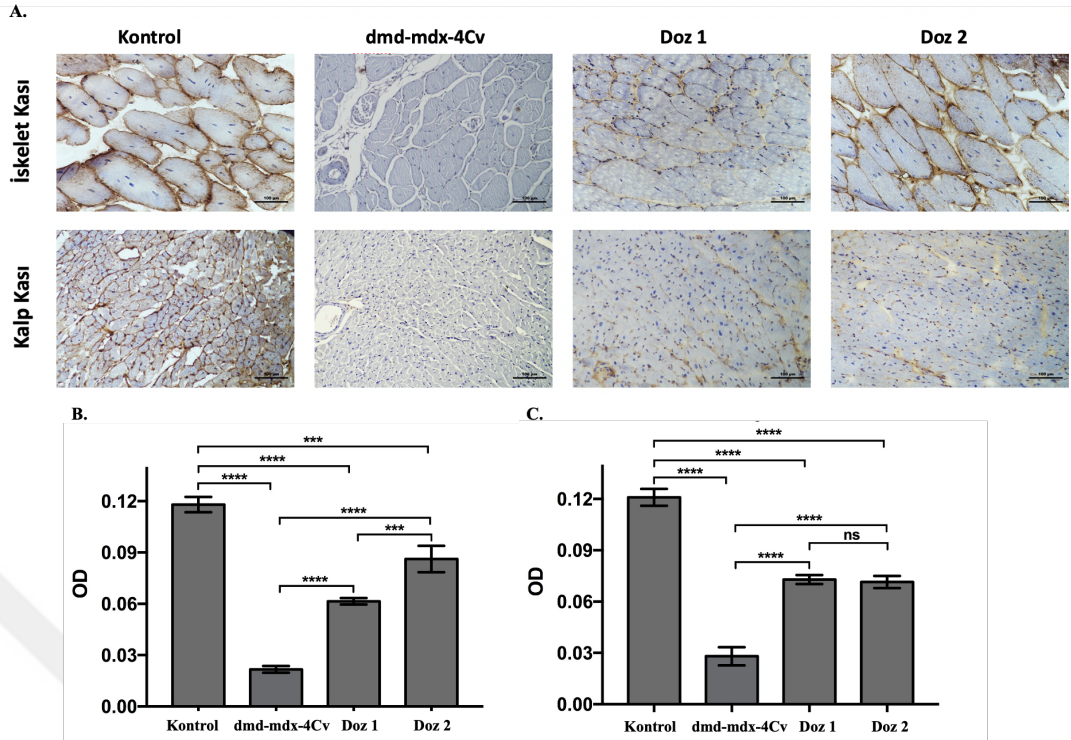
Tedaviden sonra inceleme için ayrılmış dokulardan distrofin ekspresyonunu belirlemeyi amaçladık. q-RT-PCR, iskelet ve kalp kasından elde edilen mikro-distrofin mRNA seviyelerinin, DMD ile tedavi edilmeyen kontrol grubuna göre Lv-HSA-μDys/eGFP uygulanan her iki grupta arttığını göstermektedir. Tedavi sonrası iskelet ve kalp kasında distrofin ekspresyonu saptanırken, tedavi edilmeyen grupta mRNA ekspresyonu saptanmadı (Şekil 42-A ve B). Doz 1 ve 2 grupları, iskelet kasında kontrolden ve birbirinden önemli ölçüde farklıydı (Şekil 42-A). Düşük doz uygulamasından sonra iskelet kası hücrelerinde yaklaşık %10 distrofin eksprese edildi.

Bununla birlikte, daha yüksek doz enjekte edildiğinde, distrofin ifadesi yaklaşık %20'ye ulaşıyordu. Lv-HSA-μDys/eGFP, kalp dokusundaki distrofin ekspresyon seviyelerini doz gruplarında pek farklı olmayan seviyelerde azalttı (Şekil 42-B). 10 aylık mdx farelerinin iskelet ve kalp kası hücrelerinde anlamlı μ-distrofin ekspresyonunun elde edildiği gösterildi. Tedavi edilmeyen grupta distrofin ekspresyonu saptanmamıştır.



Şekil 45. İskelet ve kalp kasında distrofin ekspresyonu. A. İskelet kası göreli mRNA ifadesi. B. Kardiyak kas göreli mRNA ifadesi. Sonuçlar ortalama $\pm$ SD olarak gösterildi. ****p < 0,0001

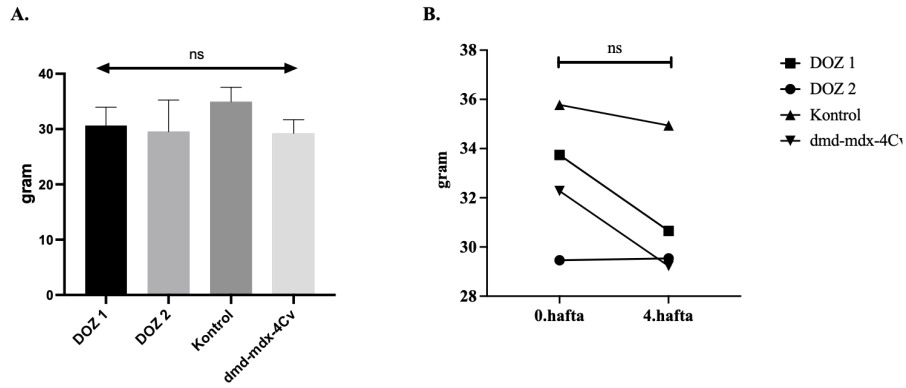
İnsan μ-distrofin geninin TA iskelet ve kalp kaslarındaki etkin ifadesi Şekil 43-A'da gösterilmiştir. Enjeksiyondan 4 hafta sonra TA kaslarının immünohistokimya analizi, Lv-HSA-μDys/eGFP ile tedavinin distrofin ekspresyonlarının seviyesini önemli ölçüde arttırdığını göstermektedir (Şekil 43-B). Yüksek doz uygulama, iskelet kasında daha yüksek distrofin ekspresyonuna yol açtı. Ancak kalp dokusunda doz 1 ve 2 grupları arasında anlamlı bir fark gözlenmedi (Şekil 43-C). Distrofin ekspresyonu, tüm gruplar için iskelet ve kalp dokularında yaklaşık olarak benzerdi. İskelet ve kalp kası bölümlerinde, kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak tedavi edilmeyen DMD farelerinde distrofin azaldı.



Şekil 46. Distrofin antikoru ile boyandıktan sonra iskelet ve kalp kasının immünohistokimya sonuçları. A. Her gruptan iskelet ve kalp kasından elde edilen kriyomatriks kesit görüntüsü. B. İskelet kasının immünohistokimya analizi (OD skoru). C. Kalp kasının immünohistokimya analizi (OD skoru). Sonuçlar ortalama $\pm$ SD olarak gösterildi. **** $p < 0,0001$

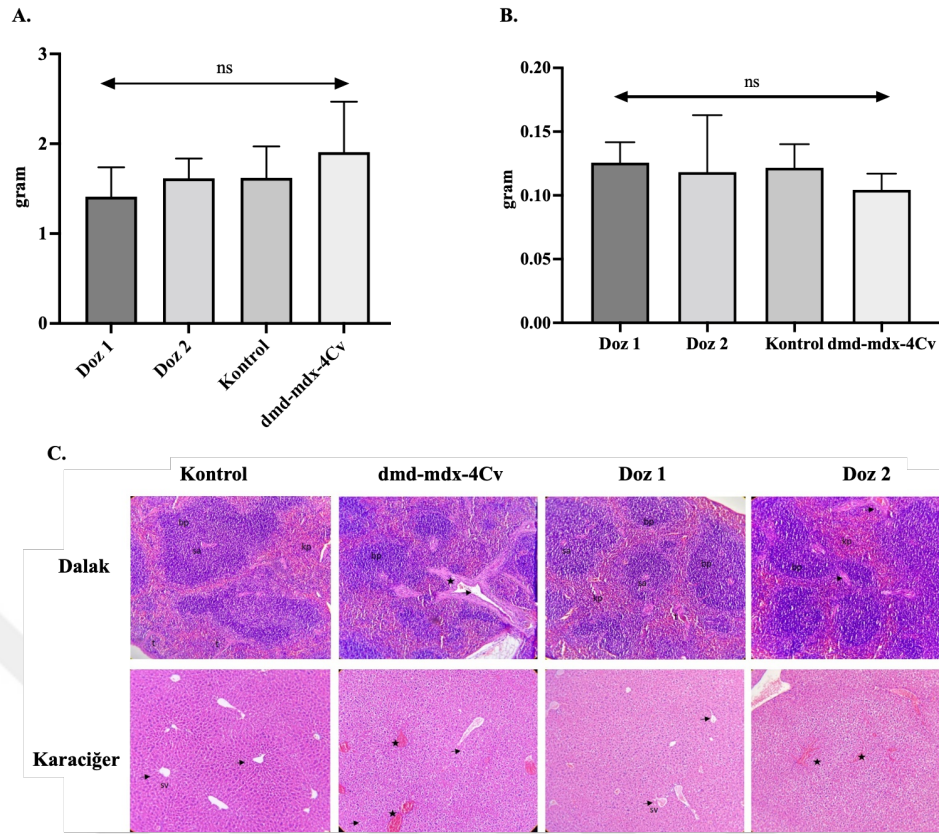
4.2.3.4 Karaciğer ve dalağın fizyolojik ve histopatolojik incelenmesi

Lentivirüs kodlayan μ -distrofinden tedavisinden önceki günden itibaren, vücut ağırlığı değişiklikleri her 2 haftada bir kontrol edildi. Grubun vücut ağırlıkları karşılaştırıldığında önemli bir değişiklik tespit edilmedi (Şekil 44-A). Ek olarak, gruplar ayrı ayrı ele aldığımızda da tedaviden önce ve sonra önemli bir ağırlık değişikliği olmadı (Şekil 44-B).



Şekil 47. Tedavi öncesi ve sonrası *in vivo* fizyolojik değerlendirme. A. Sakrifikasyondan önceki toplam vücut ağırlığını gösteren çubuk grafik. B. Her grubun tedaviden önce ve sonra tartım sonuçları. 0. hafta tedavinin başlangıcını ve 4. hafta tedavi sonrasını temsil eder. Sonuçlar ortalama $\pm$ SD olarak gösterildi.

