

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

**SPİNAL MUSKÜLER ATROFİ'Lİ FARELERDE,
ADENO İLİŞKİLİ VİRÜS SEROTİPİ 9 VEKTÖRÜ
KULLANARAK PRENATAL GEN TEDAVİSİ**

Afrooz RASHNONEJAD

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Ferda ÖZKINAY

İkinci Danışmanı: Prof. Dr. Guangping GAO

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Sunuş Tarihi: 27.04.2017

Bornova- İZMİR

2017

Afroz RASHNONEJAD tarafından Doktora Tezi olarak sunulan "Spinal Musküler Atrofi'li Farelerde, Adeno İlişkili Virüs Serotipi 9 Vektörü Kullanarak Prenatal Gen Tedavisi" başlıklı bu çalışma EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 27.04.2017 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

Jüri Başkanı : Prof. Dr. Ferda ÖZKINAY

Raportör Üye : Prof. Dr. Cumhur GÜNDÜZ

Üye : Prof. Dr. Mehmet ÖZTÜRK

Üye : Prof. Dr. Neşe ATABEY

Üye : Doç. Dr. Hüseyin ONAY

İmza

.....
.....
.....
.....
.....



EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Doktora Tezi olarak sunduğum “Spinal Musküler Atrofi’li Farelerde, Adeno İlişkili Virüs Serotipi 9 Vektörü Kullanarak Prenatal Gen Tedavisi” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

27/04/2017

İmzası

Afrooz RASHNONEJAD



ÖZET
SPİNAL MUSKÜLER ATROFİ'Lİ FARELERDE, ADENO İLİŞKİLİ
VİRÜS SEROTİPİ 9 VEKTÖRÜ KULLANARAK PRENATAL GEN
TEDAVİSİ

RASHNONEJAD, Afrooz

Doktora Tezi, Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Ferda ÖZKINAY

İkinci Danışmanı: Prof. Dr. Guangping GAO

Nisan 2017, 107 sayfa

SMN gen ekspresyonunun intrauterin (IU) şeklinde düzeltilmesi SMA hastalığının tedavisinde kritik bir yaklaşım olabilir. Bu çalışmada, fare embriyolarına rAAV9-SMN vektörün intraserebroventriküler (ICV) enjeksiyonu ile hastalığın semptomlarının yok edilmesi araştırılmıştır. Gen tedavisi çalışması için, 4×10^{10} vgc ss ya da scAAV9-SMN vektörlerden ICV enjeksiyonu ile sırasıyla, 44 ve 39 adet SMA fetüsüne aktarılmıştır. Doğumdan sonra, Enjekte edilmiş embriyoların SMN protein ekspresyonu, sağ kalım süreleri ve hastalık semptomlarının iyileşmesi araştırılmıştır. IU şeklinde enjekte edilmiş SMA'lı fetüslerin canlı doğum oranı yaklaşık %43.85'dir ki total hayatta kalma oranından (%69.41) daha düşüktür. Ss ve scAAV9-SMN vektörlerinin prenatal aktarılması SMA'lı fetüslerinin yaşam sürelerini artırarak sırasıyla 63 ± 30 ve 105 ± 50 gün hayatta kalmalarını sağlamıştır. Her iki çalışma grubunda motor nöron sayısı ve kas patolojisinde iyileştirmeler saptanmıştır, ancak scAAV9-SMN vektörünün etkinliği ss-vektörden daha fazla belirlenmiştir. Sonuç olarak, rAAV9-SMN vektörlerin intrauterin ICV enjeksiyonu SMA hastalığının tedavisi için yeni bir terapötik yaklaşım sunabilir. Ancak, bu yöntemin anne ve embriyo için güvenilirliğini incelemesi konusunda fazla araştırma yapılmalıdır.

Anahtar Kelimeler: İntraserebroventriküler enjeksiyonu, intrauterin enjeksiyonu, SMA, gen tedavi, rAAV, fetüs



ABSTRACT**PRENATAL GENE THERAPY USING ADENO-ASSOCIATED VIRUS
SEROTYP-9 VECTORS IN SMA MICE**

RASHNONEJAD, Afrooz

PhD In Biotechnology

Supervisor: Prof. Dr. Ferda ÖZKINAY

Co-Supervisor: Prof. Dr. Guangping GAO

April 2017, 107 pages

Intrauterine (IU) correction of SMN gene expression seems can be critical in the treatment of SMA disease. In this study, using Intracerebroventricular (ICV) delivery of rAAV9-SMN into mice embryos correction of disease related symptoms was investigated. For gene therapy study, 44 and 39 SMA fetuses received 4×10^{10} vgc ss and scAAV9-SMN via ICV injection, respectively. The SMN protein expression, survival rate, and improving disease symptoms of injected mice was investigated after birth. The survival rate of IU injected SMA fetuses was around 43.85% that was lower than total survival rate (69.41%). Prenatally delivery of both ss and scAAV9-SMN vectors cause to increased lifespan of injected SMA fetuses, respectively, 63 ± 30 ve 105 ± 50 days. The muscle pathology and number of the motor neurons have been improved in both study groups, however, the efficiency of the scAAV9-SMN vector was determined more than ss-vector. Thus, intrauterine administration of rAAV9-SMN via ICV injection may provide a new therapeutic approach for treating SMA disease. However, further analysis should be done for investigating the safety of this method for mother and embryo.

Keywords: Intracerebroventricular injection, intrauterinely injection, SMA, gene therapy, rAAV, fetus

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarında bilgisini esirgemeyen danışmanım Prof. Dr. Ferda ÖZKINAY'a, ikinci danışmanın Prof. Dr. Guangping Gao'ya, Tez izleme komitesi Prof. Dr. Cumhuri Gündüz ve Doç. Dr. Hüseyin Onay'a, desteğini her zaman hissettiğim ve yanımda olan çok sevgili eşim gholamhossein AMINI CHERMAHINI'ye, canım anne ve babama, arkadaşlarıma, tezin araştırma projesi olarak desteklenmesini sağlayan EÜTF Bilimsel Araştırma Projeleri (Proje No: 14-TIP-083), Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'na, Biyoteknoloji Anabilim Dalı'na, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'na, ve Gao laboratuvarına teşekkürlerimi sunarım.



İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
TEŞEKKÜR	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xxviii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xxix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Spinal muskular atrofi (SMA) hastalığı	4
2.1.1. SMA hastalığının genetik mekanizması	6
2.1.2. SMN: multifonksiyonel bir protein	7
2.1.3. Neden Motor Nöronlar benzersiz bir şekilde SMN protein eksikliğine assasdı?	8
2.1.4. SMA hastalığında tedavi stratejileri	9
2.2. SMA'lı Fare Modeli	11
2.3. Prenatal Gen Tedavisi	11

İÇİNDEKİLER (devam)Sayfa

2.3.1. Bazı hastalıklar için Prenatal yöntemlerin avantajları	14
2.4. Adeno İlişkili Viral (AAV) Vektör	16
2.4.1. AAV Genom yapısı	17
2.4.2. AAV serotipleri ve varyantları	18
2.4.3. İnsanlarda AAV enfeksiyonu	19
2.4.4. AAV: iyi güvenlik profili ancak düşük insort kapasitesi	20
3. GEREÇ VE YÖNTEM	22
3.1. Etik onayı	22
3.2. Yenidoğan farelerinin genotiplendirilmesi	22
3.3. AAV vektörlerin üretilmesi	23
3.3.1. Gereken plazmidlerin klonlanması	24
3.3.2. Plazmidlerde klonlanmış SMN gen ekspresyonunun western blot yöntemi ile araştırılması	26
3.3.3. AAV9 viral vektörlerinin HEK293 hücrelerde paketlenmesi ve saflaştırılması	27
3.3.4. Elde edilen rAAV vektörlerinin kalitesi ve saflığının incelenmesi	30

İÇİNDEKİLER (devam)Sayfa

3.4. SMA fibroblast hücre hattının rAAV9-SMN vektörleri ile transfeksiyonu	31
3.5. Intrauterin (IU) enjeksiyon	31
3.6. eGFP ekspresyonunun canlı hayvan görüntüleme cihazı (IVIS) kullanılarak incelenmesi	32
3.7. Kardiyak perfüzyonu	33
3.8. Frozen doku kesitleri (cryosectioning)	33
3.9. Parrafin doku takip işlemi	34
3.10. Hematoksilen eozin boyaması	34
3.11. Doku kesitlerinin floresan mikroskopik analizi	35
3.12. Embriyonik dönemde scAAV9-eGFP enjeksiyonu yapılan fare beyinlerinden nöral kök hücre (NKH) izolasyonu	36
3.13. Real Time PCR analizi	37
3.14. Western Blot analizi	41
3.15. Enjeksiyon yapılmış farelerin hayat süresi ve vücut ağırlıklarının incelenmesi	42

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
3.16. Statistical Analysis	42
4. BULGULAR	44
4.1. Klonlanmış cis-plazmidler	44
4.2. Elde edilmiş rAAV9-SMN	49
4.3. Farelerin çoğalması ve genotiplendirilmesi	51
4.4. Pilot çalışmada intrauterin (IU) olarak aktarılmış rAAV9-SMN vektörlerinin dağılımını incelemek	53
4.4.1. IU enjekte edilmiş embryoların hayatta kalma oranı	53
4.4.2. IVIS sonuçları	53
4.4.3. Pilot çalışmanın floresan mikroskopi sonuçları	56
4.4.4. eGFP protein ekspresyonunu Western blot ve RT-PCR ile incelenmesi	63
4.4.5. Elde edilmiş ssAAV9-eGFP ve scAAV9-GFP vektörlerinin gen ekspresyonlarının in vitro koşullarda kontrolü	65
4.4.6. rAAV9-SMN vektörleri kullanılan prenatal gen tedavisinin sonuçları	66

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
5. TARTIŞMA	75
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	88
KAYNAKLAR DİZİNİ	89
ÖZGEÇMİŞ	105





ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.1. Plazmidlerin genetik ve restriksiyon haritaları. (a) pCMV6-XL5—SMN NotI ile, ve (b) pAAV-CB6-PI EcoRI ve KpnI ile kesilerek, (c) pAAVsc-CB6-PI-SMN plazmidini elde edilmiştir. (d) pCMV6-XL5-SMN Bgl II ile, (e) pAAVsc-CB6-PI AgeI ve SacI ile kesilerek, (f) pAAVsc-CB6-PI-SMN elde edilmiştir. Elde edilmiş cis-plazmidlerinin bütünlüğünü incelemek için kullanılan restriksiyon enzimleri c ve f görüntülerde gösterilmiştir	46
4.2. Elde edilmiş plazmidlerin bütünlüğünü restriksiyon enzimi kullanılarak kontrol edilmesi. a) pAAV-CB6-CI-SMN; 1) SmaI; 2883, 1601, 1172, 343, 11, 11 bp, 2) AvaI; 2883, 1601, 1127, 333, 45, 11, 11, 10 bp, 3) NcoI/ NaeI; 4351, 1670 bp, 4) SapI/ SphI; 4329, ve 1692 bp. b) pAAVsc-CB6-PI-SMN; 1) AleI/ NcoI; 4339, and 855 bp, 2) SmaI; 2883, 1352, 937, 11, ve 11 bp, ve 3) kesilmemiş plazmid. DNA markörü M ile gösterilmiştir (GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder, Thermo Scientific)	47
4.3. pAAV-CB6-PI-SMN DNA dizi analizi sonuçları. DNA dizi analizi sonuçları SMN cDNA'sının doğru bir şekilde plazmidde klonlandığını göstermektedir	48
4.4. Cis-plazmidler ile transfekte edilmiş HEK293 hücrelerinin western blot sonuçları. a) SMN ve β -Tubulin protein miktarları. b) Hem pAAVsc-CB6-PI-SMN hem de pAAV-CB6-PI-SMN plazmidleri ile transfekte edilmiş hücrelerde kontrol hücrelerine göre daha fazla miktarda SMN proteini görüldü. Ancak, pAAV-	

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil

Sayfa

CB6-PI-SMN plazmidi ile pAAVsc-CB6-PI-SMN'ye göre 2 kat daha fazla SMN ekspresyonu sağlandı. $P < 0.001$ 48

4.5. Elde edilmiş rAAV9 vektörlerinin SDS-PAGE gümüş boyaması sonuçları. A ve B görüntülerinde rAAV2-CMW-LacZ (1 x 1013) referans standardı olarak kullanılmıştır. A ve B görüntülerinde a, b, c, d, e sütunları sırasıyla rAAV2-CMW-LacZ'nin 0.5, 1, 2, 3, 4 µl'lik miktarlarını göstermektedir. Saflaştırılmış viral vektörlerden 2 µl SDS-PAGE jele yüklenmiştir. VP1, VP2 ve VP3 kapsid proteinleri gümüş boyaması ile boyanıp analiz edilmiştir50

4.6. İzole edilmiş viral vektörlerin elektron mikroskopik görüntüleri (skala çubuğu, 200 nm). ss ve scAAV9-SMN vektörleri negatif boyaması için uranyl asetat ile boyanıp TEM ile incelenmiştir. İki görüntüde de görüldüğü gibi çoğu viral partiküller doludur. Boş/dolu oranı ve boş partiküllerin yüzdesi şekilde gösterilmiştir. scAAV9-SMN partikülleri ssAAV9-SMN'den 12 kat daha iyi paketlenmiştir. Kısmi paketlenmiş ya da boş olan partiküller okla gösterilmiştir51

4.7. 12 adet yeni doğan farenin genotiplendirme sonuçları. Wild tip farelerde sadece 750 bp PCR ürünü görünür iken (1, 4, 6, 9, ve 10), homozigot mutant (hasta) farelerde sadece 500 bp PCR ürünü görülmüştür (2 ve 8). Heterozigot farelerde ise hem 750 hem de 500 bp PCR ürünleri görülmüştür (3, 5, 7, 11 ve

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
12)	52
4.8. Yeni doğan fare yavruları. a) 7 günlük (P7) SMA'lı ve wild tip fare yavruları. SMA'lı fare yavruları postnatal (P)1. günde hastalık semptomlarını göstermemektedirler. Ancak postnatal 4. günden (P4'den) sonra hastalık semptomları görünür bir şekilde ortaya çıkmaktadır. Şiddetli kas hipotonisi hayatın ilk haftasında ortaya çıkmaktadır ve bu yavrular P13-15'de ölmektedir. b) P14'de olan SMA'lı ve wild tip fareler. 3 adet SMA'lı yavruların tümü fotoğraf çekiminden 1 gün sonra ölmüşlerdir	52
4.9. Vajinal plak. a) çiftleştirilmemiş dişi fare. b) çiftleştirilmiş ve vajinal plak oluşturulmuş dişi fare. Vajinal plak ok ile gösterilmiştir	54
4.10. E14-15'de IU enjeksiyonu. a) IU-ICV şeklinde enjekte edilmiş embriyo. Fotoğrafta ok ile gösterildiği gibi eğer doğru olarak LV içinde enjeksiyon gerçekleştirilirse boya hemen hilal şeklinde görünür. b) IU-IP enjeksiyonu. Enjeksiyondan hemen sonra yeşil boya bütün plasentaya homojen yayılır	54
4.11. IVIS Sonuçları. a) P1 yavruların posterior görüntüsü IU-ICV yöntemi ile enjekte edilen yavru farelerin beyinlerinde en fazla eGFP proteinine bağlı floresans yoğunluğu görülmüştür. b) P1 yavruların anterior görüntüsü; IU-IP yöntemi ile enjekte edilen yavru farelerin iç organlarından en fazla karaciğerinde yüksek GFP ekspresyonu görülmektedir. c ve d) P14 yavruların	

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil

Sayfa

- sırasıyla posterior ve anterior görüntüleri; Hem ICV hem de IP yöntemleri ile enjekte edilen yavru farelerde., özellikle BAT yerleşim dokuları olarak bilinen interscapular (dorsal görüntü) ve inguinal (anterior görüntü) bölgelerde yüksek GFP ekspresyonu görülmektedir55
- 4.12. IU tekniği ile enjekte olmuş farelerin A) Beyin, ve B) omuriliğinde eGFP ekspresyonu. 4X objektifi. a) kontrol, b) IU-ICV ve c) IU-IP56
- 4.13. Şekil 4.13. Koroid pleksus bölgesindeki hücrelerin scAAV9-eGFP ile transfeksiyonu. a) IU-ICV enjeksiyonu, b) IU-IP enjeksiyonu, c) Kontrol. Prenatal dönemde scAAV9-eGP enjekte olmuş embryo farelerde hem ICV hem de IP enjeksiyonlarında koroid pleksus bölgedeki hücrelerin transfeksiyonu sağlanmıştır. Yeşil: eGFP, Mavi: DAPI. 20X objektifi57
- 4.14. IU-ICV ve IU-IP teknikleri kullanılarak enjekte olmuş farelerin Korteks ve omuriliğe ait IF görüntüleri. a) beyinlerin korteks kısmında eGFP pozitif hücreler, ve b) omuriliğin anterior kısmındaki eGFP pozitif hücreler. 20X objektifi. C) IU-ICV ve IU-IP teknikleri kullanılarak enjekte olmuş farelerin korteksinde scAAV9-eGFP ile transfekte olmuş hücrelerin yüzdesi. (P<0.001). OM; omurilik58
- 4.15. Prenatal dönemde scAAV9-eGFP ile enjekte olmuş farelerin omuriliğin anterior kısmında yer alan motor nöronlarının eGFP ekspresyonu. 20X objektifi59

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.16. IU-ICV ve IU-IP teknikleri kullanılarak enjekte olmuş farelerde DG bölgesindeki eGFP pozitif hücrelerin kıyaslamalı incelenmesi. A) IU-ICV ve B) IU-IP. eGFP pozitif hücrelerin sayısı ICV tekniği kullanılarak enjekte olmuş farelerin örneklerinde IP örneklerine göre çok daha fazladır. Yeşil; eGFP, Kırmızı; NeuN, Mavi; DAPI. 20X objektifi	59
4.17. SVZ bölgesindeki Nöral Kök Hücreler (NKH)'in scAAV9-eGFP ile transfeksiyonu. a) IU-ICV ve b) IU-IP enjeksiyonu. Prenatal dönemde scAAV9-eGFP enjekte olmuş embryo farelerde hem ICV hem de IP enjeksiyonlarında SVZ bölgedeki NKH'in transfeksiyonu sağlanmıştır. ICV yöntemi ile enjekte olan farelerin örneklerinde transfekte olmuş NKH'in sayısı daha fazladır. Yeşil: eGFP, Kırmızı: Nestin: Mavi: DAPI. 20X objektifi	60
4.18. IU tekniği kullanılarak scAAV9-eGFP ile enjekte edilmiş farelerin beyinlerinden izole edilmiş NKH'in 5. Pasajlarındaki görüntüsü. a) IU-ICV ve b) IU-IP tekniği kullanılarak enjekte olmuş fareler. c) kontrol. ICV yöntemi ile scAAV9-eGFP vektör enjekte edilmiş farelerde daha fazla sayıda NKH transfekte edilebilmiştir. 20X objektifi	61
4.19. İzole edilmiş NKH'lerin eGFP pozitiflik yüzdesi ve eGFP/Sox2 ekspresyonlarının qRT-PCR analiz sonuçları. a) ICV tekniği kullanılarak enjekte edilmiş farelerden izole edilmiş NKH'in %11.6'sı eGFP protein eksprese ederken, IP yöntemi ile enjekte olanlarda sadece %3.1 eGFP pozitif hücreler görülmüştür (P<0.003). b) Sox2 gen ekspresyonu NKH'lerde 1 olarak kabul	

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil

Sayfa

edilirse, ICV tekniği kullanılarak enjekte olanlarda eGFP protein ekspresyonu Sox2'ye göre yaklaşık 0.45 ve IP örneklerinde ise 0.125 kattır61

4.20. omuriliğin anterior kısmındaki glia ve astrositlerin scAAV9-eGFP vektör ile transfeksiyonu. a) IU-ICV, b) IU-IP, ve c) kontrol. Prenatal dönemde ICV yada IP tekniği kullanılarak enjekte olan bütün farelerde astrositlerin transfeksiyonu sağlanmıştır. IU-IP örneklerinde astrosit ve gliaların transfeksiyonu IU-ICV tekniğine göre daha fazladır. 20X objektifi62

4.21. Western blot ve RT-PCR sonuçları. a ve b) prenatal dönemde scAAV9-eGFP ile enjekte olmuş farelerin MSS'nin farklı bölgelerindeki eGFP ekspresyonunu göstermektedir. En çok eGFP miktarı ICV tekniği kullanılarak enjekte olmuş farelerin hipokampusunda (26 kat) ve omurilikte (17 kat) saptanmıştır. C ve d) İç organlar arasında en çok eGFP miktarı IP şeklinde enjekte olan farelerin karaciğer (19.76 kat) ve BAT (18 kat) dokularında saptanmıştır. $P < 0.0001$. E) RT-PCR sonuçlarına göre merkezi sinir sisteminin farklı bölgelerinde en çok eGFP protein miktarı, western blot sonuçlarındaki gibi, ICV tekniği kullanılarak enjekte olmuş farelerin Hipokampus (38.12 ve) ve omurilik (32.5 kat) dokularında, ve IP enjekte olmuş farelerin karaciğer (33.8 kat) ve BAT (32 kat) dokularında görülmüştür, ($P < 0.003$). SC: omurilik, Ctx: Korteks, Hip: Hipokampus, Thal: Talamus, Crb: serebellum, Li: Karaciğer, BAT: Kahverengi adipoz doku, Ki: Böbrek, Lg: akciğer, SM: iskelet Kası, Ht: Kalp64

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil

Sayfa

- 4.22. SMA'lı fibroblastların in vitro koşullarında rAAV9-SMN vektörleri ile transfeksiyon sonuçları. a) IF mikroskopi sonuçları. ssAAV9-SMN ile transfekte edilmiş hücrelerin çekirdeklerinde scAAV9-SMN ile transfekte edilmiş olanlara göre daha fazla Gem multiprotein yapıları görülmüştür. b) floresan mikroskopi sonuçları RT-PCR analizi ile doğrulanmıştır. RT-PCR sonuçlarına göre ssAAV9-SMN ile transfekte olmuş hücrelerde SMN ekspresyonu 3.25 kat artmış iken, scAAV9-SMN ile transfekte olan hücrelerde SMN ekspresyonu 2 kat artmıştır. $P < 0.0001$ 66
- 4.23. Prenatal dönemde ssAAV9-SMN ya da scAAV9-SMN vektörleri ile enjekte olmuş farelerin yaşam süreleri ve vücut ağırlığı sonuçları. a) normal wild tip fareler ortalama 405 gün hayatta kalır iken, SMA'lı fareler 13 ± 2 gün hayatta kalmaktadırlar. Prenatal dönemde ssAAV9-SMN ile enjekte olan SMA'lı fareler ortalama 63 ± 30 ve sc ile enjekte olmuş olanlar 150 ± 50 gün hayatta kalmışlardır. b) scAAV9-SMN ile enjekte olmuş farelerin vücut ağırlığı ssAAV9-SMN ile enjekte olanlara göre wild tip farelere daha yakındır. Ancak, her iki tedavi grubunun da vücut ağırlıkları sağlıklı wild tip farelerden daha düşüktür68
- 4.24. Omuriliğin servikal bölgesindeki motor nöronların P14'deki IF görüntüsü. a) SMA'lı farede motor nöronların sayısı azalmıştır ve morfolojileri değişmiştir. b) Wild tip fare.; c) ssAAV9-SMN ile, ya da d) scAAV9-SMN ile enjekte olmuş farelerin P14'deki motor nöron sayısı SMA'lı fareden daha fazladır. D örneğindeki motor nöronların yapısı P14' deki wild tip örneğe

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil

Sayfa

- benzemektedir69
- 4.25. P14'deki fare omuriliğinin servikal bölgesindeki mörör nöron sayısı. Tedaviden sonra motor nöron sayısı her iki tedavi grubunda artış göstermiştir. Tedavi edilmiş SMA, wild tip, ssAAV9 ve scAAV9 ile enjekte edilmiş farelerin motor nöron sayısı sırasıyla 11 ± 2 , 27 ± 3 , 18 ± 2 , ve 23 ± 4 'dür. $P < 0.003$ 70
- 4.26. P14 farelerin GC kaslarının HE boyaması. a) SMA'lı, b) Wild tip, c) ssAAV9-SMN ve d) scAAV9-SMN ile enjekte olmuş farelerin GC kas morfolojisi. 20X objektifi71
- 4.27. Prenatal dönemde rAAV9-SMN ile enjekte edilmiş farelerin beyin, omurilik ve GC kaslarında SMN protein ekspresyonunun analiz sonuçları. Farklı gruptaki farelerin; a) MSS'deki, ve b) kas örneklerindeki SMN protein miktarı. c) western blot sonuçlarının kantitatif değerlendirilme sonuçları. ss ve scAAV9-SMN vektörleri ile enjekte edilmiş farelerde SMN protein miktarı beyinde 12 ve 14.2, omurilikte 9.28 ve 11.79, ve kasta 0.66 ve 0.97 olarak saptanmıştır. d) SMN proteinin kat değişimi. ss ve scAAV9-SMN vektörleri ile enjekte edilmiş farelerde SMN protein kat değişimi beyinde 1.35 ve 1.68, omurilikte 2.85 ve 3.62, ve kasta 0.21 ve 0.35 kat artış göstermektedir. GC: Gastrocnemius72
- 4.28. RT-PCR sonuçları. Enjekte edilmiş iki çalışma grubunda SMN protein ekspresyonu beyin, omurilik ve kaslarda artış

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
göstermiştir. En çok SMN ekspresiyon artışı scAAV9-SMN ile enjekte edilmiş farelerinin omuriliğinde (sağlıklı fare'ye göre 6.11 kat artış) saptanmıştır	73
4.29. Farklı gruptaki farelerin P14'deki fenotipleri. Tedavi edilmemiş SMA'lı farede ağır bir hipotoni görülmektedir (2.5 gr). Heterozigot ve wild tip fareler tamamen sağlıklı görünürler (yaklaşık 6 gr). ss ve scAAV-SMN ile enjekte edilmiş fareler wild tip ve heterozigot farelere göre daha küçüktürler (sırasıyla 3.6 gr ve 4.65 gr). Ancak, hareket konusunda sağlıklı farelere benzemektedirler	74
4.30. scAAV9-SMN ile E14-15. gününde ICV tekniği ile enjekte edilmiş farenin 2.5 aylıkkenki görüntüsü. Vücudu sağlıklı farelerden daha küçüktür ancak hareketlilik açısından sağlıklı farelere benzemektedir	74

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.1. PCR programı	23
3.2. Elde edilmiş plazmidlerin dizi analizinde kullanılmış primerler	26
4.1. Pilot çalışmada, E14-15' de IU şeklinde enjekte edilmiş embriyolarının canlı doğum oranı	55
4.2. Prenatal dönemde rAAV9-SMN vektörler ile enjekte olan embriyolarının hayatta kalma oranı	67

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİSimgelerAçıklama

°C

Santigrat

g

Yer çekimi

mg

Miligram

ml

Mililitre

mM

Milimolar

µl

Mikrolitre

µM

Mikromolar

µm

Mikrometre

Kısaltmalar

AAV

Adeno ilişkili virüs

Cap

kapsid

ASO

Antisens oligonükleotid

BAT

Kahverengi Adipoz dokusu (*Brown Adipose Tissue*)CO₂

kardon dioksit

DAPI

4', 6-diamidino-2-fenilindol, dihidroklorür

ddH₂O

Bidistile Saf Su

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
DMEM	Dulbecco's Modification of Eagles Medium
DMEM-F12	Dulbecco's Modification of Eagles Medium F12
EGF	Epidermal Büyüme Faktörü
ITR	Ters terminal tekrar
NKH	Nöral kök hücre
PBS	Tuzlu Fosfat Tamponlu
Pen-Strep	Penisilin-Streptomisin
Rep	Replikasyon
RNP	Ribonükleoprotein
scAAV	kendi kendini tamamlayıcı Adeno ilişkili virüs (<i>self-complementary Adeno-Associated Virus</i>)
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
SMA	Spinal muküler atrofi
SMN	<i>survival motor neuron</i>
ssAAV9	tek zincirli Adeno ilişkili virüs (single stranded adeno-associated virus)
UTR	Çevrilmemiş bölge

1. GİRİŞ

Spinal müsküler atrofi (SMA) hastalığı; her yaşta görülebilen, ilerleyici paraliziye neden olan kalıtsal hastalıkların en önemli ve heterojen gruplarından biri olarak bilinmektedir. Batı'da SMA, görülme sıklığı açısından beyaz ırkta, kistik fibrozisten sonra ikinci sırayı almaktadır. Otozomal resesif olarak kalıtılan SMA'nın taşıyıcılık oranı 1/40-1/60 ve prevalansı 1/6000-1/10,000'dir. Türkiye'deki SMA prevalansı bilinmemekle birlikte, akraba evliliklerinin yüksek olması prevalansın gelişmiş ülkelerden daha fazla olduğunu düşündürmektedir. Kollarda ve bacaklarda güçsüzlük ve atrofiyle seyreden bu hastalığın en ağır formunda, solunum kaslarda etkilenerak erken yaşta ölümle sonulanırmasıdır (Brichta et al., 2006). Çocukluk ağı SMA hastalığı başlangıç yaşı ve klinik Őiddetine göre 4 tipe ayrılmaktadır: Tip I (*Werdnig-Hoffmann* hastalığı) en Şiddetli form olup hastalar yardımsız oturamaz ve 2 yaşından önce hayatlarını kaybeder gözlenmiştir. Ara form olan tip II (*Intermediate form*-subakut form)'de hastalar oturabilir fakat yürüyemezler, tip III (Kugelberg-Welander hastalığı) ve tip IV (yetişikin formu) ise daha hafif formlar olarak bilinmektedir (Striano et al., 2004). SMA'dan sorumlu genin 15. kromozomda *SMN1* ve *SMN2* olmak üzere iki kopyası bulunmaktadır. *SMN1* gen delesyonları SMA hastalığıyla sonuçlanırken, *SMN2* (*pseudogene*) kopya sayısındaki bireysel farklılıklar ise hastalığın ağırlığını etkilemektedir. SMA hastalarının %95-98'inde *SMN1* geni 7. ve 8. ekzonlarında homozigot delesyonlar görülmektedir (Wirth, 2000).

Gen tedavisi, kalıtsal hastalıklar için en uygun tedavi yöntemi olarak görülmektedir. Sağlıklı *SMN* genini viral vektör aracılıyla hücrelere aktarmak bir diğer ilgi çekici tedavi yöntemidir. Bu yöntemde en çok kullanılan viral vektör Adeno İlişkili Virus (AAV) vektörüdür. Şimdiye kadar postnatal (P)'ın 1. gününde rAAV9 vektörü kullanılarak yapılan klinik öncesi çalışmalar ile oldukça başarılı sonuçlar elde edilmiştir. P14 (Postnatal 14. gün)'de len SMA'lı fare bu yöntem ile tedavi olduğunda ortalama 200 gün yaşayabilmiştir ve hastalıkların semptomlarının çoğu iyileşiği gözlemlenmiştir (Armbruster et al., 2016). Bu gen tedavisi yönteminin faz 1 klinik çalışmaları tamamlanıp faz 2 çalışmalarına başlanmıştır (Rashnonejad et al., 2016a). SMA'nın prenatal dönem gen tedavisindeki en büyük dezavantajı oldukça maliyetli olan tekrar dozlara ihtiyaç duyulması ve

semptomlarının %100 iyileşmemesi ile birlikte bazı dokularda nekroz oluşturmaktadır. Tedavi edilmiş farelerin boyutlarının, sağlıklı farelerden daha küçük olduğu gözlenmiştir. Daha küçük boyut, SMN proteinin embriyonik bir rol oynadığını düşündürmektedir (Foust et al., 2010). SMN1 proteininin yüksek konsantrasyonu, hamileliğin son aylarında ve doğumdan hemen sonra motor nöronların ve ardından kasların normal gelişmesi için çok önemlidir (Le et al., 2011). Öte yandan SMA hastalığının moleküler patolojisi prenatal dönemlerde başlayıp fetüsün anne rahminde daha az hareket etmesi gibi bazı semptomlar göstermektedir. Postnatal gen tedavisinin en büyük problemi verilen tedaviye karşı bağışıklık sistemi tarafından oluşturulan immün yanıtlardır. Bu yüzden postnatal dönemde aktarılan gen daha az eksprese olup tekrarlı dozların verilmesi gerekmektedir. Doğumdan sonra yapılan gen tedavileri iyileştirici tedaviden ziyade hafifletici tedavilerdir ve kısa aralıklarla tekrar edilmelidir (David and Peebles, 2008; Pearson and Flake, 2013).

Prenatal gen tedavisi özellikle embriyonik dönemde ortaya çıkan kalıtsal hastalıklar için umut vaat eden bir tedavi yaklaşımı olabilir. İlk defa 1990'ların başında ağır kombine immün yetmezlik ve talasemi hastalıklarının tedavisi için umbilikal venden transkutan ultrason yardımıyla fetal karaciğer hücrelerine minimal invazif girişimle gen tedavisi uygulanmıştır (Touraine, 1992). 1995'de, kemirgen ve koyun fetuslarına marker genlerin direkt uterus içine farklı yöntemler ve vektörler ile transfeksiyonu gerçekleştirilmiştir (Hatzoglou et al., 1990; Hatzoglou et al., 1995; Mccray et al., 1995; Pitt et al., 1995; Tsukamoto et al., 1995). Daha sonra, bu yöntemler farklı organları da hedefleyebilmek için birkaç hayvan modelinde geliştirilip uygulanır hale getirilmiştir (Waddington et al., 2005). Günümüzde bazı hastalıklar için prenatal gen tedavisinin klinik öncesi çalışmaları devam etmektedir (Coutelle and Waddington, 2012).

Prenatal gen tedavisinin; a) kalıtsal hastalıkların erken semptomlarının ve doku hasarlarının önlenmesi; b) fetal dönemde çok sayıda bulunan ve vücuda yayılıp farklılaşabilen kök hücre popülasyonuna ve postmitotik dokulara transfekte edilerek genetik hastalıkların kalıcı düzeltilmesi; c) vektör ya da transgenin, immün sistem tamamen gelişmeden önce fetusa aktarılması ile vektör ve transgenik proteine karşı geliştiren immün yanıtların önlenmesi; d) ileri dönemde ulaşması zor

olan ancak embryonik dönemde kolaylıkla erişilebilir ve yara izi bırakmadan düzelebilen doku ve organlara ulaşmasını sağlamak gibi çeşitli avantajları olabilmektedir.

Bu tez kapsamında sağlıklı SMN cDNA'sını taşıyan rAAV9 vektörleri prenatal dönemde, embriyonik gün 14-15 (E14-15)'de hasta farelere aktararak, hastalık semptomları ortaya çıkmadan önce hastalığın tedavi edilebilmesi, tedavi edilmiş hasta farenin sağ kalım süresini artırması, doku nekrozunu önleyebilmesi, aktarılan transgen ve viral vektöre karşı bağışıklık adaptasyonu geliştirip transgen ekspresyonunu daha uzun sürede sağlayabilmesi ve günümüze kadar postnatal SMA gen tedavisi çalışmalarında hastalık ile ilgili çözülmemiş problemleri çözebilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Spinal muskular atrofi (SMA) hastalığı

Spinal Müsküler Atrofi (SMA), infantil hipotoninin en önde gelen genetik sebeplerinden biri olup, otozomal resesif kalıtım gösteren nörodejeneratif bir hastalıktır. Hastalık, *SMN1* mutasyonu ya da delesyonu sonucu meydana gelmekte, omurilikte ön boynuz hücrelerinin ve alt beyin sapında kranial motor nöron çekirdeklerinin dejenerasyonuna, dolayısıyla da kas güçsüzlüğü, atrofi ve olguların önemli bir kısmında erken ölümlere yol açmaktadır. İnsidansı 6000-10000 canlı doğumda 1 ve taşıyıcı sıklığı 1/40-60 olan, hastalığın başlangıç yaşı ve klinik gidiş açısından birbirinden farklı dört tipi vardır (Brichta et al., 2006).

Sınıflandırma:

SMA Tip 1 (infantil SMA ya da Werdnig-Hoffman hastalığı), en sık görülen ve en ağır klinik tabloya sahip olan tipidir. Klasik olarak yenidoğan döneminde bulgu verirse de, gebelikte fetal hareketlerde azlık şeklinde doğumdan önce başladığı bilinmektedir. Semptomlar çok hızlı gelişir, ilk 6 ayda tablo oturur, 2 yaşından önce olguların çoğu kaybedilir.

SMA Tip 2 ve SMA Tip 3 (Kugelberg-Walender hastalığı) daha geç başlangıçlı ve daha hafif gidişli olup, SMA Tip 2 genellikle 2-15 aylar arasında, SMA Tip 3, 1 yaşından sonra hafif kas güçsüzlükleri ile başlayıp kronik forma dönüşür.

Erişkin tip SMA (SMA Tip 4) hayatın genellikle 2. ya da 3. onyılında ortaya çıkmakla birlikte klinik olarak SMA Tip 3'e benzerlik göstermektedir (Striano et al., 2004).

Klinik Bulgular:

Tüm SMA formlarında hastaların yaygın, simetrik, alt ekstremitelerde daha belirgin proksimal kas güçsüzlüğü vardır. Derin tendon refleksleri genel olarak kaybolmuştur ya da azalmıştır. SMA 1 olan bebeklerde ağır düzeyde, simetrik,

gevşek paralizi vardır ve bu bebekler genellikle desteksiz oturamazlar. Üst kraniyal sinirler korunduğu için, SMA 1 hastalarında normal göz hareketleri, çatık kaşlar ve uyanık bir yüz ifadesi vardır. Bulber tutulum nedeniyle ağlamaları ve emmeleri zayıftır, yutma refleksi etkilenmiş olduğundan ağızdan salya akması, aspirasyon ve dilde fasikülasyon görülebilir. Neonatal başlangıçlı hastalarda bazen artrogripozis mültepleks saptanabilir. Bu hastalarda ayrıca polihidramniyoz, intrauterin büyüme geriliği, iskelet anomalileri ve çoklu artiküler kontraktürler ve pulmoner hipoplazi saptanabilir.

SMA 1'de daha belirgin olmak üzere, tüm SMA tiplerinde, restriktif, progresif solunum yetmezliği görülür. İnterkostal kaslar klasik olarak diyaframdan daha çok etkilenir, paradoksal solunum görülür (Lunn and Wang, 2008).

Tanı:

SMA şüphesi olan bir hastada ilk yapılacak tanısal test *SMNI*'de homozigot delesyon araştırmaktır. Bu testin % 95 duyarlılığı ve % 100 özgüllüğü vardır. *SMNI* geninde ekzon 7 homozigot delesyonunun mutasyon analizi ile belirlenmesi tanı koydurucudur. Ekzon 7'deki mutasyon çok siktir ancak nokta mutasyonları da görülebilmektedir. Eğer genetik testler negatif saptandı ise diğer tetkikler ve elektrofizyolojik incelemeler yapılabilir.

