



T.C.

ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DİSİPLİNLERARASI SİNİRBİLİMLERİ
ANABİLİMDALI

IN UTERO ELEKTROPORASYON İLE GEN AKTARIMI
YAPILARAK MOTOR NÖRON HASARI OLUŞTURULAN
SIÇANLARIN DAVRANIŞ TESTLERİYLE
DEĞERLENDİRİLMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İLKİM BÜYÜKGÜDÜK

DANIŞMAN

PROF. DR. EMEL ULUPINAR

YIL

2020



T.C.

ESKİŞEHİR OSMANGAZI ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DİSİPLİNLERARASI SİNİRBİLİMLERİ
ANABİLİMDALI

IN UTERO ELEKTROPORASYON İLE GEN AKTARIMI
YAPILARAK MOTOR NÖRON HASARI OLUŞTURULAN
SIÇANLARIN DAVRANIŞ TESTLERİYLE
DEĞERLENDİRİLMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İLKİM BÜYÜKGÜDÜK

DANIŞMAN

PROF. DR. EMEL ULUPINAR

YIL

2020

ÖZET

In utero elektroporasyon ile gen aktarımı yapılarak motor nöron hasarı oluşturulan sıçanların davranış testleriyle değerlendirilmesi

Hücre içerisinde proteinleri kodlayan genlerin doğru ifade edilişi ve doğru katlanmış protein konsantrasyonu hücrenin yaşam döngüsünü devam ettirebilmesi için kritik öneme sahiptir. Nöronlarda proteostazın sağlanamadığı durumlarda patoloji oluşma riski artmaktadır. Son yıllarda, TDP-43 adı verilen proteinini kodlayan TARDP genindeki mutasyonların amiyotrofik lateral skleroz (ALS) ve frontotemporal lobar demans (FTLD) başta olmak üzere nörodejeneratif hastalıkları tetiklediği gösterilmiştir.

Bu tez çalışmasında, insanlarda TDP-43 proteinini kodlayan gende üç farklı mutasyon oluşturularak, in utero elektroporasyon yöntemi ile sıçan embriyolarına aktarımı ile motor nöron hasarını taklit eden hayvan modellerinin oluşturulması ve meydana gelen değişikliklerinin davranış testleriyle değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Motor nöronlarda hasar oluşturmak amacıyla iki farklı nokta mutasyonu (N276S ve A315T) ve NLS sinyali delesyona uğratılmış mutant TDP-43 geni kullanılmış ve bu genlerin motor nöronlarda uzun süreli ekspresyonu CBA (chicken β -actin) promotörü ile sağlanmıştır. Sprague-Dawley cinsi erişkin dişi sıçanlar (n=7) çiftleştirildikten sonra hamileliklerinin 16. gününde, amniyon kesesi içinde bulunan embriyolarının lateral ventrikülleri içine mutant DNA'yı içeren plazmidler nanojektör ile enjekte edilmiştir. Enjeksiyon yapılmayan yavrular ise kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Özel olarak dizayn edilmiş bir elektropod aracılığıyla DNA lateral ventrikülden motor kortekse doğru yönlendirildikten sonra batın usulüne uygun olarak kapatılmış ve gebe sıçanlar doğuma kadar kontrol koşullarında bakılmıştır. Gen aktarımı yapılan deney hayvanlarında motor fonksiyonları değerlendirmek amacıyla, postnatal (P) 90, 120, 150, 180 ve 300. günlerde olmak üzere, aktivitemetre, modifiye grip, rotarod ve cat-walk yürüme testleri uygulanmış ve gruplar arası farklılıklar non-parametrik istatistiksel testler ile karşılaştırılmıştır. Sıçanların spontan lokomotor aktivitelerini değerlendirilmek amacıyla yapılan testlerde horizontal,