Histopatolojik değerlendirmeler karaciğer, dalak, beyin ve böbrek dokuları ile yapıldı. Sakrifikasyon edildikten sonra organlar tartıldı ve karaciğer ve dalakta kontrol, tedavi edilmeyen ve doz grupları arasında önemli bir fark gözlenmedi (Şekil 45-A ve B). H&E boyamasından sonra, 10 aylık histopatolojik değerlendirmede, kontrol gruplarına ait karaciğer dokusu normal yoğunlukla normal yapıda hepatositlerden (ok) oluşan karaciğer parankim yapısı gözlemlendi. Santral venden (sv) ırsinal seyreden hepatosit plakları düzenli yerleşim göstermekteydi. Doz 1 uygulanan grupta portal alan, periportal alan, hepatositler ve sinüzoidler kontrol grubuna benzer yapıda ayırt edildi. Tedavi edilmeyen ve doz 2 grupların sitoplazmalarında yaygın vakuol içeriğine sahip hepatositler (ok), sinüzoidal dilatasyon ve intertisyel hemaroji (yıldız) saptandı. Doz 1 gruplara ait dalak kesitleri incelendiğinde kontrol grubuna benzer şekilde beyaz pulpa (bp), kırmızı pulpa(kp), sentral arter(sa) ve trabekül (t) belirgin olarak ayırt ediliyordu. Tedavi edilmeyen ve doz 2 gruplarda parenşimde trabeküler bağ dokuya, özellikle damarların etrafında (ok) daha belirgin olarak rastlandı (Şekil 45-C). Yaşlı farelere lentiviral mikro-distrofin gen tedavisinin uygulandığı göz önüne alındığında her iki dozda da bile toksik olarak kabul edilmedi.



Şekil 48. Kontrol, doz grubu ve tedavi edilmemiş DMD fare grubunun karaciğer ve dalağının histopatolojik incelemesi. A. Karaciğer organlarının ağırlığını temsil eden çubuk grafikler. B. Dalak organlarının ağırlığını temsil eden çubuk grafikler. Sonuçlar ortalama $\pm$ SD olarak gösterildi. C. Fare gruplarının histopatolojik analizi. Parafilm içerisine gömülü olan dalak ve karaciğer H&E ile boyanmıştır. Tüm resimler 100x büyütmede gösterildi. bp: beyaz pulpa, sv: santral ven, sa: santral arter, kp: kırmızı pulp, t: trabekül, yıldız: interstisyel kanama, ok: hepatosit.

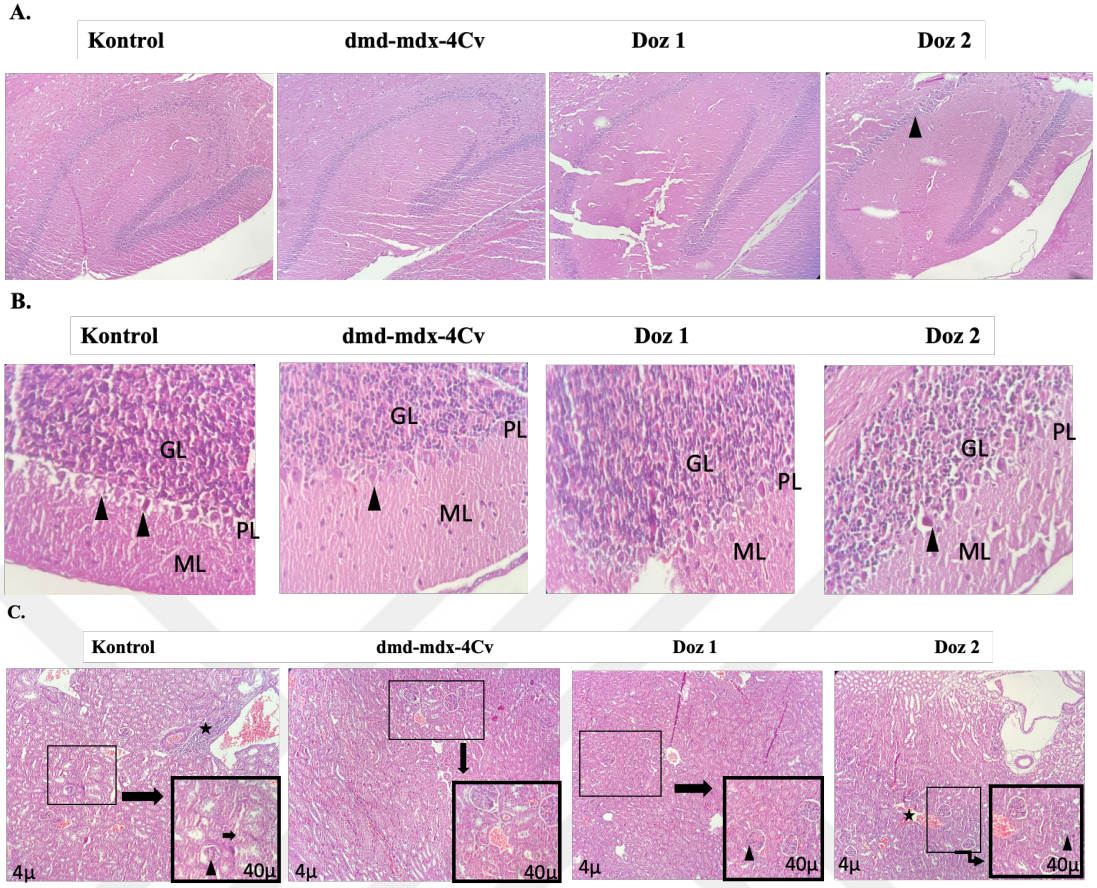
Hipokampus kesitlerine bakıldığında, dmd-mdx-4Cv grubundaki nöronlar net sınırlarla yakın bir şekilde düzenli ve sitoplazma ile çekirdek arasındaki sınırlar belirlidir. Kontrol grubunda nöronlar, net sınırlı ve normal morfolojidedir. Sitoplazma ve çekirdek arasındaki sınırlar açıktır ve belirgin bir anormallik gözlenmemiştir. Doz 1 grubunda nöronların normal morfolojisi ve yapıda sitoplazma ve çekirdeğin sınırları nettir. Doz 2 grubunda ise çekirdek ve sitoplazma sınırları belirsizdir ve dağınıktır (siyah ok) (Şekil 46-A).

Cerebellum kesitlerindeki dmd-mdx-4Cv grubundaki Purkinje tabakası (PL) apikal dendritleri (ok ucu) olan bir sıra şeklinde Purkinje hücrelerini içeriyordu. Granüler katman (GL) küçük, sıkı bir şekilde paketlenmiş granül hücrelerden

oluşturmuştur. Kontrol, grubunda PL'nin lineer organizasyonunda düzensiz, seyrek ve küçülmüş Purkinje hücrelerinden oluşmaktadır (ok ucu). GL hücreleri, derin lekeli çekirdeklerle küçülmüş görünmektedir. Doz 1 grubunda PL'de çoğu hücreler normal görünüm göstermektedir ve doğrusal organizasyonunu korumaktadır. Doz 2 grubunda, kontrol grubuna benzer fakat daha hafif eozinofilik sitoplazmaya (ok) sahip birkaç Purkinje hücrelerinin varlığı dikkat çekmiştir. Moleküler tabakadaki (ML) 'deki granül hücreler, tüm gruplarda benzer morfolojiye sahiptir (Şekil 46-B).

Dmd-mdx-4Cv grubuna ait böbreklerde herhangi bir patolojik lezyonla karşılaşılması. Kontrol grubunda peritübüler inflamasyon (yıldız), tübüllerde ise, yaygın atrofi (ok başı) ile yer yer tubuler dilatasyonlar (ok) dikkati çekmektedir. Segmental proliferasyon saptamıştır (ok başı). Az sayıda alanda ise tubuler dejenerasyon (ok başı) ve tübüller arasında hafif hemoraji görüldü (yıldız).

Dmd-mdx-4Cv grubuna ait böbrek kesitinde korteks ve medulla ayrımı oldukça belirgindi. Tübül ve glomerül yapıları belirgin olup normal morfoloji sergilemekte idi. Kontrol deney grubuna ait böbrek kesitine bakıldığında proksimal tübüllerin fırçamsı kenarlarında yer yer hasar meydana geldiği ve tübüllerin çevresinde inflamasyon görülmektedir. Dmd-mdx-4Cv grubunun böbrek kesiti ile karşılaştırıldığında glomerüllerin daha dağınık yerleştiği görülmektedir. Doz 1 grubunda, böbrek tübüllerinin lümeni oldukça düzenliydi. Kortekste şekillenmekte olan glomerül yapıları düzenli olup bowman boşluğu normal görülmekteydi. Doz 2 grubuna ait böbrek kesitinde glomeruller normal yapıda idi fakat Doz 1 grubuna kıyasla bowman boşluğu daha geniş görülmekteydi (Şekil 46-C).



Şekil 49. Kontrol, doz grubu ve tedavi edilmemiş DMD fare grubunun beyin ve böbrek dokularının histopatolojik incelemesi. Fare gruplarının, A. hipokampus B. cerebellum C. Böbrek histopatolojik analizi. Parafilm içerisine gömülü olan dokular H&E ile boyanmıştır. Hipokampus ve böbrek resimleri 100x büyütmede gösterildi. Cerebellum kesitleri 200x büyütmede gösterildi. PL: Purkinje tabakası, ML: Moleküler tabaka, GL: Granüler katman.

5 TARTIŞMA

DMD ölümcül bir genetik nöromusküler bozukluktur, ancak DMD'nin henüz tedavisi yoktur (133). Gen tedavisi günümüzde potansiyel bir tedavi seçeneğidir. DMD gen tedavisi sonuçları, kas hücrelerinde distrofin ekspresyonunun geri kazanılması için önemli ölçüde yüksek yanıt oranları göstermiştir (134,135). Burada yapılan çalışma, farklı enjeksiyon yollarının denenmesi ile geç evre ve erken evre dmd-mdx-4cv farelerinde farklı dozların test edildiğine dair kanıt sağlamaktadır.

Lentiviral gen tedavisinin üretim sonrasında bir dizi testlere tutulmuştur. *In vivo* öncesinde etkinliğini test etmek için iskelet kasıyla aynı türden olan MKH hücreleri kullanılarak farklı MOI'lerde transdükte edilip, sonucu akım sitometri cihazıyla takip edilmiştir. MOI yükselttikçe transdükte oranında arttığı tespit edilmiştir. Yine terapötik lentiviral tedavisinde tercih edilen HSA promotörü de test edilmiştir. Çünkü HSA bir leakage promotör özelliği taşımaktadır ve test etmek için farklı hücre hatları ile kültüre alınmıştır. Hücre hatlarında devamlı farklılaşma olduğu için ister istemez bir leakage olmaktadır, ama primer bir hücre hattına (PKMH) baktığımızda belirli bir eGFP ekspresyonu göremedik. Bu elde edilen sonuçta gen tedavisinde kullanmak için doğru bir promotör seçtiğimizi göstermiş olmaktadır.