Elektromiyografi/Biyokimyasal testler

SMA hastalarında elektromiyografik olarak denervasyon potansiyelleri görülür. Motor ünit potansiyellerinin süresi ve amplitüdü artmıştır, polifazi sıklıkla eşlik eder. Sinir ileti çalışmaları normal ya da ileti hızı hafifçe düşük bulunabilir, duysal yanıtlar ise korunmuştur. Serum kreatin kinaz düzeyleri genellikle normal ya da hafifçe artmış saptanabilir (Hausmanowa-Petrusewicz and Karwanska, 1986).

Kas Biyopsisi

Kas biyopsisinde hipertrofiye olmuş Tip 1 liflerin arasına dağılmış olarak sirküler atrofik Tip 1 ve 2 kas lifleri izlenir (grup atrofisi). Genişlemiş, hipertrofiye lifler, hayatta kalan sinirlerin filizlenmesi ile oluşur, normalin 3 ya da 4 katı kadar genişleme izlenebilir. Yenidoğanda histolojik tanı koymak zordur, çünkü sadece atrofiye uğramış lifler saptanır. Ancak sonraki biyopsilerde hastalık bulguları oturduktan sonra hipertrofik ve atrofik lifler birlikte görülür (Zalneraitis et al., 1991).

2.1.1. SMA hastalığının genetik mekanizması

SMA hastalığı ile ilişkili olan kromozom 5q13 lokusu 1990 yılında bulunmuştur. *Survival Motor Neuron (SMN)* geninin hastalığın moleküler etiolojisindeki rolü ise 1995 yılında belirlenmiştir (Kolb and Kissel, 2011). Kromozom 5q13 bölgesinde yer alan SMA lokusu ters duplikasyonu ile ortaya çıkmıştır ve yaklaşık 500 kb uzunluktadır (Melki et al., 1994).

Farklı insan popülasyonu ve hominidlerinin incelenmesi sonucunda *SMN* gen duplikasyonunun yeni bir olay olduğu, kemirgen ve primatların birbirinden ayrılmasından sonra yaklaşık 5 ± 7 milyon yıl önce ortaya çıktığı gösterilmiştir (Rochette et al., 2001). Şempanzelerde her bir diploid genomda *SMN* geninin 2-7 kopyası bulunmaktadır. Şimdiye kadar 7. ekzondaki G>T nokta mutasyonu hiçbir primatta bulunamamıştır. Bu sayede *SMN1* ve *SMN2*'nin transkriplerindeki ekzon 7'nin farklı *splicing* (kırılma)'lerinin varlığı ve sonuçta SMA hastalığının insanlara özgü olduğunu söyleyebiliriz (Sendtner, 2001).

SMN geninin telomerik kopyası (*SMN1*, *tSMN*)'ndaki en küçük delesyonlar veya *missens*, *non-sens* yada kırılma bölge mutasyonları gibi intragenik mutasyonlarının varlığı SMA hastalığına sebep olmakta ve bu genin SMA için sorumlu olduğunu göstermektedir (Melki et al., 1994; Lefebvre et al., 1995; Brahe et al., 1996).

SMN1 duplikasyonu sonucunda *SMN2* adı verilen ve *SMN1* ile yüksek bir homoloji gösteren genin 2. kopyası (psödogen) ortaya çıkmıştır. *SMN* geninin iki kopyası da insanlarda eksprese olmaktadır. SMA hastalarının %98'inden fazlasında *SMN1* geninin delesyonlarının sorumlu olduğu fonksiyon kaybına yol açan mutasyonlar saptanabilmektedir. Ancak, bu olgularda *SMN2*'nin en az bir kopyası bulunmaktadır. *SMN2*'nin bulunması ve az da olsa ifade edilmesi, *SMN1* delesyonu sonucu oluşan klinik tabloyu telafi edemez.

SMN1 ve *SMN2* arasında sadece 5 nükleotid fark vardır, bu farklılıklar hiçbir amino asit değişikliğine sebep olmaz (Lefebvre et al., 1995). Bunlardan birisi 280. kodonda, ekzon 7'nin +6 pozisyonunda (*SMN1*'de C, ve *SMN2*'de T) yer almaktadır ve *SMN2* transkriptlerine özgü olacak şekilde ekzon 7'nin alternatif kırılmasına neden olmaktadır. Tam boyuttaki transkriptler özellikle *SMN1* üzerinden kodlanır iken, *SMN2*'nin kodladığı transkriptlerde ekzon 7 eksikliği vardır (Lefebvre et al., 1995; Lorson et al., 1999). Ekzon 7 eksikliği nedeniyle bir ucu eksik olan (trunkat) transkriptler, C-terminal kısmında 16 aminoasidi eksik olan (*SMN Δ 7*) proteinini kodlar. *SMN Δ 7* proteini stabil olmayan ve kolayca yıkılan bir protein olup *SMN1* defekti bulunan hastalarda yeterli protein fonksiyonunu sağlayamamaktadır (Lorson and Androphy, 2000; Cifuentes-Diaz et al., 2001). *SMN1* ve *SMN2*'nin aynı anda iki kromozomda birlikte mutasyonları raporlanmamıştır. Böyle bir genotip, çok ağır bir SMA tipine neden olup fetüsün abortusuna yol açmaktadır. Bu hipotez, *SMN2* (*SMN1* genin ortologu) bulunmayan diğer canlılarda, *SMN* knock out'un erken embriyonik öldürücülük özelliğini göstererek güçlendirilmiştir (Lorson et al., 1999; Monani et al., 1999).

2.1.2. SMN: multifonksiyonel bir protein

SMN, tüm hücrelerde eksprese olan 294 amino asit içeren, 38kDa ağırlığında olan, ve başka proteinler ile anlamlı bir homoloji göstermeyen, proteindir. SMN birkaç protein ile bağlanır ve büyük bir multiprotein kompleksini oluşturur. SMN geni tüm hücrelerde eksprese olup hücrelerinin hem sitoplazmada hem de çekirdekte görülmektedir. SMN kompleksi hem sitoplazmada hem de çekirdekte 'gem' ('*gemini of coiled bodies* ') adı verilen yapılarda bulunmaktadır, ve çoğu zaman analiz edilen hücre ve doku tipi *Cajal* cismi (*Cajal bodies, coiled bodies*) ile

ilişkilidir (Liu and Dreyfuss, 1996). Bu kompleksde, SMN ile bağlı olan proteinler: Gemin 2 (ya da SP1, SMN intracting protein 1), Gemin 3 (daha önce dp103 olarak adlandırılan *DEAD box* motifini içeren RNA helikaz), Gemin 5, küçük nükleer splisozomla Sm ribonükleoprotein (RNP), Lsm proteini, fibrilların ve GAR1'i içeren küçük nükleer RNP, heterojen RNP-Q ve SMN snRNP'nin splisozom içinde sitoplasmada toplanmasını kolaylaştırır. Bu kompleks pre-mRNA'ların kırılmalarını katalize eden büyük bir RNA-protein kompleksidir. Çekirdekte, SMN proteini direkt pre-mRNA'larının kırılmalarında, ve ribozomla RNA'larının transkripsyonu ve metabolizmasında rol oynarlar (Charroux et al., 2000). SMN direkt olarak Bcl-2 ve p53 gibi apoptozisde rol oynayan proteinler ile etkileşimdedir. Böylece apoptozisde etkili olduğu düşünülmektedir (Rossoll et al., 2002). *FUSE-binding protein*, profilin II, ZRP1, RNA helikaz A, RNA polimeraz II, ve RNA gibi SMA ile direkt ya da indirekt işbirliği yapan proteinler (Yong et al., 2002) SMN'nin bir multifonksiyonel protein olduğunu ve çeşitli görevleri olduğunu gösterir. SMN proteini hücrenin hayatta kalması için önemlidir. SMN proteini bütün hücrelerde eksprese olur ancak farklı hücreler hayatta kalmak için SMN proteininin farklı miktarlarına ihtiyaç duymaktadırlar. Böylece özellikle iskelet kaslarında ve nöronlarda SMN proteinin başka görevleri olduğu düşünülmektedir (Yong et al., 2002).

2.1.3. Neden Motor Nöronlar benzersiz bir şekilde SMN protein eksikliğine hassastır?

SMN proteininin az bir miktarı tüm hücrelerinin hayatta kalması için gereklidir. Prenatal (McWhorter et al., 2003) ve erken postnatal (Le et al., 2011) dönemlerde sinir sisteminin gelişimi özellikle SMN protein miktarına oldukça bağımlıdır. Fonksiyonel SMN proteini bulunmayan Nematod, sinek ve fare modellerin tümünde aynı şekilde erken embriyonik öldürücü fenotip görülmüştür (Miguel-Aliaga et al., 1999). SMN proteininin az miktarlarının motor nöronlarda bozukluğa sebep olan mekanizmaları hala tam olarak bilinmemektedir. Bir olasılıkla, motor nöronlara özgü bir şekilde yüksek bir snRNA toplaması ve mRNA işlemine ihtiyaç duymaktadırlar. Alternatif olarak, snRNA'larının yetersiz toplaması bir ya da birden fazla motor nöronlara özgü mRNA'larının yersiz

(uygunsuz) kırılmasına sebep olur ve böylece bu durum hücrelerinin hayatta kalmasını etkiler (Sumner, 2007).

SMN proteininin motor nöronlarda aksonal mRNA trafiği gibi spesifik bir fonksiyonu olduğu, ve böylece motor nöronların SMN eksikliğine çok duyarlı oldukları ileri sürülmektedir (Zhang et al., 2006).

2.1.4. SMA hastalığında tedavi stratejileri

SMA tedavisinde, günümüzde yürütülen çalışmaların ışığında yeni seçenekler ortaya çıksa da temel bozukluğun tedavisi mümkün değildir ancak destekleyici tedaviler uygulanır. Solunum ve beslenme desteği önemli olup güçsüzlüğün yol açtığı komplikasyonların önlenmesi amaçlanır. Fizik tedavi ve nörorehabilitasyon yardımcıdır, skolyozun önlenmesinde, sekresyonların mobilizasyonunda ve temizlenmesinde faydalı olsa da her tipinde semptomlar ilerleyicidir ve SMA tip 1 hastaları bebeklik döneminde kaybedilir (Kolb and Kissel, 2011).

Küçük molekül tedavileri

SMN miktarını arttıran farklı bileşikler SMA hayvan modellerinde denenmiştir. Bu çalışmalar sonucunda, histon deasetilaz inhibitörleri, aminoglikozidler ve quinazolin derivatlarının nispeten etkili olduğunu göstermişlerdir. Valproik asid, sodyum butirat, fenilbutirat, ve *trichstatin A* gibi çeşitli histon deasetilaz inhibitörleri *SMN2*'nin promoterini aktive ederek, SMN proteininin miktarını artırmaktadır. Fare modelinde beklenen sonuçların elde edilmesine rağmen klinik çalışmalar başarısızlıkla sonuçlanmıştır (Kolb and Kissel, 2011).

RNA bazlı tedavi

SMN2 pre-mRNA kırılmasını değiştirerek ekzon 7'yi içeren olgun mRNA'ları elde etmek ve sonuçta normal uzunlukta SMN proteininin ekspresyonunu sağlamak, umut vadeden SMA tedavi stratejilerdendir. Bu yöntem *SMN2* pre-mRNA'nın intron ve ekzonlarında bulunan *cis-acting* dizi motifleri

arasında mükemmel bir iletişim kurarak ekzon 7'nin kırılmasını düzenler. Antisens oligonükleotid (ASO)'ler, intron ya da ekzonda yer alan kendi komplementer dizilerine bağlanabilen şekilde tasarlanmış terapötik RNA molekülleridir. Ekzon 7'nin SMN2 pre-mRNA'lardan kesilip atılmasını engellemek ve tam uzunlukta olan SMN mRNA'sının miktarını arttırmak için yapılan ilk ASO tedavilerinde, ekzon 8'in kırılma bölgesini inhibe eden ASO'lar tasarlanmıştır (Lim and Hertel, 2001). Başka kırılma bölgeler tanımlanmış ve ASO'ların kimyasal stabiliteyi düzeltilmiştir. Tanımlanan başka bir kırılma regülatör bölgesi *SMN2* geninin intron 7'sinde yer alan intronik kırılma önleyen (*splicing silencer*) N1'dir (Singh et al., 2006). Kültüre edilmiş fibroblastlarda, intronik kırılma önleyen N1'i bloke eden ASO'lar ekzon 7'nin olgun mRNA'larda yer almasını sağlayıp SMN1 proteininin miktarının artmasına sebep olur (Hua et al., 2008). 2016 yılında SMA hastalığının tedavisi için ilk ASO bazlı tedavi ilacı FDA onayını alıp piyasaya girmiştir (Ottesen, 2017).

SMA hastalığına Gen Tedavisi

SMA tedavisinde en direkt yöntem, bozulmuş *SMN1* geni yerine fonksiyonel sağlıklı geni yerleştirmektir. scAAV9 aracılığıyla yapılan gen tedavi çalışmaları, ağır SMA fare modelinde başarılı sonuçlara sebep olmuştur (Foust et al., 2010). Bu çalışmada fare yavrulara postnatal 1. günde (P1) 5×10^{11} viral vektörü tek intravenöz enjeksiyonu ile verilmiştir. Bu çalışmanın sonucunda, motor nöronların %60'ında *SMN1* ekspresyonu saptanmıştır. Motor nöron fonksiyonu ve gücü, kas fizyolojisi, ve farenin hayat süresi düzeltilmiştir. Hasta fare 16 gün hayatta kalırken tedavi edilmiş fare ise 400 günden daha uzun bir süre yaşayabilmiştir. Bu yöntem diğer gruplar tarafından *SMN1*'i motor nöronlara aktarmak için AAV serotip 8 ve 9 kullanılarak denenmiştir (Passini et al., 2010).

Bizim önceki in vitro SMA gen tedavisi çalışmamızda gen hedefleme kaseti (gene targeting cassette) kullanılarak homolog rekombinasyon yöntemi ile SMA'lı fibroblast hücre hattında SMN ekspresyonunun düzeltilebileceği gösterilmiştir (Rashnonejad et al., 2016b).

Gen hedefleme kasetinde yer alan homolog diziler SMN cDNA'sının genomu integre edilmesini ve SMN protein ekspresyonunun artmasını sağlamıştır.

2.2. SMA'lı Fare Modeli:

Farelerde SMN geni 13. Kromozomda yer almaktadır. Farelerde sadece bir SMN geni mevcuttur ve fonksiyon olarak insandaki *SMN1* geni ile eşdeğerdir. Fare SMN geni üzerinden kodlanan protein insan *SMN1* proteinine % 82 oranında benzemektedir (DiDonato et al., 1997). Farelerde *SMN2* geni bulunmadığı için *SMN1*'deki homozigot delesyonlar ya da mutasyonlar öldürücü fenotiplere ve embriyonik dönem abortlara sebep olur. *SMN1* geni açısından homozigot knockout fareler embriyonel dönemde kaybedildiği için, SMA araştırmalarında uygun bir model değildir. Bu nedenle en az 1 kopya *SMN2* bulunduran transgenik SMA fare modeli kullanılmaktadır (Monani et al., 2000). SMA gen tedavisinde en çok kullanılan SMA fare modeli [*SMN1*^{-/-}; *SMN2*^{+/+}] veya [*SMN1*^{-/-}; *SMN2*^{+/+}; *SMNΔ7*^{+/+}] modelleridir. Birinci fare modeli ikincisine göre daha ağır SMA semptomları göstermektedir. [*SMN1*^{-/-}; *SMN2*^{+/+}] fare modelinin yaşam süresi 5 gündür ve insanlarda SMA tip 1'e karşılık gelmektedir. [*SMN1*^{-/-}; *SMN2*^{+/+}; *SMNΔ7*^{+/+}] fare modeli ise daha hafif semptomlar göstermektedir ve insanlardaki SMA tip 2'ye karşılık gelmektedir (Sleigh et al., 2011).

2.3. Prenatal Gen Tedavisi

Gebelik ve embriyonun gelişimi, fizyolojik koşullar, endojen fetal ve maternal stres faktörlerinden veya dışsal stres faktörlerinden kaynaklanan olumsuz etkilere karşı oldukça savunmasızdır. Tüm bunlar, Fetal Tıp'ın bir uzmanlık alanı olarak gelişmesini sağlamıştır. Fetal Tıp, hamile kadınlara ve çocuklarına en iyi bilimsel temelli sağlık bakımını sağlamak için doğum (obstetrics), neonatoloji, pediatrik cerrahi ve genetik dalları dahil olmak üzere multidisipliner alanları bir araya getirir. Konjenital malformasyonlar ve bazı genetik hastalıklar gibi fetal risk faktörlerini taşıyan gebeliklerde; ultrason taraması, karyotipleme ve DNA analizi için amniyotik sıvı veya koryonik villüs örnekleme ile tanımlanabilir. Günümüzde, prenatal genetik teşhisi genellikle aile öyküsünde genetik hastalık riski barındıran çiftler için önerilir. Sonuçlara göre, aileler etkilenen bir çocuğun

doğum sonrası semptomatik bakımına hazırlıklı olmak veya gebeliğin sonlandırması arasında seçim yapmak için umutsuz bir ikilemde bırakılırlar (McCandless et al., 2004).

Gen Tedavisi genetik hastalıkların en mantıklı tedavisidir. İdeal olarak, genetik hastalıkların tedavileri tek doz vektör kullandıktan sonra uzun vadede ya da mümkünse ömür boyu etkisini koruyabilmelidir.

Birçok gen tedavi yönteminin amacı hasta kişinin hücrelerine normal gen dizisini aktararak bozuk genin patolojik gen ekspresyonunu düzeltmektir. Şimdiye kadar tüm klinik gen tedavisi denemeleri postnatal dönemlerde ve çoğunlukla yetişkin hastalarda uygulanmıştır. Ancak, genetik hastalıkların birçoğu hayatın çok erken dönemlerinde kendini gösterir ve zamanla gen tedavisi gibi postnatal tedaviler uygulanabilir. Ancak hastalığın sebep olduğu hasarlar genellikle geri döndürülemez. Bu da daha sonra normal gen ekspresyonu değiştirilse bile gecikmiş tedavi yaklaşımı iyileşmeyi engelleyebilir. Terapötik gen dizisinin prenatal dönemde aktarılarak erken ve geri dönüşü olmayan hasarların önlenbilmesinin ilk fikri 1990'ların başında konjenital malformasyonlarının tedavisi için geliştirilen cerrahi yöntemler ile ortaya çıkmıştır. Bu müdahaleler fetal hayatta yara izi bırakmayan iyileşmeler gibi avantajlara sahiptirler, ve bu tip müdahaleler ilk defa intrauterin cerrahi teknikleri (Flake and Harrison, 1995) ve ardından fetoskopik yöntemler (Harrison, 2000) ile ortaya çıkmıştır. İlk uygulamalar 1985 yılında *ex-vivo* orta gebelik kordon kanı hücrelerine retroviral gen transferi ve ardından koyun ve primatlara gen transplantasyonu ile başlamıştır ve hematopoetik hücrelere 2 yıldan daha fazla süreyle gen transferi yapılmıştır (Anderson et al., 1986).

İlk defa 1990'ların başında ağır kombine immun yetmezliği ve talasemi hastalıklarının tedavisi için umbilikal venden ultrason yardımıyla fetal karaciğer hücreleri minimal invazif girişimle enjekte edilmiştir (Touraine, 1992).

1995'de, kemirgen ve koyun fetuslarına marker genlerin direkt uterus içine farklı yöntemler ve vektörler ile transfeksiyonu başlamıştır (Hatzoglou et al., 1990).

Daha sonra, bu yöntemler farklı organları da hedefleyebilmek için birkaç hayvan modelinde geliştirilip uygulanır hale getirilmiştir (Waddington et al., 2005)

Senut et al., (1998) otolog plasenta hücreleri ve primer fibroblastların ex vivo genetik modifikasyonlarını ve onların plasentaya transplantasyonunu, transgenik marker proteinin ekspresyonunu ve fetusun vücudunda bulunduğunu göstererek bu yöntemin terapötik proteinlerin geçici olarak üretilip, kullanılabileceğini önermişlerdir. Prenatal gen tedavisinin; a) kalıtsal hastalıklarının erken semptomlarının ve doku hasarlarının önlenmesi; b) entegre olabilen vektörler kullanılarak fetal dönemde çok sayıda bulunan ve vücuda yayılıp farklılaşabilen kök hücre popülasyonuna transfekte etmek yada postmitotik dokulara entegre olmayan vektörler ile tekrar transfeksiyon yapılarak genetik hastalıkların kalıcı düzeltilmesi; c) vektör ya da transgenin, immün sistem tamamen gelişmeden önce fetusa aktarılması ile vektör ve transgenik proteine karşı geliştiren immün yanıtların önlenmesi; d) ileri dönemde ulaşması zor olan ancak kolaylıkla erişebilen ve yara izi bırakmadan düzelebilen doku ve organlara ulaşmasını sağlamak gibi çeşitli avantajları olabilmektedir (Coutelle and Waddington, 2012).

NIH Rekombinant DNA Danışma komitesi (*The NIH Recombinant DNA Advisory Committee*), prenatal gen tedavisi için aday hastalıkların, fetüs ve yeni doğan için ciddi (önemli) morbidite ve mortalite risklerini taşıması, hiçbir etkili postnatal tedavisi bulunmayan hastalıklar olması gibi gerekliliklerden bahsetmektedir. Talasemi ya da lizozomal depo hastalığı gibi, ölümcül olmayan ancak postnatal ve yetişkin dönemlerde gen transferi yararlı olmayan kalıtsal konjenital hastalıklar için, prenatal gen tedavisi daha güvenli ve etkili görülürse uygulanabilir. Ancak, fetal büyümenin kısıtlanması gibi obstetrik koşullarda da hedef gen tedavi yöntemleri kullanılabilir. Her hastalıkta, durumun antenatal tarama ya da prenatal tanı yoluyla tanı konmuş olması gerekmektedir (Coutelle and Waddington, 2012).

Çoğu genetik hastalık için yapılan tedavi yaklaşımları, hastalığı iyileştirici etkiden ziyade hafifletici etkilere sahiptir. Hastanın yaşam süresi uzatılırken, hayat kaliteleri hala çok düşük kalmaktadır. Bu durum özellikle kistik fibroziste sıklıkla görülmektedir, KF'nin hayatta kalma süresi 1955 yılındaki okul yaşından

günümüzdeki otuzlu yaşlara kadar uzamıştır. Hastalar bu süreye ulaşmak için; günlük göğüs fizyoterapisi, antibiyotik tedavisi, beslenme destekleri, diabet mellitus için insülin tedavisi ve çoğu zaman immün baskılayıcı tedaviler gerektiren akciğer transplantasyonuna ihtiyaç duymaktadırlar. İntrauterin tedaviler genetik hastalıkları tedavi edebilir, ya da hastalığın ilerlemesi üzerinde etkili olabilir (Coutelle and Waddington, 2012).

2.3.1. Bazı hastalıklar için Prenatal yöntemlerin avantajları

1- Prenatal gen tedavisi, erken dönemlerde ortaya çıkan, organlarda doğum öncesinde ya da doğumdan hemen sonra geri dönülmez patolojik hasarlara yol açan genetik hastalıklar için belli avantajlar sağlar (Coutelle and Waddington, 2012). Bu tip hastalıkların çoğunda, kistik fibrozisde akciğerde, ya da üre döngü bozukluklarında beyinde, ya da epidermolizis büllozada deride olduğu gibi, organlarda doğum sonrası tedavisi zor olan hastalıklar için prenatal tedavi avantajlı olabilmektedir.

2- Bazı obstetrik hastalıklar da prenatal gen tedavisi için uygun aday olabilir. Altında genel obstetrik koşullar yatan uteroplazental dolaşım yetmezliği ve potansiyel genetik büyümesine ulaşmayan fetal büyüme kısıtlaması (*fetal growth restriction*, FGR) gibi tedavisi olmayan problemler için prenatal gen tedavisi uygulanabilir. Bir tedavi yöntemi olarak hedeflenmiş lokal gen transferi ile dolaşım iyileşmesi denenmiş ve bazı başarılı sonuçlara ulaşılmıştır (Coutelle and Waddington, 2012).

3- Fetüs boyutu özellikle transgenik protein ekspresyonunun miktarının önemli olduğu durumlarda konjenital hastalıkların tedavisi için önemli bir faktördür. Klinik düzeyde kullanılabilen vektörlerin üretilmesi zaman alıcı ve pahalıdır. Bu durumda, fetusun küçük boyutları vektör dağılımını yetişkinlerde kullanılanlara benzer dozlarda artmasını sağlayabilir.

4- Fetüs yetişkinlere göre fonksiyonel olarak olgunlaşmamış immün sisteme sahiptir. Bu özellik bazı hastalıkların prenatal tedavisi için avantaj olarak sayılabilir. Dünya çapında yetişkinlerin %50'sinde normalde gen tedavisi

çalışmalarında kullanılan adenovirüs ve adeveno ilişkili virüslerin serotiplerine karşı önceden mevcut olan humoral bağışıklık görülmektedir (Eglitis et al., 1987).

Üstelik, önceden var olan immun sensitivitesi yokluğunda bile, yetişkinlere vektör uygulanması immun yanıtlara sebep olarak süreç ve transgen ekspresyonu miktarını azaltabilir. Örnek olarak, yetişkin *Duchenne* musküler distrofisi bulunan farelere distrofin geni taşıyan adenovirüs vektörlerinin kas içine enjeksiyonundan sonra, distrofin proteinine karşı gelişen antikolar saptanmıştır (Kantoff et al., 1989).

Bu komplikasyonlar, gen ürününün tamamen yokluğunda ortaya çıkan genetik hastalıkların düzeltilmesi söz konusu olduğunda çok önemli olabilmektedir.

Diğer çoğu terapötik yöntemler gibi, prenatal gen tedavisinin riskleri ve etkinliği hala iyi bilinmemektedir. Bu konuda, NIH Rekombinant DNA Danışma komitesi (*The NIH Recombinant DNA Advisory Committee*) Touraine (1992) ilk prenatal gen tedavisi uygulamalarını aşağıdaki hastalıklar için önermiştir;

- 1- Fetüs için; uterus içine ya da postnatal dönemlerde ciddi morbidite ve mortalite riskleri taşıyan hastalıklar.
- 2- Etkili bir postnatal tedavisi olmayan, ya da mevcut postnatal tedaviler ile düşük sonuç gösteren hastalıklar.
- 3- Ciddi anomaliler taşıyan ve gen tedavisi ile düzeltilemeyen hastalıklar,
- 4- Kesinlikle uterus içinde teşhis edilebilir ve iyi bir genotip/fenotip korelasyonu olan hastalıklar,
- 5- Uterus içine gen transferi için insandaki hastalığı simgelemek için hayvan modeli mevcut olan hastalıklar.

Prenatal gen tedavisi için uygun aday olan bazı hastalıklar Tablo 1'de özetlenmiştir (Coutelle and Waddington, 2012).

2.4. Adeno İlişkili Viral Vektör;

Adeno ilişkili virüsler (AAVs) Parvovirüslerin Dependovirus cinsinin yardımcı (helper) bağımlı (depended) üyeleridir (Berns and Giraud, 1996).

Bir AAV enfeksiyonu, yardımcı elemanlarının işlevlerine (fonksiyonununa) ihtiyaç duymaktadır bu da yardımcı virüsler ile birlikte enfekte olarak ya da DNA hasarlarına yol açan ajanlarla sağlanabilir. Adenovirüs ve herpes simpleks virüs helper virüs olarak AAV replikasyonunu destekleyebilirler. Yardımcı virüsler, AAV genin ekspresyonunu ve çoğalmasını kolaylaştıracak hücre ortam değişikliklerini meydana getirirler. İnsan popülasyonunda yaygın olarak görülmesine rağmen, AAV herhangi bir insan hastalığı ile ilişkili bulunmamıştır. AAV enfeksiyonunun başarısı, yaşam döngüsünün her aşamasında virüs ve konakçı hücresi ile arasındaki moleküler etkileşimler tarafından belirlenir. AAV'ler sınırlı kodlama kapasitesine sahip küçük virüslerdir ve bu nedenle hücre ortam ve makinelere (mekanizmalara, machinery) oldukça bağımlıdır. Yardımcı virüsün yokluğunda, AAV birçok hücre tipinde latent bir enfeksiyonuna sebep olabilir, bu latent durumu daha sonra yardımcı virüs enfeksiyonu ile aktive olabilir. AAV2 virüsleri genellikle 19'uncu insan kromozomun belirli bir yerine spesifik şekilde entegre olur ve bu entegrasyonu da virüsün Rep proteinine bağlıdır (McCarty et al., 2004; Samulski et al., 1991). AAV vektörleri, özellikle kendi kendine tamamlayıcı (self-complementary, sc) rAAV vektörleri, istenilen geni konak hücrelere taşımak için sınırlı kapasiteye sahiptirler (AAV'nin genom uzunluğu ~ 4.7 kb dır) (Grieger and Samulski, 2012). AAV vektör ile aktarılan genin aşırı ekspresyonunun indüklenmesi için AAV vektör genomuna oluşturan cis-plazmidler genellikle CMV gibi çok güçlü bir *promoter*, *enhancer*, ve *polyA* sinyali içermektedir. AAV vektörleri üretmek için HEK293 hücreleri cis-, trans-, ve helper- plazmidleri ile transfekte edilir. Sadece ITR dizileri içeren cis-plazmidler HEK293 hücrelerde sentezlenmiş yeni kapsidlerde paketlenmektedirler (Grieger and Samulski, 2012).

2.4.1. AAV Genom yapısı;

AAV'nin en çok çalışılan serotipi, tip 2 (AAV2) olup AAV ailesi için bir prototip olarak hizmet etmektedir. AAV genomu 4.7 kb tek zincirli DNA molekülünden oluşmaktadır. Pozitif ve negatif zincirler eşit verimliliği ile ayrı oluşmuş partiküllerde paketlenir. Genomun her iki ucunda T-şeklinde ve baz eşleşmesi yapısında olan hairpinleri (*base-paired hairpin structures*) oluşturan uç bölgesindeki ters tekrar (*inverted terminal repeats*, ITRs) dizileri, ve virüsün replikasyonu ve paketlenmesi için gereken cis-elementleri bulunmaktadır. AAV'nin genomunda Rep ve cap olmak üzere iki gen yer almaktadır. Bu genler, yapısal olmayan ancak replikasyonu için gereken Rep78, Rep68, Rep52, ve Rep40 proteinleri ve virüs kapsidini oluşturan VP1, VP2, ve VP3 olmak üzere 3 yapısal proteini eksprese eder. AAV'nin genomunda p5, p19, ve p40 olmak üzere 3 adet viral promotörü yer almaktadır. Farklı AAV serotiplerinin transkripsiyon profilleri farklı olmasına rağmen (Qiu and Pintel, 2008), AAV2'nin bütün transkripsiyonlarında tek bir intron bulunmaktadır. kırılma olmamış (olgunlaşmamış) RNA'lar Rep78 ve Rep52'yi kodlar iken, Rep68 ve Rep40 ise splice olmuş RNA'lardan kodlanır.

rAAV vektörlerinin üretilmesinin temeli rep ve cap genlerinin viral genomundan silinmesi ve trans-plazmid adı verilen ayrı bir plazmid içinde klonlanmasına dayanmaktadır. Viral genlerin yerine transgen ve onun transkripsiyonal elementleri yerleştirilir ve böylece 4.5 kb büyüklüğünde olan ve 2 adet ITR ile çevrelenen vektör genomu oluşturulur. rAAV vektörün üretilmesi ve saflaştırılması için çeşitli yöntemler kullanılabilir (Zolotukhin, 2005).

Saflaştırma protokolleri sezyum klorür yoğunluk gradienti (cesium chloride density gradients) aracılığıyla ultrasantrifügasyon, iyonik olmayan iyodixanol gradient (nonionic iodixanol gradients) kullanılması ve çeşitli kromatografi kolonların kullanılmasıyla yapılabilir. rAAV'nin küçük genomun içinde paketlenen genlerinin doğal sınırlamaların bazıları temel vektörün genomunda mükemmel manipülasyonları yapılarak bertaraf edilmiştir. Bunlar, rAAV'nin paketlenme kapasitesini genişleten ikili vektör sistemi (Ghosh and Duan, 2007) ve virüsün tek zincirli DNA'sını çift zincirli DNA'ya dönüştürme basamaklarını

atlayan, kendi kendini tamamlayabilen (*self-complementary*, scAAV) vektörler kullanılmaktadır. İkili vektörler, iki adet ayrı virüslerden oluşmaktadır (McCarty, 2008). Her birisi transgen kasetinin bir kısmını taşır ve ko-enfeksiyon (*co-infection*)’dan (ikisi aynı anda hücreye transfekte ettiğinden) sonra hücre içinde yeniden yapılanıp birleşirler.

İkili vektörlerden örnek olarak, ekzonları iki ayrı *trans-splicing* vektör içinde yerleştirilmiş ve daha sonra hücre içinde kırılma aşamasında yeniden birleşen (Sun et al., 2000) ve homologus rekombinasyonu tetikleyen üst üste gelen (çakışmalı) vektörleri (Duan et al., 2001) sayabiliriz. Bu vektörler, geleneksel tek zincirli vektörlere nazaran 2 kat daha fazla kapasiteye sahiptir. scAAV vektörler ise, genomun büyüklüğünü normal virüs genomunun yarısına kadar, yani 2500 bp’e kadar azaltarak, üretilirler. scAAV vektörleri üretmek için genellikle bir ITR’ın terminal resolution site (TRS) dizisi silinip dimer genomu oluşur (McCarty et al., 2001; McCarty et al., 2003). scAAV virüsü hücre içinde soyulma (*uncoating*) işlemine uğradıktan hemen sonra virüs genomu üst üste katlanarak, bir ucunda kovalent bağlarıyla kapanmış ITR yapısı olan, çift zincirli DNA hairpin molekülü oluşturur. Bu scAAV vektörler transgeni taşımak için kısıtlı bir kapasiteye sahip olmasına rağmen geleneksel vektörlere göre daha hızlı bir transduksiyon ve gen ekspresyonunu sağlayabilirler (McCarty et al., 2011).

2.4.2. AAV serotipleri ve varyantları

AAV serotipleri, primat ve diğer türlerden (kuş ve sığır gibi) adenovirüs hazırlanması sırasında kontaminasyon ürünü olarak izole edilmiştir. AAV’nin 2., 3., 5., ve 6. Serotipleri insan hücrelerinden izole edilmiş iken, serotip 1, 4, 7-11 ise insan olmayan primatlarda bulunmuştur (Gao et al., 2002; Gao et al., 2004).

Parvovirüs genomunun genel organizasyonu, replikasyonu ve yapısal genleri bütün AAV türlerinde korunmuştur, ancak transkripsiyon profillerinde bazı farklılıklar görülmüştür (Qiu and Pintel, 2008).

Doğal AAV varyantlarından elde edilmiş vektörler farklı doku tropizması (yönelim, doğruluk) göstermektedirler (Gao et al., 2005; Wu et al., 2006a; Wu et

al., 2006b). Farklı kapsidlerde aynı vektör genomunu kullanan çapraz paketleme vektörleri, farklı serotiplerin doğrudan karşılaştırılmasını sağlamışlardır ve tropizmanın *in vivo* koşullarda farklı dokular arasında farklı olduğunu göstermişlerdir (Rabinowitz et al., 2002; Wu et al., 2006a; Wu et al., 2006b). AAV kapsidlerinin yapıları arasındaki karşılaştırmalar, yakından ilişkili serotipler arasındaki antijenik benzerliği ve hücre içi trafik yolları farklılıklarını belirten yüzey topolojilerinde hücre yüzeyine bağlanma ve reseptör kullanımındaki çeşitliliği göstermektedir (Nam et al., 2007).

Doğal AAV kapsidleri ile ilgili elde edilmiş bilgiler, spesifik özelliklere sahip kapsidlerin tasarlanmasını sağlar. Farklı serotiplerinin kapsid proteinleri birbirleriyle karıştırarak mozaik vektörlerin (Rabinowitz et al., 2004) ya da kimerik virionlarının (Perabo et al., 2006) oluşturulmasını sağlamıştır. Kapsid proteinlerinin kombinasyonel kütüphanesi, gelişmiş işlevsellikleri olan vektörleri izole etmek için DNA shuffling ve *error-prone* PCR yöntemleri kullanılarak oluşturulmuştur (Perabo et al., 2006). Hedeflenen transdüksiyon ve immün sistemden kaçma, alana yönelik mutagenез, peptid yerleştirme ve kimyasal konjügasyon aracılığıyla kapsid manipülasyonu ile başarılmıştır (Muzyczka and Warrington, 2005).

2.4.3. İnsanlarda AAV enfeksiyonu

İnsan popülasyonunun yaklaşık %80'i anti-AAV antikoru için seropozitifdir. Bu antikolar genellikle serotip 1, 2, 3, ve 5 karşısında geliştirilmiştir. Popülasyonun yaklaşık %60'ında ise 10 yaşlarında nötrale antikolar bulunmaktadır ve genellikle yetişkinlikte de devam etmektedir. Şimdiye kadar AAV ile ilgili hiçbir hastalık ve patolojik tablo insanlarda raporlanmamıştır (Rabinowitz et al., 2002). Bu nedenle, AAV ve konak arasında ideal bir ilişki (bağ) gelişmiş olduğu düşünülmektedir. Koşullar müsait olunca, örneğin yardımcı virüsün varlığında, AAV hücre başına 100,000-1,000,000 kopyaya kadar anlamlı miktarlarda çoğalabilir. *In vivo* koşullarda AAV virüsün hayat döngüleri incelendiğinde, AAV partikülleri sadece akut bir Ad enfeksiyonu varlığında izole edilebilmiştir (Blacklow et al., 1967). Ayrıca, AAV, ya herpes ya da papilloma virüsleri ile birlikte cinsel yolla aktarılabileceği düşünülmektedir (Walz et al., 1998).

Epidemiyolojik çalışmalar, sağlıklı kadınların %85'inin AAV için seropozitif iken, servikal kanser hastalarının %14'ünde AAV antikörleri saptanmış olduğunu göstermektedir (Mayor et al., 1976). Önceki çalışma ile tutarlı olarak başka bir çalışmada, sağlıklı kadınlardaki AAV titreleri servikal kansere yakalanan kadınlara göre çok daha fazla olduğunu gösterilmiştir (Georg-Fries et al., 1984). HPV enfeksiyonu taşıyan kişilerde AAV enfeksiyonu bulunduğu takdirde servikal neoplazi geliştirme riskleri azalmaktadır. Günümüzde, bu olayların hiç birisinin mekanizması açıklanmamıştır ve sadece birkaç tane hipotez öne sürülmüştür (Agorastos et al., 2008).

2.4.4. AAV: iyi güvenlik profili ancak düşük insort kapasitesi

AAV vektörleri başlangıçta çok umut verici olmuşlardır. AAV2 sıkça insanlarda bulunmasına rağmen şimdiye kadar insanlarda hiçbir hastalıkla ilişki göstermemiştir. Ancak, AAV2 vektörleri sadece 4.7 kb yabancı DNA'yı yerleştirebilir ve hedef hücreleri çok sınırlıdır. Bu vektörler ana virüsün bölge-spesifik entegrasyon yeteneğini kaybedip çoğunlukla epizomal şekilde kalıp bazen konak hücrenin genomuna rastgele entegrasyon özelliği gösteren ve uygulanmasından sonra maksimum transgen ekspresyonunu sağlamak için birkaç hafta zamana ihtiyaç duyan vektörlerdir. Bunlar üremek için Adeno- ya da Herpes-yardımcı virüslere ihtiyaç duyarlar ve herpes virüs olmadan yüksek titre ve saflıkta üretilmeleri çok zordur (Coutelle and Waddington, 2012).