vertikal, stereotipik ve toplam hareket sayıları ile test süresince ambulasyonda veya dinlenmede geçirdikleri zaman ve toplam kat ettikleri mesafelerde anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. Sadece P120'de TDP-43 N267S grubundaki sıçanların toplam hareket sayıları kontrol grubundakilere kıyasla daha düşük bulunmuştur. Öte yandan rota-rod testindeki ortalama düşme sayıları karşılaştırıldığında; A315T mutasyon grubunda P120. günden itibaren, N276S mutasyon grubunda P150. günden itibaren, NLS delesyonunda ise P240. ve P300. günlerde olmak üzere düşme sayılarında kontrol gruplarına kıyasla anlamlı bir artış olduğu gözlenmiştir. Benzer şekilde mutasyonlu grupların modifiye edilmiş grip testindeki performans skorları karşılaştırıldığında da kontrol grubundaki deney hayvanlarına kıyasla daha düşük skorlar aldığı gözlenmiştir. Özellikle erken evrelerde (P90 ve P120) NLS delesyonlu TDP-43 grubu ile kontrol grubundaki sıçanların skorları arasında anlamlı farklılıklar saptanmıştır. P120. günde ise tüm mutasyon gruplarının grip testinde aldıkları skorların kontrol grubuna göre daha düşük olduğu gözlenmiştir. Cat-walk testinde ise sağ ve sol, ön ve arka olacak şekilde ardışık iki adım arası mesafe, aynı şekilde her bir ayak için maksimum ayak izi alanı ve ardışık iki adımın üst üste binme sıklığında gruplar arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir.

Bu tez çalışmasında elde edilen sonuçlar, TDP-43 genomunda oluşturulan farklı mutasyonlar sonrasında, in utero elektroporasyon tekniği kullanılarak spesifik bir nöron popülasyonunda, belirlenen bir zaman dilimi içinde, hücre tipine özel hasarlanma oluşturabileceğini göstermektedir. Bu teknik, bu tez çalışmasında genetik risklere bağlı olarak eksprese edilen hatalı proteinlerin davranış düzeyindeki etkilerini araştırmak amacıyla kullanılmıştır. Ancak ileri çalışmalarda, motor nöronlarda meydana gelen morfolojik ve fonksiyonel değişikliklerin araştırılması amacıyla da kullanılması mümkündür.

Anahtar kelimeler: gen aktarımı, in utero elektroporasyon, rota-rod, modifiye grip, aktivitemetre, cat-walk testi

SUMMARY

Evaluation of rats with motor neuron damage produced by in utero electroporation using behavioral tests

Proper expression of the genes encoding proteins and the right concentration of folded proteins in the cell are critical for maintaining the life cycle of cell. There is an increased risk of pathology in neurons when proteostasis cannot be achieved. In recent years, mutations in the TARDP gene encoding the protein called TDP-43 have been shown to trigger neurodegenerative diseases, primarily amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and fronto-temporal lobar dementia (FTLD).

In this thesis study, generation of three different mutations in the gene encoding TDP-43 protein, their transfer to rat embryos via utero electroporation method and evaluation of phenotypic alterations via behavioral tests were aimed.

In order to produce motor neuron damage, two different point mutations (N276S and A315T) and deletion of the NLS signal in the TDP-43 gene were used and the long-term expression of the genes was maintained by the CBA (chicken β -actin) promoter. After mating Sprague-Dawley adult female rats ($n = 7$), on the 17th day of their pregnancy, plasmids containing mutant DNA were injected into the lateral ventricles of the embryos growing inside of the amniotic sac via a nanojector. Pups without injection were used as a control group. By using a specially designed triple-electrode probe, DNA was directed from the lateral ventricle to the motor cortex and then abdominal layers were closed accordingly and pregnant rats were remained under control conditions until birth. In order to evaluate motor functions in animals, activity meter, modified grip, rota-rod and cat-walk walking tests were applied on postnatal days (P) 90, 120, 150, 180 and 300, and differences among groups were analyzed by non-parametric statistical tests.

Spontaneous locomotor activities of rats were evaluated based on the number of horizontal, vertical, stereotypical and total movements, total traveled distance, ambulation and resting time, and no significant difference was observed among

groups. However, only at P120, the total number of movements was lower in the N267S group than those of control group.

On the other hand, when the mean number of falls in the rota-rod test was compared; there was a statistically significant increase in the A315T mutation group starting from P120, N276S mutation group starting from P150 and NLS deleted group at P240 and P300, in comparison to the control group. Similarly, in the modified grip test, mutation groups had lower scores than those of controls. Especially at the early stages (P90 and P120), significant differences were found between the scores of the TDP43 group with NLS deletion and the control group. Also that the scores of all mutation groups were lower than those of the control group in the modified grip test, at P120.

In the cat-walk test, no significant difference was observed among the groups in terms of the parameters including; distance between two consecutive steps, right and left, front and back, as well as the maximum footprint area for each foot and the overlapping frequency of consecutive steps.