Projede sunulmaktan olan DMD gen terapi modelinin testlerinin yapılacağı dmd-mdx-4Cv faresi, kimyasal mutagenез ile geliştirilmiştir ve C57BL/6 suşuna geri çaprazlanmıştır. Dmd-mdx-4Cv fareleri, distrofin geninin ekzon 53'ünde bir erken sonlandırma kodonuna sahiptir. Bu suşun MDX-10ScSn suşuna göre 10 kat daha az dönüşebilen miyofiberi vardır (116). DMD modeli fare fenotipi, insanlara göre daha hafif distrofik patoloji göstermektedir. Çünkü genç DMD farelerinde hastalığın şiddetini azaltan telafi edici mekanizmalar bulunmaktadır. Utrofin ve integrin ekspresyonu Distrofin yokluğunda artarak regülasyon ve böylelikle kas rejenerasyonu yavaş da olsa devam etmektedir (117). Bundan dolayı, genç dmd-mdx fareleri, DMD çocuklarının aksine, başarılı bir kas rejenerasyonu sergiler ve geniş bir fibroz fenotipi göstermez. Dmd-mdx farelerde yapılacak fonksiyonel egzersiz testleri, bir tedavinin etkili olup olmadığını belirlemek için dmd-mdx-4Cv fare kaslarını zorlamak ve

hastalığı şiddetlendirmek için kullanılmaktadır (118,119). 18 aylık Dmd-mdx farelerde, rejenerasyon kapasitesi giderek azalır ve hastalığın ciddiyetinde eşzamanlı bir artış meydana gelmektedir. Bu nedenle, 18. ayı takiben yaşlı dmd-mdx fareleri tarafından sergilenen musküler distrofi, insan DMD'nin miyopatisine daha çok benzemektedir (119). Projede gerçekleştirilecek ilk *in vivo* deneyleri 18 aylık dmd lentiviral enjeksiyonu ve testleri bu bilgiler ışığında planlanlandı.

Uygulama yolu, viral vektörlerinin *in vivo* biyolojik dağılımını ve transdüksiyon verimliliğini önemli ölçüde etkiler. Şu anda, viral vektörler uygulamasındaki birçok yol, farklı terapötik amaçları olan lokalize veya sistemik kas gen transferini gerçekleştirebilir (136). Örneğin; intramusküler enjeksiyon, retrograd transvenöz uzuv perfüzyonu, intrakoronar infüzyon, intraperikardiyal enjeksiyon, transendokardiyal enjeksiyon, sirküle uygulama, intraperitoneal enjeksiyon ve intravenöz uygulama gibi.

İlk olarak 18 aylık fare çalışmasında; IM ve IP ayrı ayrı ve her ikisinde birlikte olarak denemiştir ki deney sonucunda göre hangi enjeksiyon yolunu seçmemiz gerektiği kararlaştırılmıştır. Motor fonksiyon testlerinden kavrama gücü testinde, tedaviden önce ve tedaviden sonra 24. haftada giderek askıda daha uzun süre tutunmayı başarmışlardır. Buna ek olarak; kas yıkımı biyobelirteçlerinden en önemlisi olan CK değerlerinde de anlamlı bir düşüş sağlamıştır. Buradan çıkarım yaparak, en çok IM ve IP enjeksiyonu birlikte uygulandığı zaman kas yıkımının oldukça yavaşladığını söyleyebiliriz. Ayrıca, CK ölçümü kandaki hemolizden oldukça etkilenmektedir ve yüksek standart sapmanın nedeni fareden alınan kandaki hemoliz oluşumudur.

18 aylık fare grubunda sakrifikasyon sonrası iskelet kası ve kalp kası hızlı bir şekilde toplanmıştır. Bu kas gruplarında immunohistokimya çalışması ile distrofin ekspresyonunu saptamak için kriyo kesitlerin alınması gerekmektedir. Fakat zaman aşımından dolayı, dokular otoliz olduğu için çalışılamadı ve sonuç sunulamamaktadır.

Toksisite sonuçlarına baktığımızda tedavi verilmeyen DMD grubunda infiltrasyon saptanırken, tedavi verilen ve sağlıklı kontrol gruplarında saptanmadı. Lentiviral

tedavinin ileri yaştaki farelerin karaciğer ve dalağına toksik etkisi olmadığı gibi rejenerasyonunda tetiklemiştir. Tedavi uygulanan tüm farelerde sağ kalım gözlemlendi. Distrofi patolojini en iyi gözlemlediğimiz ileri yaştaki DMD farelerinde 24 hafta içerisinde kilo kaybı saptandı fakat tedavi verilen gruplarda anlamlı bir değişim saptanmadı. Bu durum, tedavi verilmeyen grupta kas yıkımının oldukça fazla olduğunun ve tedavi uygulanarak distrofin ekspresyonu tetiklendiği için kay kaybı azaldığı için bu da kilo kaybını önüne geçmektedir.

18 aylık Dmd-mdx farelerin klinik bulguları DMD hasta bulgularına benzemesi nedeniyle ön fizibilite çalışmalar kapsamında 18 aylık farelerde prelinik çalışmaları tamamlanmış, lentiviral Lv-HSA- μ Dys/eGFP enjeksiyon sonrası motor performanslarının arttığı saptanmıştır. Klinik olarak DMD hastaları 3 ve 4 yaşlarında teşhis edildiği ve 12 yaşında motor kaslarını kullanamadıkları göz önüne alınınca, erken dönem olan 4 haftalık dmd-mdx farelerde benzer deneyin uygulanması planlanmıştır.

Bu fare deneyi gruplarında, kas hücrelerinin genomuna entegre olabilecek ve sadece kas hücrelerinde mikro-Distrofin ekspresyonu sağlayacak lentiviral-mikro-Distrofin enjeksiyonu ile distrofi patolojisindeki iyileştirme etkinlikleri, toksisite, immun tepkime düzeyleri, gen ekspresyonu ve peptid ifadesi karşılaştırıldı. Kavrama, rotarod, tracking testi gibi davranış deneyleri ile kas rejenerasyonu ve gelişimi incelendi. Bu çalışmada hedef kas dokusunda %3'ten fazla Distrofin ekspresyonu sağlanması hedeflenmektedir. Böylelikle, kas dokularının yenilenmesi, tedavi edilmesi ve hasta sağ kalımlarının artması öngörülmektedir.

Lentiviral mikro-distrofini IM ile sağ ve sol TA iskelet kaslarına ve IP enjeksiyonuna başarıyla aktarıldı. Bu gen tedavisinin etkinliğini histolojik, fonksiyonel ve fiziksel gözlemlerle doğruladık. Motor fonksiyonu testlerine baktığımızda; kavrama gücü, rotarod ve tracking testindeki hız parametresinde tedavi verilenlerin, tedavi edilmeyen gruba karşı istatistiksel olarak anlamlı bir gelişme saptanmıştır. Tedavideki dozların etkili olmasının motor kaslarındaki kas dejenerasyonunun önüne geçildiğini söyleyebiliriz.

Kantitatif sonuçları ele aldığımızda doz 1 ve doz 2 grubunda da CK değerlerinin tedavi edilmeyen gruba karşı düştüğü tespit edildi. q-RT-PCR sonuçlarında da doz 2 dozunda iskelet kasında %35, doz 1 dozunda kalp kasında %15'e yakın distrofin ekspresyonu saptandı. Tedavi verilmeyen dmd-mdx-4Cv grubunda ufak bir yüzdede olsa distrofin ekspresyonu saptanmıştır. Genç farelerde hala bir miktar distrofin ekspresyonu devam ettiği için bu değer öncesinde de beklenmektedir. Başlangıçtaki hedefimiz %3'ün çok daha üstünde gen tedavisi etkili bir şekilde aktarım sağlanıp, rejenerasyonun dejenerasyondan daha fazla olduğu söyleyebiliriz. Testlerin bazılarında doz 1 bazılarında doz 2 grubu daha etkin bulundu. Bunun sebebinin ise grubun 'n' sayısına bağlı olduğu, n sayısının arttırılırsa bu varyasyon ortadan kalkacaktır.

Kilo tartım sonuçlarına bakıldığında, 4 haftalık olduklarında başlattığımız tedavi süreci 8 hafta boyunca takip edildi. Kilo artışının gruplar arasında bir fark bulunmadı, ama grupların kendi içinde anlamlı bir kilo artışı saptandı. Buda, büyüme sürecinde olan fareler için oldukça açıklanabilir ve mantıklı bir sonuçtur.

Patoloji deneylerinden toksisiteye baktığımızda 18 aylık farelere verilen doza kıyasla 3 katı fazla doz verilmiştir doz 2 grubuna. Buna rağmen genç farelerin karaciğer ve dalak organlarında, sağlıklı kontrole kıyasla anlamlı bir toksik etki saptanmadı. Bu verilerde *in vitro* olarak MKH hücreleri kullanarak yaptığımız MTT bazlı sitotoksikite sonuçlarını doğrulamaktadır.

18 aylık ve 4 haftalık dmd-mdx-4Cv fare gruplarımızda önceden belirlenen immünohistokimya deneyi distrofin ekspresyon artışını kanıtlamak için planlanmıştır. Sakrifikasyon sonrası dokuların otoliz olmaması için hiç beklenilmeden dokular PBS içerisinden alınarak uygun şekilde bistrü ile kesildi ve bir parçası hızlıca Cryostat cihazında kriyo ile kaplanarak kesitler alınmıştır. İlk başta kesitlerin boyanmasında Dystrophin (N-terminus) (DYS3-CE, Dy10/12B2) (Leica Biosystems) kullanılmıştır (137). Sonuç görsellerinde, çok fazla arka planda boyama oluştu ve farklı dilüsyonlar çalışılmaya başlandı. Fakat, yine de patolojik açıdan değerlendirmeye uygun bulunmadı ve grup farkı olmaksızın aşırı boyanma saptandı. Farklı distrofin antikorları

denensede istenilen boyama başarılı bir şekilde elde edilmediği için sonuçlar eklenmemiştir. Daha sonra NACL-DYS-1 (Leica Biosystems) antikorunu kullanılarak 10 aylık fare grubunda istenilen sonuç ve görseller elde edildi.

Elde etmekte sıkıntı yaşadığımız diğer bir deney sonucu ise kandaki serumdan bakmak istediğimiz AST ve LDH sonuçlarıdır. Farelerden çıkan serum az toplanabildiği için tüm farelerin tüm parametrelerini saptamak için yeterli olmadı. Öncelikle önemli olan sonuç CK olduğu için AST ve LDH için bazı farelerde bakılamadı. Bu yüzden AST ve LDH'nin sonuç grafiği bulgular kısmına eklenemedi. LDH parametresi ile farenin dokularında hasar veya yıkım olup olmadığı kontrol edilmek istenmiştir. Aynı zamanda AST ise karaciğer organında oluşabilecek hasarın tespiti için bakılması uygun görülmüştür.

Mikro-Distrofin lentiviral gen tedavisinin iskelet kas dokusundaki protein ekspresyon değişimine LC-MS/MS yöntemi kullanılarak incelendi. LC-MS/MS hassas ve spesifik sonuçlar veren nicel bir analizdir. Sağlıklı kontrole göre kıyasla up-regüle olan proteinleri seçtiğimizde bir Venn diagramı oluşturduk (Şekil 37-A). Sadece tedaviyle ilintili olan 18 protein saptandı. Tedavi edilmeyen Dmd-mdx-4Cv grubunda 15 protein DMD hastalık patolojisiyle ilişkilendirildi. 22 tane protein ise hem hastalıklarda hem de tedaviyle alakalı olabilir. Bu 22 proteinin sadece 7 tanesi hastalıkta artıp; tedavi ile azalmış ve sağlıklı kontrol grubuna yaklaşmıştır. Gen tedavisi uygulaması ile hastalık patolojisinde 7 proteine etkisi olumlu yönde bir iyileşme saptanmıştır. Ayrıca, istatistiksel olarak anlamlı proteinlerde distrofinin olmamasının sebebi dmd-mdx-4Cv farelerindeki distrofin genindeki mutasyonlardan kaynaklıdır. Böylece, mevcut kütüphaneye eşleşme gerçekleştirelememiştir.