Fetal dokularının hızlı hücre çoğalması nedeniyle AAV2 vektörlerinin beklenen ekspresyon düzeyine girmeden önce kaybolması çok açıktır, bu yüzden bu vektörler özellikle uterus içine gen transferi için uygun vektörler değildir (Douar et al., 1996). Postnatal gen tedavisinde bile, AAV vektörlerin ekspresyonu uzun zaman almaktadır. Saf vektörü yüksek titrede üretmek çok zor ve pahalıdır. AAV2 vektörü kullanılarak Hemofili B hastalığının tedavisinin ilk klinik denemelerine devam edilmemiştir çünkü vektör dizileri tedavi edilmiş hastanın germ hücrelerinde (semen, sperma) geçici olarak bulunmuştur ve hafif hepatotoksik immun reaksiyona neden olmuştur. Son yıllarda AAV vektörün etkisi ve üretilme durumu, sc vektörlerin üretiminin geliştirilmesi ile, AAV vektörlerin hücre tropizminin genişletilmesi ile, ve en önemlisi, AAV vektör üretimini iyileştirilmesi

ile dramatik bir şekilde değiştirilmiştir. Yetişkinlerde birkaç umut verici klinik deneme, bu vektör ile yürütölmektedir. Ancak, AAV vektörünün sınırlı kapasitesi, büyük gen dizilerinin transferi için hala önemli bir engel olarak kalmaktadır. Uterus içine AAV1 vektörü kullanımı ilk kez Pompe hastalığında kemirgen modelinde uygulanmıştır bunun yanısıra konjenital körlük, Mukopolisakaridosis tip VII, Duchenne musküler distrofisi (DMD) , ve Hemofili B için de uygulanmıştır. AAV2/8 uterus içine uygulanması olağanüstü etkili olmuş ve bu nedenle bu vektör erken başlangıçlı kas hastalıklarının tedavisi için mükemmel bir platform olarak düşünölmüştür. Yukarıda belirtildiği gibi AAV vektörleri hücre bölünmesi sırasında kaybolduğu için intrauterin kullanımı sınırlıdır. Ancak, toksisitesi olmadan yüksek titrelere verildiğinde bu ilerleyici kaybı telafi edebilir. İkinci trimesterin başlarında AAV2/5, AAV2/9, ve AAV2/10'un intratorasik veya intramiyokardiyal enjeksiyonu ile primatların kaslarında Lusiferazın CMV promoter kontrolünde uzamış ekspresyonu, insan faktörü IX cDNA'yı kodlayan AAV2/8 vektörlerin fetal enjeksiyonu ile koyunda ve makaklarda faktör IX'un uzamış ekspresyonu görölmüştür. Prenatal gen tedavisi fetusda transgenik terapötik proteine karşı tolerans kazanmasını sağlar, böylece gerektiğinde postnatal dönemlerde vektörün tekrar dozları verilebilir. Çok yakın zamanda, AAV2/9'un intravenöz verilmesi farelerde ve insan olmayan primatlarda merkezi ve periferik sinir sisteminin nöronlarına etkin bir gen transferini sağladığı gösterilmiştir. Şimdiye kadar AAV vektörlerin uterus içine uygulaması ile ilgili hiçbir yan etki raporlanmamıştır; ancak, β -glukuronidazı eksprese eden AAV vektörlerin yenidoğan farelerde kullanılmasından sonra hepatoselöler tümörler gözlemlenmiştir. Bu olayların mekanizmaları hala spekülatiftir, ancak diğer potansiyel vektör sistemleri gibi, insan fetus uygulamasına geçmek için uzun vadeli hayvan çalışmalarına ihtiyaç olduğunu belirtmemiz gerekir (Coutelle and Waddington, 2012).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Etik Onayı

Tüm deney hayvan çalışmaları, Ege Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'na başvurularak gereken izin ve onaylar alındıktan (etik onay no: 2014-019) sonra gerçekleştirilmiştir. Tüm Deney Hayvanları çalışmaları, Ege Üniversitesi İlaç Geliştirme & Farmakokinetik Araştırma-Uygulama Merkezi (ARGEFAR) Deney Hayvanları Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

Amerika'da bulunan Jackson Deney Hayvanları Laboratuvarı'ndan temin edilen, seksüel olgunluğa erişmiş ağırlıkları 23-30 gr arasında değişen ve *SMN*^{-/+}, *SMN2*^{+/+}, *SMN2Δ7*^{+/+} olan 005025 albino SMA dişi ve erkek fareler, %45-75 nem ve 24 °C'de, 12 saat aydınlık ve karanlık dönemlerle, serbest su ve gıda sağlanarak araştırmaya alınmıştır. Yem ve su günlük olarak değiştirilmiştir. Çalışma süresinde hayvanlar, kenarları sert plastik ve üstünde çelik ızgara bulunan özel kapalı havalandırma sistemi ile havalandırılan deney grubuna göre işaretlenmiş kafeslerde (19X12X12 cm) tutulmuştur. Fare kafeslerine yatak olarak ahşap talaşları konulmuştur.

Hayvanların sağlık durumu günlük olarak kontrol edilmiştir. Sağlıklı *wild* tipi olan *SMN*^{+/+}, *SMN2*^{+/+}, *SMNΔ7*^{+/+} dişi ve erkek fareler pilot çalışması için kullanırken, *SMN*^{-/+}, *SMN2*^{+/+}, *SMN2Δ7*^{+/+} heterozigot dişi ve erkekler ana çalışmada kullanılmıştır.

3.2. Yenidoğan farelerinin genotiplendirilmesi

Farelerin genotiplendirme analizi için kullanılan DNA örnekleri, 6 mm kuyruk ya da kulak (yeni doğanlar için 2 mm) biyopsi örneklerinden, invitrogen DNA izolasyon kiti kullanılarak elde edilmiştir. Örnekler steril bistüri ya da küçük cerrahi makası kullanılarak kesilip işaretlenmiş steril 1.5 ml'lik tüplere konularak DNA izolasyonu için hemen laboratuvara getirilmiştir yada çalışmaya kadar -80°C'de saklanmıştır.

Genotiplendirme analizi için farelerin *SMN1* geni açısından mutant ya da *wild* tip olduğunu, 5'-CTC CGG GAT ATT GGG ATT G-3' forward primeri, 5'-GGT AAC GCC AGG GTT TTC C-3' Revers Mutant primeri ve 5'-TTT CTT CTG GCT GTG CCT TT-3' Revers *Wild* tip primeri kullanarak, AmpliTaq Gold 360 Master Mix Kiti (AB Applied Biosystems, CA, USA) ile, PCR yöntemi ile araştırılmıştır. PCR tüplere 6.25 µl Master Mix, 1 µl Forward primer, 0.75 µl Revers *Wild* tip primeri, 0.38 µl Revers Mutant primeri, 3 µl ddH₂O ve 60 ng DNA eklenerek toplam 12 µl PCR karışımı hazırlanmıştır. PCR koşulları ise Çizelge 3.1.'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. PCR programı.

Step	Sıcaklık (°C)	Aralık (Süre)	Döngü
Denaturasyon	94	11 dk	1
Denaturasyon	94	30 sn	} 35
Yapışma	58	1 dk	
Uzama	72	1 dk	
Son Uzama	72	7 dk	1
Bekleme	4	Analiz zamanına kadar	

PCR ürünleri %1.5 gel üzerinde yürütülerek görüntülenmiştir.

3.3. AAV vektörlerin üretilmesi

Bu çalışmada kullanılan tüm AAV9 vektörleri Gao laboratuvarında, Horae Gen Tedavi Merkezinde, Massachusetts Üniversitesi Tıp Fakültesi, Worcester, MA, ABD'de, daha önceki çalışmamızda açıklandığı gibi üretilmiştir (Rashnonejad et al., 2016a). ss ve scAAV9-SMN vektörleri ise bu proje kapsamında üretilmiştir. scAAV9-eGFP ise hediye olarak Gao laboratuvarı tarafından temin edilmiştir.

3.3.1. Gereken plazmidlerin klonlanması

Bu çalışmada, kullanılan plazmidler PubMed ve Ensembl DNA ve protein veri tabanları kullanılarak, Vektör NTI programı (Invitrogen) ile tasarlanmıştır. Homo sapiens survival of motor neuron 1 (*hSMN1*, NCBI Reference Sequence: NM_000344.2) cDNA sekansı (CDS) bu çalışmada kullanılmıştır. Tam uzunlukta olan SMN cDNA'sı ve onun spesifik UTR'larını içeren plazmid, pCMV6-XL5-SMN (OriGene, SC128237, Rockville, MD, USA), hazır olarak satın alınmıştır. Satın alınmış SMN cDNA dizisinin doğruluğu DNA veri tabanları kullanılarak DNA Blast yöntemi ile kontrol edilmiştir. SMN cDNA'sı restriksiyon enzimleri ile kesilip pAAV-CB6-PI (4409 bp) yada pAAVsc-CB6-PI plazmid'lerde (Gao's Lab., Gene Therapy Center, UMass Medical School, Worcester, MA, USA) klonlanmıştır. pAAV-CB6-PI plazmidinde klonlanan SMN cDNA'sı genin özel UTR'larını içerir iken, pAAVsc-CB6-PI plazmidinde klonlanan SMN cDNA'sı genin özel UTR dizilerini içermemektedir. Plazmidler ampisiline dirençli geni taşımaktadır.

ss ve scAAV-SMN cis-plazmidleri aşağıdaki yöntemle elde edilmiştir;

ssAAV9-SMN Cis plazmid;

ss viral vektörün üretilmesi için gereken cis-plazmidin backbone'unu elde etmek için 1 µg pAAV-CB6-PI plazmid DNA'sı steril 1.5 µl'lik tüpe eklenmiştir. Tüpe, 1 µl EcoRI ve KpnI (New England Biolabs, MA, USA) restriksiyon enzimleri eklenerek 37°C su banyosunda 1 saat bekletilmiştir. UTR'larını içeren SMN cDNA'sını elde etmek için pCMV6-XL5-SMN plazmidine ise başka steril 1.5'lik tüpe eklenerek üzerinde 1 µl NotI (New England Biolabs, MA, USA) restriksiyon enzimi ilave edilip 37°C su banyosunda 1 saat bekletilmiştir. Kesilmiş plazmidler %1 agaroz gel üzerinde yürütülmüştür. pAAV-CB6-PI ile ilgili 4393 bp ve UTR'ları içeren SMN cDNA ile ilgili 1629 bp DNA bantları QIAquick gel extraction kiti (Qiagen, Boston, MA, USA) kullanılarak agaroz jelden izole edilmiştir.

scAAV9-SMN Cis plazmid;

sc viral vektörün üretilmesi için gereken cis-plazmidin backbone'unu elde etmek için 1 µg ng/µl pAAVsc-CB6-PI plazmid DNA'sı steril 1.5 µl'lik tüpe eklenmiştir. Tüpe, 1 µl AgeI and SacI (New England Biolabs, MA, USA) restriksiyon enzimleri eklenerek 37°C su banyosunda 1 saat bekletilmiştir. UTR'larını içeren SMN cDNA'sını elde etmek için pCMV6-XL5-SMN plazmidi ise başka steril 1.5'lik tüpe eklenerek üzerine 1 µl Bgl II (New England Biolabs, MA, USA) restriksiyon enzimi ilave edilip 37°C su banyosunda 1 saat bekletilmiştir. Kesilmiş plazmidler %1 agaroz jel üzerinde yürütülmüştür. pAAVsc-CB6-PI ile ilgili 4339 bp ve UTR'ları içeren SMN cDNA ile ilgili 937 bp DNA bantları QIAquick gel extraction kiti (Qiagen, Boston, MA, USA) kullanarak agaroz jelden izole edilmiştir.

Ligasyon;

Elde edilmiş bütün DNA fragmanları QIAquick PCR purifikasyon kiti (Qiagen, Boston, MA, USA) ile saflaştırılmıştır. DNA örneklerinin kalite ve miktarları NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, MA, USA) ile ölçülmüştür. Daha sonra DNA örneklerinin her birinden 100 ng %1'lik agaroz jel üzerinde yürütülerek DNA fragmanlarının saflığı ve kaliteleri kontrol edilmiştir. T4 DNA Ligaz enzimi (New England Biolabs, MA, USA) ligasyon reaksiyonu için kullanılmıştır. Bir tüpe 25 ng plazmid DNA, 25 ng insort DNA, 1 µl ligasyon buffer (NEB), ve 0,5 µl T4 ligaz enzimi eklenerek karıştırılmıştır. ddH₂O eklenerek son hacim 10 µl'ye tamamlanmıştır. Ligasyon karışımı 16 saat 37°C'de inkübe edilmiştir. Ertesi gün Kompatent *Escherichia coli* DH5α (ThermoFisher Scientific, 18258012) bakteriler, ligasyon karışımı ile transforme edilmiştir.

Elde edilmiş plazmidleri bakterilerde çoğaltmak

Hazır olarak satın alınmış Kompatent *Escherichia coli* DH5α (ThermoFisher Scientific, 18258012) bakterileri plazmidlerin klonlanması için kullanılmıştır. Buz üzerinde 16 saatlik 10 µl ligasyon karışımı kompetent DH5 α bakterilere aktarılmıştır. Bakteriler üzerine 900 ml S.O.C medyumu eklenmiştir ve 37°C'de

çalkalayıcı üzerinde 1 saat bekletilmiştir. Bakteriler 100 µg/ml ampicillin (Sigma, A5354) içeren *Terrific broth* (TB) agar plate'lere aktarılmıştır. Plateler 37°C'de 16-18 saat inkübe edilmiştir. QIAprep spin miniprep kiti (Qiagen, Boston, MA, USA) kullanılarak her bir plate'in 20 kolonisinden plazmid izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilmiş plazmidlerin yapıları restriksiyon enzim analizi ve DNA dizi analizi ile kontrol edilmiştir. DNA dizi analizi ticari olarak McLab (CA-USA) tarafından gerçekleştirilmiştir (<http://www.mclab.com/>). DNA dizi analizi için kullanılan primer dizileri Çizelge 3.2.'de gösterilmiştir. Cis-plazmid'de yer alan AAV vektörün Ters uç tekrarları (*inverted terminal repeats*, ITR)'larının bütünlüklüğü Sma I ve Ava I enzimleri ile kontrol edilmiştir.

Çizelge 3.2. Elde edilmiş plazmidlerin dizi analizinde kullanılmış primerler.

Plazmid	Primer adı	Dizi
pAAV-CB6-PI-SMN	Sv40intron-f	TATCAAGGTTACAAGACAGGTTT
	SMN1-R	GTTACCCATTCCACTTCCTT
pAAVsc-CB6-PI-SMN	g629-861-f	TGACACCTACTCAGACAATG
	g562-5041-r	CTGCTCCTCAGTGGATGTTG

3.3.2 Plazmidlerde klonlanmış *SMN* gen ekspresyonunun western blot yöntemi ile araştırılması

Transfeksiyondan 24 saat önce 1×10^5 HEK293 hücreleri 6 well'lik platelerin her bir kuyucuğuna eklenip 37°C'de inkübe edilmiştir. Hücreler %50 yoğunluğuna geldiğinde *Lipofectamine 2000* kiti (invitrogen, 11668-019) kullanılarak elde edilmiş plazmidler ile transfekte edilmiştir. 2 ayrı tüpe 150 µl optimem eklenmiştir, tüplerden birine 6 µl *Lipofectamine 2000* ve diğerine 3 µg plazmid DNA'sından eklenip vorteks ile karıştırılmıştır. Bir tüpün içerisindeki karışım diğer tüpe damla damla eklenip vorteks ile karıştırılmıştır. Oda sıcaklığında, hücre kültür kabininde 15 dakika bekletilip damla damla hücrelere eklenmiştir. Hücreler 48 saat 37°C'de inkübe edilmiştir. Daha sonra kuyucuktaki besi ortamı uzaklaştırılarak 2.5 ml 1X PBS eklenmiştir. Üç kere pipetlenerek hücreler kaldırılmış ve PBS içerisinde steril 1,5'lik tüplere aktarılmıştır. 2500X g'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Hücre pelleti üzerinde *protease inhibitor cocktail'i* (Roche) içeren 100 µl RIPA

(Thermoscientific) buffer eklenerek 6 kere pipetlenmiştir. 40 dakika buz üzerinde bekletilmiştir ve hücrelerin daha iyi parçalanması için inkübasyon sırasında 4-5 kere vorteks ile karıştırılmıştır. Ultrasantrifüjde 27000X g'de, +4°C'de santrifüj edilmiştir. Süpernatant toplanıp yeni steril 1.5'lik tüplere aktarılmıştır ve western blot analizi yapılana kadar -80°C'de saklanmıştır.

3.3.3 AAV9 viral vektörlerinin üretilmesi

Bu çalışmada kullanılan rAAV9 vektörlerin üretilmesi için üçlü geçici transfeksiyon yöntemi kullanılmıştır (Gao and Sena-Esteves, 2012). HEK 293 hücrelerin çoğalması için %10 FBS, %1 pen-strep, %1 L-glutamin içeren DMEM kullanılmıştır.

Transfeksiyondan 24 saat önce HEK293 hücreleri 40 adet 15 cm'lik petri kaplar içinde kültüre ekilmiştir. Petri kabı başına 7×10^6 HEK293 hücresi eklenip üzerine 20 ml besi ortamı eklenmiştir. Hücreler %70-80 yoğunluğa geldiğinde plazmidler ile transfeksiyonu gerçekleştirilmiştir.

- 1- Transfeksiyon gününde besi ortamı yenilenmiştir.
- 2- Transfeksiyon karışımı aşağıdaki protokole göre 125 ml'lik kap içinde hazırlanmıştır;

Steril-Ultra saf su	Son hacim 54 ml'ye tamamlayana kadar
CaCl ₂ (2.5M)	5,2 ml
pΔF6 adeno yardımcı plazmidi	1040 (Gao lab)
trans plazmid	520 µg (Gao lab)
Cis plazmid	520 µg (bu çalışmada üretilmiştir)

- 3- 50 ml'lik falkon içine 12,5 ml 2X HBS eklendi. Her birisine 4. basamaktaki DNA karışımından 12,5 ml eklendi. Vorteks ile iyice karıştırıldıktan sonra 5 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir.

4- Beşinci basamakta hazırlanan karışımdan 2,5 ml damla damla her bir hücre kültür petri kabına eklenmiştir.

5- Platelere 37°C'de, %5 CO₂ ile inkübe edilmiştir

6- Transfeksiyondan 6 saat sonra besi ortamı yenilenmiştir.

7- Transfeksiyondan 72 saat sonra hücreler hücre kazıyıcı (*scraper*) ile kaldırılmıştır.

8- Bütün platelerinin hücre süspansiyonu tek bir 500 ml'lik santrifüj kabına aktarılmıştır.

9- 4000 rpm'de 4°C'de 20 dakika santrifüj edildikten sonra süspansiyon uzaklaştırılmıştır.

10- Hücre pelleti üzerinde 15 ml 50 mM Tris (pH 7.4), 1mM MgCl₂ içeren buffer eklenmiştir. Hücreler 50 ml'lik falkona aktarılmıştır.

11- Hücreler buz üzerinde %25 gücü ile 1 dakika sonike (*sonicate*) edildi. Bu işlem iki kere 2 dakika aralık ile tekrar edilmiştir.

12- 150 µl *Benzonase* (EMD Chemical, Gibbstown, NJ) (Son konsantrasyon 100 U/ml) eklenip yavaşça alt üst edilerek iyice karıştırılmıştır.

13- 37°C'de 20 dakika bekletilmiştir.

14- 1.25 ml %10 deoksikolik asit eklenip karıştırılmıştır.

15- 37°C'de 10 dakika bekletilmiştir.

16- 20 dakika buz üzerinde bekletilmiştir.

17- 4000 rpm'de ve 4°C'de 30 dakika santrifüj edilmiştir.

- 18- Her 1 ml hücre lizatı başına 0,454 g ultra saf CsCl eklenmiştir.
- 19- Alt üste edilerek iyice karıştırılmıştır.
- 20- 9 ml ağır ve 9 ml hafif CsCl solüsyonlarından, sırasıyla SW28 santrifüj tüplere aktarılmıştır.
- 21- 20 ml hücre lizatından CsCl kromatografi sütü üzerine eklenmiştir.
- 22- 25000 rpm'de 15°C'de 20 saat santrifüj edilmiştir.
- 23- Santrifüjden sonra SW28 santrifüj tüpü dik olarak sabitlenmiştir ve 18 gauge iğne ile tüpün alt kısmına girilmiştir.
- 24- İlk 11 ml gradiyan solüsyonu alındıktan sonra geri kalan atılmıştır.
- 25- Geri kalan 16 ml için her bir 1ml'si ayrı bir 1,5 ml'lik tüpe alınmıştır. Her bir tüpten 5 µl alınıp refraksiyon (*refraction*) indeksi refraktometre (*refractometer*) ile okutulmuştur. Refraktif indeksi 1.3650-1.3760 olan tüplerin rAAV vektör içerdiği kabul edilmiştir. Diğer tüpler atılmıştır.
- 26- İkinci CsCl gradiyanı yapılması için uygun indeksini gösteren tüm tüpler birleştirilmiştir ve 70.1 *Ti Quick-Seal* santrifüj tüplere aktarılmıştır.
- 27- Üzerine 1.4 g/ml CsCl içeren hafif CsCl solüsyonu eklenmiştir.
- 28- 60,000 rpm'de 15°C'de 24 saat santrifüj edilmiştir.
- 29- 18 guage iğne ucu ile tüpün altına girilerek ilk 13 ml gradiyan solüsyonu toplanıp her bir ml ayrı bir 1.5 ml'lik tüpe eklenmiştir. Her bir tüpten 5 µl alınıp refraksiyon indeksi refraktometre ile okutulmuştur. Refraktif indeksi 1.3650-1.3760 olan tüpler rAAV vektör içerdiği kabul edilmiştir. Diğer tüpler ise atılmıştır.
- 30- 3. CsCl gradiyanı için 28-31. basamaklar tekrarlanmıştır.

- 31- Toplanan en son virüsler *Slide-A-Lyze* kaseti (invitrogen) ve diyaliz cihazı kullanılarak tuzları uzaklaştırılmış ve saflaştırılmıştır.
- 32- Diyalizden çıkan son ürünü 15 ml'lik falkon içine alınmıştır.
- 33- Elde edilmiş vektörün saflığı ve kalitesi elektron mikroskobu kullanılarak ve SDS-PAGE gümüş boyama yöntemleri ile kontrol edilmiştir.
- 34- Elde edilmiş rAAV vektörler -80°C 'de saklanmıştır.

3.3.4 Elde edilen rAAV vektörlerinin kalitesi ve saflığının incelenmesi

Elde edilen viral vektörlerin morfolojilerini ve dolu ya da boş olduklarını incelemek için *transmission electron microscopy* analizi ticari olarak UMass Tıp Fakültesi Elektron Mikroskopi Merkezinde (Worcester, MA, ABD) yapılmıştır. Elektron mikroskobik görüntülerinde merkezleri koyu renkte olan bazı virüs partikülleri boş veya kısmen paketlenmiş kapsidleri gösterir iken tamamen beyaz olan viral partikülleri dolu vektörleri göstermektedir (Gao and Sena-Esteves, 2012). ITR dizileri ve paketleme sinyalleri içermeyen trans-plazmid ve yardımcı-plazmidler, genomlarını hücrelerde üretilmiş yeni kapsidlere aktaramazlar.

AAV viryonlarının ana kapsid proteinleri VP1, VP2 ve VP3'dür. Yüksek düzeyde saflaştırılmış AAV vektörleri, SDS-PAGE jelinde ayrıştırıldığında ve gümüş boyama yöntemi ile görünür hale getirildiğinde normalde sadece 87, 73 ve 62 kD ağırlığında olan bu 3 kapsid proteinleri sırasıyla 1: 1: 18 oranında görülmektedir. Elde edilen yeni bir viral vektörün konsantrasyonunun yarı kantitatif tahmini, VP1, VP2 ve VP3 proteinler ile ilgili bantların bilinen referans standartla karşılaştırılmasıyla elde edilebilmektedir (Gao and Sena-Esteves, 2012).

SDS-PAGE gümüş boyası ve qPCR analizleri ise UMass Tıp Fakültesi Gen tedavisi Merkezinde, Vektör Üretme Merkezi (Gao lab, Worcester, MA, ABD) tarafından yapılmıştır. Virüsün saflığı gümüş boyama analizinde viral kapsid proteinlerinin incelenmesi ile belirlenmiş iken, elde edilen viral vektör titreleri ve genom kopya sayısı ise Real-Time qPCR ile belirlenmiştir.

3.4. SMA fibroblast hücre hattının rAAV9-SMN vektörleri ile transfeksiyonu

Transfeksiyon işleminin 24 saat öncesinde 1×10^6 hücre 6 kuyucuklu plate'in her bir kuyucuğuna kültüre edilmiştir. Hücreler %70 yoğunluğa geldiğinde *multiplicity of infection* (MOI) değerine göre 10^6 virus/hücre oranında ile transfekte edilmiştir. Hücreler 37°C 'de %5 CO_2 içeren inkübatör içinde inkübe edilmiştir. 7 gün sonra SMN protein ekspresyonu florasan mikroskopu ve qRT-PCR yöntemi ile incelenmiştir.

3.5. Intrauterin (IU) enjeksiyon

Dişi ve erkek fareler 1 dişi/1 erkek ya da 3 dişi/1 erkek olarak çiftleşmeye bırakılmıştır. Çiftleşmenin sonraki gününde, dişi fareler kontrol edilmiş ve vajinal plak görülen fareler işaretlenmiştir. Vajinal plağın görüldüğü gün gebeliğin birinci günü olarak kabul edilmiştir. Gebeliğin 14-15. gününde (Embriyonik 14-15. gün, E14-15) intrauterin enjeksiyon gerçekleştirilmiştir. Gebeliğin 14-15. gününde, dişi fareler solunum yoluyla verilen izofluran (%2 izofluran + %6 oksijen) ile anestezi altına alınmıştır. Anestezi öncesinde ve sonrasında bir analjezik olan Meloksikam subkutan yolla ya da içme suyu içinde verilmiştir. Cerrahi sırasında korneaları nemli tutmak için gözlere oftalmik merhem uygulanmıştır. Ameliyattan hemen önce farelere 2 mg/kg Meloksikam subkutan yolla uygulanmıştır. Farelerin karın bölgesi tıraş edilip alkol ve batikon ile sterilize edilmiştir. Steril koşullar altında karın bölgesinde orta hatta 2 cm laparotomi yapılarak uterus boynuzları dışarıya çıkartılmıştır. Uterus boynuzu başına embriyo sayısı hesaplanmıştır. Bütün enjeksiyonlar steril 34-guage Hamilton iğneleri ile gerçekleştirilmiştir. Intrauterin ICV enjeksiyonu için 2 μl (4×10^{10} vektör genomu kopyası, vgk) scAAV9-eGFP, ya da 2 μl (4×10^{10} vektör genomu kopyası, vgk) ssAAV9-SMN ya da 4 μl (4×10^{10} vgk) scAAV9-SMN, embriyonun bir lateral ventrikülünün (LV) içine enjekte edilmiştir. Lateral ventrikülü bulmak için kafatasında lambda ve orta hattın 1-2 mm uzaklıkta enjeksiyon yapılmıştır. Enjeksiyon doğruluğunu incelemek için bazı embriyolara rAAV9-SMN ile birlikte %0.5 FastGreen (Sigma) boyası karıştırılıp verilmiştir. Enjeksiyon uygun olarak yapılabilmiş ise rengin iki hemisferde hilal şeklinde dağıldığı gözlenmiştir. IP enjeksiyonu için, 5 μl (1×10^{11} vg) plasenta içine

enjekte edilmiştir. Embriyolar üzerlerine 37°C PBS ile ıslatılarak cerrahi sırasında nemli tutulmuşlardır. Enjeksiyon işlemleri bittikten sonra embriyolar nazikçe karın boşluğuna yerleştirilmiştir. Karın boşluğu 100 mg/kg sefazolin içeren 1 ml ılık PBS ile doldurulduktan sonra kas ve deri insizyonu 0.5 emilebilen dikiş ile kapatılmıştır. Gebe farenin vücut sıcaklığını korumak ve hipotermiyi önlemek için, fareler cerrahi sırasında *Deltaphase Isothermal Pad* (Braintree scientific Inc.) üzerinde tutulmuşlardır. Ağrı kesici olarak cerrahiden sonra 3 gün boyunca içme suyuna 1.5 mg/kg Meloksikam eklenmiştir. Cerrahi olmuş gebe fare ayrı bir kafese konularak doğuma kadar sağlık durumu düzenli olarak kontrol edilmiştir.

Wild tip erkekler ile çiftleştirilmiş 6 adet *wild* tip dişi dişi pilot çalışma için kullanılmıştır. Pilot çalışmada scAAV9-eGFP vektörün beyin, Omurilik ve iç organlarda dağılımını incelemek ve gen tedavisi çalışması için en iyi enjeksiyon yolunu belirlemek amacıyla vektör fetüslere E14-15. günde intraserebroventriküler (ICV) ve intraplasental (IP) yolla aktarılmıştır. Pilot çalışmada kontrol olarak bazı fetüsler sadece PBS ile enjekte edilmiştir.

Asıl gen tedavisi çalışmasında heterozigot erkek fareler ile çiftleştirilmiş heterozigot 59 adet gebe dişi fareler çalışmaya dahil edilmiştir.

3.6. eGFP ekspresyonunun canlı hayvan görüntüleme cihazı (IVIS) kullanılarak incelenmesi

Embriyonik dönemde enjeksiyon yapılmış yeni doğan farelerin farklı dokularında eGFP ekspresyonu, P1 ve P14. günlerde izofluran anestezi altında canlı hayvan görüntüleme sistemi (IVIS Spectrum imaging system, Caliper Life Sciences, USA) ile görüntülenmiştir. eGFP floresanını algılamak için cihazın GFP filteri kullanılarak eGFP ekspresyonu 465 nm - 560 nm dalgaboyutlarında farelerin farklı organlarında görüntülenmiştir. Her bir görüntüyü almak için hayvanlar 0.2 saniye uygun dalga boylara maruz kalıp *Living Image program version 4.5.2* programı kullanılarak otomatik olarak fotoğraflar çekilmiştir.

3.7. Kardiyak perfüzyon

Yenidoğan fareler analiz edilene kadar anneleri ile aynı kafes içinde bırakılmıştır. Pilo çalışması için P30 ve asıl gen tedavi çalışması için P14 ya da P90 günlerde sakrifiye edilerek doku histolojisi ya da gen ekspresyon analizleri gerçekleştirilmiştir. 250/150 mg/kg Ketamin/kesilazin ile ağır anestezi altında olan farelerin derisi karın bölgesinden başlayarak diyaframa kadar açılmıştır. Cerrahi makası ile göğüs kafesinin tabanı ve kaslar kesilmiştir. Daha sonra diyafram kesilerek göğüs kafesine ulaşılmıştır. Göğüs kafesinin kaburga kemikleri sağ ve sol kenarlarından kesilmiştir. Kaburgalar ve ksifoid yukarıya doğru kaldırılarak göğüs boşluğu açılmıştır. Böylece kalp perfüzyonu değerlendirebilmek için görülebilir hale getirilmiştir. Kalp kontraksiyonları devam eder iken 26 guage iğne ucu ile sol ventriküle (*protrusion*) girilmiştir. 25,000 U/l Heparin içeren 1X PBS yavaşça enjekte edilmiş ve kalp ve vücuda dağılması sağlanmıştır. Kan ve yıkama solüsyonlarının vücuttan dışarıya akabilmesi için cerrahi makas ile atriyum kesilmiştir. Çıkan kan tamamen temizleyene kadar PBS ile yıkamaya devam edilmiştir. Perfüzyon un uygunluğunu değerlendirmek amacıyla karaciğerin renginin açılıp sare rengine dönüşmesi gözlemlenmiştir. Doku fiksasyonunu sağlamak için 50 ml 1X PBS sonrasında 50 ml %4 paraformaldehid (PFA) solüsyonu verilmiştir. Daha sonra beyin, omurilik ve kas gibi incelenmesi gereken dokular çıkarılmış ve %4 PFA içinde doku büyüklüğüne göre 1-2 gün +4°C'de bekletilmiştir.

3.8. Frozen doku kesitleri (*cryosectioning*)

PFA solüsyonunun uzaklaştırılması için dokular 1X PBS içinde yarım gün 4°C'de bekletilmiştir. Daha sonra dokular %30 sükröz içinde konularak çökünceye kadar 4°C'de bekletilmiştir. Dokular istenilen pozisyonda *OCT Tissue-Tek compound* (Sakura Finetek, Torrance, CA) içinde gömülüp sıvı azot içinde dondurulduktan sonra kesilinceye kadar -80 °C'de saklanmıştır. 15 µm doku kesitleri *Cryostat* (Microm HM 560 Cryostat, Thermo Fisher Scientific™ Inc., Germany) cihazı kullanılarak kesilmiş ve farklı boyamalar için kullanılmıştır.

3.9. Parafin doku takip işlemleri

Kasların histolojisini incelemek için parafin doku takibi uygulanmıştır.

- 1- 30'er dakika %80'den %100'e artan etil alkol serilerinden geçirilmiştir (dehidratasyon amacıyla).
- 2- Örnekler 10-20 dakika ksilen içinde şeffaflaştırma amacıyla bırakılmıştır.
- 3- 45'er dakika 2 kez parafin ile 60°C'lik etüvde immersiyonu sağlanmıştır.
- 4- Blok kaplarına alınarak parafin içinde gömülmüş ve oda sıcaklığında tamamen kapanıncaya kadar bırakılmıştır.
- 5- 5 µm'lik doku kesitleri mikrotom ile alınmıştır.

3.10. Hematoksilen eozin boyaması

- 1- 5 µm'lik parafin kesitleri deparafinizasyon işlemi için 1 gece 60°C'lik etüvde bırakılmıştır.
- 2- Onar dakika 3 kez ksilene tabi tutulmuştur. En son ksilenden çıkan doku örnekleri oda sıcaklığında iyice kurulmuştur.
- 3- 2'şer dakika %100'den %80'e azalan alkol serilerinden geçirilerek rehidratasyon işlemi yapılmıştır.
- 4- 5 dakika distile su ile yıkanmıştır.
- 5- Hematoksilen (Dako) ile 2.5 dakika boyanmıştır.
- 6- Boyanın fazlasının uzaklaştırılması için 5 dakika akan suda yıkanmıştır.
- 7- Pembe renge dönene kadar asit alkol içine batırılıp çıkartılmıştır.
- 8- Kesitler 5 dakika akan su ile yıkanmıştır.

9- 2 dakika Eozin (Dako) boyası ile boyanmıştır.

10- Sırasıyla % 95 ve %100'lik alkol serilerinden geçirilip havada kurutulmuştur.

11- Kesitler 10'ar dakika 3 kez ksilende tutulmuştur.

12- Kesitler entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapatılmıştır.

3.11. Doku kesitlerinin floresan mikroskobik analizi

1- Doku kesitleri *Silane adhesive coated slide'ler* (Isotherm) üzerine aktarılmış ve oda sıcaklığında 1 saat kurutmaya bırakılmıştır.

2- Kesitler 1X PBS içinde 30 dakika bekletildikten sonra %2 *Triton-X100* (Fisher, Pittsburg, PA) ve %0.5 *Tween 20* (Bio-Rad, USA) içeren PBS içinde 30 dakika oda sıcaklığında permeabilizasyon için tutulmuştur.

3- Spesifik olmayan antijen/antikor bağlamalarını önlemek için kesitler 1 saat oda sıcaklığında %4 BSA (Sigma) ve %1 *Triton-X100* içeren PBS içinde inkübe edilmiştir.

4- Kesitler daha sonra 1/1000 rabbit anti-GFP (abcam, ab6556), 1/250 goat anti-GFAP (abcam, ab53554), 1/500 rabbit anti-NeuN (abcam, ab104225), 1/50 goat anti-ChAT (EMD Millipore, AB144P), 1/200 rabbit anti-Nestin (sigma, N5413), 1/200 monoklonal Mouse anti SMN ya da monoklonal Mouse anti coilin 2 (Santacruz) primer antikorlarda 4 °C'de 18-20 saat inkübe edilmiştir.

5- Doku kesitleri 3 kere 30'ar dakika %0,5 Triton X-100 ve % 0,2 Tween 20 içeren PBS ile yıkanmıştır.

6- Kesitler daha sonra 1/200 dilue edilmiş goat anti rabbit Alexaflor 488 (abcam, ab150081), goat anti rabbit Alexaflor 594 (abcam, ab150084), donkey anti goat Alexaflor 594 (abcam, ab150140), goat anti Mouse Alexaflor 586

(Thermoscientific), goat anti Mouse Alexaflor 488 (abcam) sekonder antikoları ile 4°C’de 18-20 saat boyunca inkübe edilmiştir.

7- Doku kesitleri 3 kere 30’ar dakika %0,5 *Triton X-100* ve %0.2 *Tween 20* içeren PBS ile yıkanmıştır.

8- Kesitler *4',6-diamidino-2-phenylindole* (DAPI) içeren *Vectashield mounting media* (Vector Laboratories, Burlingame, CA) ile kapatılıp *Olympus florasan mikroskobu* (Olympus, Tokyo, Japan) ile incelenmiştir.

9- eGFP eksprese eden nöronları ya da omurilikteki motor nöron sayılarını hesaplamak için her bir farenden 4 adet ayrı doku kesiti kullanılmıştır.

3.12. Eembriyonik dönemde scAAV9-eGFP enjeksiyonu yapılan fare beyinlerinden nöral kök hücre (NKH) izolasyonu

Nöral kök hücre (NKH) izolasyonu için daha önce Azari et al. (2011) tarafından açıklanmış yöntem değiştirerek kullanılmıştır. NKH’ler 3-4 haftalık farelerden izole edilmiştir. 250/150 mg/kg Ketamin/kesilazin ile ağır anestezi altında olan farelerin kafa derileri %70 alkol ile temizledikten sonra makas ile kesilmiştir. Steril koşullarında kafa derisi ve kafatası kesilerek açılmıştır. İnce uçlu bir pens yardımıyla kafa tabanındaki kemikler nazikçe soyuldu ve beyin tek parça şeklinde çıkarılıp PBS ile yıkandıktan sonra %1 Pen-Strep içeren DMEM-F12 içinde konulmuştur. Bütün beyin çıkarıldıktan sonra 3 kere yukardaki besi ortamı ile yıkanmıştır. Beyinler steril bir petri kabına alınmıştır. *Dorsal* görüntüden beyaz renkli optik kiyazmaların olduğu yerden kesilerek LV’lerin etrafındaki dokular çıkarılmıştır. Çıkarılan dokular bistüri ile iyice parçalanıp 250/ml DNase I (Qiagen) içeren 1 ml %0,05 Tripsin-EDTA içinde 37°C’de 7 dakika inkübe edilmiştir. 300X g’de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Hücreler steril bir tüpe alınarak 1000 µl’lik pipet ucu yardımıyla 4-6 kere pipetlenmiştir. Daha sonra 15 ml besi ortamı eklenip 40 µm’lik hücre süzgecinden geçirilmiştir. 300X g’de 5 dakika santrifüj edildikten sonra hücreler 500 µl, %5 FBS, %1 pen-strep, %1 L-glutamin, 2µg/ml Heparin, 20 ng/ml FGF-2, 20 ng/ml EGF ve glutamax içeren DMEM-F12 büyüme ortamı içinde

12 well'lik plate içinde kültüre edilmiştir. Hücreler koloni oluşuncaya kadar 37°C'de %5 CO2 ile inkübe edilmiştir. Besi ortamı 3 günde bir yenilemiştir.