The results obtained in this thesis study showed that various mutations in the TDP-43 genome might produce cell type-specific damages in a specific neuron population within a specified time frame using the in utero electroporation technique. In this thesis study, this technique has been used to investigate the effects of defective proteins expressed due to the genetic risks, at the behavioral level. However, in further studies, it is also a very useful method for investigation of the morphological and functional changes in motor neurons.

Keywords: gene transfer, in utero electroporation, rota-rod, modified grip, activitymeter, cat-walk test.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	1
SUMMARY	iii
1.GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Serebral Korteksin Yapılanması.....	4
2.1.1. <i>Neokortikal öncü hücrelerin gelişimi</i>	4
2.1.2. <i>Serebral kortekste ki projeksiyon nöronlarının sınıflandırılması</i>	7
2.2. Motor sistemin organizasyonu.....	11
2.2.1. <i>Alt motor nöronların genel özellikleri</i>	11
2.2.2. <i>Omurilikteki motor nöronların özellikleri</i>	12
2.2.3. <i>Beyin sapındaki motor nöronların özellikleri</i>	13
2.2.4. <i>Kortikal motor nöronların özellikleri</i>	14
2.3. Motor Nöron Hastalıkları.....	16
2.3.1. <i>Sınıflandırılması</i>	16
2.4. Amiyotrofik Lateral Skleroz.....	17
2.4.1. <i>Hastalığın oluşumu ve gelişimi (etiopatogenezi)</i>	17
2.4.2. <i>ALS’de klinik özellikler</i>	18
2.4.3. <i>ALS’de rol oynayan genetik mutasyonlar</i>	19
2.5. TDP-43 Geni ve Agregasyonu	22
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	25
3.1. Deney Hayvanları	25
3.1.1. <i>Çiftleştirme protokolü</i>	25
3.3. In Utero Elektroporasyon uygulaması.....	25
3.3.1. <i>Enjeksiyon için fast green ve DNA çözeltilisinin hazırlanması</i> ..	25
3.3.2. <i>Cerrahi işlem sırasında kullanılan materyallerin sterilizasyonu</i>	27
3.3.3. <i>Mikroenjeksiyon pipetlerinin hazırlanması</i>	27
3.3.4. <i>Cerrahi operasyon için hazırlık</i>	28
3.3.5. <i>Cerrahi operasyon</i>	30
3.3.6. <i>DNA enjeksiyonu ve elektroporasyon</i>	31
3.4. Motor Davranışın Değerlendirilmesi.....	34
3.4.1. <i>Lokomotor spontan aktivite testi</i>	34

3.4.2. <i>Rota-rod testi</i>	35
3.4.3. <i>Modifiye Grip testi</i>	36
3.4.4. <i>Cat-walk yürüme testi</i>	38
3.5. İstatistiksel Analizler	38
4. BULGULAR.....	39
4.1. Lokomotor Aktivite Testi Sonuçlarının Karşılaştırılması.....	39
4.2. Rota-rod Testi Sonuçlarının Karşılaştırılması.....	47
4.3 Modifiye Grip Testi Sonuçlarının Karşılaştırılması	49
4.4 Cat-walk Testi Sonuçları	51
5. TARTIŞMA	63
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	68

KAYNAKLAR DİZİNİ

ÖZGEÇMİŞ

TABLO DİZİNİ

Tablo 4. 1. Postnatal 90. gündeki lokomotor aktivite test sonuçları	40
Tablo 4. 2. Postnatal 120. gündeki lokomotor aktivite test sonuçları	41
Tablo 4. 3. Postnatal 150. gündeki lokomotor aktivite test sonuçları	42
Tablo 4. 4. Postnatal 180. gündeki lokomotor aktivite test sonuçları	43
Tablo 4. 5. Postnatal 300. gündeki lokomotor aktivite test sonuçları	44
Tablo 4. 6. Kontrol ve deney gruplarının farklı günlerdeki rota-rod sonuçları....	48
Tablo 4. 7. Deney ve kontrol gruplarının modifiye testi puanları	50
Tablo 4. 8. Deney ve kontrol gruplarının Cat-walk testindeki iki ardışık adım arasındaki mesafe ölçüm değerleri.....	52
Tablo 4. 9. Deney ve kontrol gruplarının Cat-walk testindeki ayak izi alan değerleri.....	60