Gen tedavisinin etkili olduğu 7 protein; serpin B6, uzama faktör 1-alfa, endoplazmik retikulum şaperon, hemopexin, albümin, gelsolin, alfa-1-antitripsindir. Daha önceki çalışmalara bakıldığında; karaciğerde sentezlenen glikoproteinlerden alfa-1-antitripsin sağlıklı kontrole kıyasla DMD ve BMD hastalarında artış göstermektedir (138). Serpin peptidaz inhibitör olan serpin B6 proteininde DMD patolojisinde artış göstermektedir (139). Yine DMD hastalığında peptid ifadesinde

artış gösteren proteinlerden bir tanesi de albümindir (140). Dmd-mdx-4Cv farelerin ekstra oküler kaslarının analizinde, yüksek seviyelerde glikolitik enzimler ve moleküler şaperonların yanı sıra mitokondriyal enzimlerdeki düşüşler de saptandı (140). Distrofin eksikliği olan Mdx-4cv ekstra oküler kaslarındaki bariz up-regüle olan şaperon proteinleri, sağlam bir hücrel stres yanıtının bir göstergesidir. Çeviri başlatma ve uzama, iskelet kası dokusunda karmaşık süreçlerdir ve protein sentezini düzenleyen yollar, gen ekspresyonunu düzenleyenlerden farklı olabilir.

Distrofin eksikliği sarkolemmayı destabilize eder; kas liflerinde kasılma sırasında yaralanmaya duyarlı hale getirir ve distrofinle ilişkili protein kompleksini bozarak genel olarak kas sistemini etkiler, böylece kalsiyum homeostazını ve sonuç olarak kasılma gevşeme süreçlerini etkiler. Mevcut çalışmadan elde edilen sonuçlar, kas fonksiyonunun kaybına katkıda bulunan distrofine kesinlikle bağımlı olan oyunculara genel bir bakış sağlar. Düzensiz proteinlere bir bakış açısı sağlamak ve distrofinin yanı sıra kas fonksiyonunun bozulmasının temelinde hangi moleküler organizasyonun ve kritik moleküllerin olduğu anlamak için tasarlanmıştır.

Erken evre dmd-mdx-4Cv farelerinde, utrofin ekspresyonu nedeniyle fizyolojik DMD profili zordur (141). Ancak 10 aylık veya daha ileri yaştan sonra fizyolojik ve fonksiyonel kas yıkımı kolaylıkla tespit edilebilir. Son deney grubumuz olan 10 aylık dmd-mdx-4Cv farelere yapılan enjeksiyon sonuçlarına bakıldığında; motor performans testleri ile uygulamadan sonra iskelet kası gelişimini gösterdiğimizi göstermektedir. Her ne kadar anlamlılık belirlenmemiş olsa da doz 1 ve tedavi edilmeyen dmd gruplarının ağırlıkları, kas dejenerasyonu ve farelerin yaşının artması nedeniyle bir ayda azaldı. Bununla birlikte, doz 2 gruplarının ağırlık değişimi küçüktü ve kaslarda distrofin iyileşmesi nedeniyle ağırlıkları arttı. İleri yaşta çift doz uygulamamıza rağmen karaciğer ve dalakta toksisite gözlenmedi. Böbrek dokularına bakıldığında ise kontrol grubunda inflamasyon saptanmasına rağmen doz gruplarında herhangi bir inflamasyon saptanmamıştır. Cerebellum kesitlerinde doz grupları benzer morfolojiye sahiptir. Fakat, hippocampus kesitlerinde yüksek doz olan doz 2 grubunda çekirdek ve sitoplazma sınırları belirsiz ve dağınıktır. İstatistiksel olarak anlamlılık bulunmadığı için yüksek doz toksik etkiye sebep olmuştur denilemez. Öte yandan, Lv-

HSA-μDys/eGFP'nin kas fonksiyonunu ve distrofin ekspresyonunu korumak için DMD fare modelinde uzun vadeli etkisi belirlenmemiştir.

Viral gen transferi, distrofin genleri kadar büyük transgenleri teslim ederken düşük verimlilikle çalışan klinik olarak uygulanabilir viral vektörlerin paketleme kısıtlamaları tarafından engellenir (135). Bununla birlikte, mikro-distrofin lentiviral vektörlerin kullanılması bile yüksek distrofin ekspresyonuna yol açmıştır. Distrofinle ilgili mRNA ekspresyon sonuçlarının yanı sıra, immünohistokimya görüntüleri, uygulanan doz gruplarındaki belirgin farkı ve iyileşmeyi göstermektedir. Yüksek doz grubu (1.5×10^6 TU'luk çift doz uygulama), kavrama gücü ve hareket etme testi ile gösterildiği gibi, iskelet kasının motor fonksiyonunu önemli ölçüde arttırdığını göstermiştir. Askı testinde zamanlayıcı, fareler dört uzuvlarıyla (arka ve ön ayaklar) asılıyken başlatıldı. Bu nedenle fareler teli dört uzvuyla kavramak zorunda kaldılar. Böylece tüm sistemdeki gelişmeyi inceleme fırsatı elde edilmiştir. Her iki doz grubunda da lentiviral gen tedavileri IM ve IP yoluyla uygulandı. Bunun nedeni, IM uygulama ile kaslar üzerindeki etkiyi değerlendirirken, IP uygulama ile tüm sistemin etkilemesini bekliyorduk.

Kandaki CK değeri, DMD hastalarının ve distrofik fare modellerinin serumunda oldukça yüksektir. Son çalışmamızda, mikro-distrofin transgen tedavisi, LV enjeksiyonundan sonra tedavi edilmemiş dmd farelerine kıyasla serum CK seviyelerini normalleştirme ve nihayetinde kandaki seviyeyi koruma yeteneğine sahip olduğu saptanmıştır. Lentiviral mikro-distrofin gen tedavi yöntemimiz ile geri kazanıldığını ve yüksek verimliliğini doğrulamaktadır. Terapötik etkinliği daha da iyileştirmek için, kas fonksiyonunu ve stabil distrofin ekspresyonunu iyileştirdiği için daha yüksek doz uygulaması da tercih edilmelidir.

Yüksek doz viral vektör gen dağılımında klinik sonuçlarda başarıya ulaşmak için kritik olduğu belirtilmiştir. Potansiyel riskler nedeniyle bu dozlardaki ilk denemeler hoş karşılanmasa da çalışmaların (spinal müsküler atrofi gen tedavisi dahil (142)) yüksek dozları iyi tolere edilebileceğini ve yeterli transgen ekspresyonu sağlayabildiği gösterilmiştir (143).

Kantitatif veri elde ettiğimiz RT-qPCR sonuçlarına bakıldığında 10 aylık fare deneylerinde doz 1 ve doz 2 gruplarının ikisinde de belirtilen dozlar iki kere uygulanmıştır. 4 haftalık fare deneylerinde doz 1 ve doz 2 gruplarına bir kerelik lentiviral enjeksiyon uygulanmıştır. Fakat, sonuçları kıyaslamaya kalkarsak 4 haftalık farelerde daha yüksek distrofin ekspresyonunun saptandı. Bunun sebebinin ise genç farelerde hala bir miktar olan distrofin ekspresyonu ve erken evrede lentiviral tedaviye daha yüksek ve etkili şekilde yanıt verebiliyor olmalarını söyleyebiliriz.

Mdx fareleri, etkilenen DMD'li hastaları daha iyi taklit edebilen ve çok sayıda mutasyon varyantı ile tamamlanmaktadır. Bununla birlikte, son on yıldır geliştirilmekte olan tedaviler klinik denemelere girdikçe yeni sorular ortaya çıkmaktadır. Bu yeni soruların çoğu (AAV vektörüne karşı bağışıklık tepkisi ve sistemik olarak büyük ölçekli gen transferi gibi), tam olarak karakterize edilmeyi bekleyen bir model olan cDMD köpekleri ile de daha iyi yanıtlanabilir (144,145).

AAV'nin gen tedavisinde kullanımı yaygın olmasına rağmen, AAV vektörünün paketlenme limiti nedeniyle LV tedavisi ile transdüksiyon yapmayı tercih ettik. Ancak distrofin geninin boyutu düşünüldüğünde de lentiviral kullanmak doğru bir seçimdi. Ayrıca LV, uygulamadan sonra daha az bağışıklık tepkimesi oluşturmaktadır. AAV ile DMD gen tedavisinin gelişimi hala belirsizdir ve ilerlemeye ihtiyacı vardır. Aksine literatürde kullanılan kreatin kinaz promotörü kalpte etkisizdir (146). Bu nedenle çalışmalarımızda HSA promotörü tercih ettik ve ek olarak IP enjeksiyonunun yardımıyla da kalp hücrelerinde distrofin ekspresyonunu indükledik.

AAV'nin boyutu lentiviralden daha küçüktür, bu nedenle öncelikle AAV vektörleri kan-beyin bariyerini (BBB) geçemez. BBB'nin bloke olması nedeniyle, vasküler düz kas hücreleri dahil olmak üzere çok sayıda dokuda distrofin ekspresyonu geri yüklenir, ancak beyin dokularında (BBB) geçerli değildir (147,148). Bu nedenle deneylerde merkezi sinir sistemi (CNS) lentiviral entegrasyona odaklanılmadı. Bunun yerine, iskelet ve kalp kaslarında distrofin ekspresyonunu eski haline getirilmesi hedeflenmektedir. Vektörümüzde, HSA promotörünü miyojenik olmayan hücrelere transdüksiyon yapamayan iskelet kasına özgü promotör/arttırıcı element olarak tercih

edildiği için karaciğer, dalak, böbrek veya CNS'de herhangi bir lentiviral vektör entegrasyonu beklenmemektedir (101).

Gen terapisindeki en önemli bir engel, AAV'ye karşı önceden var olan bağışıklıktır. Buda hastaları tedavi için uygun olmayan hale getirmektedir. En büyük ilerlemelerden biri, bu hastalara gen terapisinin uygulanmasına izin vermek için AAV antikorlarını önleyebilme yeteneği olacaktır. Plazmaferez veya T hücre baskılaması için Rituksimab ve Rapamisin gibi ilaçlar kullanılması aktif bir araştırma alanıdır (149). Bu yöntemlerin önceden var olan bağışıklık engelini aşılabileceğini tahmin etmek için henüz çok erkendir.



6 SONUÇ

Genetik hastalıkların erken teşhisi, hastalığın seyrini değiştirmek için yeni gen tedavilerinin en etkili şekilde uygulanmasını sağlayarak, hastanın yaşam süresini uzatabilir. Sonuç olarak, nadir hastalıklarda gen tedavisinin başarısı, gen transferinin benzersiz yönlerini açıklayan klinik öncesi ve klinik araştırma tasarımına bağlıdır. Tedavilerin hastalara sunulmasında güvenlik ve etkinlik sonuçlarının ikna edici bir şekilde sağlamak için uygun tasarım ilkelerinin mantıklı ve dikkatli bir şekilde uygulanması gerekir.