3.13. Real Time PCR analizi

Total RNA izolasyonu;

Steril koşullarda 200 mg doku örnekleri alınarak 1 ml TRizol (ThermoFisher Scientific, 15596018) içinde buz üzerinde laboratuvara aktarılmıştır. Total RNA izolasyonu için doku örnekleri ilk önce sonikasyon yöntemi ile (maksimum güçte 5 saniye, 2 döngü) homojenize hale getirilmiştir. 5 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 200 µl kloroform eklenmiş ve 15 saniye vorteks ile karıştırılmıştır. 3 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. 12000 g'de 4°C'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. En üst şeffaf tabakası steril bir tüpe alınıp 400 µl %70 etanol eklenerek 15 saniye vorteks ile karıştırılmıştır. Bütün karışım RNA izolasyon sütununa eklenerek 12000Xg 'de 15 saniye santrifüj edilmiştir. DNA'ların parçalanması için 100 µl DNase I enzimi eklenerek 15 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Üzerine 500 µl yıkama solüsyonu I (Roche, 11828665001) eklenip 12000X g'de 15 saniye santrifüj edilmiştir. Bu işlem yıkama solüsyonu II ile tekrar edilmiştir. Filtre boş şeklinde 12000X g'de 3 dakika çevrilmiştir. Daha sonra filtreye steril 1,5'lik tüpe konulmuş ve 50 µl su filtreye eklendikten sonra 14000X g'de santrifüj edilerek total RNA'lar toplanmıştır. İzole edilmiş total RNA'ların miktar ve saflıkları Nanodrop kullanılarak ölçülmüştür.

cDNA sentesi;

1 µg (12 µl) izole edilmiş total RNA'lar komplementer DNA (cDNA) sentezlenmesi için kullanılmıştır. cDNA sentezlenmesi için *Transcriptor first Strand cDNA Synthesis kiti* (Roche) kullanılmıştır. Kitin protokolüne göre total RNA'dan cDNA elde etmek için iki basamaklı bir çalışma protokolü uygulanmıştır.

İlk basamakta tüplere aşağıdaki karışım eklenmiş ve 65°C'de 10 dakika denatüre edilmiştir;

Total RNA	12 µl
<u>Anchored-oligo (dT)₁₈ Primer, 50 pmol/µl</u>	<u>1 µl</u>
Toplam	13 µl

Daha sonra, aynı tüplere aşağıdaki maddeler eklenip 55°C'de 30 dk, 85°C'de 5 dk ve 4°C'de 5 dk revers transkripsiyon işlemi gerçekleştirilmiştir;

<i>Transcriptor Revers Transcriptase Reaction Buffer, 5×</i>	4 µl
<i>Protector RNase Inhibitor, 40 U/µl</i>	0.5 µl
<i>dNTP Mix, 10 mM each</i>	2 µl
<u><i>Transcriptor Revers Transcriptase, 20 U/µl</i></u>	<u>0.5 µl</u>
Toplam	7 µl

Toplam hacmin 13+7 µl = 20 µl olması sağlanmıştır.

cDNA ürünü kısa süre için 4°C'de ve uzun süre için -20°C'de saklanmıştır.

RT-PCR karışımının hazırlanması

eGFP gen ekspresyonu eGFP için spesifik primer ve problemleri içeren *TaqMan Gene Expression Assays Kit* (ThermoFisher scientific, 4331182, Mr03989638_mr) kullanılarak hesaplanmıştır.

Fare gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz (Mm-GAPDH) genine spesifik prob ve primerleri içeren *TaqMan gene expression kiti* (ThermoFisher scientific, 4331182) kullanılmıştır.

SMN gen ekspresyonunu incelemek için *SMN1* mRNA'nın 6. ve 7. ekzonları arasındaki bölgeyi çoğaltan ve işaretleyen 5'-TTAAGAGAGAAACCTGTGTTGTGG-3' forward primeri ve 5'-TCGGACAGATTTTGCTCCTC-3' revers primerleri ve Probe #47 (cat. no. 04688074001)(acactgga) (Universal ProbeLibrary, Roche) kullanılmıştır.

SMA'lı insan fibroblast hücrelerinin RT-PCR analizlerinde ise *LightCycler h-G6PDH Housekeeping Gene Set* (Roche, 03261883001) kiti kullanılmıştır.

Her örnek için iki tüp hazırlanmıştır: bir tanesi hedef gen (T), diğeri ise referans gen (R).

T tüpleri içinde aşağıdaki karışım hazırlanmıştır;

cDNA	2,5 µl
Forward primer	1 µl
Revers primer	1 µl
Prob	1 µl
Enzim	2 µl
<u>H₂O</u>	<u>2,5 µl</u>
Toplam	10 µl

R: House-keeping genin ekspresyonunu gösterir. R tüpleri içine aşağıdaki karışım eklendi;

cDNA	2.5 µl
Primer mix	1.5 µl
Prob	1.5 µl
Enz.	2 µl
<u>H₂O</u>	<u>2.5 µl</u>
Total Hacim	10 µl

RT-PCR Programı;

Hazırladığımız tüpler spin edilip LightCycler 480 cihazın özel platelerine aktarıldı. Platelere özel kapaklar ile kapandı ve kısa bir spin sonrası cihaza yüklenmiştir. Tüm RT-PCR çalışmalarda aşağıdaki program kullanılmıştır.

Denatürasyon	95°C → 10 dk	→ 1 siklus	
Denatürasyon	94°C → 10 sn	}	40 siklus
Anealing/enzim-prob çalışması	60°C → 1 dk		
Cooling	40°C → 1 siklus		

Data Analizi;

RT-PCR işlemi sonucunda, Cycle Threshold (C_t) değerleri elde edilmiştir. Her örnek için iki C_t değeri vardır, bir tanesi C_{tR} diğeri C_{tT} . C_t değerleri kullanılarak her örnek için $\Delta(\Delta C_t)$ değeri hesaplanmıştır. Daha sonra test gruplarının $\Delta(\Delta C_t)$ değerleri kontrol $\Delta(\Delta C_t)$ 'sine bölünerek kat değişimi elde edilmiştir.

$$\Delta C_t = C_{tT} - C_{tR}$$

$$\Delta(\Delta C_t) = 2^{-\Delta C_t}$$

$$\text{Kat değişim (FC)} = \text{Transfekte } \Delta(\Delta C_t) / \text{Kontrol } \Delta(\Delta C_t) \text{'si}$$

Eğer FC 1'den küçük ise → - FC

3.14. Western Blot analizi

Total protein izolasyonu;

100 mg doku paröaları steril koşullarında *protease inhibitor cocktaili* (Roche) içeren 400 µl RIPA lysis buffer içinde laboratuvara getirildi. Dokular sonikasyon yöntemi ile homojenize hale getirildi. 10 dk buz üzerinde bekletildikten sonra 14000 xg'de 4°C'de 15 dk santrifüj edildi. Süpernatant steril bir tüpe alındı ve -80°C'de saklandı.

Protein miktarı tayini;

Thermoscientific BCA kiti kullanılarak protein miktarı tayini yapılmıştır. 96 kuyucuklu platelerin her bir kuyucuğuna BSA protein standart seti ya da protein örneklerinden 25 µl eklenmiştir. Her birisine 200 µl boya eklenerek proteinler 8 kere sulandırılmıştır. 30 saniye 400 rpm çalkalayıcı üzerinde karıştırılmıştır. Plate 37°C'de 30 dakika bekletilmiştir. Örneklerin absorbansları, Mikroplak okuyucu, Thermoscientific spektrofotometre cihazı kullanılarak 595 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Standartların absorbansı ve protein konsantrasyonları kullanılarak standart grafiği çizilmiştir. Bu standarda göre örneklerin protein miktarı hesaplanmıştır.

SDS-PAGE jel elektroforezi

50 µg total protein, 7.5 µl *LDS Sample Buffer* (4×), 3 µl *Reducing* (10×) ile karıştırılmış ve son hacim su ile 30 µl'e tamamlandıktan sonra 10 dakika 95 derecede denatüre edildi. Bu çalışmada hazır olarak satın alınmış %4-12 *Bis-Tris SDS-PAGE* jellere yüklenerek 200 mA 60 dakika yürütülmüştür.

Protein Transferi

SDS-PAGE jelde yürütülüp protein ağırlıklarına göre birbirinden ayrılmış proteinlerin PVDF kağıtlara transfer etmek için *iBlot Gel Transfer System*, *iBlot Gel Transfer Stacks PVDF Regular* kullanılmıştır. Transfer sandviçi hazırlandıktan

sonra protein transferi 7 dakika içinde gerçekleştirilmiştir. PVDF kağıdı 5 dakika ultra saf su ile yıkadıktan sonra immunodeteksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

İmmunodeteksiyon

Proteinlerin immunodeteksiyon işlemi için *Western Breeze kit, Chromogenic Immunodetection System* (novex, invitrogen, WB7105) kullanılmıştır. PVDF kağıdı 10 ml hazır *Blocking* solüsyonu içinde oda sıcaklığında 30 dakika bekletilmiştir. PVDF Kağıdı üzerine 1/5000 sulandırılmış anti eGFP, anti SMN, ya da anti β -Tubulin primer antikoları eklenmiş ve 1 saat oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde beklenmiştir. 3 kere 5 dakika boyunca 20 ml *Antibody Wash solüsyonu* ile yıkanmıştır. PVDF kağıdı üzerine kitte bulunan ve kullanıma hazır sekonder antikor eklenip 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. 3 kere 5'er dakika 20 ml *Antibody Wash solüsyonu* ile yıkanmıştır. 2'şer dakika 20 ml ultra saf su ile yıkanmıştır. 5 ml Chromogenic Substrate eklenerek 10 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Mor bantlar ortaya çıktıktan sonra 2'şer dakika 20 ml ultra saf su ile yıkanmıştır. Membran, kurutma kağıtları arasında kurumaya bırakılmıştır. Western blot sonuçlarını değerlendirmek için *ImageJ program* (<https://imagej.nih.gov/ij/>) kullanılmıştır.

3.15. Enjeksiyon yapılmış farelerin hayat süresi ve vücut ağırlıklarını incelenmesi

Farelerin genel durumu her gün gözlemlenmiştir. Vücut ağırlıkları her gün ölçülmüştür. E14-15. günde terapötik viral vektör enjekte edilmiş bazı SMA'lı fareler, sağlıklı *wild* tipler, ve enjekte olmamış SMA'lı fareler rastgele olarak seçilip hayat sürelerinin hesaplaması için gözlemlenmiştir. Çalışma sonunda tüm değerlerin ortalamaları hesaplanarak grafikler oluşturulmuştur.

3.16. Statistical Analysis

SPSS 15.0 software (Chicago, IL, USA) kullanılarak tüm sonuçlar Student's t-test ile değerlendirilmiştir. Bütün sonuçlar ortalama \pm standart sapma (SD)

şeklinde gösterilmiştir. 0.05'den küçük ($P < 0.05$) olan P değerleri anlamlı olarak kabul edilmiştir. Bütün çalışmalar ez az 3 kere tekrar edilmiştir.



4. BULGULAR

4.1. Klonlanmış cis-plazmidler

rAAV9-SMN vektörleri üretmek için gereken cis-plazmidlerinin yapısı şekil 4.1’de gösterilmiştir. pAAV-CB6-PI-SMN plazmidinde SMN cDNA’sı gene spesifik UTR’ları ile birlikte bulunur iken, pAAVsc-CB6-PI-SMN plazmidinde SMN cDNA’sı genin spesifik UTR’larını içermemektedir. Bunun nedeni de scAAV’nin cis-plazmidinin sınırlı gen taşıma kapasitesidir.

Her iki cis-plazmid, transgen ekspresyonu için gereken *CMV enhancer/chicken beta-actin (CB) promoter*’i, *CMV IE enhancer*’i, *TATA box*, ve polyA sinyali içermektedirler. Transgenin kırılmasını desteklemek için *promoter* ve insersiyon bölgesi arasına bir adet küçük intron dizisi eklenmiştir. CB promoter’i, CMV enhancer’i, poly A sinyali ve SMN cDNA’sı 2 adet AAV ITR ile çevrelenmiştir. scAAV vektörü geliştirebilmesi için pAAVsc-CB6-PI plazmidinin ITR dizileri değiştirilmiştir. ITR dizileri transgenin *virion* içinde paketlenmesi için gereklidir.

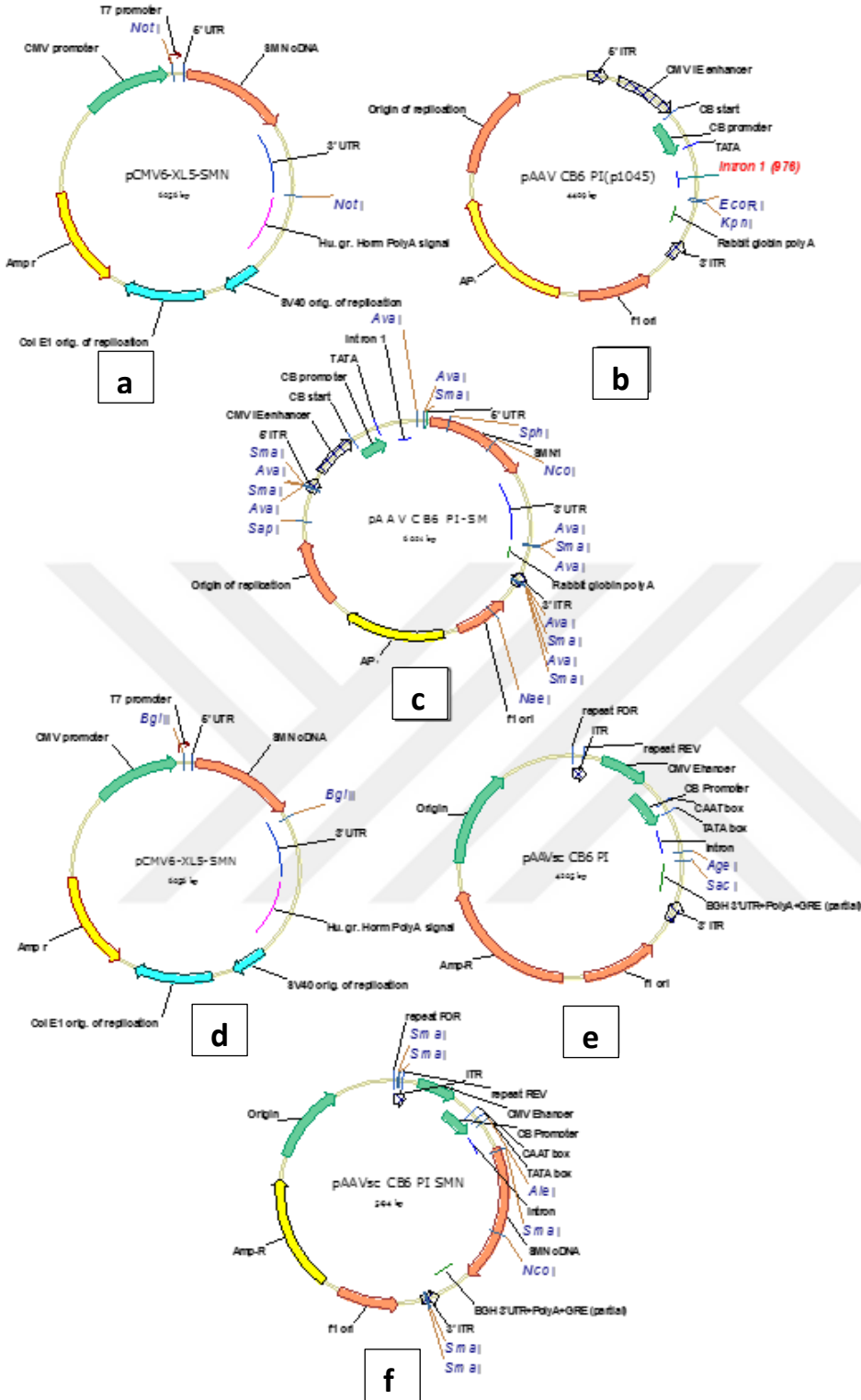
Şekil 4.2’de gösterildiği gibi elde edilmiş cis-plazmidlerinin bütünlüğü restriksiyon enzimleri ile kontrol edilmiştir. İlk olarak VNTI programında cis-plazmidleri kesebilen uygun enzimler bulundu ve *in silico* enzim kesme analizi yapıldı. Daha sonra seçilmiş enzimler ile cis-plazmidler kesildi ve %1 agaroz jel üzerinde yürütüldükten sonra jel görüntüleri *in silico* sonuçları ile kıyaslandı. Sonuçlara göre istenilen genler doğru bir şekilde plazmidlerde klonlanmıştı. pAAV-CB6-CI-SMN plazmidini SmaI, AvaI, NcoI/ NaeI, ve SapI/ SphI enzimleri ile kesilir iken, pAAVsc-CB6-PI-SMN plazmidini ise AleI/ NcoI, SmaI, enzimleri ile kesildi.

Daha sonra restriksiyon enzimi ile kesilip görüntüsü istenilen DNA bantlarını sağlayan plazmidler spesifik primerler kullanılarak sekanslandı (Şekil 4.3). Dizi analizi sonuçlarına göre en iyi klonlar seçildi.

Seçilmiş plazmidler *E. Coli* DH5 α bakterilerde çoğaltıldı. Plazmidin içinde klonlanmış SMN cDNA protein ekspresyonunu kontrol etmek için western blot

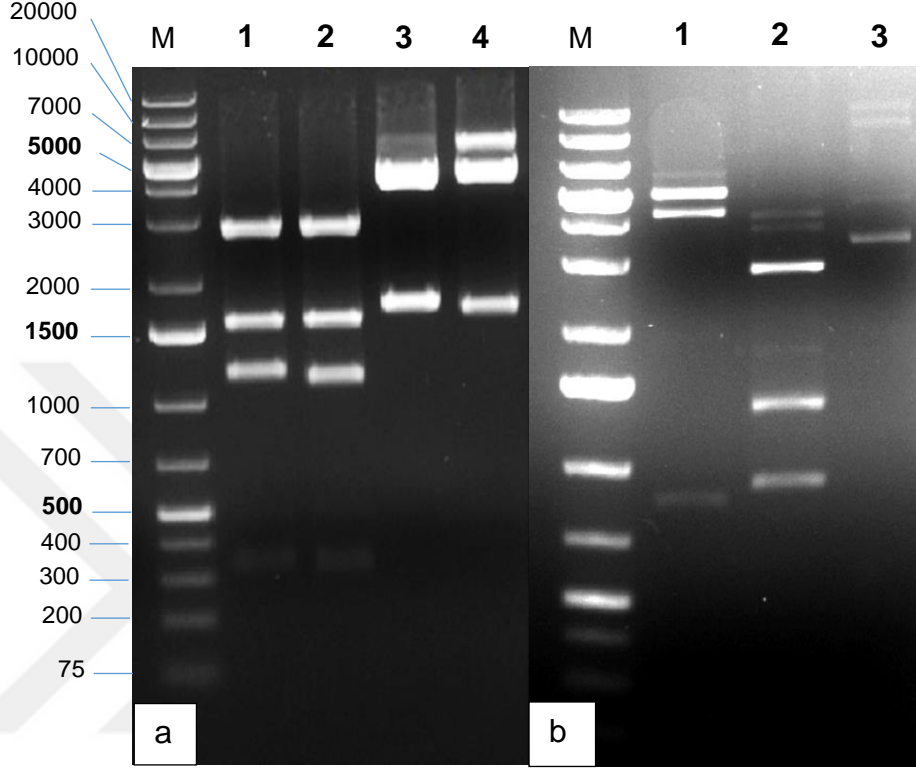
analizi yapıldı. Şekil 4.4’de gösterildi gibi pAAV-CB6-PI-SMN ve pAAVsc-CB6-PI-SMN ile transfekte edilmiş HEK293 hücreler transfekte olmamış kontrol hücrelerine göre sırasıyla, 4.853-kat ve 2,321-kat daha fazla SMN proteini eksprese etmişlerdir ($P < 0.001$). pAAV-CB6-PI-SMN ise pAAVsc-CB6-PI-SMN’ye göre yaklaşık 2 kat daha fazla SMN ekspresyonunu sağlamıştır.



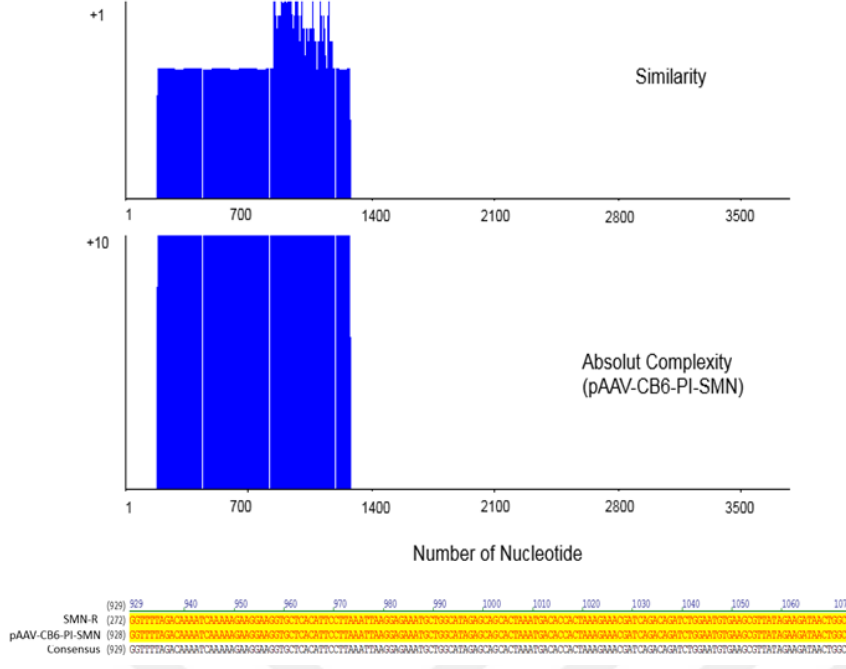


Şekil 4.1. Plazmidlerin genetik ve restriksiyon haritaları. (a) pCMV6-XL5—SMN NotI ile, ve (b) pAAV-CB6-PI EcoRI ve KpnI ile kesilerek, (c) pAAVsc-CB6-PI-SMN plazmidini elde edilmiştir. (d) pCMV6-XL5-SMN Bgl II ile, (e) pAAVsc-CB6-PI AgeI ve SacI ile kesilerek, (f) pAAVsc-CB6-PI-

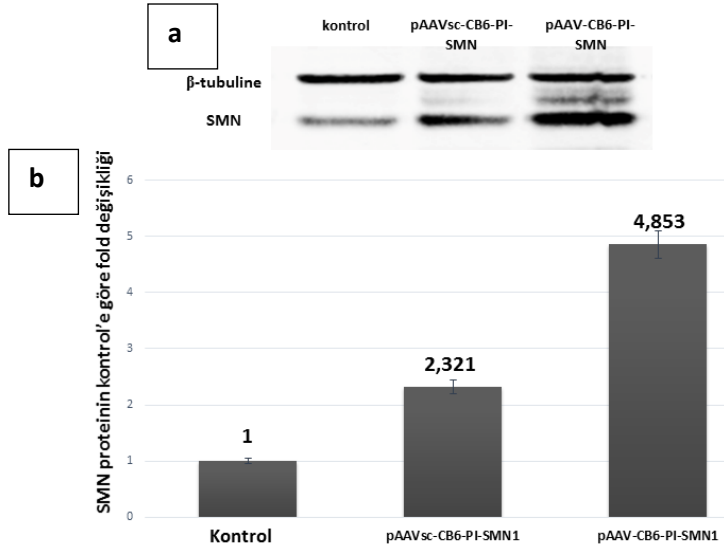
SMN elde edilmiştir. Elde edilmiş cis-plazmidlerinin bütünlüğünü incelemek için kullanılan restriksiyon enzimleri c ve f görüntülerde gösterilmiştir.



Şekil 4.2. Elde edilmiş plazmidlerin bütünlüğünü restriksiyon enzimi kullanılarak kontrol edilmesi. a) pAAV-CB6-CI-SMN; 1) SmaI; 2883, 1601, 1172, 343, 11, 11 bp, 2) AvaI; 2883, 1601, 1127, 333, 45, 11, 11, 10 bp, 3) NcoI/ NaeI; 4351, 1670 bp, 4) SapI/ SphI; 4329, ve 1692 bp. b) pAAVsc-CB6-PI-SMN; 1) AleI/ NcoI; 4339, and 855 bp, 2) SmaI; 2883, 1352, 937, 11, ve 11 bp, ve 3) kesilmemiş plazmid. DNA markörü M ile gösterilmiştir (*GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder, Thermo Scientific*).



Şekil 4.3. pAAV-CB6-PI-SMN DNA dizi analizi sonuçları. DNA dizi analizi sonuçları SMN cDNA'sının doğru bir şekilde plazmidde klonlandığını göstermektedir.



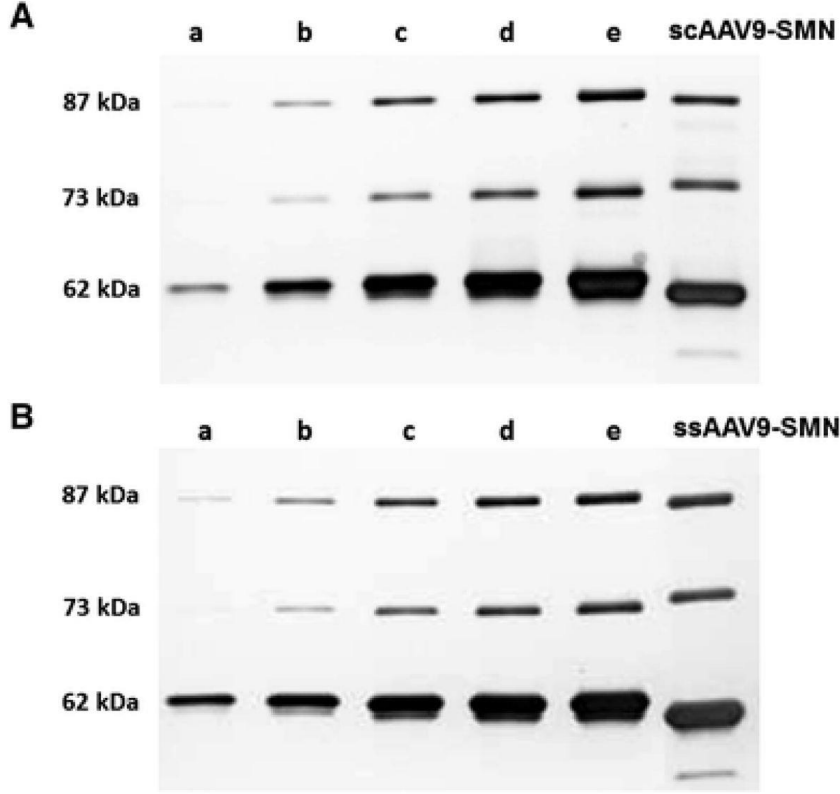
Şekil 4.4. Cis-plazmidler ile transfekte edilmiş HEK293 hücrelerinin western blot sonuçları. a) SMN ve β -Tubulin protein miktarları. b) Hem pAAVsc-CB6-PI-SMN hem de pAAV-CB6-PI-SMN plazmidleri ile transfekte edilmiş hücrelerde kontrol hücrelerine göre daha fazla miktarda SMN proteini görüldü. Ancak, pAAV-CB6-PI-SMN plazmidini ile pAAVsc-CB6-PI-SMN'ye göre 2 kat daha fazla SMN ekspresyonu sağlandı. $P < 0.001$

4.2. Elde edilmiş rAAV9-SMN

Bu çalışmada scAAV9-eGFP, ssAAV9-SMN, scAAV9-SMN olmak üzere 3 ayrı viral vektör kullanılmıştır. scAAV9-eGFP vektörü Guangping Gao'nun Laboratuvarından (UMass, Massachusetts, ABD) temin edildi. ssAAV9-SMN ve scAAV9-SMN ise bu çalışma için Gao laboratuvarında (Horae Gen Tedavi Merkezi, UMass Tıp Fakültesi, Worcester, MA, ABD) üretildi. Bu çalışmada kullanılan vektörler 3'lü geçici transfeksiyon (*triple transient transfection*) yöntemi ile üretildi. HEK293 hücreler aşağıdaki 3 adet plazmid ile aynı anda transfekte edildi;

- 1- Cis-plazmid: *promoter, transgen, poly A signal, enhancer*, ve ITR dizilerigibi transgen ekspresyonu için gereken bütün elemanları içerir,
- 2- Trans-plazmid: *virion* paketleme hücrelerinde rAAV vektörlerinin Kapsid proteinlerinin sentezlenmesi, ve viral genomun kapsid içinde paketlenmesi için gereken *Rep* ve *Cap* genlerini içerir,
- 3- Adenovirüs *helper* (yardımcı) plazmidi; *virion* paketleme hücrelerinde AAV genomunun çoğalmasını sağlayan ve kapsid içinde paketlenmesine yardımcı olan adenovirüs *trans-acting* yardımcı faktörlerini içerir.

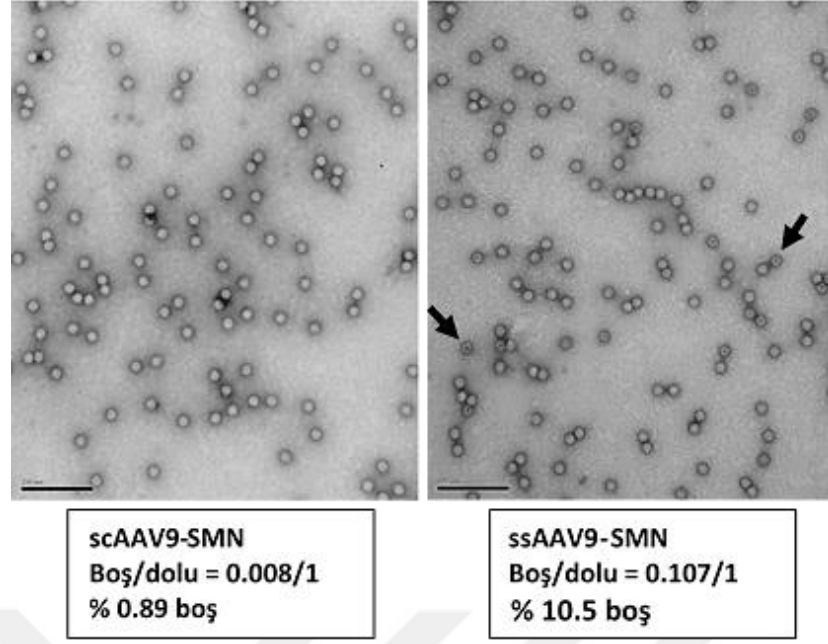
Bu çalışmada rAAV trans-plazmidi ve adenovirüs *helper* plazmidleri hazır olarak Guangping Gao'nun Laboratuvarından temin edildi. rAAV9-SMN vektörlerinin üretilmesi için gereken pAAV-CB6-PI-SMN ve pAAVsc-CB6-CB6-SMN cis-plazmidler ise bu tez çalışması sırasında klonlanmıştır. qRT-PCR sonuçlarına göre scAAV9-SMN ve ssAAV9-SMN vektörlerinin titreleri sırasıyla, 1×10^{13} ve 2×10^{13} genom kopyası/ml'dir.



Şekil 4.5. Elde edilmiş rAAV9 vektörlerinin SDS-PAGE gümüş boyama sonuçları. A ve B görüntülerinde rAAV2-CMW-LacZ (1×10^{13}) referans standardı olarak kullanılmıştır. A ve B görüntülerinde a, b, c, d, e sütunları sırasıyla rAAV2-CMW-LacZ'nin 0.5, 1, 2, 3, 4 μ l'lik miktarlarını göstermektedir. Saflaştırılmış viral vektörlerden 2 μ l SDS-PAGE jele yüklenmiştir. VP1, VP2 ve VP3 kapsid proteinleri gümüş boyama ile boyanıp analiz edilmiştir.

İzole edilmiş vektörlerin saflığı şekil 4.5'de gösterilmiştir. Gümüş boyama yönteminde sadece virüsün kapsid protein leri görüldüğü için viral vektörler saf olarak kabul etmektedir.

Elde edilmiş AAV vektörlerinin bütünlüğünü ve kapsidlerinin dolu ya da boş olduğunu incelemek için *transmission electron microscopy* (TEM) analizi yapılmıştır. Şekil 4.6'de gösterildiği gibi viral kapsidler içinde scAAV9-SMN vektörlerinin genomu ssAAV9-SMN'ye göre daha iyi paketlenmiştir. Boş kapsid sayısı scAAV9-SMN'de % 0.89 iken ssAAV9-SMN'de ise % 10.5 dir.

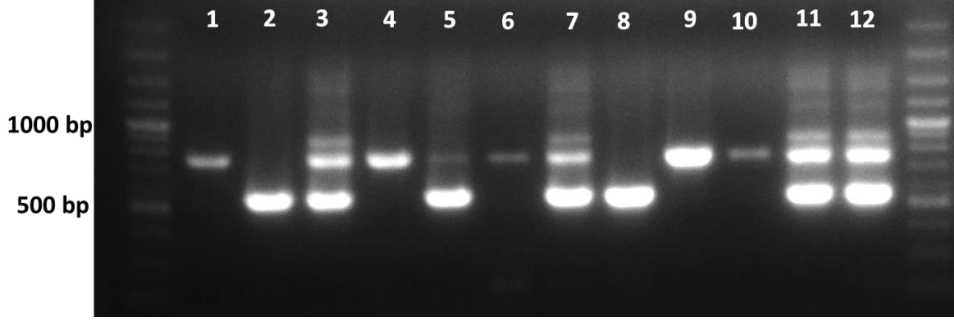


Şekil 4.6. İzole edilmiş viral vektörlerin elektron mikroskopik görüntüleri (skala çubuğu, 200 nm). ss ve scAAV9-SMN vektörleri negatif boyama için *uranil asetat* ile boyanıp TEM ile incelenmiştir. İki görüntüde de görüldüğü gibi çoğu viral partiküller doludur. Boş/dolu oranı ve boş partiküllerin yüzdesi şekilde gösterilmiştir. scAAV9-SMN partikülleri ssAAV9-SMN'den 12 kat daha iyi paketlenmiştir. Kısmi paketlenmiş ya da boş olan partiküller okla gösterilmiştir.

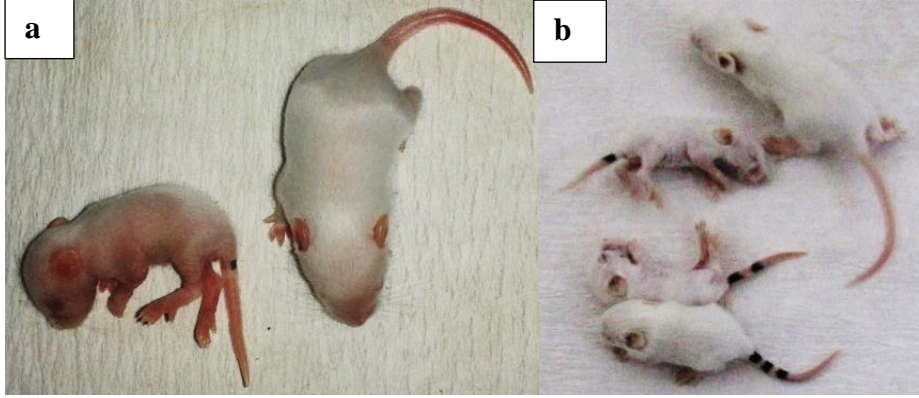
4.3. Farelerin çoğalması ve genotiplendirilmesi

Bu çalışmada, Jakson laboratuvarından (ABD) *SMN1* geninin delesyonu için heterozigot olan, *SMN*^{-/+}, *SMN2*^{+/+}, *SMN2Δ7*^{+/+} genotipi gösteren 4 adet dişi ve 4 adet erkek fare satın alındı. 2.5 aylık olan bu fareler 1 dişi / 1 erkek yada 3 dişi / 1 erkek şeklinde çiftleştirilmeye bırakıldı. Mendel genetik kurallarına göre, otozomal resesif bir hastalık için anne ve baba heterozigot olduğunda çocukların %25'i homozigot sağlıklı, %25'i homozigot hasta, ve %50'si heterozigot taşıyıcı olacaktır. SMA hastalığı, otozomal resesif bir hastalık olup erkek ve dişi fareler taşıyıcı oldukları için yeni doğan farelerin %25'i homozigot sağlıklı (*wild type*), %25'i homozigot hasta (mutant), ve %50'si heterozigot taşıyıcı olmalıdır. Homozigot sağlıklı dişi ve erkekler pilot çalışma için kullanıldı. Heterozigot dişi ve erkekler ise asıl gen tedavisi uygulamaları için çiftleştirilmede kullanıldı. Farelerin genotipini belirlemek için PCR analizi yapıldı. Kullandığımız *forward* primeri hem *wild* tipi hem de mutant geni için ortak bir primerdir. Ancak *reverse* primerlerinden birisi *wild* tip genini çoğaltırken diğeri ise mutant genini çoğaltır. PCR sonuçları

şekil 4.7’de gösterilmiştir. Genotiplendirme PCR ürünleri sonucu ve hasta farelerin görüntüleri sırasıyla şekil 4.7 ve Şekil 4.8’de gösterilmiştir.



Şekil 4.7. 12 adet yeni doğan farenin genotiplendirme sonuçları. *Wild* tip farelerde sadece 750 bp PCR ürünü görünür iken (1, 4, 6, 9, ve 10), homozigot mutant (hasta) farelerde sadece 500 bp PCR ürünü görülmüştür (2 ve 8). Heterozigot farelerde ise hem 750 hem de 500 bp PCR ürünleri görülmüştür (3, 5, 7, 11 ve 12).



Şekil 4.8. Yeni doğan fare yavruları. a) 7 günlük (P7) SMA’lı ve *wild* tip fare yavruları. SMA’lı fare yavruları postnatal (P)1. günde hastalık semptomlarını göstermemektedirler. Ancak postnatal 4. günden (P4’den) sonra hastalık semptomları görünür bir şekilde ortaya çıkmaktadır. Şiddetli kas hipotonisi hayatın ilk haftasında ortaya çıkmaktadır ve bu yavrular P13-15’de ölmektedir. b) P14’de olan SMA’lı ve *wild* tip fareler. 3 adet SMA’lı yavruların tümü fotoğraf çekiminden 1 gün sonra ölmüşlerdir.