Bir insan mikro-distofin geninin çift dozlu terapötik sonuçları, sadece patolojiyi etkili bir şekilde geliştirmekle kalmadı, aynı zamanda geç evre dmd-mdx-4cv fare modelinde hem iskelet hem de kardiyak distrofik kasların işlevlerini geliştirdiği gösterilmiştir. Ayrıca sunulan sonuçlar, klinik deneyler için mikro-distofin gen versiyonunun lentiviral terapi ile potansiyel uygulamasının bir göstergesi olmaktadır.

Yaptığımız bu çalışma ile Türkiye'deki ilk DMD gen tedavisi çalışması olmakla birlikte, ileri evre farelerde Lv-HSA-μDys/eGFP enjeksiyon sonrası ulusal araştırmalar anlamında da ilk olma özelliği taşımaktadır.

Proje sonucunda, optimum DMD gen terapi protokolü kararlaştırıldı. Pre-klinik hayvan testleri sonucunda belirlenen Distofin gen terapi metodunun klinik DMD hasta uygulamalarında kullanılmak üzere gen konstraktının (lentiviral vektör) içerisinden markör gen dizilimleri (eGFP) çıkartılmalıdır. Böylelikle, insan kas dokusu hücrelerinde, sadece Distofin geni kodlayacak yeni bir gen konstraktı/dizilimi tasarlanmalıdır. Ayrıca pre-klinik DMD hayvan çalışmasında da tekrar test edilecek olan bu tasarlanacak yeni gen konstraktının, toksisite, teratojenite analizleri ve GMP standardında diğer kalite kontrol testleri (saflık, sterilit, toksisite, stabilite, etkinlik, replikatif olup olmadığı) yapılarak insan klinik çalışmaları için etkinliği ve güvenilirliği test edilmelidir.

Hedeflenen bu pre-klinik testler, özel DMD modeli (dmd-mdx-4Cv) farelerde gerçekleştirilmelidir. Yürüme, rotarod, ön ayak tutuş gücü testi gibi davranış deneyleri ile kas rejenerasyonu ve gelişimi incelenmelidir. Bununla birlikte, gen transferi yapılan kaslardan doku kesiti alınarak Distrofin gen anlatım seviyesinin kontrolü hedeflenmelidir. Proje sonunda optimum DMD gen terapi protokolü, intervali ve dozu belirlenecek olup, beklenen sonuçlar elde edilmesiyle DMD hastalarıyla klinik çalışma gerçekleştirmek üzere, son basamak, kapsamlı klinik proje başvurusu hazırlanmalıdır.



7 KAYNAKLAR

1. Koenig M, Monaco AP, Kunkel LM. The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell*. 1988;53(2):219–28.
2. Toussaint M, Chatwin M, Soudon P. Review Article: Mechanical ventilation in Duchenne patients with chronic respiratory insufficiency: clinical implications of 20 years published experience. *Chron Respir Dis*. 2007 Aug 24;4(3):167–77.
3. Mueller CR, Emery A.E.H., Muntoni F. (eds): Duchenne muscular dystrophy. *Hum Genet*. 2004 Nov 25;115(6):529–529.
4. Allamand V. Animal models for muscular dystrophy: valuable tools for the development of therapies. *Hum Mol Genet*. 2000 Oct 1;9(16):2459–67.
5. Voisin V, de la Porte S. Therapeutic Strategies for Duchenne and Becker Dystrophies. In 2004. p. 1–30.
6. Cossu G, Sampaolesi M. New therapies for Duchenne muscular dystrophy: challenges, prospects and clinical trials. *Trends Mol Med*. 2007 Dec;13(12):520–6.
7. Falzarano M, Scotton C, Passarelli C, Ferlini A. Duchenne Muscular Dystrophy: From Diagnosis to Therapy. *Molecules*. 2015 Oct 7;20(10):18168–84.
8. Anderson NL, Anderson NG. Proteome and proteomics: New technologies, new concepts, and new words. *Electrophoresis*. 1998 Aug;19(11):1853–61.
9. Emery AE. Duchenne Muscular Dystrophy. Oxford Medical Publication. 1993;24.
10. Cullen MJ, Jaros E. Ultrastructure of the skeletal muscle in the X chromosome-linked dystrophic (mdx) mouse. *Acta Neuropathol*. 1988;77(1):69–81.
11. Hoffman EP, Brown RH, Kunkel LM. Dystrophin: The protein product of the duchenne muscular dystrophy locus. *Cell*. 1987 Dec;51(6):919–28.
12. Monaco AP, Neve RL, Colletti-Feener C, Bertelson CJ, Kurnit DM, Kunkel LM. Isolation of candidate cDNAs for portions of the Duchenne muscular dystrophy gene. *Nature* [Internet]. 1986 [cited 2022 May 4];323(6089):646–50. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3773991/>
13. Koenig M, Hoffman EP, Bertelson CJ, Monaco AP, Feener C, Kunkel LM. Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell* [Internet]. 1987 Jul 31 [cited 2022 May 13];50(3):509–17. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3607877/>
14. Ahn AH, Kunkel LM. The structural and functional diversity of dystrophin. *Nat Genet* [Internet]. 1993 [cited 2022 May 13];3(4):283–91. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7981747/>
15. Ervasti JM. Dystrophin, its interactions with other proteins, and implications for muscular dystrophy. *Biochim Biophys Acta* [Internet]. 2007 Feb [cited 2022 May 11];1772(2):108–17. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16829057/>

16. Marshall JL, Crosbie-Watson RH. Sarcospan: a small protein with large potential for Duchenne muscular dystrophy. *Skelet Muscle* [Internet]. 2013 Jan 3 [cited 2022 May 13];3(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23282144/>
17. Crosbie RH, Lim LE, Moore SA, Hirano M, Hays AP, Maybaum SW, et al. Molecular and genetic characterization of sarcospan: insights into sarcoglycan-sarcospan interactions. *Hum Mol Genet* [Internet]. 2000 Aug 12 [cited 2022 May 13];9(13). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10942431/>
18. Liu LA, Engvall E. Sarcoglycan isoforms in skeletal muscle. *J Biol Chem* [Internet]. 1999 Dec 31 [cited 2022 May 13];274(53):38171–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10608889/>
19. Noguchi S, McNally EM, Othmane K ben, Hagiwara Y, Mizuno Y, Yoshida M, et al. Mutations in the dystrophin-associated protein gamma-sarcoglycan in chromosome 13 muscular dystrophy. *Science* [Internet]. 1995 [cited 2022 May 13];270(5237):819–22. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7481775/>
20. McNally EM, Duggan D, Gorospe JR, Bönnemann CG, Fanin M, Pegoraro E, et al. Mutations that disrupt the carboxyl-terminus of gamma-sarcoglycan cause muscular dystrophy. *Hum Mol Genet* [Internet]. 1996 Nov [cited 2022 May 13];5(11):1841–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8923014/>
21. Mild and severe muscular dystrophy caused by a single gamma-sarcoglycan mutation - PubMed [Internet]. [cited 2022 May 13]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8900232/>
22. Coral-Vazquez R, Cohn RD, Moore SA, Hill JA, Weiss RM, Davisson RL, et al. Disruption of the sarcoglycan-sarcospan complex in vascular smooth muscle: a novel mechanism for cardiomyopathy and muscular dystrophy. *Cell* [Internet]. 1999 Aug 20 [cited 2022 May 13];98(4):465–74. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10481911/>
23. Yucel N, Chang AC, Day JW, Rosenthal N, Blau HM. Humanizing the mdx mouse model of DMD: the long and the short of it. Vol. 3, *npj Regenerative Medicine*. Nature Publishing Group; 2018.
24. Li D, Bareja A, Judge L, Yue Y, Lai Y, Fairclough R, et al. Sarcolemmal nNOS anchoring reveals a qualitative difference between dystrophin and utrophin. *J Cell Sci* [Internet]. 2010 Jun 15 [cited 2022 May 13];123(Pt 12):2008–13. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20483958/>
25. Blake DJ, Weir A, Newey SE, Davies KE. Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. *Physiol Rev* [Internet]. 2002 [cited 2022 May 13];82(2):291–329. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11917091/>
26. Dystrophin-related protein, utrophin, in normal and dystrophic human fetal skeletal muscle - PubMed [Internet]. [cited 2022 May 13]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8407365/>
27. Utrophin upregulation in Duchenne muscular dystrophy - PubMed [Internet]. [cited 2022 May 13]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16629055/>

28. Helliwell TR, Nguyen thi M, Morris GE, Davies KE. The dystrophin-related protein, utrophin, is expressed on the sarcolemma of regenerating human skeletal muscle fibres in dystrophies and inflammatory myopathies. *Neuromuscul Disord* [Internet]. 1992 [cited 2022 Aug 18];2(3):177–84. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1483043/>
29. Janghra N, Morgan JE, Sewry CA, Wilson FX, Davies KE, Muntoni F, et al. Correlation of Utrophin Levels with the Dystrophin Protein Complex and Muscle Fibre Regeneration in Duchenne and Becker Muscular Dystrophy Muscle Biopsies. *PLoS One* [Internet]. 2016 Mar 1 [cited 2022 Aug 18];11(3). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26974331/>
30. Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* [Internet]. 2002 Sep 20 [cited 2022 May 13];110(6):673–87. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12297042/>
31. Gullberg D, Velling T, Lohikangas L, Tiger CF. Integrins during muscle development and in muscular dystrophies. *Front Biosci* [Internet]. 1998 [cited 2022 May 13];3. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9778539/>
32. McDonald KA, Horwitz AF, Knudsen KA. Adhesion molecules and skeletal myogenesis. *Semin Dev Biol*. 1995 Apr 1;6(2):105–16.
33. Lapidos KA, Kakkar R, McNally EM. The dystrophin glycoprotein complex: signaling strength and integrity for the sarcolemma. *Circ Res* [Internet]. 2004 Apr 30 [cited 2022 May 13];94(8):1023–31. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15117830/>
34. Hodges BL, Hayashi YK, Nonaka I, Wang W, Arahata K, Kaufman SJ. Altered expression of the alpha7beta1 integrin in human and murine muscular dystrophies. *J Cell Sci* [Internet]. 1997 Nov 15 [cited 2022 May 13];110 (Pt 22)(22):2873–81. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9427295/>
35. McGreevy JW, Hakim CH, McIntosh MA, Duan D. Animal models of Duchenne muscular dystrophy: From basic mechanisms to gene therapy. Vol. 8, *DMM Disease Models and Mechanisms*. Company of Biologists Ltd; 2015. p. 195–213.
36. Basumatary LJ, Das M, Goswami M, Kayal AK. Deletion pattern in the dystrophin gene in Duchenne muscular dystrophy patients in northeast India. *J Neurosci Rural Pract* [Internet]. 2013 Apr [cited 2022 May 4];4(2):227–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23914114/>
37. Ferlini A, Neri M, Gualandi F. The medical genetics of dystrophinopathies: molecular genetic diagnosis and its impact on clinical practice. *Neuromuscul Disord* [Internet]. 2013 Jan [cited 2022 May 4];23(1):4–14. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23116935/>
38. Aartsma-Rus A, Ginjaar IB, Bushby K. The importance of genetic diagnosis for Duchenne muscular dystrophy. *J Med Genet* [Internet]. 2016 [cited 2022 May 4];53(3):145–51. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26754139/>
39. Aartsma-Rus A, van Deutekom JCT, Fokkema IF, van Ommen GJB, den Dunnen JT. Entries in the Leiden Duchenne muscular dystrophy mutation database: an overview of mutation types