4.4. Pilot çalışma: İntrauterin (IU) olarak aktarılmış rAAV9-SMN vektörlerinin dağılımı

4.4.1 IU enjekte edilmiş embriyoların hayatta kalma oranı

Heterozigot (*Smn*+/-, *SMN2*+/, *SMNΔ7*+/) dişi ve erkeklerin sağlıklı *wild* tip (*Smn*+/, *SMN2*+/, *SMNΔ7*+/) yavruları pilot çalışma için kullanılmıştır. *Wild* tip dişi ve erkekler 2.5 aylığa geldiğinde çiftleştirilmeye bırakıldı. Çiftleştirilmenin ertesi gününde dişi fareler vajinal plak oluşturması açısından kontrol edildi. Vajinal plak (Şekil 4.9b) görüldüğü gün gebeliğin 1. günü (embriyonik gün 1, E1) olarak kabul edildi. E14-15 gününde dişi farenin karın boşluğu izofluran anestezisi altında açılıp uterus boynuzları nazikçe dışarıya çıkarıldı. Boynuz başında embryo sayıları hesaplandı.

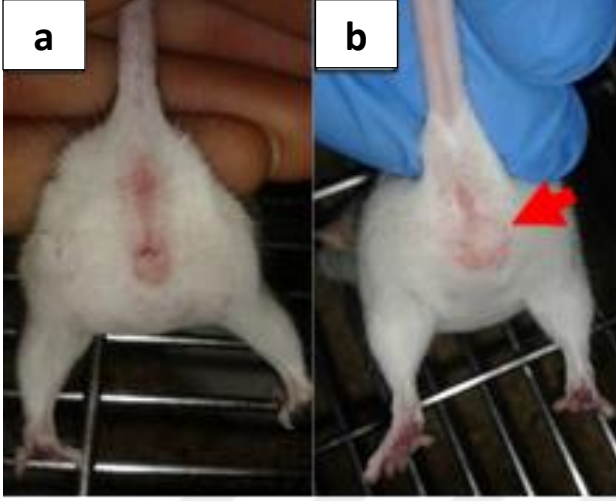
Toplam olarak, 52 fetus (erkek ve dişi) E14-15'de IU tekniğiyle enjekte edildi. 52 fetustan 12 tanesine sadece PBS enjekte edilmiştir ve kontrol grubudur. Geri kalan fetüslerden 21 'ine ICV ve 19 'una IP enjeksiyonu ile sırasıyla 2 µl (4×10^{10}) ve 5 µl (1×10^{11}) scAAV9-GFP vektörü uygulanmıştır. IU-ICV ve IU-IP teknikleri ile enjekte olan E14-15 embriyolar Şekil 4.10'da gösterilmiştir. ICV enjeksiyonu doğru yapıldığında boya hemen hilal şeklinde görünür (8A) ve birkaç saniye içerisinde diğer ventriküllere dağılırken, IU-IP enjeksiyonu doğru yapıldığında ise yeşil boya hemen bütün plasentaya yayılır.

Tablo 4.1'de enjekte olan embriyoların canlı doğum oranını göstermektedir. Genel olarak enjekte olmuş embryo farelerin % 87'si canlı olarak doğmuştur.

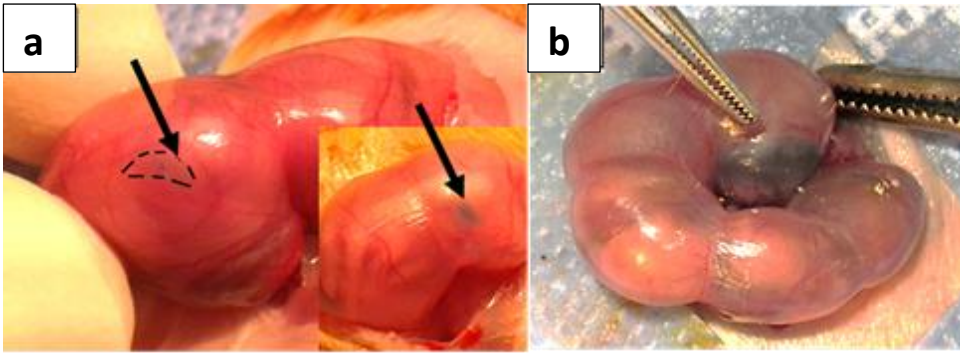
4.4.2 IVIS sonuçları

IU olarak scAAV9-eGFP ile enjekte olan fareler P1 ve P14'de eGFP ekspresyonu için canlı hayvan görüntüleme sistemi (IVIS) ile görüntülenmiştir. Fareler izofluran anestezisi altında cihaza konulmuş ve cihazın GFP filtresini ve *Living Image program* 4.5.2 versiyonunu kullanılarak otomatik olarak görüntülenmiştir. eGFP ile ilgili floresent ışığın şiddeti Şekil 4.11'de gösterilmiştir. Şekil 4.11A'da gösterildiği gibi P1'de en çok floresan miktarı IU-ICV grubunun

beyninde saptanmıştır. Bu grupta floresan miktarı P14’de omurilikte artmıştır. ICV ve IP gruplarında interskapular alanda (omuzlar arası) P14’de floresan miktarda artış görülmüştür. *Anterior* görüntülerde ise IP enjekte olmuş farelerin P14’de en çok eGFP miktarları özellikle karaciğer ve *inguinal* (Kasık) bölgelerinde saptanmıştır. eGFP protein ekspresyonunun hücresel düzeyde incelenebilmesi için Floresan mikroskopi analizleri yapılmıştır.



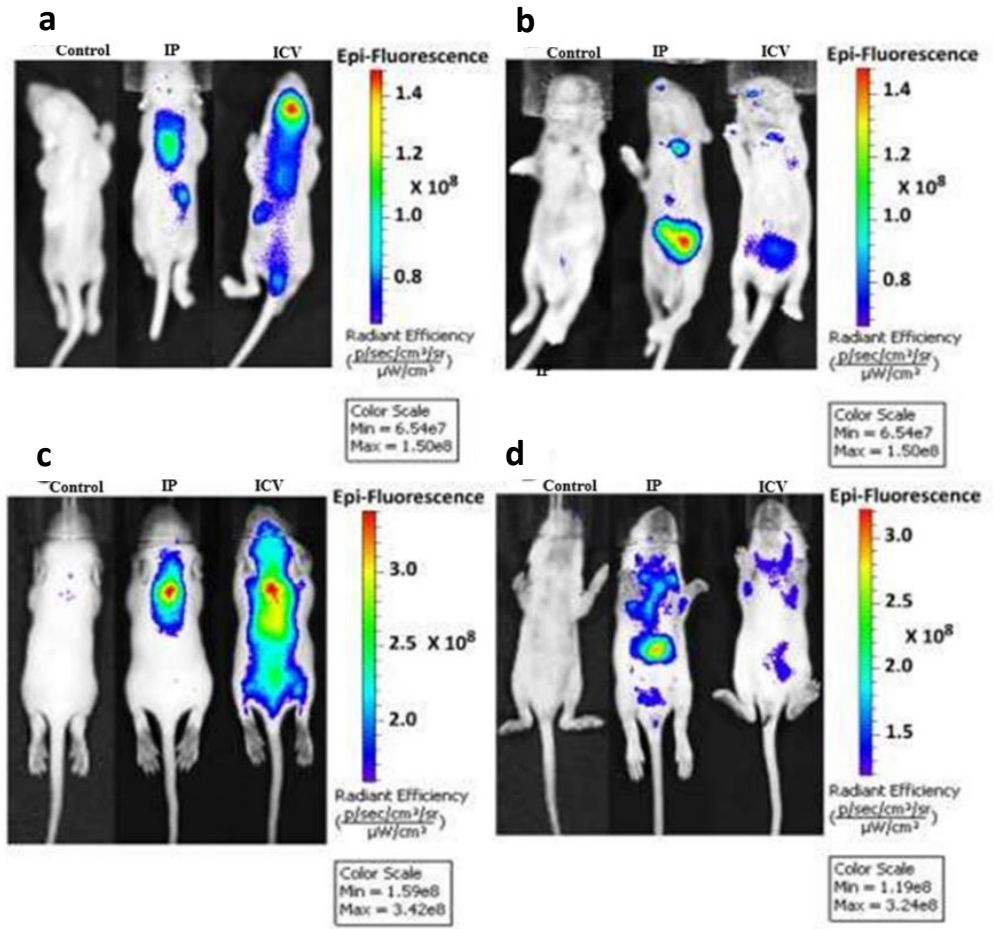
Şekil 4.9. Vajinal plak. a) çiftleştirilmemiş dişi fare. b) çiftleştirilmiş ve vajinal plak oluşturulmuş dişi fare. Vajinal plak ok ile gösterilmiştir.



Şekil 4.10. E14-15’de IU enjeksiyon. a) IU-ICV şeklinde enjekte edilmiş embriyo. Fotoğrafta ok ile gösterildiği gibi eğer doğru olarak LV içinde enjeksiyon gerçekleştirilirse boya hemen hilal şeklinde görünür. b) IU-IP enjeksiyonu. Enjeksiyondan hemen sonra yeşil boya bütün plasentaya homojen yayılır.

Çizelge 4.1. Pilot çalışmada, E14-15'de IU şeklinde enjekte edilmiş embriyolarının canlı doğum oranı.

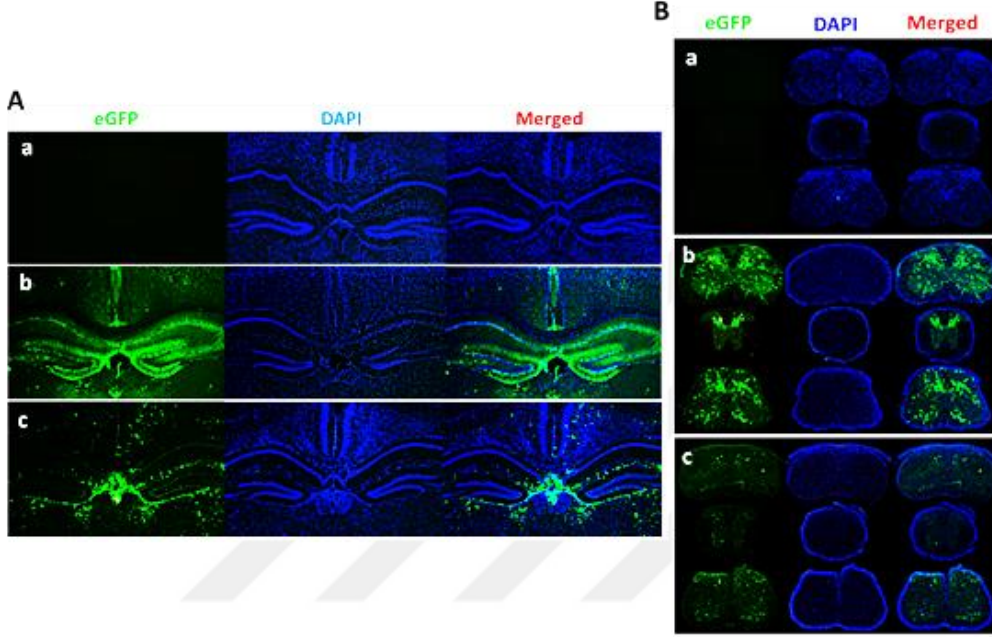
Grup	Enjekte edilmiş embriyolar	Enjeksiyon miktarı (µl)	Viral vektör titreleri	Canlı doğum	Canlı doğum oranı (%)
IU-ICV	21	2	4×10^{10}	18	85.71
IU-IP	19	5	1×10^{11}	17	89
Toplam	40	-	-	35	87



Şekil 4.11. IVIS Sonuçları. a) P1 yavruların *posterior* görüntüsü IU-ICV yöntemi ile enjekte edilen yavru farelerin beyinlerinde en fazla eGFP proteinine bağlı floresans yoğunluğu görülmüştür. b) P1 yavruların *anterior* görüntüsü; IU-IP yöntemi ile enjekte edilen yavru farelerin iç organlarından en fazla karaciğerinde yüksek GFP ekspresyonu görülmektedir. c ve d) P14 yavruların sırasıyla *posterior* ve *anterior* görüntüleri; Hem ICV hem de IP yöntemleri ile enjekte edilen yavru farelerde,, özellikle BAT yerleşim dokuları olarak bilinen *interscapular* (*dorsal* görüntü) ve *inguinal* (*anterior* görüntü) bölgelerde yüksek GFP ekspresyonu görülmektedir.

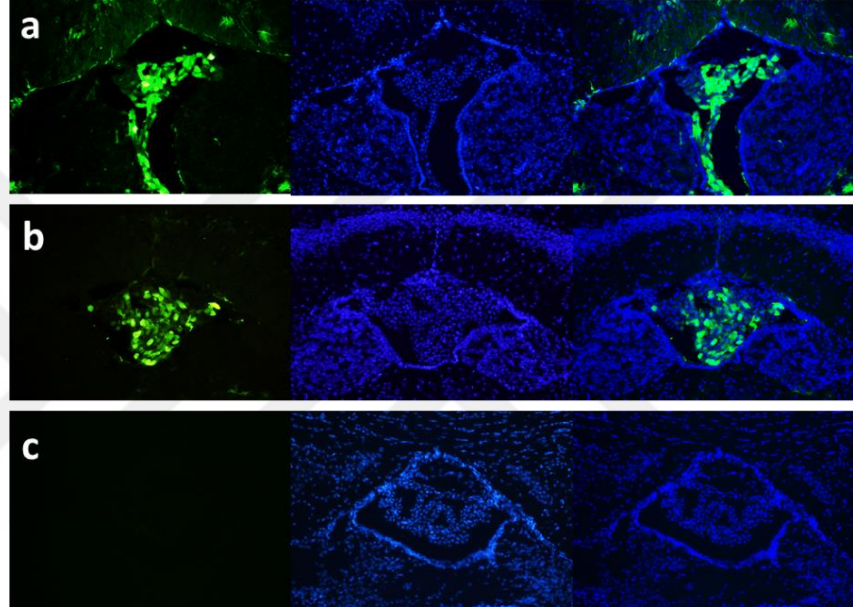
4.4.3. Pilot çalışmanın floresan mikroskopi sonuçları

Embryonik dönemde rAAV9-eGFP ile enjekte edilmiş fareler P30'de sakrifiye edilip histoloji injemeler gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.12 A ve 12 B'de gösterildiği gibi hem ICV hem de IP gruplarının beyin ve omuriliğinde eGFP ekspresyonu saptanmıştır. ICV grubunda eGFP ekspresyonu daha fazladır.



Şekil 4.12. IU tekniği ile enjekte olmuş farelerin A) Beyin, ve B) omuriliğinde eGFP ekspresyonu. 4X objektifi. a) kontrol, b) IU-ICV ve c) IU-IP.

Beynin korteks, *Dentate Gyrus* (DG) ve Koroid pleksus hücreleri scAAV9-eGFP vektörü ile transfekte olmuştur. eGFP ekspresyonu IP grubunda, ICV grubuna göre daha az olsa da tüm beyinde daha homojen bir şekilde görülmüştür. IU-ICV grubundaki beyin kesitlerinde en yüksek eGFP ekspresyonu DG bölgesinde saptanmıştır. Omuriliğin hem *dorsal* hem de *anterior* bölgelerindeki hücreler hem IU-ICV hem de IU-IP tekniği ile enjekte edilen gruplarda transfeksiyon başarılı olmuştur, ancak, eGFP ekspresyonu IU-IP örneklerinde IU-ICV'ye göre daha azdır.



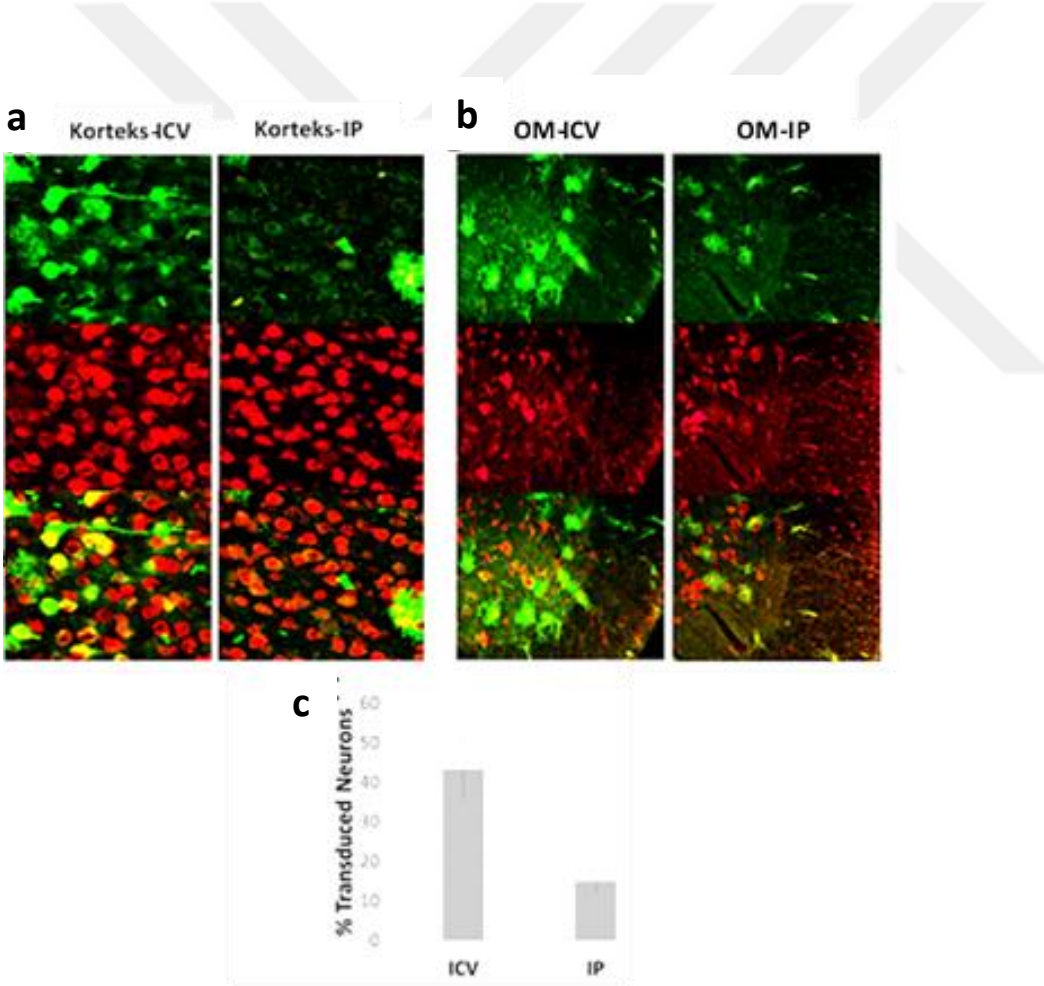
Şekil 4.13. Koroid pleksus bölgesindeki hücrelerin scAAV9-eGFP ile transfeksiyonu. a) IU-ICV enjeksiyonu, b) IU-IP enjeksiyonu, c) Kontrol. Prenatal dönemde scAAV9-eGFP enjekte olmuş embriyo farelerde hem ICV hem de IP enjeksiyonlarında koroid pleksus bölgedeki hücrelerin transfeksiyonu sağlanmıştır. Yeşil: eGFP, Mavi: DAPI. 20X objektifi.

Şekil 4.13'de gösterildiği gibi hem IU-ICV hem de IU-IP olarak enjekte edilmiş farelerde koroid pleksus hücreleri scAAV9-eGFP ile transfekte olup çoğu hücreler eGFP ekspresyonu göstermişlerdir. Şekil 4.14a ve 4.14b'de gösterildiği gibi IU-ICV tekniği kullanılarak enjekte olmuş farelerde scAAV9-eGFP vektör ile transfekte olmuş hücrelerinin sayısı ICV farelerinin korteksinde $43.3 \pm 7\%$ iken, IP farelerinde $12 \pm 2.5\%$ dir. ICV tekniği kullanılarak enjekte olan farelerin korteksinde transfekte olan hücreler IP tekniği kullanılarak enjekte olanlara göre daha şiddetli bir yeşil floresans göstermişlerdir. ICV örneklerinde omuriliğin

anterior kısmındaki çoğu nöronlar eGFP ekspresyonu gösterirken, IP örneklerinde transfekte olmuş hücrelerin sayısı çok azdı. (Şekil 4.14b).

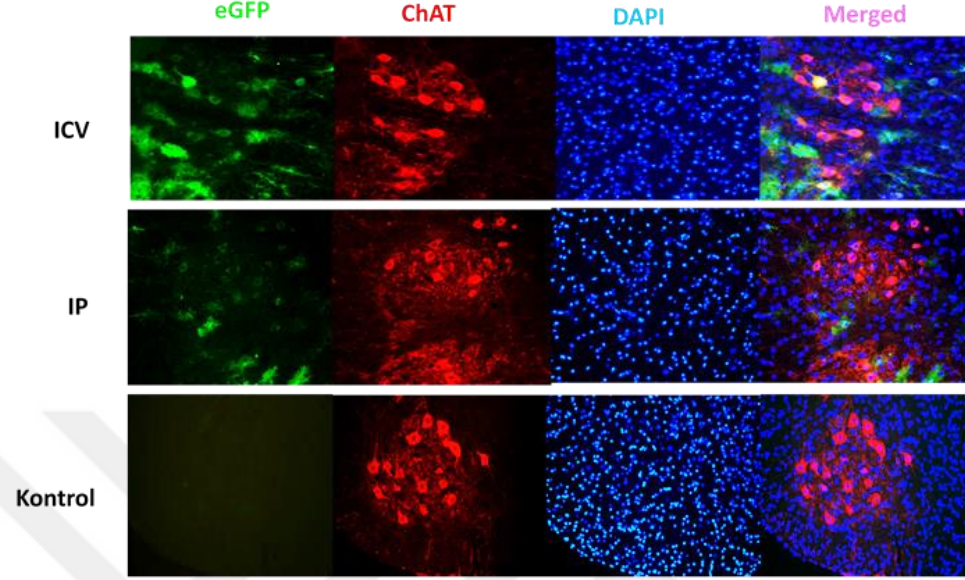
Omurilikteki motor nöronlarının scAAV9-eGFP ile transfekte olup olmadıklarını incelemek için bazı doku kesitleri *anti-choline acetyltransferase* (ChAT) antikoru ile boyanmıştır. Şekil 4.15’de gösterildiği gibi motor nöronlar hem ICV hem de IP örneklerinde transfekte olmuştur. Ancak, ICV örneklerinde transfekte olan motor nöronların sayısı IP örneklerine göre daha fazladır.

Şekil 4.16’de gösterildiği gibi ICV farelerinin DG bölgesinde transfekte olan nöronların sayısı IP örneklerine göre çok daha fazladır.

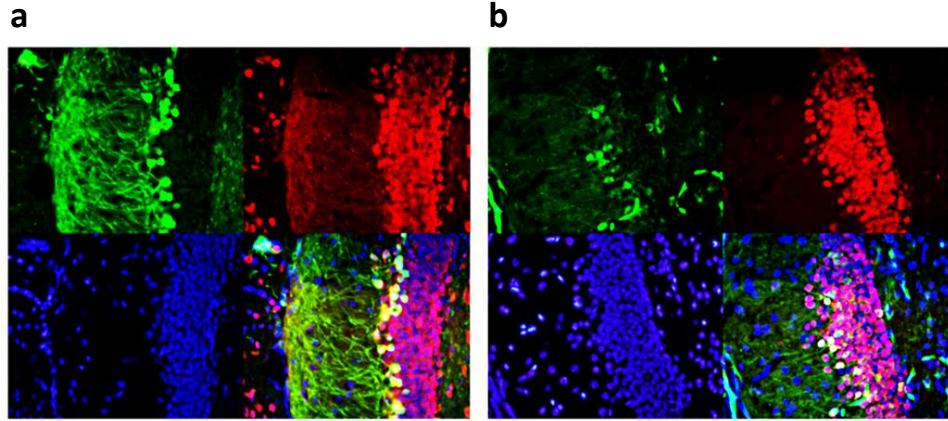


Şekil 4.14. IU-ICV ve IU-IP teknikleri kullanılarak enjekte olmuş farelerin Korteks ve omuriliğe ait IF görüntüleri. a) beyinlerin korteks kısmında eGFP pozitif hücreler, ve b) omuriliğin *anterior* kısmındaki eGFP pozitif hücreler. 20X objektifi. c) IU-ICV ve IU-IP teknikleri kullanılarak enjekte

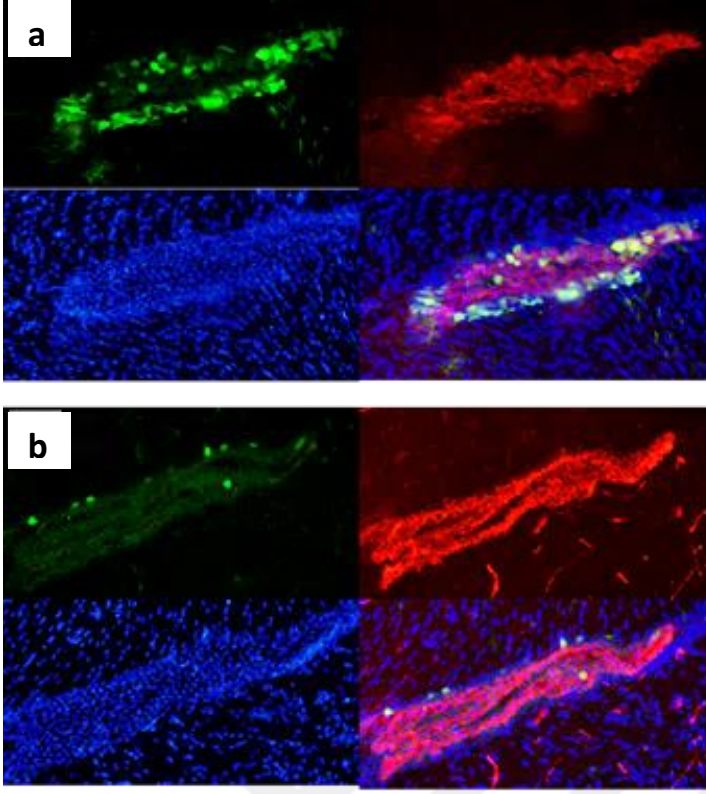
olmuş farelerin korteksinde scAAV9-eGFP ile transfecte olmuş hücrelerin yüzdesi. ($P < 0.001$). OM; omurilik. Yeşil: eGFP, Kırmızı: Neun.



Şekil 4.15. Prenatal dönemde scAAV9-eGFP ile enjekte olmuş farelerin omuriliğın *anterior* kısmında yer alan motor nöronlarının eGFP ekspresyonu. 20X objektifi.

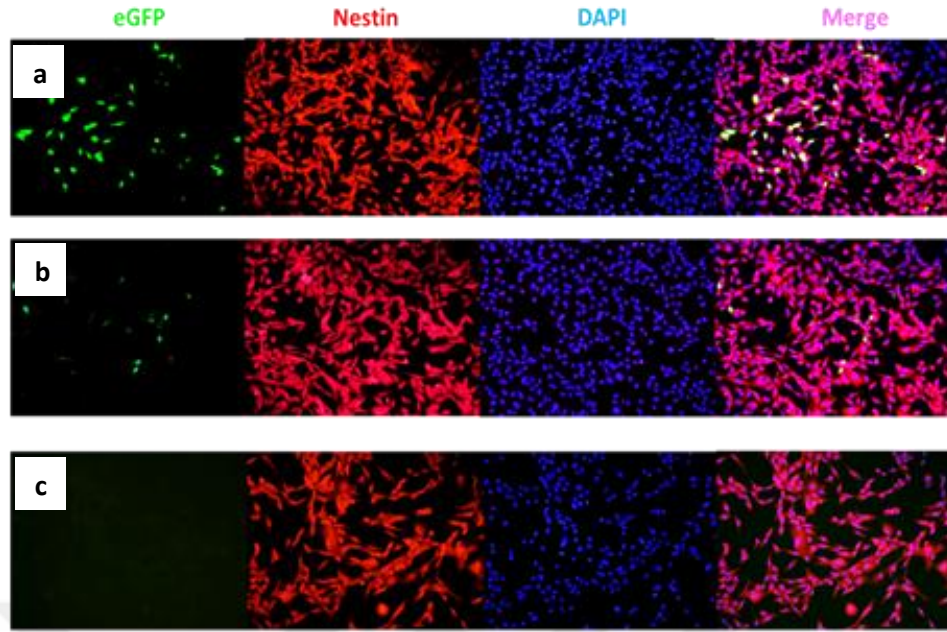


Şekil 4.16. IU-ICV ve IU-IP teknikleri kullanılarak enjekte olmuş farelerde DG bölgesindeki eGFP pozitif hücrelerin kıyaslamalı incelenmesi. a) IU-ICV ve b) IU-IP. eGFP pozitif hücrelerin sayısı ICV tekniği kullanılarak enjekte olmuş farelerin örneklerinde IP örneklerine göre çok daha fazladır. Yeşil; eGFP, Kırmızı; NeuN, Mavi; DAPI. 20X objektifi.

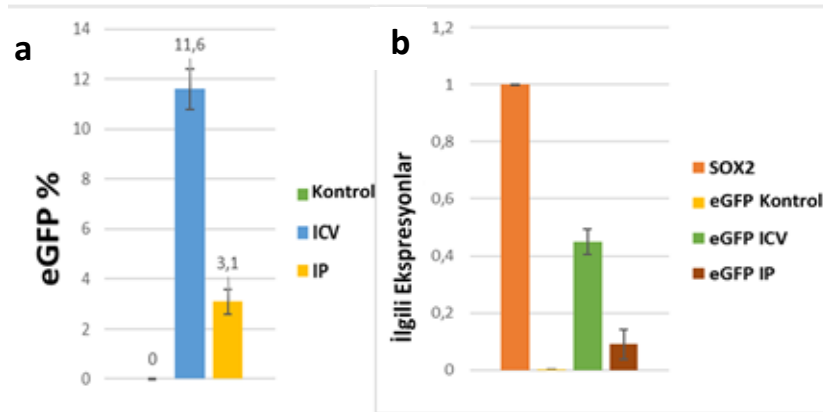


Şekil 4.17. SVZ bölgesindeki Nöral Kök Hücreler (NKH)'in scAAV9-eGFP ile transfeksiyonu. a) IU-ICV ve b) IU-IP enjeksiyonu. Prenatal dönemde scAAV9-eGP enjekte olmuş embryo farelerde hem ICV hem de IP enjeksiyonlarında SVZ bölgedeki NKH'in transfeksiyonu sağlanmıştır. ICV yöntemi ile enjekte olan farelerin örneklerinde transfekte olmuş NKH'in sayısı daha fazladır. Yeşil: eGFP, Kırmızı: Nestin; Mavi: DAPI. 20X objektifi.

SVZ bölgesindeki NKH'in scAAV9-eGFP ile transfeksiyonunu incelemek için bazı kesitler NKH markeri olan anti Nestin antikoruna ile boyanmıştır. Şekil 4.17'de gösterildiği gibi eGFP ve Nestin ko-lokalizasyonu hem ICV hem de IP örneklerinin SVZ bölgesindeki bazı hücrelerde saptanmıştır. Ancak, Nestin pozitif-transfekte hücrelerin sayısı ICV örneklerinde daha fazladır. IU-ICV ve IP teknikleri kullanılarak enjekte olmuş farelerden (her gruptan 3'er adet fare), NKH izolasyonu gerçekleştirilmiş ve eGFP ve Sox2 genleri için qRT-PCR analizi yapılmıştır. Şekil 4.18'de izole edilmiş NKH'ler görülmektedir ve şekil 4.19a'da eGFP pozitif hücrelerin yüzdeleri hesaplanmıştır. Sox2, Nestin ile birlikte NKH'in markör'ü olarak kabul edilmektedir. Bu yüzden, bu çalışmada NKH'lerdeki eGFP ekspresyonu Sox2 geninin ekspresyonuna göre ICV ve IP örneklerinde orantılı bir şekilde hesaplanmıştır (Şekil 4.19b).

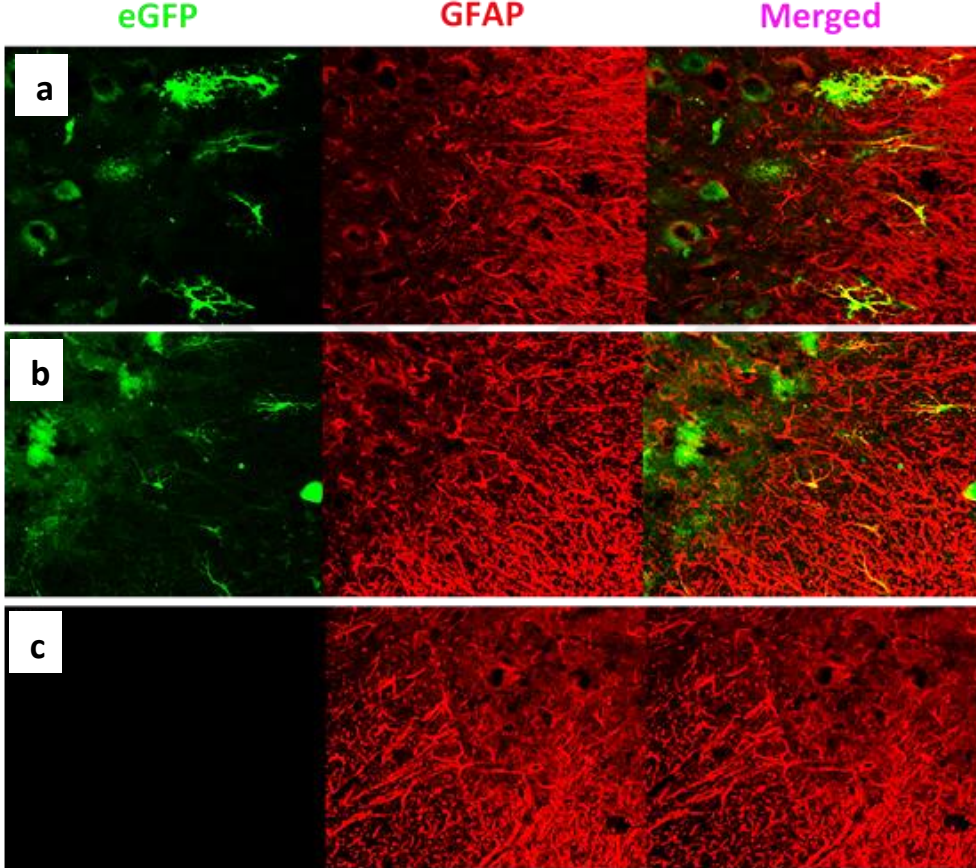


Şekil 4.18. IU tekniği kullanılarak scAAV9-eGFP ile enjekte edilmiş farelerin beyinlerinden izole edilmiş NKH'in 5. Pasajlarındaki görüntüsü. a) IU-ICV ve b) IU-IP tekniği kullanılarak enjekte olmuş fareler. c) kontrol. ICV yöntemi ile scAAV9-eGFP vektör enjekte edilmiş farelerde daha fazla sayıda NKH transfekte edilebilmiştir. 20X objektifi.



Şekil 4.19. İzole edilmiş NKH'lerin eGFP pozitiflik yüzdesi ve eGFP/Sox2 ekspresyonlarının qRT-PCR analiz sonuçları. a) ICV tekniği kullanılarak enjekte edilmiş farelerden izole edilmiş NKH'in %11.6'sı eGFP protein eksprese ederken, IP yöntemi ile enjekte olanlarda sadece %3.1 eGFP pozitif hücreler görülmüştür ($P < 0.003$). b) Sox2 gen ekspresyonu NKH'lerde 1 olarak kabul edilirse, ICV tekniği kullanılarak enjekte olanlarda eGFP protein ekspresyonu Sox2'ye göre yaklaşık 0.45 ve IP örneklerinde ise 0.125 kattır.

Prenatal dönemde scAAV9-eGFP ile enjekte olan farelerde astrosit ve gliaların transfeksiyonunu incelemek için bazı omurilik kesitleri anti-GFAP antikoru ile boyanmıştır. Şekil 4.20’de gösterildiği gibi hem ICV hem de IP tekniği kullanılarak enjekte olan farelerde astrosit ve glialarda transfeksiyon sağlanmıştır. eGFP ve GFAP için pozitif olan hücrelerin sayısı IP örneklerinde ICV örneklerine göre daha fazladır.



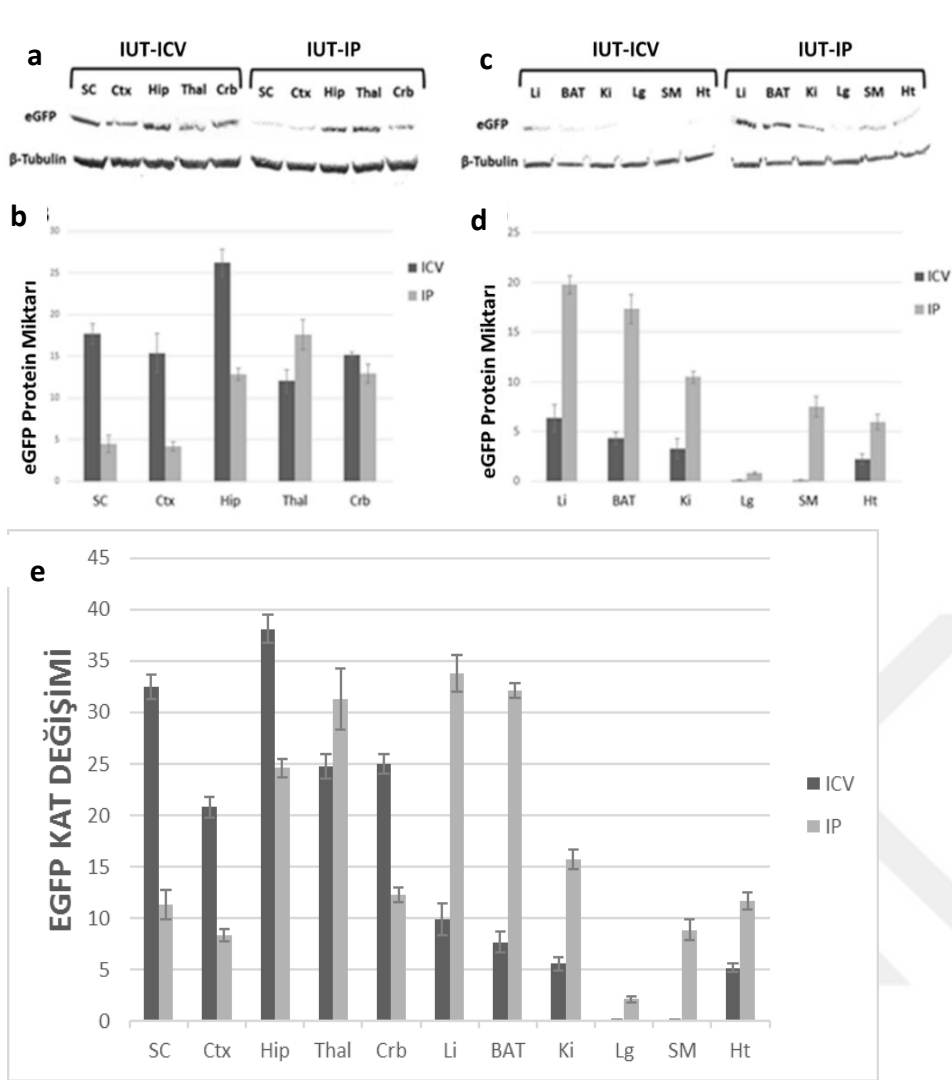
Şekil 4.20. omuriliğin *anterior* kısmındaki glia ve astrositlerin scAAV9-eGFP vektör ile transfeksiyonu. a) IU-ICV, b) IU-IP, ve c) kontrol. Prenatal dönemde ICV yada IP tekniği kullanılarak enjekte olan bütün farelerde astrositlerin transfeksiyonu sağlanmıştır. IU-IP örneklerinde astrosit ve gliaların transfeksiyonu IU-ICV tekniğine göre daha fazladır.20X objektifi.

4.4.4 eGFP protein ekspresyonunu Western blot ve RT-PCR ile incelenmesi

eGFP'in mRNA ekspresyonu ve protein miktarlarını farelerin farklı dokularında incelemek için RT-PCR analizleri ve western blot yapılmıştır (Şekil 4.21).

Western blot sonuçlarına göre en çok eGFP protein miktarı ICV örneklerinin hipokampus (26-kat) bölgelerinde görülmüştür (Şekil 4.21a ve 4.21b). Şekil 4.21c ve 4.21d'de gösterildiği gibi, iç organlarda en çok eGFP protein ekspresyonu IP şeklinde enjekte olmuş farelerin karaciğer ve kahverengi adipoz dokusunda (Brown adipose tissue, BAT) sırasıyla 19.76-kat ve 18.6-kat şeklinde saptanmıştır. ICV tekniği kullanılarak enjekte olmuş fare beyininin farklı bölümlerinin IP örneklerine göre daha fazla eGFP ekspresyonu ve protein miktarı gösterdiği hem RT-PCR'da hem de western blot'da gösterilmiştir. Ancak, IP örneklerin talamus bölgesi ICV örneklerinin talamusundan daha fazla miktarda eGFP proteini eksprese etmiştir (Şekil 4.21a ve 4.21b). ICV örneklerinin omuriliğinde de eGFP protein miktarı 17 kat artmış iken IP örneklerinde 4.5 artış görülmüştür. Western blot sonuçları kalıcı bir AAV9 transfeksiyonunun sağlandığını göstermektedir.

Western blot sonuçlarını teyit etmek için RT-PCR analizi de yapılmıştır. Şekil 4.21e'de gösterildiği gibi eGFP mRNA miktarı ICV şeklinde enjekte olmuş farelerin hipokampus, omurilik, ve *serebellum* bölgelerinde sırasıyla 38.12 kat, 32 kat, ve 25 kat artış göstermiştir. İç organlar arasında, eGFP mRNA ekspresyonu IP şeklinde enjekte olmuş farelerin karaciğer ve BAT'ında maksimum miktarda (sırasıyla 33.8 kat ve 32 kat) saptanmıştır (Şekil 4.21e).

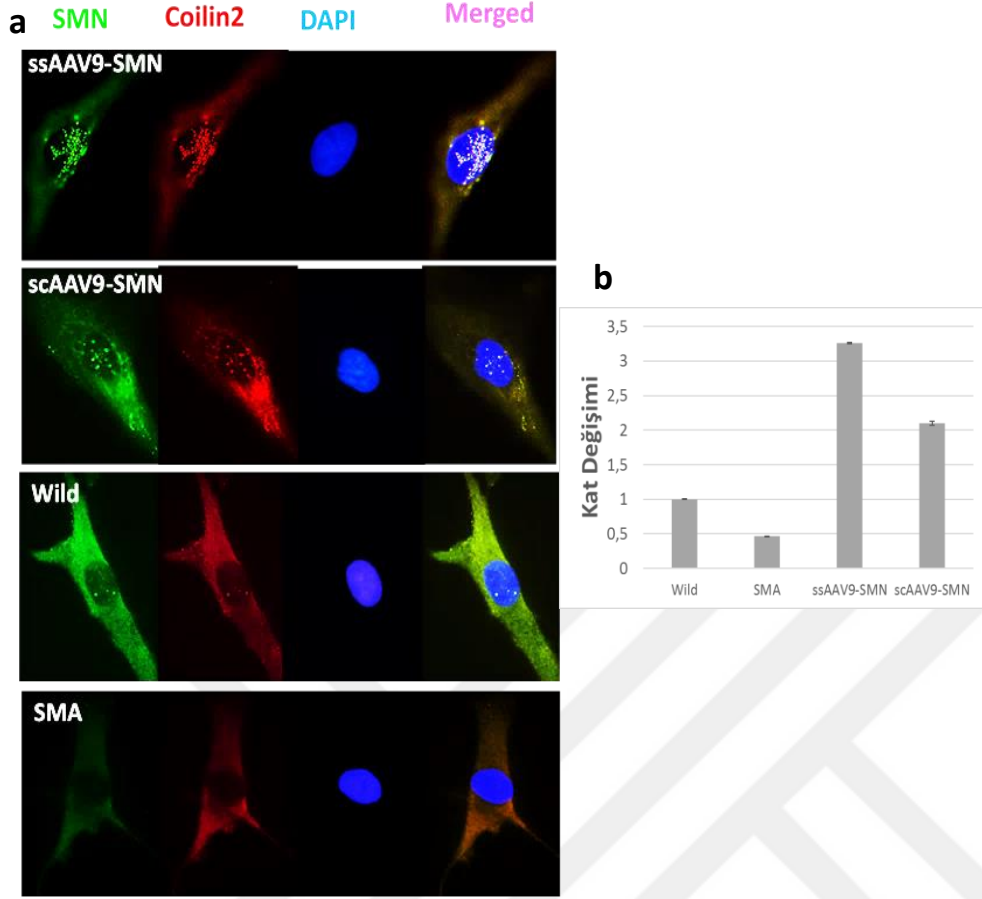


Şekil 4.21. Western blot ve RT-PCR sonuçları. a ve b) prenatal dönemde scAAV9-eGFP ile enjekte olmuş farelerin MSS'nin farklı bölgelerindeki eGFP ekspresyonunu göstermektedir. En çok eGFP miktarı ICV tekniği kullanılarak enjekte olmuş farelerin hipokampusunda (26 kat) ve omurilikte (17 kat) saptanmıştır. c ve d) İç organlar arasında en çok eGFP miktarı IP şeklinde enjekte olan farelerin karaciğer (19.76 kat) ve BAT (18 kat) dokularında saptanmıştır. $P < 0.0001$. e) RT-PCR sonuçlarına göre merkezi sinir sisteminin farklı bölgelerinde en çok eGFP protein miktarı, western blot sonuçlarındaki gibi, ICV tekniği kullanılarak enjekte olmuş farelerin Hipokampus (38.12 ve) ve omurilik (32.5 kat) dokularında, ve IP enjekte olmuş farelerin karaciğer (33.8 kat) ve BAT (32 kat) dokularında görülmüştür, ($P < 0.003$). SC: omurilik, Ctx: Korteks, Hip: Hipokampus, Thal: Talamus, Crb: serebellum, Li: Karaciğer, BAT: Kahverengi adipoz doku, Ki: Böbrek, Lg: akciğer, SM: iskelet Kası, Ht: Kalp.

4.4.5. Elde edilmiş ssAAV9-SMN ve scAAV9-SMN vektörlerinin gen ekspresyonlarının *in vitro* koşullarda kontrolü

Bu çalışmada üretilmiş rAAV9-SMN vektörlerin çalışıp çalışmadığını kontrol etmek için *in vitro* koşullarında SMA'lı fibroblast hücelere *multiplicity of infection* (MOI) değerine göre 10^6 virus/hücre oranında rAAV9-SMN vektörü transfekte edilip IF ve RT-PCR analizler ile SMN ekspresyonu incelenmiştir. IF analizlerinde SMN ile birlikte Gem multiprotein yapılarında yer alan anti Coilin 2 antikoru SMN boyaması ile birlikte kullanılmıştır. Şekil 4.22A'da SMA'lı, ss ve scAAV9-SMN transfekte edilmiş ve *wild* tipi- sağlıklı hücrelerde IF görüntülerinde SMN ve Coilin 2 ko-lokalizasyonu görülmektedir.

Sağlıklı fibroblast hücrelerde 3-4 adet Gem yapısı görünür iken SMA'lı fibroblastlarda Gem yapısı görülmemektedir. ssAAV9-SMN ile transfekte edilmiş fibroblastlarda scAAV9-SMN ile transfekte olanlara göre Gem sayısı daha fazladır (Şekil 4.22a). Yapılan RT-PCR analizlerinde ssAAV9-SMN ile transfekte olmuş hücrelerdeki SMN ekspresyonu sağlıklı Fibroblastlara göre 3.25 kat ve scAAV9-SMN ile transfekte olanlarda 2 kat artış göstermektedir (Şekil 4.22b).



Şekil 4.22. SMA'lı fibroblastların in vitro koşullarında rAAV9-SMN vektörleri ile transfeksiyon sonuçları. a) IF mikroskobisi sonuçları. ssAAV9-SMN ile transfekte edilmiş hücrelerin çekirdeklerinde scAAV9-SMN ile transfekte edilmiş olanlara göre daha fazla Gem multiprotein yapıları görülmüştür. b) floresan mikroskobisi sonuçları RT-PCR analizi ile doğrulanmıştır. RT-PCR sonuçlarına göre ssAAV9-SMN ile transfekte olmuş hücrelerde SMN ekspresyonu 3.25 kat artmış iken, scAAV9-SMN ile transfekte olan hücrelerde SMN ekspresyonu 2 kat artmıştır. $P < 0.0001$.

4.4.6. rAAV9-SMN vektörleri kullanılan prenatal gen tedavisinin sonuçları

Pilot çalışmada yapılan analiz sonuçlarına göre ICV enjeksiyonu IP enjeksiyonuna göre merkezi sinir sistemi (MSS)'nde daha fazla sayıda nöronların transfeksiyonunu sağladığı için ve özellikle de omurilikteki motor nöronlara daha fazla transfekte edilebildiği için asıl gen tedavisi çalışmalarında IU-ICV enjeksiyonları ile devam edilmiştir.

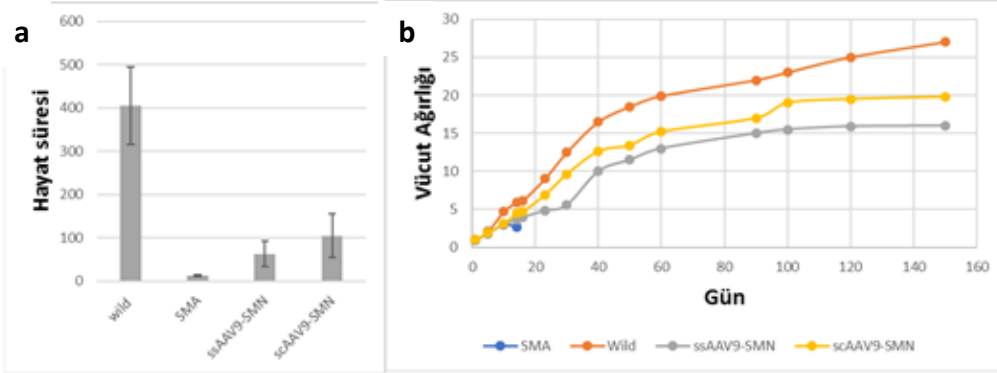
Heterozigot, *SMN*^{+/-}, *SMN2*^{+/+}, *SMN17*^{+/+}, dişi ve erkek fareler çiftleştirilmeye bırakılmıştır. Gebeliğin 14.-15. (E14-15) gününde daha önce pilot çalışma kısmında yapıldığı gibi karın boşluğu açıldı ve uteruslar dışarıya çıkarılmış ve farelerin beyinlerine ICV enjeksiyonu ile 3 µl (3×10^{10}) ssAAV9-SMN yada scAAV9-SMN enjekte edildi. Çizelge 4.2’de gösterildiği gibi bu çalışmada 180 adet embriyo ssAAV9-SMN ile, 165 adet scAAV9-SMN ile, 53 adet embriyo PBS (kontrol grubu) ile enjekte edilmiştir. Böylece toplam 417 embriyo (59 gebe fare) enjekte edilmiştir. Çizelge 4.2’de gösterildiği gibi ortalama olarak enjekte olmuş SMA’lı embriyoların %43.85’i, heterozigot embriyoların %82.15’i ve *wild* tipi embriyoların ise % 82.24’ü canlı olarak doğmuştur.

Çizelge 4.2. Prenatal dönemde rAAV9-SMN vektörler ile enjekte olan embriyolarının hayatta kalma oranı.

	ssAAV9-hSMN			scAAV9-hSMN			PBS			Toplam %
	enjekte edilmiş embriyo	canlı doğum	%	enjekte edilmiş embriyo	canlı doğum	%	enjekte edilmiş embriyo	canlı doğum	%	
Wild	50	41	82	42	35	81.39	18	15	83.33	82.24
Het	86	68	79.06	84	71	84.52	35	29	82.85	82.15
SMA	44	19	43.18	39	16	41.02	19	9	47.36	43.85
Total	180	128	71.11	165	122	68.98	72	53	71.18	69.41

Farelerin doğduktan sonra vücut ağırlıkları günlük olarak kontrol edilip hayatta kalma süreleri de hesaplanmıştır. Tedavi edilmemiş SMA'lı farelerin hayatta kalma süresi 13 ± 2 gündür. Bizim çalışmada ARGEFAR Deney Hayvanları Laboratuvarında tutulan, %3 yağ ve % 28 protein ile beslenen normal sağlıklı farelerin hayatta kalma süreleri ortalama 405 ± 90 gündür. ssAAV9-SMN ile E14-15'de ICV ile enjekte olmuş farelerin hayatta kalma süresi 63 ± 30 gündür. Aynı şekilde scAAV9-SMN ile enjekte olmuş farelerin hayatta kalma süresi ise 105 ± 50 gündür (Şekil 4.23a).

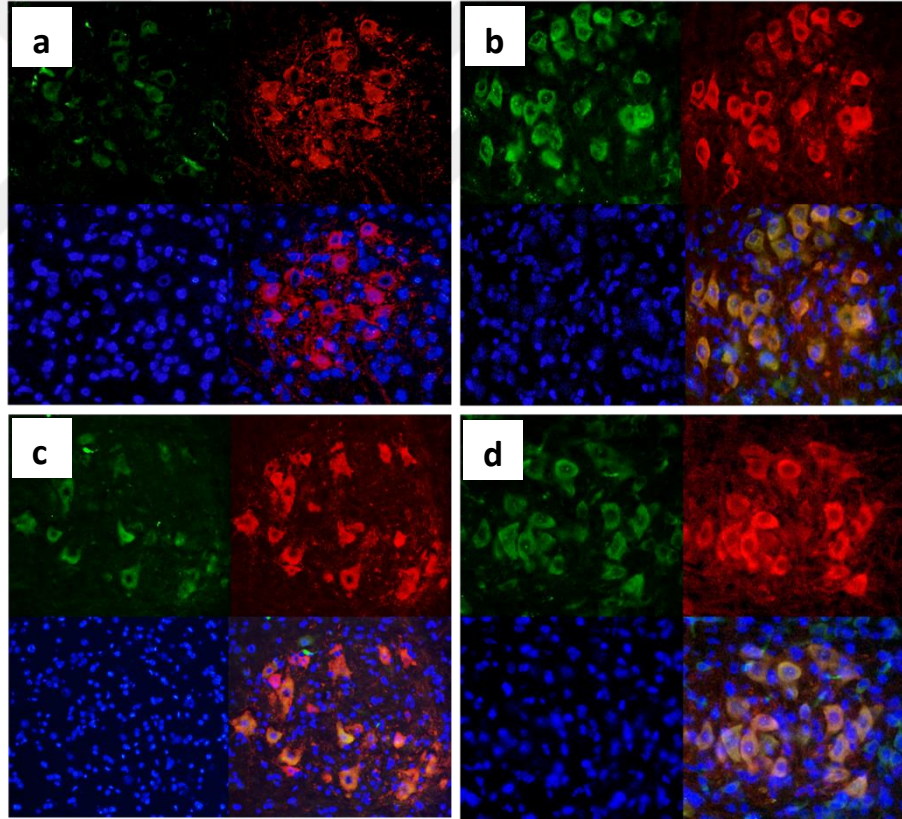
P14'de SMA'lı farenin vücut ağırlığı 2.66 gr iken, *Wild* tip farenin vücut ağırlığı 5.9 gr'dır. ssAAV9-SMN ve scAAV9-SMN ile enjekte olmuş farelerin vücut ağırlığı ise P14'de sırasıyla 3.6 ve 4.65 gr'dır (Şekil 4.23b). Bir aylık *wild* tip farenin ağırlığı yaklaşık 12.5 gr iken, ss ve scAAV9-SMN ile enjekte olmuş farelerin vücut ağırlığı sırasıyla 5.57 ve 9.64 gr'dır (Şekil 4.23b). Şekil 4.23b'de görüldüğü gibi her iki grupta enjekte olmuş farelerin vücut ağırlıkları normal *wild* tip fareden çok daha düşüktür. Ancak, scAAV9-SMN ile enjekte olmuş farelerin vücut ağırlığı sağlıklı wild tip farelerin ağırlıklarına daha yakındır.



Şekil 4.23. Prenatal dönemde ssAAV9-SMN ya da scAAV9-SMN vektörleri ile enjekte olmuş farelerin yaşam süreleri ve vücut ağırlığı sonuçları. a) normal *wild* tip fareler ortalama 405 gün hayatta kalır iken, SMA'lı fareler 13 ± 2 gün hayatta kalmaktadırlar. Prenatal dönemde ssAAV9-SMN ile enjekte olan SMA'lı fareler 63 ± 30 ve sc ile enjekte olmuş olanlar 105 ± 50 gün hayatta kalmışlardır. b) scAAV9-SMN ile enjekte olmuş farelerin vücut ağırlığı ssAAV9-SMN ile

enjekte olanlara göre *wild* tip farelere daha yakındır. Ancak, her iki tedavi grubunun da vücut ağırlıkları sağlıklı *wild* tip farelerden daha düşüktür.

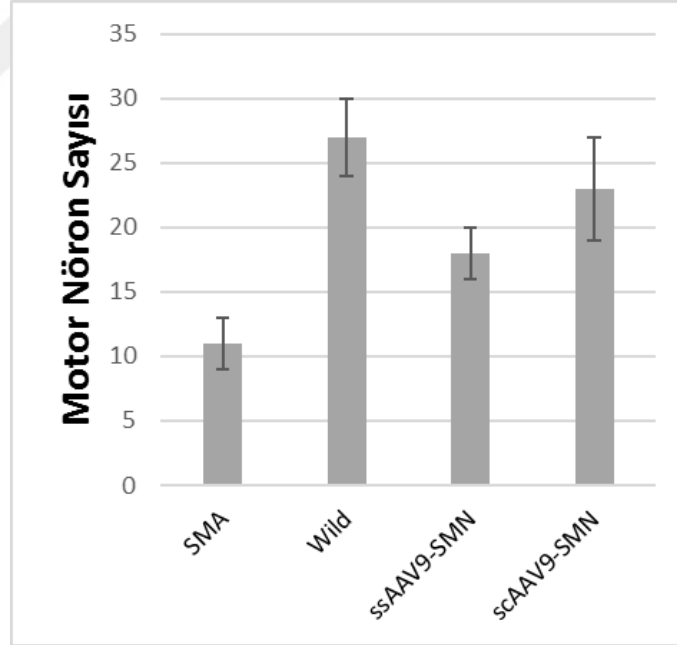
SMA hastalığında omuriliğin *anterior* bölgesindeki motor nöronlar apoptoza girerek kaslarda atrofi ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle bu çalışmada tedavi edilmiş farelerin omuriliğin *anterior* bölgesindeki motor nöron sayısı, yapısı ve morfolojisi P14 farelerde, IF analizleri ile incelenmiştir. Şekil 4.24’de gösterildiği gibi SMA’lı farelerin motor nöronlarının sayısı çok azdır ve morfoloji açısından *wild* tip örnekleri ile kıyasladığında sağlıklı hücre morfolojisi göstermemektedir. Ss ya da scAAV9-SMN ile enjekte olmuş farelerin motor nöronları, özellikle scAAV9-SMN ile enjekte olmuş örneklerde daha belirgin olmak üzere sağlıklı fare örneklerine benzemektedir (Şekil 4.24). Motor nöron sayıları da iki grupta SMA’lı gruba göre daha fazladır.



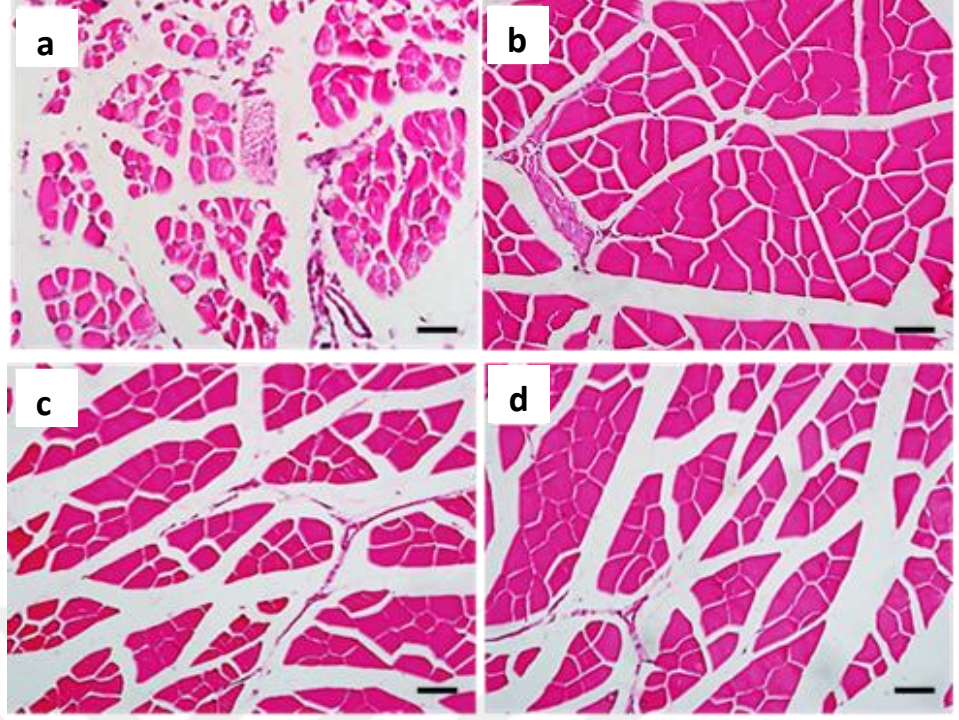
Şekil 4.24. Omuriliğin servikal bölgesindeki motor nöronların P14’deki IF görüntüsü. a) SMA’lı farede motor nöronların sayısı azalmıştır ve morfolojileri değişmiştir. b) *Wild* tip fare.; c) ssAAV9-SMN ile, ya da d) scAAV9-SMN ile enjekte olmuş farelerin P14’deki motor nöron sayısı SMA’lı fareden daha fazladır. D örneğindeki motor nöronların yapısı P14’deki *wild* tip örneğe benzemektedir.

P14'deki SMA'lı ve sağlıklı *wild* tip farelerinin servikal motor nöron sayısı ortalama 11 ± 2 ve 27 ± 3 olarak saptanmıştır (Şekil 4.25). Aynı yaşta olan ve prenatal dönemde ss ve scAAV9-SMN enjeksiyonu ile tedavi edilmiş farelerinin servikal motor nöron sayısı ise sırasıyla 18 ± 2 ve 22 ± 4 olarak saptanmıştır (şekil 4.25).

Farklı grupların P14'deki kas morfolojileri şekil 4.26'de gösterilmiştir. Parafin takibinden geçen Gastrocnemius (GC) kası örneklerinden 5 µm kesitler alınmış ve Hematoksilen-Eozin ile boyanmış. P14'deki SMA'lı farenin kası tamamen atrofiye uğramış iken tedavi gruplarının kas örnekleri *wild* tip kasa benzemektedir. Farklı grupların P14'deki kas morfolojileri şekil 4.26'de gösterilmiştir. Parafin takibinden geçen GC kası örneklerinden 5 µm kesitler alındı ve Hematoksilen-Eozin ile boyandı. P14'deki SMA'lı farenin kası tamamen atrofiye uğramış iken tedavi gruplarının kas örnekleri *wild* tip kasa benzemektedir.



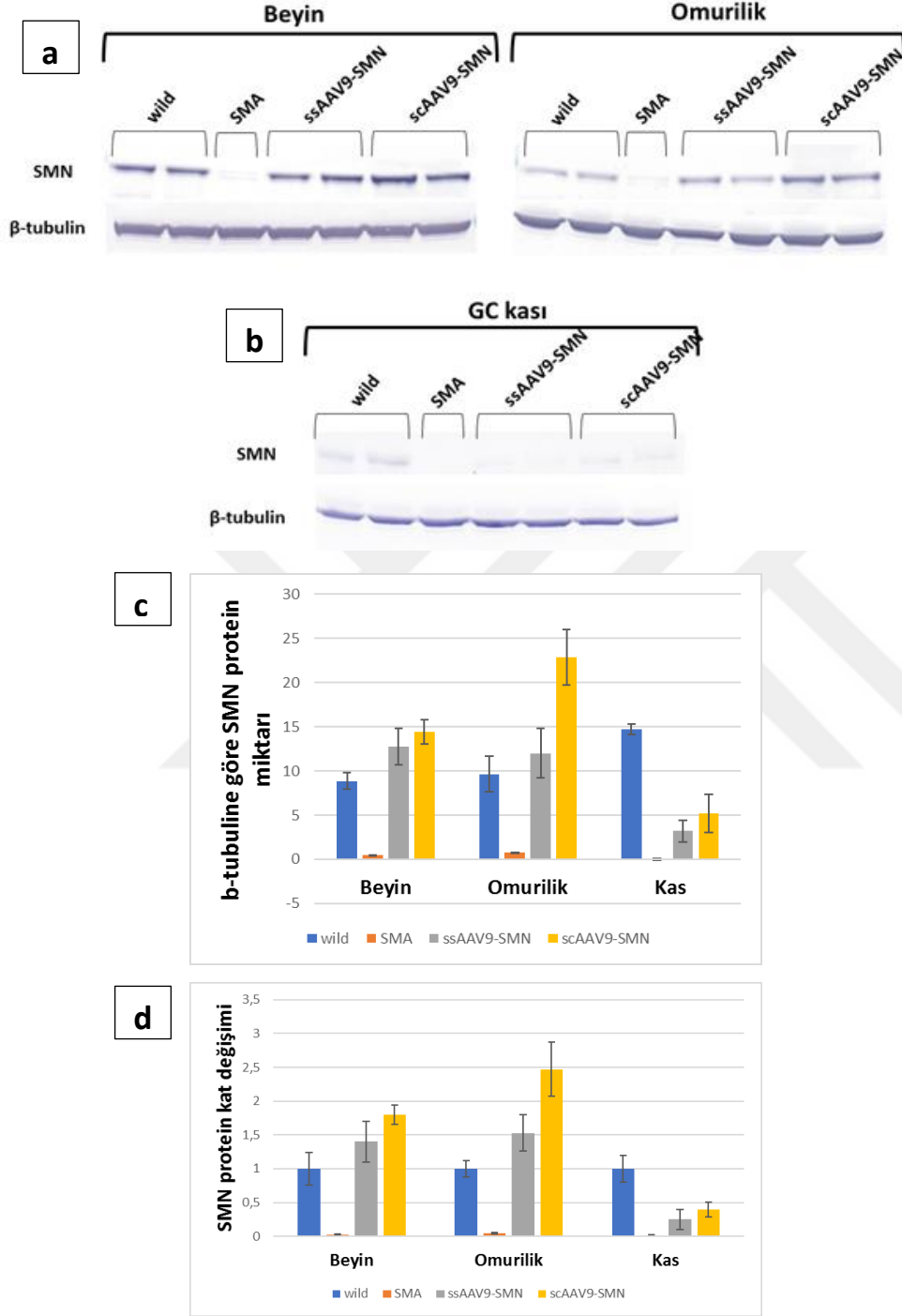
Şekil 4.25. P14'deki fare omuriliğinin servikal bölgesindeki motor nöron sayısı. Tedaviden sonra motor nöron sayısı her iki tedavi grubunda artış göstermiştir. Tedavi edilmiş SMA, *wild* tip, ssAAV9 ve scAAV9 ile enjekte edilmiş farelerin motor nöron sayısı sırasıyla 11 ± 2 , 27 ± 3 , 18 ± 2 , ve 22 ± 4 'dür. $P < 0.003$



Şekil 4.26. P14 farelerin GC kaslarının HE boyaması. a) SMA'lı, b) *Wild* tip, c) ssAAV9-SMN ve d) scAAV9-SMN ile enjekte olmuş farelerin GC kas morfolojisi. 20X objektifi.

Histolojik analizlerden sonra, SMN protein ekspresyonu MSS ve kaslarda western blot ve RT-PCR analizleri ile incelenmiştir. Western blot için P14'de fare dokularından izole edilmiş 50 µg total protein SDS-PAGE jele yüklenmiştir. Proteinler PVDF kâğıda transfer edildikten sonra anti SMN ve anti β-Tubulin ile boyanmıştır. Western blot sonuçları şekil 4.27'de gösterilmiştir. Western blot sonuçlarına göre SMA'lı farenin beyin, omurilik ve kaslarında SMN proteini saptanmamıştır. Tedavi gruplarında SMN protein ekspresyonu *wild* tip fare örneklerine göre daha fazladır (Şekil 4.27a, 4.27b, ve 4.27c). Şekil 4.27d'de gösterildiği gibi SMN protein miktarı western blotta kontrol olarak kullanılmış β-Tubulin protein miktarına göre değerlendirildiğinde en çok SMN protein miktarı *wild* tip farelerin kaslarında saptanmıştır. ssAAV9-SMN ile enjekte edilmiş farenin beyin, omurilik, ve kasında SMN protein ekspresyonu sağlıklı *wild* tip fareye göre sırasıyla 1.4, 1.53 ve 0.25 kat artış göstermiştir (şekil 4.27d). scAAV9-SMN ile enjekte edilmiş farelerde ise beyin, omurilik ve kas örneklerinde SMN protein miktarı sırasıyla, 1.8, 2.47 ve 0.4 kat daha fazla artış göstermektedir (şekil 4.27d).

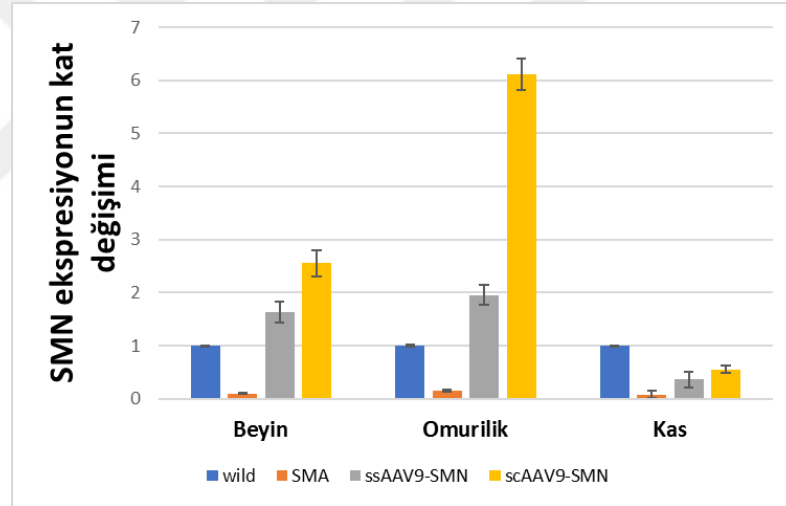
En çok SMN protein kat değışikliği scAAV9-SMN ile enjekte edilmiş farelerinin omurilıklarında saptanmıştır.



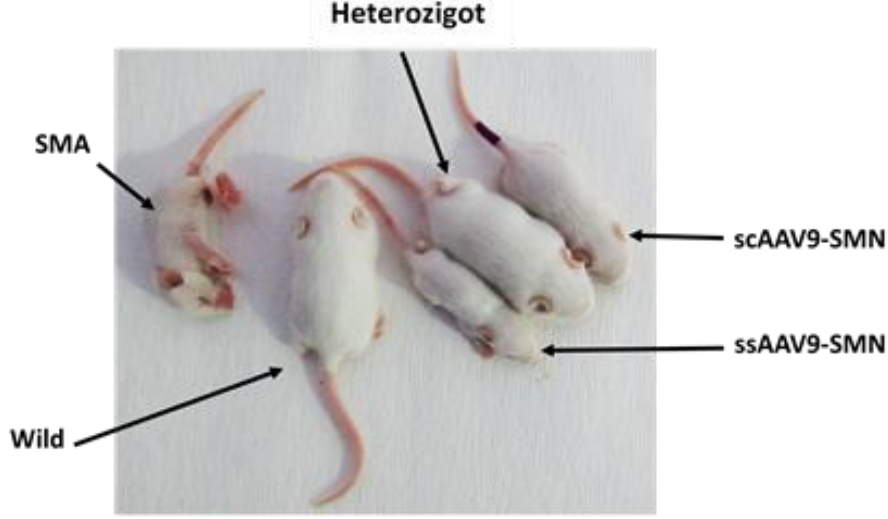
Şekil 4.27. Prenatal dönemde rAAV9-SMN ile enjekte edilmiş farelerin beyin, omurilik ve GC kaslarında SMN protein ekspresyonunun analiz sonuçları. Farklı gruplardaki farelerin; a) MSS'deki, ve b) kas örneklerindeki SMN protein miktarı. c) western blot sonuçlarının kantitatif değerlendirilme sonuçları. ss ve scAAV9-SMN vektörleri ile enjekte edilmiş farelerde SMN protein miktarı beyinde

12.75 ve 14.43, omurilikte 11.99 ve 22.86, ve kasta 3.19 ve 5.17 olarak saptanmıştır. d) SMN proteinin kat değişimi. ss ve scAAV9-SMN vektörleri ile enjekte edilmiş farelerde SMN protein kat değişimi beyinde 1.4 ve 1.8, omurilikte 1.53 ve 2.47, ve kasta 0.25 ve 0.4 kat artış göstermektedir. GC: *Gastrocnemius*, $P < 0.001$

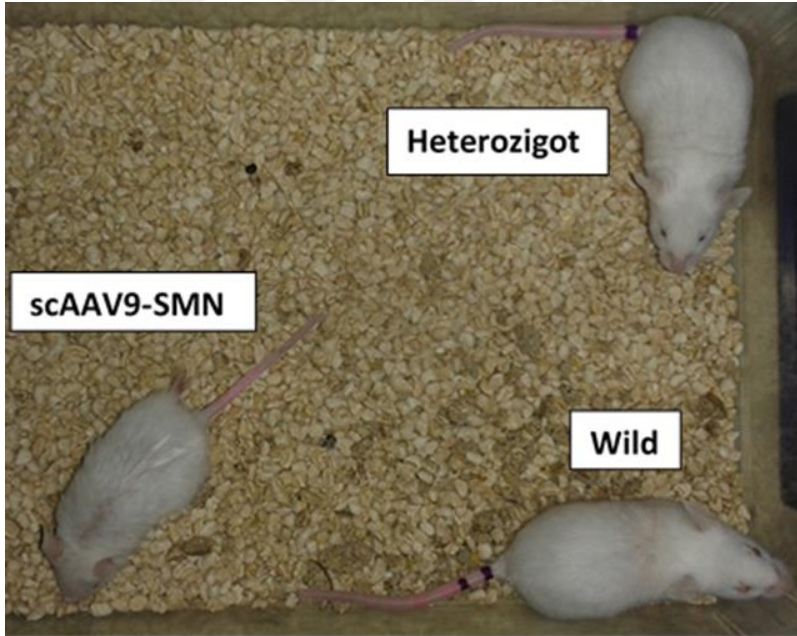
Western blot sonuçları RT-PCR analizi ile doğrulanmıştır. Tedavi gruplarının beyin, omurilik ve kaslarındaki SMN protein ekspresiyon miktarı sağlıklı fare SMN protein ekspresiyon miktarıyla kıyaslanarak değerlendirildi (Şekil 4.28). SMN protein ekspresiyonu, ssAV9-SMN ile enjekte edilmiş farelerde sağlıklı fareye göre beyinde 1.63, omurilikte 1.95 ve kasta 0.36 kat artış gösterirken, sc ile enjekte edilmiş farelerde ise beyin, omurilik ve kas dokusunda sırasıyla 2.5, 6.11, 0.55 kat artış göstermiştir (Şekil 4.28). enjekte edilmiş farelerin genel durumu Şekil 4.29 ve Şekil 4.30’de gösterilmiştir.



Şekil 4.28. RT-PCR sonuçları. Enjekte edilmiş iki çalışma grubunda SMN protein ekspresiyonu beyin, omurilik ve kaslarda artış göstermiştir. En çok SMN ekspresiyon artışı scAAV9-SMN ile enjektelenmiş farelerinin omuriliğinde (sağlıklı fare’ye göre 6.11 kat artış) saptanmıştır.



Şekil 4.29. Farklı gruptaki farelerin P14'deki fenotipleri. Tedavi edilmemiş SMA'lı farede ağır bir hipotoni görülmektedir (2.5 gr). Heterozigot ve *wild* tip fareler tamamen sağlıklı görünürler (yaklaşık 6 gr). ss ve scAAV-SMN ile enjekte edilmiş fareler *wild tip* ve heterozigot farelere göre daha küçüktürler (sırasıyla 3.6 gr ve 4.65 gr). Ancak, hareket konusunda sağlıklı farelere benzemektedirler.



Şekil 4.30. scAAV9-SMN ile E14-15. gününde ICV tekniği ile enjekte edilmiş farenin 2.5 aylıkkenki görüntüsü. Vücudu sağlıklı farelerden daha küçüktür ancak hareketlilik açısından sağlıklı farelere benzemektedir.

5. TARTIŞMA

Gen tedavisi genetik hastalıkları için en kesin tedavi yöntemi olarak bilinmektedir. Postnatal gen tedavisinin en büyük problemi (dezavantajı), ekzojene karşı bağışıklık sistemi tarafından oluşturan immün yanıt ve genin daha az ekspresyonudur. Uterus içi tedaviler geliştirildiğinde, hastalığın semptomları ortaya çıkmadan önce hastalığı tedavi etme olasılığı daha da artacaktır. Fetüsün en önemli özelliği, olgunlaşmamış bir immün sisteme sahip olmasıdır. Böylece dışardan verilen vektör ve genlere karşı immün yanıtlar gelişmemektedir ve daha uzun süreli gen ekspresyonu sağlanabilmektedir. Diğer yandan, fetüsün kök hücre popülasyonu yetişkinlere göre daha fazla olduğu için gen tedavisinde transfekte olan hücre sayısı daha fazla olacaktır. Doğumdan sonra yapılan gen tedavileri iyileştirici tedaviden ziyade hafifletici tedavilerdir ve kısa aralıklarla tekrar edilmelidir (David and Peebles, 2008). Tüm bunlardan yola çıkarak, bu çalışmada, rAAV9-SMN vektörü kullanılarak SMA'lı farelerde prenatal gen tedavisinin araştırılması amaçlanmıştır. SMA gen tedavisi çalışmalarında, en çok kullanılan viral vektör tipi rAAV vektörüdür.