- and paradoxical cases that confirm the reading-frame rule. *Muscle Nerve* [Internet]. 2006 Aug [cited 2022 May 4];34(2):135–44. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16770791/>
40. Bladen CL, Salgado D, Monges S, Foncuberta ME, Kekou K, Kosma K, et al. The TREAT-NMD DMD Global Database: analysis of more than 7,000 Duchenne muscular dystrophy mutations. *Hum Mutat* [Internet]. 2015 Apr 1 [cited 2022 May 4];36(4):395–402. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25604253/>
 41. Vulin A, Wein N, Strandjord DM, Johnson EK, Findlay AR, Maiti B, et al. The ZZ domain of dystrophin in DMD: making sense of missense mutations. *Hum Mutat* [Internet]. 2014 Feb [cited 2022 May 4];35(2):257–64. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24302611/>
 42. Trippe H, Wieczorek S, Kötting J, Kress W, Schara U. Xp21/A translocation: a rarely considered genetic cause for manifesting carriers of duchenne muscular dystrophy. *Neuropediatrics* [Internet]. 2014 Oct 1 [cited 2022 May 4];45(5):333–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25046452/>
 43. Ray PN, Belfall B, Duff C, Logan C, Kean V, Thompson MW, et al. Cloning of the breakpoint of an X;21 translocation associated with Duchenne muscular dystrophy. *Nature* [Internet]. 1985 [cited 2022 May 4];318(6047):672–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3001530/>
 44. Dau PC, Tomkins JK, Robinson L, Toyka K v., Besinger UA. The molecular defect in Duchenne muscular dystrophy. *Muscle Nerve* [Internet]. 1980 [cited 2022 May 4];3(6):529–31. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7453717/>
 45. Muntoni F, Torelli S, Ferlini A. Dystrophin and mutations: one gene, several proteins, multiple phenotypes. *Lancet Neurol* [Internet]. 2003 Dec 1 [cited 2022 May 4];2(12):731–40. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14636778/>
 46. Ohlendieck K, Matsumura K, Ionasescu V v., Towbin JA, Bosch EP, Weinstein SL, et al. Duchenne muscular dystrophy: deficiency of dystrophin-associated proteins in the sarcolemma. *Neurology* [Internet]. 1993 [cited 2022 May 4];43(4):795–800. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8469343/>
 47. Wells KE, Torelli S, Lu Q, Brown SC, Partridge T, Muntoni F, et al. Relocalization of neuronal nitric oxide synthase (nNOS) as a marker for complete restoration of the dystrophin associated protein complex in skeletal muscle. *Neuromuscul Disord* [Internet]. 2003 Jan [cited 2022 May 4];13(1):21–31. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12467729/>
 48. Adams ME, Tesch Y, Percival JM, Albrecht DE, Conhaim JI, Anderson K, et al. Differential targeting of nNOS and AQP4 to dystrophin-deficient sarcolemma by membrane-directed alpha-dystrobrevin. *J Cell Sci* [Internet]. 2008 Jan 1 [cited 2022 May 4];121(Pt 1):48–54. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18057022/>
 49. Wakayama Y, Inoue M, Kojima H, Murahashi M, Shibuya S, Oniki H. Localization of sarcoglycan, neuronal nitric oxide synthase, beta-dystroglycan, and dystrophin molecules in normal skeletal myofiber: triple immunogold labeling electron microscopy. *Microsc Res Tech*

- [Internet]. 2001 Nov 1 [cited 2022 May 4];55(3):154–63. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11747090/>
50. Emery AEH. Population frequencies of inherited neuromuscular diseases--a world survey. *Neuromuscul Disord* [Internet]. 1991 [cited 2022 May 4];1(1):19–29. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1822774/>
 51. Poysky J. Behavior patterns in Duchenne muscular dystrophy: report on the Parent Project Muscular Dystrophy behavior workshop 8-9 of December 2006, Philadelphia, USA. *Neuromuscul Disord* [Internet]. 2007 Dec [cited 2022 May 4];17(11–12):986–94. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17720499/>
 52. Bushby KMD, Hill A, Steele JG. Failure of early diagnosis in symptomatic Duchenne muscular dystrophy. *Lancet* [Internet]. 1999 Feb 13 [cited 2022 May 4];353(9152):557–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10028989/>
 53. Bushby K, Finkel R, Birnkrant DJ, Case LE, Clemens PR, Cripe L, et al. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and pharmacological and psychosocial management. *Lancet Neurol* [Internet]. 2010 Jan [cited 2022 May 4];9(1):77–93. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19945913/>
 54. Abbs S, Tuffery-Giraud S, Bakker E, Ferlini A, Sejersen T, Mueller CR. Best practice guidelines on molecular diagnostics in Duchenne/Becker muscular dystrophies. *Neuromuscul Disord* [Internet]. 2010 [cited 2022 May 4];20(6):422–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20466545/>
 55. Lalic T, Vossen RHAM, Coffa J, Schouten JP, Guc-Scekic M, Radivojevic D, et al. Deletion and duplication screening in the DMD gene using MLPA. *Eur J Hum Genet* [Internet]. 2005 [cited 2022 May 4];13(11):1231–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16030524/>
 56. Okizuka Y, Takeshima Y, Awano H, Zhang Z, Yagi M, Matsuo M. Small mutations detected by multiplex ligation-dependent probe amplification of the dystrophin gene. *Genet Test Mol Biomarkers* [Internet]. 2009 [cited 2022 May 4];13(3):427–31. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19473085/>
 57. JS C, JR C, RG F, PA W, CT C, LS D, et al. Diagnosis of Duchenne and Becker muscular dystrophies by polymerase chain reaction. A multicenter study. *JAMA* [Internet]. 1992 May 20 [cited 2022 May 4];267(19):2609–15. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1573747/>
 58. Beggs AH, Koenig M, Boyce FM, Kunkel LM. Detection of 98% of DMD/BMD gene deletions by polymerase chain reaction. *Hum Genet* [Internet]. 1990 [cited 2022 May 4];86(1):45–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2253937/>
 59. Practice Guidelines for the Testing for Maternal Cell Contamination (MCC) in Prenatal Samples for Molecular Studies | Request PDF [Internet]. [cited 2022 May 4]. Available from: https://www.researchgate.net/publication/237755284_Practice_Guidelines_for_the_Testing_for_Maternal_Cell_Contamination_MCC_in_Prenatal_Samples_for_Molecular_Studies

60. Flanigan KM, Dunn DM, von Niederhausern A, Howard MT, Mendell J, Connolly A, et al. DMD Trp3X nonsense mutation associated with a founder effect in North American families with mild Becker muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* [Internet]. 2009 Nov [cited 2022 May 4];19(11):743–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19793655/>
61. Angelini C, Fanin M, Freda MP, Martinello F, Miorin M, Melacini P, et al. Prognostic factors in mild dystrophinopathies. *J Neurol Sci* [Internet]. 1996 [cited 2022 May 4];142(1–2):70–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8902723/>
62. Lanza G, Pino M, Fisicaro F, Vagli C, Cantone M, Pennisi M, et al. Motor activity and Becker’s muscular dystrophy: lights and shadows. *Phys Sportsmed* [Internet]. 2020 Apr 2 [cited 2022 May 4];48(2):151–60. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31646922/>
63. Markham LW, Kinnett K, Wong BL, Woodrow Benson D, Cripe LH. Corticosteroid treatment retards development of ventricular dysfunction in Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* [Internet]. 2008 May [cited 2022 May 4];18(5):365–70. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18436445/>
64. King WM, Ruttencutter R, Nagaraja HN, Matkovic V, Landoll J, Hoyle C, et al. Orthopedic outcomes of long-term daily corticosteroid treatment in Duchenne muscular dystrophy. *Neurology* [Internet]. 2007 [cited 2022 May 4];68(19):1607–13. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17485648/>
65. Biggar WD, Politano L, Harris VA, Passamano L, Vajsar J, Alman B, et al. Deflazacort in Duchenne muscular dystrophy: a comparison of two different protocols. *Neuromuscul Disord* [Internet]. 2004 [cited 2022 May 4];14(8–9):476–82. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15336688/>
66. Mesa LE, Dubrovsky AL, Corderi J, Marco P, Flores D. Steroids in Duchenne muscular dystrophy--deflazacort trial. *Neuromuscul Disord* [Internet]. 1991 [cited 2022 May 4];1(4):261–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1822804/>
67. Nereo NE, Fee RJ, Hinton VJ. Parental stress in mothers of boys with duchenne muscular dystrophy. *J Pediatr Psychol* [Internet]. 2003 Oct [cited 2022 May 4];28(7):473–84. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12968039/>
68. Diagnosis of Duchenne muscular dystrophy: parents’ experiences and satisfaction - PubMed [Internet]. [cited 2022 May 4]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8820016/>
69. Cyrulnik SE, Fee RJ, Batchelder A, Kiefel J, Goldstein E, Hinton VJ. Cognitive and adaptive deficits in young children with Duchenne muscular dystrophy (DMD). *J Int Neuropsychol Soc* [Internet]. 2008 [cited 2022 May 4];14(5):853–61. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18764980/>
70. Evidence-based psychotherapies for children and adolescents. - PsycNET [Internet]. [cited 2022 May 4]. Available from: <https://psycnet.apa.org/record/2003-88002-000>
71. Cyrulnik SE, Fee RJ, de Vivo DC, Goldstein E, Hinton VJ. Delayed developmental language milestones in children with Duchenne’s muscular dystrophy. *J Pediatr* [Internet]. 2007 May [cited 2022 May 4];150(5):474–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17452219/>