Bu çalışmanın pilot kısmında kullanılan scAAV9-eGFP vektörleri hazır olarak Guangping Gao (Horae Gen Tedavi Merkezi, Massachusetts Üniversitesi Tıp Fakültesi, Worcester, MA, ABD) tarafından temin edilirken, diğer 2 viral vektörler, ss ve scAAV9-SMN'ler ise Gao lab'da bu proje kapsamında üretilmiştir. Bu çalışmada, elde edilen ssAAV9-SMN cis-plazmidleri (pAAV-CB6-PI-SMN) SMN cDNA'sı ve onun spesifik 5' ve 3' çevrilmemiş bölgeler (*untranslated regions*, UTRs)'i içerir iken, scAAV9-SMN cis-plazmidini (pAAVsc-CB6-PI-SMN) ise SMN genin spesifik UTR'leri içermemektedir (şekil 4.1). İki farklı vektörün kullanımı sahip oldukları taşıma kapasitelerindeki farktan kaynaklanmaktadır. Daha önceki çalışmalar, scAAV9 vektörlerinin ssAAV9 vektörlere göre daha az taşıma kapasitesine sahip olduğunu göstermiştir (Grieger and Samulski, 2005; Grieger and Samulski, 2012; Wu et al., 2007). Bu çalışmada SMN protein ekspresyonu, elde edilmiş cis-plazmidler ile transfekte olmuş HEK293 hücrelerde westren blot analizi ile incelenmiştir (şekil 4.4). Western blot sonuçlara göre, SMN genin UTR dizilerini içermeyen ssAAV9 cisplazmidler scAAV9cis-plazmidlere göre yaklaşık 2 kat daha fazla SMN protein ekspresyonuna sebep olmuşlardır (şekil 4.4). Larsen

and Howard'ın (2014) çalışmalarında, *DMD* UTR'lerinin gen ekspresiyonununun distrofin gen ekspresyonu için çok önemli olduğunu göstermişlerdir. Yapmış oldukları çalışmada özellikle *DMD*'nin 3' UTR dizisinde yapılan her hangi bir değişikliğin distrofin ekspresiyonunda azalmaya sebep olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada, Larsen and Howard'ın (2014) sonuçlarından yola çıkarak ssAAV9 cisplazmidlerin, UTR içermeyen scAAV9 cis-plazmidlerine göre 2 kat daha fazla gen ekspresyon profili sergilemesi, UTR'lerin gen ifadesinde sahip oldukları önemli roller nedeniyle, bu dizilerin yokluğu transgenin azalmış ekspresyonuna neden olabileceği düşünülmektedir.

Bu çalışmada, elde edilmiş ss ve scAAV9-SMN vektörlerinde Gümüş boyama ile sadece 87, 73 ve 62 kD ağırlığında olan VP1, VP2, VP3 olmak üzere 3 kapsid proteini gözlenmiştir (şekil 4.5). Bu sonuçlar Zolotukhin et al. (1999), Lia et al. (2012), ve Gao, and Sena-Esteves (2012) sonuçları ile yüksek oranda bezelik gösterip izole edilmiş vektörlerin saflığının oldukça yüksek olduğunu vurgulamaktadır.

Ss ve scAAV9-SMN vektörlerinin TEM görüntülerinde merkezleri koyu renkte olan bazı virüs partikülleri boş veya kısmen paketlenmiş kapsidleri gösteriyor iken, AAV9 viryonlarının çoğunluğunu tamamen paketlenmiş partiküller oluşturmaktadır. Ss ve scAAV9-SMN vektörlerinin elektron mikrograflarında az sayıda boş kapsid görülmektedir (şekil 4.6). Özellikle ssAAV-SMN vektörünün boş kapsid sayısının scAAV9-SMN vektörüne göre 12 kat daha fazla olduğu saptanmıştır. TEM mikrograf görüntüleri, Grieger et al. (2006) çalışma sonuçları ile benzerlik göstermektedir. Ren et al. (2005), scAAV vektörlerinin çift zincirli genomlarının ssAAV'nın genomlarına göre daha stabil olduğunu göstermişlerdir. Özellikle Horowitz et al. (2013), yüksek sıcaklıklarda scAAV'nın daha dayanıklı olduğunu ve sıcaklığa maruz kalan scAAV vektörlerinin boş kapsid sayısının ssAAV vektörlere göre daha az olduğunu göstermişlerdir. Bu çalışmada, ssAAV-SMN vektörünün boş kapsid sayısının scAAV9-SMN vektörüne göre 12 kat daha fazla olduğunun saptanması çalışma sırasında, viral vektörleri üretirken virüsler değişik işlemlere maruz bırakıldığından dolayı scAAV'nın çift zincirli genomunun, ssAAV'nın tek zincirli genomuna göre daha sağlam ve bozulmamış şekilde kaldığını düşündürmektedir.

İzole edilmiş viral vektörlerden boş kapsidlerin tamamen temizlenmesi oldukça zordur, ancak saflaştırma en çok istenen bir özelliktir. CsCl gradyan yöntemi, boş kapsidlerin tamamen temizlenmesi için en iyi yöntem olarak bilinmektedir (Lock et al., 2010). Bu nedenle, elde edilmiş viral vektörler bu çalışmada CsCl gradyan yöntemi ile saflaştırılmıştır. Yapılan bütün analizlerin sonuçları, bu çalışmada üretilmiş rAAV-SMN vektörlerinin istenilen kalitede olduğunu kanıtlamaktadır. Bu nedenle, planladığımız sonraki in vivo SMA gen tedavisi araştırmalarında bunlarla çalışmalara devam edilmiştir.

Gen tedavisi çalışmalarının ilk aşamasında, prenatal dönemde ICV ve IP olmak üzere iki farklı yöntem ile E14-15 embriyolara aktarılmış scAAV9 vektörünün biyodağılımı araştırılmıştır. Her iki çalışma grubunda da eGFP ekspresyonu beyin ve spinal kordda saptanmıştır (şekil 4.12). Hem IU-ICV hem de IU-IP yöntemleri ile enjekte edilmiş farelerde koroid pleksus hücreleri (şekil 4.13), hipokampus ve talamus bölgeleri MSS'nin en iyi transfekte olmuş bölgeleri olarak tespit edilmişlerdir. Bu bulguların yanı sıra, ICV şeklinde enjekte edilmiş farelerde, iyi transfekte olmuş diğer bir MSS bölgesi omurilik olarak saptanmıştır. Haddad et al. (2013) tarafından yapılan çalışmalarda da E15'de rAAV5-GFP ya da rAAV9-GFP ile enjekte edilmiş farelerde en çok GFP ekspresyonu koroid pleksus'de saptanmıştır. Bu çalışma sırasında elde edilen bulgular, Haddad et al. (2013) çalışma sonuçları göz önünde bulundurularak, embriyonik dönemde enjekte edilmiş rAAV9 vektörlerinin MSS'nin Hipokampus, Talamus, koroid pleksus ve omurilik bölgeleri için diğer bölgelere göre daha yüksek bir tropizm sergilediğini düşündürmektedir. Ayrıca bu sonuçlar, rAAV9 vektörlerinin yüksek bir verimlilik ile Alzheimer ve Ölümcül ailesel uykusuzluk gibi Hipokampus, Talamus, ya da koroid pleksusu ilgilendiren hastalıkların tedavilerinde kullanabileceğini göstermektedir. AAV9 vektörünün beynin bazı bölgelerinde ve omurilikte daha yoğun dağılım göstermesi, bu bölgelerin beyinin BOS'la daha geniş temas yüzeyine sahip olması ve bu nedenle BOS içindeki vektöre daha fazla maruz kalmalarından kaynaklanabiliyor olabileceği Guo et al. (2016) tarafından öne sürülmüştür. Hipokampus, talamus ya da koroid pleksus dışında rAAV9'un IU-ICV enjeksiyonununun, rAAV1, rAAV8 ve rAAV9 enjeksiyon sonuçlarıyla benzer olarak geniş bir norönl ve glial hücre transdüksiyonuna sebep olduğu birçok araştırmacı tarafından gösterilmiştir (Karolewski and Wolfe, 2006; Rahim et al., 2012; Haddad

et al., 2013). Bu araştırmacıların elde ettikleri sonuçlardaki kadar geniş bir transdüksiyon saptanmamış olmasına rağmen, bu çalışmada da rAAV9 vektörlerinin ICV enjeksiyonunda, nöral ve glial hücrelerin transdüksiyonları saptanmıştır (şekil 4.14 ve 4.20). Hordeaux et al. (2015), postnatal ICV enjeksiyonundan sonra saptanmış olduğu periferel dağılım ile tutarlı olarak bu çalışmada da ICV enjeksiyondan sonra periferel dağılım saptanmıştır.

Bu çalışmada, prenatal dönemde rAAV9 ile enjekte edilmiş farelerde SVZ bölgesindeki NKH'nin rAAV9 ile transfeksiyonu ilk kez saptanmıştır (şekil 4.17 ve 4.18). Bu NKH'ler çoğalıp farklılaşarak Hipokampus ve Talamus gibi yakın bölgelere dağılabilmektedirler. Böylece, Hipokampus ve Talamusta iyi transfeksiyon belirlenmesinin nedeni, onlara yakın NKH'ler olarak düşünülmektedir. Bu düşünceden yola çıkılarak, transfekte edilmiş NKH'lerden farklılaşan yeni nöronlar MSS'de daha yüksek bir transgen ekspresyonu sağlayarak, tedavi sonuçlarının daha kalıcı olmalarını sağlayabilecekleri de düşünülmektedir.

Embriyonik dönemde ICV ve IP enjeksiyon yöntemleri ile fare embriyolarına aktarılan rAAV9 vektörü korteksdeki nöronlar için diğer bölgelere göre en az tropizm göstermiştir (şekil 4.14). ICV yöntemi ile enjekte edilmiş farelerin omuriliğinde motor nöronların transdüksiyonu IP yöntemi ile enjekte edilmiş farelerle karşılaştırıldığında, belirgin olarak daha yüksek oranda saptanmıştır. Ancak, ICV yöntemi ile enjekte edilmiş farelerin omuriliğinde görülen glia transdüksiyonu ve iç organlarda transgenin ekspresyon düzeyi rAAV9 vektörlerinin, aksonlar içinden geçerek veya kan dolaşımından dağıtılarak iç organlara ulaşabileceği Guo et al. (2016) tarafından öne sürülmüştür. Bu çalışmada, Hordeaux et al. (2015) sonuçları da dikkate alınarak ICV veya diğer BOS enjeksiyonlarının, MSS hücrelerinin rAAV9 ile transdüksiyonunu sağlamak için etkili yöntem olduğu gösterilmiştir.

Bu çalışmada, rAAV9'un periferel dağılımının özellikle IP yöntemi ile enjekte edilmiş farelerde hem karaciğer hem de BAT'de yüksek transgen ekspresyonu sağladığı gösterilmiştir (şekil 4.21). Mattar et al. (2015), IU-vitellin damar içi enjeksiyon yoluyla fare fetüslerine aktarılan ss ve scAAV9-GFP vektörleri kas kalp, böbrek, dalak, karaciğer gibi periferik organlarda çok geniş ve

yüksek bir gen ekspresyonu olduğu gösterilmiştir. En çok GFP miktarı sırasıyla kas, deri karaciğer ve böbrekte saptanmıştır (Mattar et al., 2015). Bizim çalışmalarımızda ise IU-IP yöntemi ile enjekte edilmiş farelerde en çok GFP ekspresyon miktarı karaciğer ve BAT'de saptanmıştır (şekil 4.11 ve şekil 4.21). IVIS sonuçları interskapular (hem ICV hem de IP enjeksiyonu) ve Inguinal (IP enjekte yöntemi ile edilmiş örneklerde) bölgeleri gibi BAT'ın bulunduğu alanlarında şiddetli floresan emisyonu göstermiştir (şekil 4.11). Bu sonuçlar rAAV9 vektörünün akson veya kandan geçerek BAT ve karaciğer gibi iç organlara girdiğini düşündürmektedir. İskelet kaslarında ve akciğerde anlamlı bir AAV9 vektörün dağılımı gözlemlenmemiştir. ICV farelerinin kalp, karaciğer, BAT ve böbreklerinde çok düşük bir transgen ekspresyonu saptanmış iken IP yöntemi ile enjekte edilmiş farelerde çok daha fazla oranda saptanmıştır (şekil 4.21). Guo et al. (2016) tarafından, rAAV9 vektörün tropizminin doku özgünlüğüne ilaveten, BOS'un lenf sistemine drenajının rAAV'nin farklı organlara ve kan dolaşımına dağılımında önemli bir role sahip olduğu önerilmiştir. Viral kapsidlerin farklı türleri ile birlikte, konakçı dokunun çeşitli viral reseptörleri, hücre içi engelleri (Nonnenmacher and Weber, 2012) ya da dokunun spesifik gen düzenleme mekanizmaları gibi (Liu et al., 2008) konakçı doku ile ilgili bir dizi faktörler transgenin ekspresyonunu etkileyebilmektedir.

Bu çalışmada, SVZ'deki NKH'lerin rAAV9 vektörleri ile transfeksiyonu hem IU-ICV hem de IU-IP yöntemleri ile enjekte edilmiş farelerde görülmüştür (şekil 4.17 ve şekil 4.18). KH'lerin transfeksiyonu fetal gen tedavisinin en büyük avantajlarından biridir. Kotterman et al. (2015), AAV2, AAV4, AAV6, ve AAV r3.45'nin postnatal enjeksiyonlarında, fare beyнинin DG bölgesindeki NKH'lerin transfeksiyonu gösterilmiştir. Ancak, aynı çalışmada postnatal dönemde enjekte edilmiş AAV2, AAV4 ve AAV6'nın NKH'leri transfeksiyon verimliliğinin AAVr3.45'e göre daha düşük olduğu gösterilmiştir. Fakat kök hücrelerin sayıları embriyonik dönemde daha fazla olduğu için bu dönemde yapılan enjeksiyonlar daha fazla sayıda NKH transfeksiyonuna yol açabilir ve böylece tedavinin sonuçları daha kalıcı olabileceği düşünülmektedir. Bu çalışmada, embriyonik dönemde scAAV9-eGFP ile enjekte edilmiş farelerin beyinlerinden izole edilmiş NKH'ler (şekil 4.18 ve şekil 4.19) GFP'yi eksprese eden hücre sayılarında ve floresan ışımada herhangi bir değişiklik olmadan 1'aya kadar pasajlanmıştır. Bu sonuçlar,

in vitro koşullarda transfekte edilmiş NKH'lerin belli bir süre boyunca GFP ekspresyonunu sürdürdüğünü gösteren Jang et al. (2011), çalışmaları ile oldukça uyumludur. Rahim et al. (2011) çalışmalarında, AAV9'un prenatal ve postnatal dönemlerde enjeksiyon sonuçları karşılaştırıldığında, transgen ekspresyonunun MSS'lerin çeşitli hücre tiplerinde iki enjeksiyon döneminde önemli farklılıklar gösterdiği raporlanmıştır. AAV9'un doğum öncesi enjeksiyonu, nöronların ve motor nöronların baskın bir transdüksiyonunu sağlar iken, vektörün doğum sonrası enjeksiyonu baskın olarak astrosit transdüksiyonuna sebep olur. Ayrıca prenatal gen aktarımı, postnatal enjeksiyon ile kıyaslandığında, fetal gen tedavisinde verimli bir transgen ekspresyonunu elde etmek için vektörlerin daha düşük dozlarına ihtiyaç duyulmaktadır. Prenatal gen tedavisinde, hem düşük miktarda enjekte edilmiş viral vektörler hem de fetüsün olgunlaşmamış bağışıklık sistemi, vektöre karşı "bağışıklık adaptasyon"u (immune adaption) geliştirmeye yardımcı olur. Bu da fetal gen tedavisinin diğer bir avantajıdır ve aktarılmış transgenin ömür boyu ifadesini sağlamaktadır (Coutelle and Waddington, 2012). Embriyonik dönemde rAAV ile enjekte edilmiş farelerde postnatal dönemlerde AAV ya da transgene karşı nötralize antikor gelişmediği daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir (Lipshutz et al., 2001).

Bu çalışmanın sonuçları beklenildiği gibi, MSS'nin hücrelerin transdüksiyonunun IP yöntemi ile enjekte edilmiş farelerde ICV örneklere göre daha az olduğunu ve IP enjeksiyonunun BAT ve karaciğer gibi organların transdüksiyonu için verimli bir enjeksiyon yöntemi olduğunu göstermektedir. MSS hücrelerin transdüksiyonu için ICV enjeksiyonu en iyi yöntemdir. Postnatal ICV enjeksiyonları bazı ciddi komplikasyonlara yol açtığından (Cohen-Pfeffer et al., 2017), NKH'lerin transdüksiyonu, virüsün enjekte edilen düşük dozları ve bağışıklık sisteminin adaptasyonu gibi IU-ICV yönteminin avantajları nedeniyle bu çalışma kapsamında tercih edilmiştir. Bu çalışmada IU-ICV enjeksiyon yönteminin diğer tercih nedeni, AAV9'un prenatal dönemde (immün sistemin tam gelişmediği dönem) aktarılması karaciğer toksisitesini engelleyerek postnatal dönemde tedavi verimliliğini artırmak için ihtiyaç duyulan steroid ve immün süpresif gibi ek tedavilerin uygulanmasını ortadan kaldırıyor olmasıdır (Armbruster et al., 2016). Prenatal dönemde aktarılmış transgene karşı geliştirilen immün adaptasyon nedeniyle sağ kalım devam ederken postnatal dönemde her hangi bir immün yanıtın

oluşması engellenmektedir ve gerektiği takdirde postnatal dönemde tekrarlı dozların verilmesi immün adaptasyon sayesinde tedavi verimliliğini olumsuz yönde etkilememektedir. Prenatal transgen aktarımına kıyasla, postnatal dönemde aktarılmış transgene karşı immün adaptasyon gelişmez. Postnatal transfeksiyonda hastalık semptomlarının hafifletilmesi için gerekli olan tekrarlı dozlarda, aktarılan her tekrar doza karşı gittikçe artan immün yanıt gelişir ki bu durum tedavi verimliliğini olumsuz yönde etkilemektedir. AAV vektörün BOS içine enjeksiyonunun diğer bir avantajı potansiyel immün yanıt karşısında ortaya çıkmaktadır. İnsanlarda, anti-AAV antikorun miktarı BOS’ da seruma göre daha az bulunmaktadır. Anti-AAV9 antikorun yüksek miktarları transgenin MSS’deki ekspresyonunu baskılamaktadır (Haurigot et al., 2013). Öte yandan, bizim pilot çalışma sonuçlarımızda gösterildiği gibi vektörün az miktarda transfeksiyonu (2 µl) beyinde yüksek bir transgen ekspresyonu sağlayabiliyorken, daha yüksek vektör dozları (5 µl) IP (kan içine) enjeksiyon ile verildiğinde MSS’de daha az oranda transgen ekspresyonuna sebep olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar Armbruster et al. (2016) ve Haurigot et al. (2013), çalışmaların sonuçları ile oldukça tutarlıdır. Bizim çalışmamızda IP yöntemi ile enjekte edilmiş farelerde transgenin yüksek ekspresyonu karaciğer ve BAT’da saptanmıştır. Transgenin aşırı miktarda ekspresyonu T hücrelere bağlı karaciğer toksisitesine neden olmaktadır. Bunun sonucunda karaciğer hasarının meydana gelmesi, kaçınılmaz bir son olarak karşımıza çıkmaktadır (Meyer et al., 2015).

Didonato et al. (2003) tarafından *SMN* geni taşıyan AAV ile hastalardan elde edilen fibroblast hücre hatlarını transfekte ettikten sonra gen protein sayısının arttığı gösterilmiştir. Bu çalışmada, SMA’lı hücre hatlarına ilk kez normal *SMN* geni aktarılması sağlanmış ve gen tedavisinde bir umut olmuştur (DiDonato et al., 2003). Şu ana kadar SMA hastalığı için yapılan çoğu gen tedavisi araştırmaları viral vektörler ve özellikle AAV vektörler aracılığıyla yapılmıştır ve bu hastalığın semptomlarının kısmen hafiflemesine sebep olmuştur. Bu çalışmada, prenatal gen tedavisi için hem ssAAV9-SMN hem de scAAV9-SMN vektörleri kullanılmıştır. Elde edilmiş AAV vektörlerin fonksiyonellik testleri ilk olarak in vitro koşullarda araştırılmıştır. Normal sağlıklı fibroblastlarda ortalama 3-4 adet Gem yapısı görülürken SMA’lı farelerde Gem yapıları hiç görülmemiştir (şekil 4.22a). ssAAV9-SMN vektörü ile transfekte edilmiş hücrelerde sc-AAV9-SMN vektörü ile

transfekte edilmiş hücrelere göre Gem'lerin sayısı daha fazla olarak saptanmıştır (şekil 4.22a). Her iki virüs ile de transfekte edilmiş hücrelerdeki Gem sayısının normal sağlıklı fibroblastlardakilere göre çok daha fazla olduğu tespit edilmiştir. IF sonuçları RT-PCR analizi ile doğrulanmıştır (şekil 4.21b). Gem'lerin sayısı SMA hastalığının şiddetini ters orantılı olarak etkilemektedir (DiDonato et al., 2003). Buradan yola çıkarak, Gem'lerin sayısı arttıkça hastalığın semptomlarında hafifleme görülmesi, Gem'lerin sayısının azalması ya da görülmemesi durumlarında hastalığın ağır fenotipik semptomların belirgin bir göstergesi olarak değerlendirilebilir. Gem'lerin miktarları ile SMN protein miktarı arasında hastalığın seyir şiddetinden farklı olarak doğru orantılı bir ilişki bulunmaktadır. Yani SMN protein miktarında meydana gelen azalma, Gem'lerin sayılarının azalmasına sebep olmaktadır (Arnold et al., 2002).

Bu çalışmada, *in vitro* koşullarda ssAAV'nin verimliliğinin scAAV'ye göre daha yüksek olduğu tespit edilmesine rağmen, Wu et al. (2012) scAAV'nin *in vivo* koşullarda ssAAV'den daha yüksek verimliliğe sahip olduklarını göstermişlerdir. scAAV ile enjekte edilmiş SMA'lı embriyoların sağ kalım sürelerinin ssAAV ile enjekte edilmiş embriyolardan daha uzun olduğunun saptanması (şekil 4.23a) Wu et al. (2012) sonuçlarıyla yüksek oranda tutarlıdır. ssAAV'nin düşük verimliliğinin en önemli nedeni bu virüsün tek zincirli DNA'sından çift zincirli DNA'yı sentezlemesi için konakçı hücreye ihtiyaç duymasındır ve bu basamak da hücre tipinden tipine göre farklılık göstermektedir (Nakai et al., 2000). scAAV'nin daha yüksek verimliliğinin nedeni, scAAV'nin çift zincirli genoma sahip olmasıdır (McCarty et al., 2003). Yani, scAAV'nin kapsidi içinde viral vektörün negatif ve pozitif DNA zincirleri mevcut iken ssAAV'nin kapsidlerinde sadece pozitif ya da sadece negatif zinciri vardır (Grieger et al., 2006). Çift zincirli DNA'ya sahip olan scAAV vektörlerin genomu hücrelere girdikten hemen sonra transgenin ekspresyonu başlar. Oysa ki, ssAAV'nin tek zincirli genomu hücrelere girdikten sonra ilk kendi komplementerini sentezler ve daha sonra protein ekspresyonu için hazır olur (McCarty et al., 2003). scAAV'nin çift zincirli DNA'sı ssAAV'nin tek zincirli DNA'sına göre daha stabil ve dayanıklıdır ve böylelikle scAAV vektörleri daha uzun süre hücrelerde kalabilir ve gen ekspresyonuna sebep olabilirler (Horowitz et al., 2013). Böylece, scAAV vektörleri ssAAV'lere göre transfekte ettiği hücre tiplerinde daha fazla eksprese olabilir.

SMA fare modelleri üzerine yapılan son gen tedavisi araştırmaları hastalığın seyri ve şiddeti açısından önemli sonuçlar ortaya koymaktadır. İnsan SMN proteini eksprese eden AAV vektörlerin potnatal enjeksiyonu SMA fenotipini iyileştirerek ağır SMA tipi olan SMN Δ 7 fare modelinde sağ kalım süresini uzatmıştır (Dominguez et al., 2011).

Tedavi araştırmalarında kullanılmış farklı stratejilerin birbirleri ile kıyaslanmaları farklı enjeksiyon yöntemleri, doz, enjeksiyon alan yaşı, viral vektör serotipi ve transgen ekspresyon kasetinden dolayı oldukça zordur. *Nationwide Children's Hospital*'da (Ohio State University, Columbus USA; trial ID: NCT02122952) 2014 yılında başlayan faz 1 ve faz 2 klinik çalışmalarından yola çıkılarak hastalara IV yöntemi ile aktarılmış *SMN1* geni eksprese eden scAAV9 vektörü güvenlik ve etkinlik açısından SMA hastalarının tedavisi için umut vaat eden bir yöntemdir.

Bu çalışmada, prenatal dönemde 4×10^{13} vg/kg dozda kullanılmış olan ssAAV9-SMN ya da scAAV9-SMN ile enjekte edilmiş farelerinin sağkalım süreleri sırasıyla, 60 ± 30 ve 105 ± 50 gün olarak saptanmıştır (şekil 4.23a). scAAV9-CBA-SMN vektörün 3×10^{13} vg/kg dozda ICV yöntemi ile postnatal dönemde SMN Δ 7 fare yavrularına aktarıldığında, bir çalışmada en fazla 282 gün (Meyer et al., 2015) ve diğer çalışmada en fazla 406 gün (Armbruster et al., 2016) raporlanmışken, aynı vektörün IV ve IM enjeksiyonu sırasıyla, 163 ve 199 gün hayatta kalmalarını sağlamıştır (Dominguez et al., 2011). Vektör miktarının 7.5×10^{13} vg/kg'e kadar artması hasta farenin 500 güne kadar hayatta kalmasını sağlamıştır (Armbruster et al., 2016). Kullanılan doz miktarı önceki bazı çalışmalara göre daha azdır. Bu nedenle, bu çalışmada enjekte edilmiş farelerinin daha kısa sağkalım süreleri daha düşük vektör dozlerin kullanılmasına bağlı olabilir. Farelerin sağkalma süresini etkileyen diğer önemli faktör, evre koşulları olabilir. Butchbach et al. (2009) tarafından gösterildiği gibi farklı çalışma gruplarındaki SMA'lı farelerin hayatta kalma süresini etkileyen evre faktörlerden biri annenin diyetidir (*maternal diet*). Farklı yemler ile beslenmiş *SMN*-/+, *SMN2*+/+, *SMN2 Δ 7*+/+ dişi farelerin SMA'lı yavrularının sağkalma sürelerinin %25'e kadar arttığı gösterilmiştir (Butchbach et al., 2009). Bizim alışmamızdaki fareler %3 yağ ve %28 protein içeren kuru fare yemleri ile beslenmiştir. Halbuki

Jackson laboratuvarının önerdiği fare yemleri %6 yağ ve %24 protein içermektedir. Butchbach et al. (2009) çalışmalarında %5.2 yağ ve %22.6 yemleri ile beslenmiş dişi farelerin SMA'lı yavrularının sağkalma sürelerinde %25 artış göstermiştir.

ICV yöntemi ile BOS'a enjekte edilmiş AAV9'un kan beyin bariyerinden geçebildiği saptanmıştır (Armbruster et al., 2016). Bu nedenle ICV yöntemi ile enjekte edilmiş embriyoların periferik organlarında gerek bu çalışmada (şekil 4.27 ve şekil 4.28) gerek ise Armbruster et al. (2016) çalışmasında, SMN protein miktarında artış gözlenmiştir. Yapılan çalışmalar ile tutarlı olarak bizim çalışmamızda prenatal dönemde enjekte edilmiş farelerin iskelet kaslarında artmış SMN proteini saptanması (şekil 4.27 ve şekil 4.28) vektörlerin kan beyin bariyerinden geçebildiklerini göstermektedir.

Bu çalışmada, tedavi edilmemiş SMA'lı fare kas örneklerinde görülmüş hipertrofiye olmuş lifler ve bunların arasına dağılmış olarak sirküler atrofik kas lifleri gözlenmiştir (şekil 4.26a). Tedavi edilmiş her iki gruptaki kas örnekleri normal sağlıklı kasa yakın bir fenotip göstermiştir (şekil 4.26). Özellikle liflerin çapı tedavi edilmemiş SMA farelerde küçülmüş iken, tedavi edilmiş farelerde özellikle scAAV ile tedavi edilmiş gruplarda liflerinin çapı artmıştır ve normale yakın bir fenotip göstermiştir. Bu sonuçlar, Glascock et al. (2012) çalışmalarının sonuçları ile tutarlıdır. Iyer et al. (2015) ve Armbruster et al. (2016) kasların normal fonksiyonu için SMN proteininin çok düşük miktarlarının yeterli olduğu gösterilmiştir. Armbruster et al. (2016) çalışmalarında sadece ICV enjeksiyonu hastalığın tedavisi için yeterli iken, iskelet kasları ve kalp gibi periferik dokulara yapılan enjeksiyonlarda hastalığın semptomlarında belirgin olarak hafifleme saptanmamıştır. SMN proteininin çok az miktarı kasların normal şekilde çalışması için yeterlidir. En son SMA gen tedavisi çalışmasında, ICV enjeksiyon yöntemi ile aktarılmış scAAV9-SMN1 vektörünün, ağır SMA modeli olan SMN Δ 7'nin hastalık semptomlarının iyileşmesi için yeterli olduğu gösterilip, ICV ve IV enjeksiyonlarının birlikte kullanılması, beklentilerin aksine, kas ve kalpte iyileşme kriterleri açısından yüksek oranda etkinlik göstermedikleri raporlanmıştır (Armbruster et al., 2016).

Önceki gen tedavisi çalışmalarda saptanan kuyruk, kulak gibi doku nekrozları (Dominguez et al., 2011; Foust et al., 2010; Narver et al., 2008), bu çalışmada hiçbir farede saptanmamıştır. Nekroz nedeni SMA'lı farelerde görülen vasküler endotel hücrelerinin bozukluğundan kaynaklanabilir (Foust et al., 2010).

Bu çalışmada prenatal dönemde yapılan intrauterin AAV9 enjeksiyonu SMA'lı farelerin abort oranının artmasına sebep olmuştur (çizelge 4.2). Abort olmuş IU-enjekte edilmiş SMA'lı farelerin beyinlerinde kanamalar görülmüştür. Bunların nedeni SMA'lı farelerde görülen vasküler endotel hücrelerinin bozuklukluğuna olabilir (Foust et al., 2010). AAV ve GFP vektörleri genellikle zararsız ve güvenli olmalarına rağmen rAAV kapsidine ya da transgen ürününe karşı gelişen herhangi iltihap ya da toksik etkiler göz ardı edilemez (Flotte et al., 2007; Salegio et al., 2012). rAAV vektörleri üretme ve saflaştırma protokoluna bağlı en son üründe kontaminasyon olarak kalan lipopolisakkaridler ve diğer endotoksinler yüksek ölüm oranının diğer olası açıklaması olabilir (Haddad et al., 2013). Ancak, pilot çalışma ve asıl gen tedavisi çalışmasının sonuçları karşılaştırıldığında embriyonik dönemde enjekte olmuş farelerin hayatta kalma oranı birbirlerine çok yakın olmakla birlikte PBS enjekte edilmiş kontrol farelere benzerlik göstermektedir. Böylelikle olası endotoksin toksisitesi de çok zayıf kalır. Tüm bunlardan yola çıkarak bizce SMA'lı embriyoların beyinlerinde görülen kanamaların en muhtemel nedeni önceki çalışmalarda gösterildiği gibi SMA'lı farelerin vasküler bozuklukları (Foust et al., 2010) olabilir.

In vitro koşullarda ssAAV9 tarafından ekprese edilmiş SMN protein miktarının scAAV9'dan daha düşük olduğu saptanmış olmasına rağmen scAAV9 (105 ± 50 gün) ile transfekte edilmiş farelerin sağ kalma süreleri ssAAV9 (63±30gün) ile transfekte edilmiş farelerden daha uzundur. Bunun en önemli nedeninin, in vivo koşullarda scAAV9'un daha fazla hücreye girebilme potansiyeli, duplike genoma sahip olduğu için hücrelerde daha uzun süre kalabilmesi ve transgen ekspresiyonunu daha uzun bir süre boyunca sağlayabilmesi olduğu düşünülmektedir.

SMA hastalığında, omuriliğin *anterior* kısmında motor nöronların (*lower-motor nöron*) sayısı azalmaktadır. Bu çalışmada, tedavi edilmiş farelerin alt motor

nöronlarının sayıları her iki grupta da normal sağlıklı fareye yakın olarak saptanmıştır (şekil 4.24). scAAV9 ile transfekte edilmiş farelerin alt motor nöronların sayısı ve morfolojileri tamamen sağlıklı farelere benzemektedir. Bu sonuçlar, Armbruster et al. (2016) ve Passini et al. (2010) tarafından saptanan postnatal gen tedavisi çalışma sonuçları ile tutarlıdır. Prenatal (McWhorter et al., 2003) ve erken postnatal (Le et al., 2011) dönemlerde sinir sisteminin gelişimi özellikle SMN protein miktarına oldukça bağımlıdır. Gelişimin her aşamasında, SMN proteini karaciğer, dalak, omurilik, kalp ve kas gibi tüm insan embriyonik dokularında tespit edilmiştir (Novelli et al., 1997). SMN gen ekspresyonu omuriliğin motor nöronlarında oldukça yüksektir (Hao et al., 2013). SMN protein miktarının azalması motor akson gelişiminde bozukluklara neden olup kas güçsüzlüğüne ve felce yol açmaktadır (Brichta et al., 2006).

Bizim çalışmamızda tedavi edilmiş bütün fareler boyut açısından sağlıklı farelerden daha küçük kalmıştır (şekil 4.29 ve şekil 4.30). Bu sonuçlar, Armbruster et al. (2016) tarafından saptanan postnatal gen tedavisi çalışma sonuçları ile tutarlıdır.

Genel anlamda, prenatal gen tedavisinin karmaşık manipülasyonlarının gerekliliğine ek olarak en büyük dezavantajı enjekte edilmiş viral vektörün maternal kan dolaşımına girebilme riskidir. Anne ve fetüs arasındaki plasenta yoluyla geniş materyal değişimi, maternal germ hücrelerin transdüksiyonu veya viral vektöre karşı bağışıklık yanıtların gelişimine sebep olabilir. Bu tip muhtemel dezavantajlar prenatal gen tedavisinin bilinmeyen özellikleri ve komplikasyonları faz öncesi ya da ileri klinik faz çalışmalarında kapsamlı olarak araştırılması gerekmektedir.

Önceki çalışmalarda, araştırmacılar periton içi ya da yolk kesesi damar yoluyla AAV2 ile prenatal dönemde (E15'de) enjekte edilmiş farelerin gonadlarında ya da sonraki nesillerinde AAV vektörün DNA'sının bulunup bulunmadığını araştırmışlardır (Jacob et al., 2005). Araştırmanın sonuçlarında, hem periton içi hem de damar yoluyla enjekte edilmiş farelerin gonadlarında nested PCR analiz yöntemi ile vektör DNA'sı saptanmıştır. Özellikle, damar yoluyla enjeksiyonu gonadlara daha fazla bir gen transferine sebep olmuştur. Ancak, vektör

DNA'sı ne sperm genomunda ne de sonraki nesillerde saptanmamıştır (Jackob et al., 2005).

Tüm bu sonuçlardan yola çıkarak, prenatal gen tedavisi SMA hastalığının tedavisi için yeni umut vaat eden bir yaklaşım olmasına rağmen prenatal gen tedavisinin olası dezavantajları ya da komplikasyonları faz öncesi çalışmalar ile detaylı olarak incelenmesi gerekmektedir.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak, SMA hastalığında prenatal gen tedavisi bu hastalığın semptomlarının hafiflemesini ve hasta farenin sağkalım süresinin artmasını sağlamıştır. Embriyonik dönemde aktarılmış ss ve scAAV9 vektörleri fare sağkalım süresini bazı prenatal çalışmalarda görüldüğü gibi 400 güne kadar artıramamış olmasına rağmen önceki postnatal SMA gen tedavisi çalışmalarında saptanan doku nekrozları; kulak ve kuyruk gibi bu çalışmada embriyonik dönemde tedavi olmuş hiçbir farede saptanmamıştır. Bunla birlikte prenatal gen tedavisinde transgen ve virüse karşı gelişen immün adaptasyon, postnatal dönemde tekrar dozların verilmesini sağlar. Hem ss hem de scAAV9'un prenatal dönemde enjeksiyonu SMN gen ekspresyonunun artmasını sağlamıştır ancak scAAV9 ile enjekte edilmiş farelerin sağ kalım süreleri ssAAV9 ile enjekte edilmiş olanlara karşı daha uzun olduğu saptanmıştır. Prenatal gen tedavisi SMA hastalığının tedavisi için umut vaat eden bir yaklaşım olmasına rağmen prenatal gen tedavisinin virüsün plasenta yoluyla anne dolaşım sistemine geçmesi, anne ve embiyonun germ hücrelerinin transdüksiyonu gibi dezavantajlarının faz öncesi ya da ileri klinik faz çalışmalarında kapsamlı olarak araştırılması gerekmektedir. Tedavi edilmiş farenin yakalama refleks testleri (*grasping test*), elektromiyografi/Biyokimyasal testler, tedavi edilmiş farelerin daha küçük kalma nedeni, farklı dokularda viral vektörün kopya sayısı ve virüsün genoma entegre olup olmaması gibi çeşitli test ve analizler yapılarak uygulanan prenatal gen tedavisinin etkinlik düzeyi değerlendirilebilir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Agorastos, T., Chrisafi , S., Lambropoulos, A.F., Mikos, T., Constandinides, T.C., Schlehofer, J.R., Schlehofer, B., Kotsis, A., and Bontis, J.N.,** 2008, Adeno-associated virus infection and cervical neoplasia: is there a protective role against human papillomavirus- related carcinogenesis?, *European Journal of Cancer Prevention*, 17:364–368pp.
- Anand, K.S. and Dhikav, V.,** 2012, Hippocampus in health and disease: An overview. *Annals of Indian Academy of Neurology*,15:239-246pp.
- Anderson, W.F., Kantoff, P., Eglitis, M., McLachlin, J., Karson, E., Zwiebel, J., Nienhuis, A., Karlsson, S., Blaese, R.M., Kohn, D., Gilboa, E., Armentano, D., Zanjani, E.D., Flake, A., Harrison, M.R., Gillio, A., Bordignon, C., and O'Reilly, R.,** 1986, Gene transfer and expression in nonhuman primates using retroviral vectors, *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 51:1073-1081pp.
- Armbruster, N., Lattanzi, A., Jeavons, M., Van Wittenberghe, L., Gjata, B., Marais, T., Martin, S., Vignaud, A., Voit, T., Mavilio, F., Barkats, M. and Buj-Bello, A.,** 2016, Efficacy and biodistribution analysis of intracerebroventricular administration of an optimized scAAV9-SMN1 vector in a mouse model of spinal muscular atrophy, *Molecular Therapy- Methods & Clinical Development*, 3:16060p.
- Arnold, A.S., Gueye, M., Ronde, P., Warter, J.M., Poindron, P. and Gies, J.P.,** 2002, Construction of a plasmid containing human SMN, the SMA determining gene, coupled to EGFP, *Plasmid*, 47:79-87pp.
- Azari, H., Louis, S.A., Sharififar, S., Vedam-Mai, V., and Reynolds, B.A.,** 2011, Neural-Colony Forming Cell Assay: An Assay To Discriminate Bona Fide Neural Stem Cells from Neural Progenitor Cells, *Journal of Visualized Experiments*, 49:2639-3791pp.
- Balusu, S., Brkic, M., Libert, C., and Vandenbroucke, R.E.,** 2016, The choroid plexus-cerebrospinal fluid interface in Alzheimer's disease: more than just a barrier, *Neural Regeneration Research*, 11: 534-537pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Berns, K.I., and Giraud, C.,** 1996, Biology of adeno-associated virus, *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 218:1–23pp.
- Blacklow, N.R., Hoggan, M.D., and Rowe, W.P.,** 1967, Isolation of adenovirus-associated viruses from man, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 58:1410–1415pp.
- Brahe, C., Clermont, O., Zappata, S., Tiziano, F., Melki, J. and Neri, G.,** 1996, Frameshift mutation in the survival motor neuron gene in a severe case of SMA type I, *Human Molecular Genetics*, 5:1971-1976pp.
- Brichta, L., Holker, I., Haug, K., Klockgether, T. and Wirth, B.,** 2006, In vivo activation of SMN in spinal muscular atrophy carriers and patients treated with valproate, *Annals of Neurology*, 59:970-975pp.
- Butchbach, M.E., Rose, F.F.Jr., Rhoades, S., Marston, J., McCrone, J.T., Sinnott, R., and Lorson, C.L.,** 2010, Effect of diet on the survival and phenotype of a mouse model for spinal muscular atrophy, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 391:835-840pp.
- Charroux, B., Pellizzoni, L., Parkinson, R.A., Yong, J., Shevchenko, A., Mann, M. and Dreyfuss, G.,** 2000, Gemin4. A novel component of the SMN complex that is found in both gems and nucleoli, *Journal of Cell Biology*, 148: 1177-1186pp.
- Cifuentes-Diaz, C., Frugier, T., Tiziano, F.D., Lacene, E., Roblot, N., Joshi, V., Moreau, M.H. and Melki, J.,** 2001, Deletion of murine SMN exon 7 directed to skeletal muscle leads to severe muscular dystrophy, *Journal of Cell Biology*, 152:1107-1114pp.
- Cohen-Pfeffer, J.L., Gururangan, S., Lester, T., Lim, D.A., Shaywitz, A.J., Westphal, M., and Slavic, I.,** 2017, Intracerebroventricular Delivery as a Safe, Long-Term Route of Drug Administration, *Pediatric Neurology*, 67:23-35pp.
- Coutelle, C. and Waddington, S.N.,** 2012, The concept of prenatal gene therapy, *Methods in Molecular Biology*, 891:1-7pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- David, A.L. and Peebles, D.**, 2008, Gene therapy for the fetus: is there a future? Best Practice, *Research in Clinical Obstetrics and Gynaecology*, 22:203-218pp.
- DiDonato, C.J., Chen, X.N., Noya, D., Korenberg, J.R., Nadeau, J.H. and Simard, L.R.**, 1997, Cloning, characterization, and copy number of the murine survival motor neuron gene: homolog of the spinal muscular atrophy-determining gene, *Genome Research*, 7:339-352pp.
- DiDonato, C.J., Parks, R.J. and Kothary, R.**, 2003, Development of a gene therapy strategy for the restoration of survival motor neuron protein expression: Implications for spinal muscular atrophy therapy, *Human Gene Therapy*, 14:179-188pp.
- Dominguez, E., Marais, T., Chatauret, N., Benkhelifa-Ziyyat, S., Duque, S., Ravassard, P., Carcenac, R., Astord, S., de Moura, A.P., Voit, T. and Barkats, M.**, 2011, Intravenous scAAV9 delivery of a codon-optimized SMN1 sequence rescues SMA mice, *Human Molecular Genetics*, 20:681-693pp.
- Douar, A.M., Themis, M., Coutelle, C.**, 1996, Fetal somatic gene therapy, *Human Molecular Genetics*, 2:633-641pp.
- Duan, D., Yue, Y., and Engelhardt, J.F.**, 2001, Expanding AAV packaging capacity with trans-splicing or overlapping vectors: a quantitative comparison, *Molecular Therapy*, 4:383-391pp.
- Eglitis, M.A., Kantoff, P.W., McLachlin, J.R., Gillio, A., Flake, A.W., Bordignon, C., Moen, R.C., Karson, E.M., Zwiebel, J.A., Kohn, D.B. and et al.**, 1987, Gene therapy: efforts at developing large animal models for autologous bone marrow transplant and gene transfer with retroviral vectors, *Ciba Foundation symposium*, 130:229-246pp.
- Ferrari, F.K., Samulski, T., Shenk, T. and Samulski, R.J.**, 1996, Second-strand synthesis is a rate-limiting step for efficient transduction by recombinant adeno-associated virus vectors, *Journal of Virology*, 70: 3227-3234pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Fischer, U., Liu, Q. and Dreyfuss, G.,** 1997, The SMN-SIP1 complex has an essential role in spliceosomal snRNP biogenesis, *Cell*, 90:1023-1029pp.
- Flake, A.W. and Harrison, M.R.,** 1995, Fetal surgery, *Annual Review of Medicine*, 46:67-78pp.
- Flotte, T.R., Conlon, T.J., Poirier, A., Campbell-Thompson, M., and Byrne, B.J.,** 2007, Preclinical characterization of a recombinant adeno-associated virus type 1-pseudotyped vector demonstrates dose-dependent injection site inflammation and dissemination of vector genomes to distant sites, *Human Gene Therapy*, 18:245–256pp.
- Foust, K.D., Wang, X., McGovern, V.L., Braun, L., Bevan, A.K., Haidet, A.M., Le, T.T., Morales, P.R., Rich, M.M., Burghes, A.H. and Kaspar, B.K.,** 2010, Rescue of the spinal muscular atrophy phenotype in a mouse model by early postnatal delivery of SMN, *Nature Biotechnology*, 28:271-274pp.
- Gao, G.P., Alvira, M.R., Wang, L., Calcedo, R., Johnston, J., and Wilson, J.M.,** 2002, Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99:11854–11859pp.
- Gao, G., Vandenberghe, L.H., Alvira, M.R., Lu, Y., Calcedo, R., Zhou, X., and Wilson, J.M.,** 2004, Clades of Adeno-associated viruses are widely disseminated in human tissues, *Journal of Virology*, 78:6381–6388pp.
- Gao, G., Vandenberghe, L.H., and Wilson, J.M.,** 2005, New recombinant serotypes of AAV vectors, *Current Gene Therapy*, 5:285–297pp.
- Gao, G.P., and Sena-Esteves, M.,** 2012, Introducing Genes into Mammalian Cells: Viral Vectors. In *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1209-1313pp.
- Georg-Fries, B., Biederlack, S., Wolf, J., and Zur Hausen, H.,** 1984, Analysis of proteins, helper dependence, and seroepidemiology of a new human parvovirus, *Virology*, 134:64–71pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ghosh, A., and Duan, D.,** 2007, Expanding adeno-associated viral vector capacity: a tale of two vectors, *Biotechnology & Genetic Engineering Reviews*, 24:165–177pp.
- Gluscock, J.J., Shababi, M., Wetz, M.J., Krogman, M.M. and Lorson, C.L.,** 2012, Direct central nervous system delivery provides enhanced protection following vector mediated gene replacement in a severe model of Spinal Muscular Atrophy, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 417:376-381pp.
- Grieger, J.C., and Samulski, R.J.,** 2005, Packaging capacity of adeno-associated virus serotypes: impact of larger genomes on infectivity and postentry steps, *Journal of Virology*, 79:9933–9944pp.
- Grieger, J.C., Choi, V.W., and Samulski, R.J.,** 2006, Production and characterization of adeno-associated viral vectors, *Nature Protocols*, 1:1412-1428pp.
- Grieger, J.C. and Samulski, R.J.,** 2012, Adeno-Associated Virus Vectorology, Manufacturing, and Clinical Applications, *Methods in Enzymology*, Vol 507: Gene Transfer Vectors for Clinical Application, 507:229-254pp.
- Gubitz, A.K., Feng, W. and Dreyfuss, G.,** 2004, The SMN complex, *Experimental Cell Research*, 296:51-56pp.
- Guo, Y.S., Wang, D., Qiao, T., Yang, C.X., Su, Q., Gao, G.P. and Xu, Z.S.,** 2016, A Single Injection of Recombinant Adeno-Associated Virus into the Lumbar Cistern Delivers Transgene Expression Throughout the Whole Spinal Cord, *Molecular Neurobiology*, 53:3235-3248pp.
- Haddad, M.R., Donsante, A., Zerfas, P., and Kaler, S.G.,** 2013, Fetal Brain-directed AAV Gene Therapy Results in Rapid, Robust, and Persistent Transduction of Mouse Choroid Plexus Epithelia, *Molecular Therapy Nucleic Acids*, 2:e101p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Hao, L.T., Duy, P.Q., Jontes, J.D., Wolman, M., Granato, M. and Beattie, C.E.,** 2013, Temporal requirement for SMN in motoneuron development, *Human Molecular Genetics*, 22:2612-2625pp.
- Harrison, M.R.,** 2000, Surgically correctable fetal disease, *The American Journal of Surgery*, 180: 335-342pp.
- Hatzoglou, M., Lamers, W., Bosch, F., Wynshaw-Boris, A., Clapp, D.W. and Hanson, R.W.,** 1990, Hepatic gene transfer in animals using retroviruses containing the promoter from the gene for phosphoenolpyruvate carboxykinase, *Journal of Biological Chemistry*, 265:17285-17293pp.
- Hatzoglou, M., Moorman, A. and Lamers, W.,** 1995, Persistent Expression of Genes Transferred in the Fetal-Rat Liver Via Retroviruses, *Somatic Cell and Molecular Genetics*, 21:265-278pp.
- Haurigot, V., Marco, S., Ribera, A., Garcia, M., Ruzo, A., Villacampa, P., Ayuso, E., Anor, S., Andaluz, A., Pineda, M., Garcia-Fructuoso, G., Molas, M., Maggioni, L., Munoz, S., Motas, S., Ruberte, J., Mingozi, F., Pumarola, M. and Bosch, F.,** 2013, Whole body correction of mucopolysaccharidosis IIIA by intracerebrospinal fluid gene therapy, *Journal of Clinical Investigation*, 123:3254-3271pp.
- Hausmanowa-Petrusewicz, I. and Karwanska, A.,** 1986, Electromyographic findings in different forms of infantile and juvenile proximal spinal muscular atrophy, *Muscle & Nerve*, 9:37-46pp.
- Hordeaux, J., Dubreil, L., Deniaud, J., Iacobelli, F., Moreau, S., Ledevin, M., Le Guiner, C., Blouin, V., Le Duff, J., Mendes-Madeira, A., Rolling, F., Cherel, Y., Moullier, P. and Colle, M.A.,** 2015, Efficient central nervous system AAVrh10-mediated intrathecal gene transfer in adult and neonate rats, *Gene Therapy*, 22:316-324pp.
- Horowitz, E.D., Rahman, K.S., Bower, B.D., Dismuke, D.J., Falvo, M.R., Griffith, J.D., Harvey, S.C., and Asokan, A.,** 2013, Biophysical and ultrastructural characterization of adeno-associated virus capsid uncoating and genome release, *Journal of Virology*, 87:2994-3002pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Hua, Y., Vickers, T.A., Okunola, H.L., Bennett, C.F. and Krainer, A.R., 2008,** Antisense masking of an hnRNP A1/A2 intronic splicing silencer corrects SMN2 splicing in transgenic mice, *The American Journal of Human Genetics*, 82:834-848pp.
- Qiu, J., and Pintel, D., 2008,** Processing of adeno-associated virus RNA, *Frontiers in Bioscience*, 13:3101–3115pp.
- Lai C.M., Estcourt M.J., Himbeck R.P., Lee S.Y., Yew-San Yeo I., Luu C., Loh B.K., Lee M.W., Barathi A., Villano J., Ang C.L., van der Most R.G., Constable I.J., Dismuke D., Samulski R.J., Degli-Esposti M.A., and Rakoczy E.P., 2012,** Preclinical safety evaluation of subretinal AAV2.sFlt-1 in non-human primates. *Gene Therapy*, 19:999-1009pp.
- Larsen, C.A., and Howard, M.T., 2014,** Conserved regions of the DMD 3' UTR regulate translation and mRNA abundance in cultured myotubes, *Neuromuscular Disorders*, 24:693–706pp.
- Le, T.T., McGovern, V.L., Alwine, I.E., Wang, X.Y., Massoni-Laporte, A., Rich, M.M. and Burghes, A.H.M., 2011,** Temporal requirement for high SMN expression in SMA mice, *Human Molecular Genetics*, 20, 3578-3591pp.
- Lipshutz G.S., Gruber, C.A., Cao, Y., Hardy, J., Contag, C.H., and Gaensler, K., 2001,** In utero delivery of adeno-associated viral vectors: intraperitoneal gene transfer produces long-term expression, *Molecular Therapy*, 3:284-292pp.
- Iyer, C.C., McGovern, V.L., Murray, J.D., Gombash, S.E., Zaworski, P.G., Foust, K.D., Janssen, P.M.L. and Burghes, A.H.M., 2015,** Low levels of Survival Motor Neuron protein are sufficient for normal muscle function in the SMN Delta 7 mouse model of SMA, *Human Molecular Genetics*, 24:6160-6173pp.
- Jakob, M., Mühle, C., Park, J., Weiss, S., Waddington, S., and Schneider, H., 2005,** No evidence for germ-line transmission following prenatal and early

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

postnatal AAV-mediated gene delivery, *The Journal of Gene Medicine*, 7:630-637pp.

Jang, J.H., Koerber, J.T., Kim, J.S., Asuri, P., Vazin, T., Bartel, M., Keung, A., Kwon, I., Park, K.I., and Schaffer, D.V., 2011, An evolved adeno-associated viral variant enhances gene delivery and gene targeting in neural stem cells, *Molecular Therapy*, 19:667-675pp.

Kantoff, P.W., Flake, A.W., Eglitis, M.A., Scharf, S., Bond, S., Gilboa, E., Erlich, H., Harrison, M.R., Zanjani, E.D. and Anderson, W.F., 1989, In utero gene transfer and expression: a sheep transplantation model, *Blood* 73:1066-1073pp.

Karolewski, B.A., and Wolfe, J.H., 2006, Genetic correction of the fetal brain increases the lifespan of mice with the severe multisystemic disease mucopolysaccharidosis type VII, *Molecular Therapy*, 14:14-24pp.

Kocot, F.J., Carter, B.J., Garon, C.F. and Rose, J.A., 1973, Self-complementarity of terminal sequences within plus or minus strands of adenovirus-associated virus DNA, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 70:215-219pp.

Kolb, S.J. and Kissel, J.T., 2011, Spinal muscular atrophy: a timely review, *Archives of neurology*, 68:979-984pp.

Kotterman, M.A., Vazin, T., and Schaffer, D.V., 2015, Enhanced selective gene delivery to neural stem cells in vivo by an adeno-associated viral variant, *Development*, 142:1885-1892pp.

Lai, Y., Yue, Y. and Duan, D., 2010, Evidence for the Failure of Adeno-associated Virus Serotype 5 to Package a Viral Genome ≥ 8.2 kb, *Molecular Therapy*, 18:75-79pp.

Le, T.T., McGovern, V.L., Alwine, I.E., Wang, X.Y., Massoni-Laporte, A., Rich, M.M. and Burghes, A.H.M., 2011, Temporal requirement for high SMN expression in SMA mice, *Human Molecular Genetics*, 20:3578-3591pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Lefebvre, S., Burglen, L., Reboullet, S., Clermont, O., Bulet, P., Viollet, L., Benichou, B., Cruaud, C., Millasseau, P., Zeviani, M., Paslier, D.L., Frezal, J., Cohen, D., Weissenbach, J., Munnich, A., and Melki, J.,** 1995, Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene, *Cell*, 80:155-165pp.
- Lim, S.R. and Hertel, K.J.,** 2001, Modulation of survival motor neuron pre-mRNA splicing by inhibition of alternative 3' splice site pairing, *Journal of Biological Chemistry*, 276:45476-45483pp.
- Liu, B., Paton, J.F. and Kasparov, S.,** 2008, Viral vectors based on bidirectional cell-specific mammalian promoters and transcriptional amplification strategy for use in vitro and in vivo, *Bmc Biotechnology*, 8:49p.
- Liu, Q. and Dreyfuss, G.,** 1996, A novel nuclear structure containing the survival of motor neurons protein, *The EMBO Journal*, 15:3555-3565pp.
- Lock, M., Alvira, M., Vandenberghe, L.H., Samanta, A., Toelen, J., Debysier, Z. and Wilson, J.M.,** 2010, Rapid, Simple, and Versatile Manufacturing of Recombinant Adeno-Associated Viral Vectors at Scale, *Human Gene Therapy*, 21:1259-1271pp.
- Lorson, C.L., Hahnen, E., Androphy, E.J. and Wirth, B.,** 1999, A single nucleotide in the SMN gene regulates splicing and is responsible for spinal muscular atroph, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96:6307-6311pp.
- Lorson, C.L. and Androphy, E.J.,** 2000, An exonic enhancer is required for inclusion of an essential exon in the SMA-determining gene SMN, *Human Molecular Genetics*, 9:259-265pp.
- Lunn, M.R. and Wang, C.H.,** 2008, Spinal muscular atrophy, *Lancet*, 371: 2120-2133pp.
- Mattar, C.N., Wong, A.M., Hoefler, K., Alonso-Ferrero, M.E., Buckley, S.M., Howe, S.J., Cooper, J.D., Waddington, S.N., Chan, J.K., and Rahim, A.A.,** 2015, Systemic gene delivery following intravenous administration of

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

AAV9 to fetal and neonatal mice and late-gestation nonhuman primates, *The FASEB Journal*, 29:3876-3888pp.

Mayor, H.D., Drake, S., Stahmann, J., and Mumford, D.M., 1976, Antibodies to adenoassociated satellite virus and herpes simplex in sera from cancer patients and normal adults, *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, 126:100–104pp.

McCandless, S.E., Brunger, J.W. and Cassidy, S.B., 2004, The burden of genetic disease on inpatient care in a children's hospital, *The American Journal of Human Genetics*, 74, 121-127pp.

McCarty, D.M., Monahan, P.E., and Samulski, R.J., 2001, Self-complementary recombinant adeno-associated virus (scAAV) vectors promote efficient transduction independently of DNA synthesis, *Gene Therapy*, 8:1248–1254pp.

McCarty, D.M., Fu, H., Monahan, P.E., Toulson, C.E., Naik, P., and Samulski, R.J., 2003, Adeno-associated virus terminal repeat (TR) mutant generates self-complementary vectors to overcome the rate-limiting step to transduction in vivo, *Gene Therapy*, 10:2112–2118pp.

McCarty, D.M., Young, S.M., Jr., and Samulski, R.J., 2004, Integration of adenoassociated virus (AAV) and recombinant AAV vectors, *Annual Review of Genetics*, 38:819–845pp.

McCarty, D.M., 2008, Self-complementary AAV vectors; advances and applications, *Molecular Therapy*, 16:1648–1656pp.

Mccray, P.B., Armstrong, K., Zabner, J., Miller, D.W., Koretzky, G.A., Couture, L., Robillard, J.E., Smith, A.E. and Welsh, M.J., 1995, Adenoviral-Mediated Gene-Transfer to Fetal Pulmonary Epithelia in-Vitro and in-Vivo, *Journal of Clinical Investigation* 95:2620-2632pp.

McWhorter, M.L., Monani, U.R., Burghes, A.H.M. and Beattie, C.E., 2003, Knockdown of the survival motor neuron (Smn) protein in zebrafish causes

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

defects in motor axon outgrowth and pathfinding, *Journal of Cell Biology*, 162:919-931pp.

Melki, J., Lefebvre, S., Burglen, L., Burlet, P., Clermont, O., Millasseau, P., Reboullet, S., Benichou, B., Zeviani, M., Le Paslier, D., Cohen, D., Weissenbach, J., and Munnich, A., 1994, De novo and inherited deletions of the 5q13 region in spinal muscular atrophie, *Science*, 264:1474-1477pp.

Meyer, K., Ferraiuolo, L., Schmelzer, L., Braun, L., McGovern, V., Likhite, S., Michels, O., Govoni, A., Fitzgerald, J., Morales, P., Foust, K.D., Mendell, J.R., Burghes, A.H.M. and Kaspar, B.K., 2015, Improving Single Injection CSF Delivery of AAV9-mediated Gene Therapy for SMA: A Dose-response Study in Mice and Nonhuman Primates, *Molecular Therapy*, 23:477-487pp.

Miguel-Aliaga, I., Culetto, E., Walker, D.S., Baylis, H.A., Sattelle, D.B. and Davies, K.E., 1999, The Caenorhabditis elegans orthologue of the human gene responsible for spinal muscular atrophy is a maternal product critical for germline maturation and embryonic viability, *Human Molecular Genetics*, 8:2133-2143pp.

Monani, U.R., Lorson, C.L., Parsons, D.W., Prior, T.W., Androphy, E.J., Burghes, A.H. and McPherson, J.D., 1999, A single nucleotide difference that alters splicing patterns distinguishes the SMA gene SMN1 from the copy gene SMN2, *Human Molecular Genetics*, 8:1177-1183pp.

Monani UR, Sendtner M, Coover DD, Parsons DW, Andreassi C, Le TT, Jablonka S, Schrank B, Rossoll W, Prior TW, Morris GE, and Burghes AH., 2000, The human centromeric survival motor neuron gene (*SMN2*) rescues embryonic lethality in *Smn(-/-)* mice and results in a mouse with spinal muscular atrophy, *Human Molecular Genetics*, 9:333-339pp.

Muzyczka, N., and Warrington, K.H., Jr., 2005, Custom adeno-associated virus capsids: the next generation of recombinant vectors with novel tropism, *Human Gene Therapy*, 16:408–416pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Nakai, H., Storm, T.A., and Kay, M.A.**, 2000, Recruitment of single-stranded recombinant adeno-associated virus vector genomes and intermolecular recombination are responsible for stable transduction of liver in vivo, *Journal of Virology*, 74:9451–9463pp.
- Nam, H.J., Lane, M.D., Padron, E., Gurda, B., McKenna, R., Kohlbrenner, E., Aslanidi, G., Byrne, B., Muzyczka, N., Zolotukhin, S., and Agbandje-McKenna, M.**, 2007, Structure of adeno-associated virus serotype 8, a gene therapy vector, *Journal of Virology*, 81:12260–12271pp.
- Narver, H.L., Kong, L.L., Burnett, B.G., Choe, D.W., Bosch-Mare, M., Taye, A.A., Eckhaus, M.A. and Sumner, C.J.**, 2008, Sustained Improvement of Spinal Muscular Atrophy Mice Treated with Trichostatin A Plus Nutrition, *Annals of Neurology*, 64:465-470pp.
- Nonnenmacher, M. and Weber, T.**, 2012, Intracellular transport of recombinant adeno-associated virus vectors, *Gene Therapy*, 19:649-658pp.
- Novelli, G., Calza, L., Amicucci, P., Giardino, L., Pozza, M., Silani, V., Pizzuti, A., Gennarelli, M., Piombo, G., Capon, F. and Dallapiccola, B.**, 1997, Expression study of survival motor neuron gene in human fetal tissues, *Biochemical and Molecular Medicine*, 61:102-106pp.
- Ottesen, E.W.**, 2017, ISS-N1 makes the First FDA-approved Drug for Spinal Muscular Atrophy, *Translational Neuroscience*, 8:1-6pp.
- Passini, M.A., Bu, J., Roskelley, E.M., Richards, A.M., Sardi, S.P., O’Riordan, C.R., Klinger, K.W., Shihabuddin, L.S. and Cheng, S.H.**, 2010, CNS-targeted gene therapy improves survival and motor function in a mouse model of spinal muscular atrophy, *The Journal of Clinical Investigation*, 120:1253-1264pp.
- Pearson, E.G. and Flake, A.W.**, 2013, Stem cell and genetic therapies for the fetus, *Seminars in Pediatric Surgery*, 22:56-61pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Perabo, L., Endell, J., King, S., Lux, K., Goldnau, D., Hallek, M., and Buning, H.,** 2006, Combinatorial engineering of a gene therapy vector: directed evolution of adenoassociated virus, *Journal of Gene Medicine*, 8:155–162pp.
- Pitt, B.R., Schwarz, M.A., Pilewski, J.M., Nakayama, D., Mueller, G.M., Robbins, P.D., Watkins, S.A., Albertine, K.H. and Bland, R.D.,** 1995, Retrovirus-Mediated Gene-Transfer in Lungs of Living Fetal Sheep, *Gene Therapy*, 2:344-350pp.
- Rabinowitz, J.E., Rolling, F., Li, C., Conrath, H., Xiao, W., Xiao, X., and Samulski, R. J.,** 2002, Cross-packaging of a single adeno-associated virus (AAV) type 2 vector genome into multiple AAV serotypes enables transduction with broad specificity, *Journal of Virol*, 76:791–801pp.
- Rabinowitz, J.E., Bowles, D.E., Faust, S.M., Ledford, J.G., Cunningham, S.E., and Samulski, R.J.,** 2004, Cross-dressing the virion: the transcapsidation of adeno-associated virus serotypes functionally defines subgroups, *Journal of Virology*. 78:4421–4432pp.
- Rahim, A.A., Wong, A.M.S., Hoefler, K., Buckley, S.M.K., Mattar, C.N., Cheng, S.H., Chan, J.K.Y., Cooper, J.D. and Waddington, S.N.,** 2011, Intravenous administration of AAV2/9 to the fetal and neonatal mouse leads to differential targeting of CNS cell types and extensive transduction of the nervous system, *Faseb Journal*, 25:3505-3518pp.
- Rahim, A.A., Wong, A.M., Ahmadi, S., Hoefler, K., Buckley, S.M., Hughes, D.A., Nathwani, A.N., Baker, A.H., McVey, J.H., Cooper, J.D., and Waddington, S.N.,** 2012, In utero administration of Ad5 and AAV pseudotypes to the fetal brain leads to efficient, widespread and long-term gene expression, *Gene Therapy*, 19:936–946pp.
- Rashnonejad, A., Chermahini, G.A., Li, S., Ozkinay, F. and Gao, G.,** 2016a, Large-Scale Production of Adeno-Associated Viral Vector Serotype-9 Carrying the Human Survival Motor Neuron Gene, *Molecular Biotechnology*, 58: 30-36pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Rashnonejad, A., Gunduz, C., Susluer, S.Y., Onay, H., Durmaz, B., Bandehpour, M. and Ozkinay, F.,** 2016b, In vitro gene manipulation of spinal muscular atrophy fibroblast cell line using gene-targeting fragment for restoration of SMN protein expression, *Gene Therapy*, 23:10-17pp.
- Ren, C., Kumar, S., Shaw, D.R., and Ponnazhagan, S.,** 2005, Genomic stability of self-complementary adeno-associated virus 2 during early stages of transduction in mouse muscle in vivo, *Human Gene Therapy*, 16:1047-57pp.
- Rochette, C.F., Gilbert, N. and Simard, L.R.,** 2001, SMN gene duplication and the emergence of the SMN2 gene occurred in distinct hominids: SMN2 is unique to Homo sapien, *Human Genetics*, 108:255-266pp.
- Rossoll, W., Kroning, A.K., Ohndorf, U.M., Steegborn, C., Jablonka, S. and Sendtner, M.,** 2002, Specific interaction of Smn, the spinal muscular atrophy determining gene product, with hnRNP-R and gry-rbp/hnRNP-Q: a role for Smn in RNA processing in motor axons?, *Human Molecular Genetics*, 11:93-105pp.
- Salegio, E.A., Samaranch, L., Jenkins, R.W., Clarke, C.J., Lamarre, C., Beyer, J., Kells, A.P., Bringas, J., Sebastian, W.S., Richardson, R.M., Rosenbluth, K.H., Hannun, Y.A., Bankiewicz, K.S., and Forsayeth, J.,** 2012, Safety study of adeno-associated virus serotype 2-mediated human acid sphingomyelinase expression in the nonhuman primate brain, *Human Gene Therapy*, 23:891–902pp.
- Samulski, R.J., Zhu, X., Xiao, X., Brook, J.D., Housman, D.E., Epstein, N., and Hunter, L.A.,** 1991, Targeted integration of adenoassociated virus (AAV) into human chromosome 19, *The EMBO Journal*, 10:3941–3950pp.
- Sendtner, M.,** 2001, Molecular mechanisms in spinal muscular atrophy: models and perspectives, *Current Opinion in Neurology*, 14:629-634pp.
- Senut, M.C., Suhr, S.T. and Gage, F.H.,** 1998, Gene transfer to the rodent placenta in situ, A new strategy for delivering gene products to the fetus, *The Journal of Clinical Investigation*, 101:1565-1571pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Singh, N.K., Singh, N.N., Androphy, E.J. and Singh, R.N.**, 2006, Splicing of a critical exon of human Survival Motor Neuron is regulated by a unique silencer element located in the last intron, *Molecular and Cellular Biology*, 26:1333-1346pp.
- Sleigh, J.N., Gillingwater, T.H. and Talbot, K.**, 2011, The contribution of mouse models to understanding the pathogenesis of spinal muscular atrophy, *Disease Models & Mechanisms*, 4:457-467pp.
- Striano, P., Boccella, P., Sarappa, C. and Striano, S.**, 2004, Spinal muscular atrophy and progressive myoclonic epilepsy: one case report and characteristics of the epileptic syndrom, *Seizure*, 13:582-586pp.
- Sumner, C.J.**, 2007, Molecular mechanisms of spinal muscular atrophy, *Journal of Child Neurology* 22:979-989pp.
- Sun, L., Li, J., and Xiao, X.**, 2000, Overcoming adeno-associated virus vector size limitation through viral DNA heterodimerization, *Nature Medicine*, 6:599–602pp.
- Touraine, J.L.**, 1992, Inutero Transplantation of Fetal Liver Stem-Cells into Human Fetuses, *Human Reproduction*, 7:44-48pp.
- Tsukamoto, M., Ochiya, T., Yoshida, S., Sugimura, T. and Terada, M.**, 1995, Gene-Transfer and Expression in Progeny after Intravenous DNA Injection into Pregnant Mice, *Nature Genetics*, 9:243-248pp.
- Waddington, S.N., Kramer, M.G., Hernandez-Alcoceba, R., Buckley, S.M., Themis, M., Coutelle, C. and Prieto, J.**, 2005a, In utero gene therapy: current challenges and perspectives, *Molecular Therapy*, 11:661-676pp.
- Walz, C.M., Anisi, T.R., Schlehofer, J.R., Gissmann, L., Schneider, A., and Muller, M.**, 1998, Detection of infectious adeno-associated virus particles in human cervical biopsies, *Virology*, 247:97–105pp.
- Wirth, B.**, 2000, An update of the mutation spectrum of the survival motor neuron gene (*SMN1*) in autosomal recessive spinal muscular atrophy (SMA), *Human Mutation*, 15:228-237pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Wu, J, Zhao W, Zhong L, Han Z, Li B, Ma W, Weigel-Kelley K.A., Warrington K.H., and Srivastava A.,** 2007, Self-complementary recombinant adeno-associated viral vectors: packaging capacity and the role of rep proteins in vector purity, *Human Gene Therapy*, 18:171–182pp.
- Wu, Z., Asokan, A., Grieger, J.C., Govindasamy, L., Agbandje-McKenna, M., and Samulski, R.J.,** 2006a, Single amino acid changes can influence titer, heparin binding, and tissue tropism in different adeno-associated virus serotypes, *Journal of Virology*, 80:11393–11397pp.
- Wu, Z., Asokan, A., and Samulski, R.J.,** 2006b, Adeno-associated virus serotypes: vector tool kit for human gene therapy, *Mol Ther*, 14:316–327pp.
- Wu, T., Töpfer, K., Lin, S.W., Li, H., Bian, A., Zhou, X.Y., High, K.A., and Ertl, H.C.,** 2012, Self-complementary AAVs induce more potent transgene product-specific immune responses compared to a single-stranded genome, *Molecular Therapy*, 20:572-579pp.
- Yong, J., Pellizzoni, L. and Dreyfuss, G.,** 2002, Sequence-specific interaction of U1 snRNA with the SMN complex, *The EMBO Journal*, 21:1188-1196pp.
- Zalneraitis, E.L., Halperin, J.J., Grunnet, M.L., Russman, B.S. and Peress, N.,** 1991, Muscle Biopsy and the Clinical Course of Infantile Spinal Muscular-Atrophy, *Journal of Child Neurology* 6:324-328pp.
- Zhang, H., Xing, L., Rossoll, W., Wichterle, H., Singer, R.H. and Bassell, G.J.,** 2006, Multiprotein complexes of the survival of motor neuron protein SMN with Gemins traffic to neuronal processes and growth cones of motor neurons, *Journal of Neuroscience*, 26:8622-8632pp.
- Zolotukhin, S., Byrne, B.J., Mason, E., Zolotukhin, I., Potter, M., Chesnut, K., Summerford, C., Samulski, R.J., and Muzyczka, N.,** 1999, Recombinant adeno-associated virus purification using novel methods improves infectious titer and yield, *Gene Therapy*, 6:973–985pp.
- Zolotukhin, S.,** 2005, Production of recombinant adeno-associated virus vectors, *Human Gene Therapy*, 16:551–557pp.

ÖZGEÇMİŞ

1984 yılında İran'da doğdu. Lisans eğitimimi 2002-2006 yıllarında İran'da Chamran Üniversitesi, Fen Fakültesi Mikrobiyoloji Bölümü'nde gerçekleştirdi. İlk yüksek lisans eğitimimi 2007 - 2010 yıllarda İran'da, Tahran Azad Üniversitesi, Fen Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda bitirdi. 2010 yılında Doktora eğitimi için Türkiye'ye gelip 1 sene Ege Üniversitesi Türk Dünyası Araştırmaları Enstitüsü, Türkçe Öğretim Merkezi (TÖMER)'nde Türkçe eğitimi aldıktan sonra Eylül 2011-2012 yılında Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda Doktora eğitimini başladı. İkinci yüksek lisans eğitimini kök hücre konusunda Eylül 2013-2016 yılında Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kök Hücre Anabilim Dalı'nda aldı (e- posta: afrash99@yahoo.com).

Tecrübeler:

Temmuz-Ağustos 2016

Stajyer,

Mustafa Tekin lab, Miami Üniversitesi,
Tıp Fakültesi, İnsan Genetik ve Genomiks
bölümü, Miami, Florida, USA

Temmuz-Ağustos 2015

Scientific Visitor,

Gen Tedavi Merkezi, Pediatrik bölümü,
Tıp Fakültesi Massachusetts Üniversitesi,
Worcester, MI, USA

Temmuz-Eylül 2014

Scientific Visitor

Gen Tedavi Merkezi, Tıp Fakültesi,
Massachusetts Üniversitesi, Worcester,
MI, USA

Ağustos-Eylül 2013

Scientific Visitor

Gen Tedavi Merkezi, Tıp Fakültesi,
Massachusetts Üniversitesi, Worcester,
MI, USA

Nisan-Eylül 2012

Stajyer,

Klonlama ve Plazmid vektör tasarımı,
Shahid Beheshti Üniversitesi, Tıp
Fakültesi, Tıbbi Biyoteknoloji Anabilim
Dalı, Tahran, İran

2011-Devam ediyor

Araştırmacı,

Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi
Genetik AD, İzmir, Türkiye

Yayınladığı Makaleler:

Afroz Rashnonejad, Gholamhossein Amini Chermahini, Cumhur Gunduz, Meral Baka, Huseyin Onay, Gurdeniz serin, Qin Su, Guangping GAO, Ferda OZKINAY. Brain and spinal cord patterns of GFP expression following in utero delivery of scAAV9-eGFP via Intracerebroventricular and Intraplacentia injections in mice, (in press).

Afroz Rashnonejad, Gulinnaz Ercan, Cumhur Gunduz, Ali Akdemir, Yigit Ozer Tiftikcioglu. Comparative analysis of human UCB and adipose tissue derived mesenchymal stem cells for their differentiation potential into brown and white adipocytes, Submitted to *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, (in press).

Afroz Rashnonejad, Huseyin Onay, Tahir Atik, Ozlem Atan Sahin, Sarenur Gokben, Hasan Tekgul, Ferda Ozkinay. Molecular genetic analysis of survival motor neuron gene in 460 Turkish cases with suspicious spinal muscular atrophy disease, *Iran Journal of Child Neurology*, 2016;10(4):30-35pp.

Afroz Rashnonejad, Gholamhossein Amini Chermahini, Shaoyong Li, Ferda Ozkinay, Guangping Gao. Large-Scale Production of Adeno-Associated Viral Vector Serotype-9 Carrying the Human Survival Motor Neuron Gene. *Molecular Biotechnology*, 2016:58:30–36pp.

Afrooz rashnonejad, Cumhur Gunduz, Sunde Yilmaz Susluer, Huseyin Onay, Burak Durmaz, Mojgan Bandehpour, and Ferda Ozkinay, In vitro Gene manipulation of Spinal Muscular Atrophy Fibroblast Cell line using Gene Targeting fragment for restoration of SMN protein expression, *Gene Therapy (Nature)*, 2016: 23, 10–17. doi: 10.1038/gt.2015.92.

Tahir Atik, Zuhul Onder Siviş, Nihal Karadaş, **Afrooz Rashnonejad**, Başak Yıldız Atikan, Deniz Yılmaz Karapınar, Fadıl Vardar, Özgür Çoğulu, Ferda Özkınay. Down Sendromlu Çocuklarda Hematolojik Maligniteler: Geçici Lösemi ve Akut Megakaryoblastik Lösemi (Hematologic Malignancies in Children with Down Syndrome: Transient Myeloproliferative Disease and Acute Megakaryoblastic Leukemia), *The Journal of Pediatric Research (JPR)*, 2015;2:46-48pp, DOI: 10.4274/jpr.27146

Afrooz Rashnonejad*, Burak DURMAZ, Ferda ÖZKINAY, Gen Tedavisinin Temel İlkeleri Ve Son Gelişmeler, *Ege Tıp Dergisi*, 2014; Cilt 53, Sayı 4: 231-240.

Jamileh Nowroozi, Abbas Akhavan Sepahi, and **Afrooz Rashnonejad***, Pyocyanin Biosynthetic Genes in Clinical and Environmental Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and Detection of Pyocyanin's Antimicrobial Effects with or without Colloidal Silver Nanoparticles, *Cell journal(yakhteh)*, Spring 2012; 14 (1): 7-18pp.