72. Hinton VJ, de Vivo DC, Nereo NE, Goldstein E, Stern Y. Selective deficits in verbal working memory associated with a known genetic etiology: the neuropsychological profile of duchenne muscular dystrophy. *J Int Neuropsychol Soc* [Internet]. 2001 [cited 2022 May 4];7(1):45–54. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11253841/>
73. Hendriksen JGM, Poysky JT, Schrans DGM, Schouten EGW, Aldenkamp AP, Vles JSH. Psychosocial adjustment in males with Duchenne muscular dystrophy: psychometric properties and clinical utility of a parent-report questionnaire. *J Pediatr Psychol* [Internet]. 2009 Sep [cited 2022 May 4];34(1):69–78. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18650207/>
74. Ramos J, Chamberlain JS. Gene therapy for Duchenne muscular dystrophy. *Expert Opin Orphan Drugs*. 2015 Nov 2;3(11):1255–66.
75. Mackenzie SJ, Nicolau S, Connolly AM, Mendell JR. Therapeutic Approaches for Duchenne Muscular Dystrophy: Old and New. Vol. 37, *Seminars in Pediatric Neurology*. W.B. Saunders; 2021.
76. Amoasii L, Hildyard JCW, Li H, Sanchez-Ortiz E, Mireault A, Caballero D, et al. Gene editing restores dystrophin expression in a canine model of Duchenne muscular dystrophy. *Science* [Internet]. 2018 Oct 5 [cited 2022 May 4];362(6410):86–91. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30166439/>
77. Gregorevic P, Blankinship MJ, Allen JM, Crawford RW, Meuse L, Miller DG, et al. Systemic delivery of genes to striated muscles using adeno-associated viral vectors. *Nat Med* [Internet]. 2004 Aug [cited 2022 May 4];10(8):828–34. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15273747/>
78. Braun S. Muscular gene transfer using nonviral vectors. *Curr Gene Ther* [Internet]. 2008 Oct 15 [cited 2022 May 4];8(5):391–405. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18855634/>
79. Li S, Kimura E, Fall BM, Reyes M, Angello JC, Welikson R, et al. Stable transduction of myogenic cells with lentiviral vectors expressing a minidystrophin. *Gene Ther* [Internet]. 2005 Jul [cited 2022 May 4];12(14):1099–108. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15759015/>
80. Duan D. Myodys, a full-length dystrophin plasmid vector for Duchenne and Becker muscular dystrophy gene therapy. *Curr Opin Mol Ther*. 2008 Feb;10(1):86–94.
81. Zhang G, Wooddell CI, Hegge JO, Griffin JB, Huss T, Braun S, et al. Functional Efficacy of Dystrophin Expression from Plasmids Delivered to *mdx* Mice by Hydrodynamic Limb Vein Injection. *Hum Gene Ther*. 2010 Feb;21(2):221–37.
82. Romero NB, Braun S, Benveniste O, Leturcq F, Hogrel JY, Morris GE, et al. Phase I Study of Dystrophin Plasmid-Based Gene Therapy in Duchenne/Becker Muscular Dystrophy. Vol. 15, *HUMAN GENE THERAPY*. 2004.
83. Hagstrom JE, Hegge J, Zhang G, Noble M, Budker V, Lewis DL, et al. A facile nonviral method for delivering genes and siRNAs to skeletal muscle of mammalian limbs. *Molecular Therapy*. 2004 Aug;10(2):386–98.

84. Danko I, Williams P, Herweijer H, Zhang G, Latendresse US, Bock I, et al. High expression of naked plasmid DNA in muscles of young rodents. *Hum Mol Genet* [Internet]. 1997 Sep [cited 2022 May 4];6(9):1435–43. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9285779/>
85. Danko I, Fritz JD, Latendresse JS, Herweijer H, Schultz E, Wolff JA. Dystrophin expression improves myofiber survival in mdx muscle following intramuscular plasmid DNA injection. *Hum Mol Genet* [Internet]. 1993 Dec [cited 2022 May 4];2(12):2055–61. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8111373/>
86. Zhang G, Ludtke JJ, Thioudellet C, Kleinpeter P, Antoniou M, Herweijer H, et al. Intraarterial delivery of naked plasmid DNA expressing full-length mouse dystrophin in the mdx mouse model of duchenne muscular dystrophy. *Hum Gene Ther* [Internet]. 2004 Aug [cited 2022 May 4];15(8):770–82. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15319034/>
87. Kimura E, Li S, Gregorevic P, Fall BM, Chamberlain JS. Dystrophin delivery to muscles of mdx mice using lentiviral vectors leads to myogenic progenitor targeting and stable gene expression. *Molecular Therapy*. 2010 Jan;18(1):206–13.
88. Gregorevic P, Blankinship MJ, Allen JM, Chamberlain JS. Systemic microdystrophin gene delivery improves skeletal muscle structure and function in old dystrophic mdx mice. *Mol Ther* [Internet]. 2008 [cited 2022 May 4];16(4):657–64. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18334986/>
89. Gregorevic P, Allen JM, Minami E, Blankinship MJ, Haraguchi M, Meuse L, et al. rAAV6-microdystrophin preserves muscle function and extends lifespan in severely dystrophic mice. *Nat Med* [Internet]. 2006 Jul [cited 2022 May 4];12(7):787–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16819550/>
90. Mayer Y, Czosnek H, Zeelon PE, Yaffe D, Nudel U. Expression of the genes coding for the skeletal muscle and cardiac actins in the heart. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 1984 Jan 25 [cited 2022 May 12];12(2):1087–100. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6546444/>
91. Schwartz K, de La Bastie D, Bouveret P, Oliviero P, Alonso S, Buckingham M. Alpha-skeletal muscle actin mRNA's accumulate in hypertrophied adult rat hearts. *Circ Res* [Internet]. 1986 [cited 2022 May 12];59(5):551–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2948733/>
92. P G, P P, H B, L K. alpha-skeletal and alpha-cardiac actin genes are coexpressed in adult human skeletal muscle and heart. *Mol Cell Biol* [Internet]. 1983 Nov [cited 2022 May 12];3(11):1985–95. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6689196/>
93. Ordahl CP. The skeletal and cardiac alpha-actin genes are coexpressed in early embryonic striated muscle. *Dev Biol* [Internet]. 1986 [cited 2022 May 12];117(2):488–92. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3758481/>
94. Mohun TJ, Brennan S, Dathan N, Fairman S, Gurdon JB. Cell type-specific activation of actin genes in the early amphibian embryo. *Nature* [Internet]. 1984 [cited 2022 May 12];311(5988):716–21. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6548550/>
95. Vandekerckhove J, Weber K. Chordate muscle actins differ distinctly from invertebrate muscle actins. The evolution of the different vertebrate muscle actins. *J Mol Biol* [Internet]. 1984 Nov

- 5 [cited 2022 May 12];179(3):391–413. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6512857/>
96. Stutz F, Spohr G. Isolation and characterization of sarcomeric actin genes expressed in *Xenopus laevis* embryos. *J Mol Biol* [Internet]. 1986 Feb 5 [cited 2022 May 12];187(3):349–61. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3009830/>
 97. Stutz F, Spohr G. A processed gene coding for a sarcomeric actin in *Xenopus laevis* and *Xenopus tropicalis*. *EMBO J*. 1987;6(7):1989–95.
 98. Modulation of actin isoform expression in alveolar myofibroblasts (contractile interstitial cells) during pulmonary hypertension - PubMed [Internet]. [cited 2022 May 12]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2183626/>
 99. Ruzicka DL, Schwartz RJ. Sequential activation of alpha-actin genes during avian cardiogenesis: vascular smooth muscle alpha-actin gene transcripts mark the onset of cardiomyocyte differentiation. *J Cell Biol* [Internet]. 1988 [cited 2022 May 12];107(6 Pt 2):2575–86. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3204121/>
 100. Garner I, Minty AJ, Alonso S, Barton PJ, Buckingham ME. A 5' duplication of the alpha-cardiac actin gene in BALB/c mice is associated with abnormal levels of alpha-cardiac and alpha-skeletal actin mRNAs in adult cardiac tissue. *EMBO J* [Internet]. 1986 [cited 2022 May 12];5(10):2559–67. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3023046/>
 101. Crawford GE, Faulkner JA, Crosbie RH, Campbell KP, Froehner SC, Chamberlain JS. Assembly of the dystrophin-associated protein complex does not require the dystrophin COOH-terminal domain. *J Cell Biol* [Internet]. 2000 Sep 18 [cited 2022 May 4];150(6):1399–409. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10995444/>
 102. Harper SQ, Hauser MA, DelloRusso C, Duan D, Crawford RW, Phelps SF, et al. Modular flexibility of dystrophin: implications for gene therapy of Duchenne muscular dystrophy. *Nat Med* [Internet]. 2002 [cited 2022 May 4];8(3):253–61. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11875496/>
 103. Bulfield G, Siller WG, Wight PAL, Moore KJ. X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1984 [cited 2022 May 11];81(4):1189–92. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6583703/>
 104. Chamberlain JS, Metzger J, Reyes M, Townsend D, Faulkner JA. Dystrophin-deficient mdx mice display a reduced life span and are susceptible to spontaneous rhabdomyosarcoma. *FASEB J* [Internet]. 2007 Jul [cited 2022 May 11];21(9):2195–204. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17360850/>
 105. Li D, Long C, Yue Y, Duan D. Sub-physiological sarcoglycan expression contributes to compensatory muscle protection in mdx mice. *Hum Mol Genet* [Internet]. 2009 [cited 2022 May 11];18(7):1209–20. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19131360/>
 106. Bulfield G, Siller WG, Wight PAL, Moore KJ. X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1984 [cited 2022 Aug 31];81(4):1189–92. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6583703/>

107. Bulfield G, Moore EA, Kacser H. Genetic variation in activity of the enzymes of glycolysis and gluconeogenesis between inbred strains of mice. *Genetics* [Internet]. 1978 [cited 2022 Aug 31];89(3):551–61. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/669257/>
108. Sicinski P, Geng Y, Ryder-Cook AS, Barnard EA, Darlison MG, Barnard PJ. The molecular basis of muscular dystrophy in the mdx mouse: a point mutation. *Science* [Internet]. 1989 [cited 2022 Aug 31];244(4912):1578–80. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2662404/>
109. Ryder-Cook AS, Sicinski P, Thomas K, Davies KE, Worton RG, Barnard EA, et al. Localization of the mdx mutation within the mouse dystrophin gene. *EMBO J* [Internet]. 1988 [cited 2022 Aug 31];7(10):3017–21. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2903046/>
110. Stedman HH, Sweeney HL, Shrager JB, Maguire HC, Panettieri RA, Petrof B, et al. The mdx mouse diaphragm reproduces the degenerative changes of Duchenne muscular dystrophy. *Nature* [Internet]. 1991 [cited 2022 Aug 31];352(6335):536–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1865908/>
111. Dangain J, Vrbova G. Muscle development in mdx mutant mice. *Muscle Nerve* [Internet]. 1984 [cited 2022 Aug 31];7(9):700–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6543918/>
112. Araki E, Nakamura K, Nakao K, Kameya S, Kobayashi O, Nonaka I, et al. Targeted disruption of exon 52 in the mouse dystrophin gene induced muscle degeneration similar to that observed in Duchenne muscular dystrophy. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 1997 Sep 18 [cited 2022 Aug 31];238(2):492–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9299538/>
113. Gregorevic P, Blankinship MJ, Allen JM, Crawford RW, Meuse L, Miller DG, et al. Systemic delivery of genes to striated muscles using adeno-associated viral vectors. *Nat Med* [Internet]. 2004 Aug [cited 2022 May 11];10(8):828–34. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15273747/>
114. Gregorevic P, Allen JM, Minami E, Blankinship MJ, Haraguchi M, Meuse L, et al. rAAV6-microdystrophin preserves muscle function and extends lifespan in severely dystrophic mice. *Nat Med* [Internet]. 2006 Jul [cited 2022 May 11];12(7):787–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16819550/>
115. Lai Y, Thomas GD, Yue Y, Yang HT, Li D, Long C, et al. Dystrophins carrying spectrin-like repeats 16 and 17 anchor nNOS to the sarcolemma and enhance exercise performance in a mouse model of muscular dystrophy. *J Clin Invest* [Internet]. 2009 Mar 2 [cited 2022 May 11];119(3):624–35. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19229108/>
116. Danko I, Chapman V, Wolff JA. The frequency of revertants in mdx mouse genetic models for Duchenne muscular dystrophy. *Pediatr Res* [Internet]. 1992 [cited 2022 May 4];32(1):128–31. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1635838/>
117. Coulton CJ, Dunkle RE, Chow JC, Haug M, Vielhaber DP. Dimensions of post-hospital care decision-making: a factor analytic study. *Gerontologist* [Internet]. 1988 [cited 2022 May 4];28(2):218–23. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2834271/>
118. Hodgetts S, Radley H, Davies M, Grounds MD. Reduced necrosis of dystrophic muscle by depletion of host neutrophils, or blocking TNFalpha function with Etanercept in mdx mice.

- Neuromuscul Disord [Internet]. 2006 Oct [cited 2022 May 4];16(9–10):591–602. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16935507/>
119. Lefaucheur JP, Pastoret C, Sebille A. Phenotype of Dystrophinopathy in Old MDX Mice. 1995.
 120. Kimura E, Han JJ, Li S, Fall B, Ra J, Haraguchi M, et al. Cell-lineage regulated myogenesis for dystrophin replacement: a novel therapeutic approach for treatment of muscular dystrophy. Hum Mol Genet [Internet]. 2008 Aug [cited 2022 May 11];17(16):2507–17. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18511457/>
 121. Stewart SA, Dykxhoorn DM, Palliser D, Mizuno H, Yu EY, An DS, et al. Lentivirus-delivered stable gene silencing by RNAi in primary cells. RNA [Internet]. 2003 Apr 1 [cited 2022 Aug 14];9(4):493–501. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12649500/>
 122. Zhao Y, Stepto H, Schneider CK. Development of the First World Health Organization Lentiviral Vector Standard: Toward the Production Control and Standardization of Lentivirus-Based Gene Therapy Products. Hum Gene Ther Methods [Internet]. 2017 Aug 1 [cited 2022 Jul 5];28(4):205–14. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28747142/>
 123. Cornetta K, Yao J, Jasti A, Koop S, Douglas M, Hsu D, et al. Replication-competent lentivirus analysis of clinical grade vector products. Mol Ther [Internet]. 2011 [cited 2022 Jul 5];19(3):557–66. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21179010/>
 124. Taştan C, Kançağı DD, Turan RD, Yurtsever B, Çakırsoy D, Abanuz S, et al. Preclinical assessment of efficacy and safety analysis of car-t cells (Isikok-19) targeting cd19-expressing b-cells for the first turkish academic clinical trial with relapsed/refractory all and nhl patients. Turkish Journal of Hematology. 2020;37(4):234–47.
 125. Agudo J, Ruza A, Kitur K, Sachidanandam R, Blander JM, Brown BD. A TLR and Non-TLR mediated innate response to lentiviruses restricts hepatocyte entry and can be ameliorated by pharmacological blockade. Molecular Therapy. 2012;20(12):2257–67.
 126. Aartsma-Rus A, van Putten M. Assessing functional performance in the mdx mouse model. J Vis Exp [Internet]. 2014 Mar 27 [cited 2022 May 4];(85). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24747372/>
 127. Kawano R, Ishizaki M, Maeda Y, Uchida Y, Kimura E, Uchino M. Transduction of full-length dystrophin to multiple skeletal muscles improves motor performance and life span in utrophin/dystrophin double knockout mice. Molecular Therapy. 2008;16(5):825–31.
 128. Gibbs EM, Crosbie-Watson RH. A simple and low-cost assay for measuring ambulation in mouse models of muscular dystrophy. Journal of Visualized Experiments. 2017 Dec 10;2017(130).
 129. Foster H, Sharp PS, Athanasopoulos T, Trollet C, Graham IR, Foster K, et al. Codon and mRNA sequence optimization of microdystrophin transgenes improves expression and physiological outcome in dystrophic mdx mice following AAV2/8 gene transfer. Molecular Therapy. 2008;16(11):1825–32.
 130. Shavlakadze T, White J, Hoh JFY, Rosenthal N, Grounds MD. Targeted expression of insulin-like growth factor-I reduces early myofiber necrosis in dystrophic mdx mice. Mol Ther

- [Internet]. 2004 Nov [cited 2022 Jul 2];10(5):829–43. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15509501/>
131. Grounds MD, Radley HG, Lynch GS, Nagaraju K, de Luca A. Towards developing standard operating procedures for pre-clinical testing in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Neurobiol Dis* [Internet]. 2008 Jul [cited 2022 Jul 2];31(1):1–19. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18499465/>
 132. Zatz M, Rapaport D, Vainzof M, Passos-Bueno MR, Bortolini ER, Pavanello R de CM, et al. Serum creatine-kinase (CK) and pyruvate-kinase (PK) activities in Duchenne (DMD) as compared with Becker (BMD) muscular dystrophy. *J Neurol Sci* [Internet]. 1991 [cited 2022 Jul 2];102(2):190–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2072118/>
 133. Duan D. Micro-Dystrophin Gene Therapy Goes Systemic in Duchenne Muscular Dystrophy Patients. *Hum Gene Ther* [Internet]. 2018 Jul 1 [cited 2022 Jun 28];29(7):733–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29463117/>
 134. Dumont NA, Wang YX, von Maltzahn J, Pasut A, Bentzinger CF, Brun CE, et al. Dystrophin expression in muscle stem cells regulates their polarity and asymmetric division. *Nat Med* [Internet]. 2015 Dec 1 [cited 2022 Jun 23];21(12):1455–63. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26569381/>
 135. Counsell JR, Asgarian Z, Meng J, Ferrer V, Vink CA, Howe SJ, et al. Lentiviral vectors can be used for full-length dystrophin gene therapy. *Sci Rep* [Internet]. 2017 Mar 17 [cited 2022 Jun 23];7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28303972/>
 136. Gruntman AM, Bish LT, Mueller C, Sweeney HL, Flotte TR, Gao G. Gene transfer in skeletal and cardiac muscle using recombinant adeno-associated virus. *Curr Protoc Microbiol* [Internet]. 2013 [cited 2022 Jul 27];Chapter 14(SUPPL.28). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23408131/>
 137. Bostick B, Yue Y, Lai Y, Long C, Li D, Duan D. Adeno-associated virus serotype-9 microdystrophin gene therapy ameliorates electrocardiographic abnormalities in mdx mice. *Hum Gene Ther*. 2008 Aug 1;19(8):851–6.
 138. Capitanio D, Moriggi M, Torretta E, Barbacini P, de Palma S, Viganò A, et al. Comparative proteomic analyses of Duchenne muscular dystrophy and Becker muscular dystrophy muscles: changes contributing to preserve muscle function in Becker muscular dystrophy patients. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* [Internet]. 2020 Apr 1 [cited 2022 Aug 1];11(2):547–63. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31991054/>
 139. Rouillard AD, Gundersen GW, Fernandez NF, Wang Z, Monteiro CD, McDermott MG, et al. The harmonizome: a collection of processed datasets gathered to serve and mine knowledge about genes and proteins. *Database (Oxford)* [Internet]. 2016 [cited 2022 Aug 1];2016. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27374120/>
 140. Gargan S, Dowling P, Zweyer M, Reimann J, Henry M, Meleady P, et al. Mass Spectrometric Profiling of Extraocular Muscle and Proteomic Adaptations in the mdx-4cv Model of Duchenne

- Muscular Dystrophy. Life (Basel) [Internet]. 2021 Jul 1 [cited 2022 Aug 1];11(7). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34206383/>
141. Isaac C, Wright A, Usas A, Li H, Tang Y, Mu X, et al. Dystrophin and utrophin “double knockout” dystrophic mice exhibit a spectrum of degenerative musculoskeletal abnormalities. *J Orthop Res* [Internet]. 2013 Mar [cited 2022 Jun 28];31(3):343–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23097179/>
 142. Mendell JR, Al-Zaidy S, Shell R, Arnold WD, Rodino-Klapac LR, Prior TW, et al. Single-Dose Gene-Replacement Therapy for Spinal Muscular Atrophy. *N Engl J Med* [Internet]. 2017 Nov 2 [cited 2022 Jul 26];377(18):1713–22. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29091557/>
 143. Asher DR, Thapa K, Dharia SD, Khan N, Potter RA, Rodino-Klapac LR, et al. Clinical development on the frontier: gene therapy for duchenne muscular dystrophy. *Expert Opin Biol Ther*. 2020 Mar 3;20(3):263–74.
 144. Duan D. Duchenne Muscular Dystrophy Gene Therapy in the Canine Model. <https://home.liebertpub.com/humc> [Internet]. 2015 Jan 14 [cited 2022 May 11];26(1):57–69. Available from: <https://www.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/humc.2015.006>
 145. Duan D. Duchenne muscular dystrophy gene therapy: Lost in translation? *Res Rep Biol* [Internet]. 2011 Mar [cited 2022 May 11];2011(2):31. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21691429/>
 146. Chu X, Li J, Qiao C, Wang J, Wang Y, Jiang XC, et al. Long-term effect of human mini-dystrophin in transgenic mdx mice improves muscle physiological function. *FASEB J* [Internet]. 2021 Jun 1 [cited 2022 Jun 28];35(6). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33982338/>
 147. Wang JW, Song M, He YH, Gong HR. Stability, adsorption, and diffusion of hydrogen in Pd3Ag phases. *J Memb Sci*. 2016 Apr 1;503:124–31.
 148. Long C, Amoasii L, Mireault AA, McAnally JR, Li H, Sanchez-Ortiz E, et al. Postnatal genome editing partially restores dystrophin expression in a mouse model of muscular dystrophy. *Science* (1979) [Internet]. 2016 Jan 22 [cited 2022 Dec 25];351(6271):400–3. Available from: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.aad5725>
 149. Chicoine LG, Montgomery CL, Bremer WG, Shontz KM, Griffin DA, Heller KN, et al. Plasmapheresis eliminates the negative impact of AAV antibodies on microdystrophin gene expression following vascular delivery. *Mol Ther* [Internet]. 2014 [cited 2022 Jul 26];22(2):338–47. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24196577/>

8 EKLER

EK 1: Mezankimal Kök Hücre Donör Onam Formu



EK 1: Mezankimal Kök Hücre Donör Onam Formu (Devamı)



EK 2: ATADEK Etik Kurul Kararı



EK 2: ATADEK Etik Kurul Kararı (Devamı)



EK 2: ATADEK Etik Kurul Kararı (Devamı)



EK 3: ACU-HADYЕК Etik Kurul Kararı



EK 3: ACU-HADYЕК Etik Kurul Kararı (Devamı)



9 ÖZGEÇMİŞ