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 2. 1. Farelerde ve insanlarda serebral korteks gelişiminin şematik gösterimi.	6
Şekil 2. 2. Neokortikal projeksiyon nöronlarının alt tipleri ve kortikal tabakaların gelişimi.	7
Şekil 2. 3. Serebral korteksteki projeksiyon nöron çeşitleri.....	10
Şekil 2. 4. Motor sistemi oluşturan nöronlar ve yerleşimi.	15
Şekil 2. 5. TDP-43 proteininin C-terminal ve N-terminal fragmanları.....	24
Şekil 3. 1. TDP-43 gen mutasyonu olan DNA plazmid tasarımı.....	26
Şekil 3. 2. Cam kapiller ve nanojektör	28
Şekil 3. 3. Sıçanın karın bölgesinin tüylerden arındırılması.	29
Şekil 3. 4. Isıtma pedi	29
Şekil 3.5. Gebe sıçanda linea alba takip edilerek yapılan batın diseksiyonu.....	30
Şekil 3.6. Elektroporasyon sırasında dişli penset ile embriyoların çıkarılması...	31
Şekil 3. 7. Lateral ventriküle DNA solüsyonunun enjeksiyonu.....	33
Şekil 3. 8. Embriyolara elektrotlarla hafif elektrik akımı verilmesi.	33
Şekil 3. 9. Lokomotor aktivite metre cihazı.	35
Şekil 3. 10. Rota-rod cihazı	36
Şekil 3. 11. Modifiye grip test aparatı ve testin puanlaması	37
Şekil 4. 1. Lokomotor aktivite testindeki horizontal hareket sayılarının farklı günlere göre karşılaştırılması.	45
Şekil 4. 2. Lokomotor aktivite testindeki vertikal hareket sayılarının farklı günlere göre karşılaştırılması.	45
Şekil 4. 3. Lokomotor aktivite testindeki stereotipik hareket sayılarının farklı günlere göre karşılaştırılması.	46
Şekil 4. 4. Lokomotor aktivite testi süresince katedilen toplam mesafenin farklı günlere göre karşılaştırılması	46
Şekil 4. 5. Rota-rod testindeki ortalama düşme sayılarının farklı günlere göre karşılaştırılması.....	48
Şekil 4. 6. Modifiye grip testi puanlarının farklı günlere göre karşılaştırılması. Modifiye grip testi puanlarının farklı günlere göre karşılaştırılması.	50

Şekil 4. 7. Cat-walk testi sağ ön ayak adım aralığı mesafesinin farklı günlere göre karşılaştırılması.....	53
Şekil 4. 8. Cat-walk testi sağ arka ayak adım aralığı mesafesinin farklı günlere göre karşılaştırılması.....	53
Şekil 4. 9. Cat-walk testi sol ön ayak adım aralığı mesafesinin farklı günlere göre karşılaştırılması.....	54
Şekil 4. 10. Cat-walk testi sol arka ayak adım aralığı mesafesinin farklı günlere göre karşılaştırılması.....	54
Şekil 4. 11. Cat-walk testi ön ayak izi alanının farklı günlere göre karşılaştırılması.....	61
Şekil 4. 12. Cat-walk testi arka ayak izi alanının farklı günlere göre karşılaştırılması.....	61
Şekil 4. 13. Cat-walk testinde çakışık adım sayısının normal adım sayısına oranının farklı günlere göre karşılaştırılması.....	62

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

ALS	Amiyotrofik lateral skleroz
CBA	Chicken β -actin
CC	Corpus callosum
CFuPN	Kortikofugal projeksiyon nöronları
CMV	Sitomegalovirüs
CP	Kortikal plaka
CPN	Kallosal projeksiyon nöronları
Crb	Cerebellum
CStrPNi	İntratelensefalik kortikostriyal projeksiyon nöronları
CStrPNp	Piramidal kortikostriyal projeksiyon nöronları
CThPN	Kortikotalamik projeksiyon nöronları
E	Embriyonik
ESOGÜ	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
FTLD	Frontotemporal lobar demans
GN	Granüler nöronlar
hnRNP	Heterojen ribonükleoprotein
IPC	Ara öncü hücreler
IZ	Ara bölge
LGN	Thalamus'un lateral genikülat çekirdeği
M1	Primer motor korteks
MNH	Motor nöron hastalıkları
MSS	Merkezi sinir sistemi
MZ	Marjinal zon
ncRNA	Kodlanmamış RNA
NE	Nöroepitelyal hücre,
NES	Nükleer eksport sinyal
NLS	Nükleer lokalizasyon sinyal
OB	Bulbus olfactorius
OT	Optik tektum
P	Postnatal

PLS	Primer Lateral Skleroz
Po	Pons
RGC	Radyal glial hücre
SC	Omurilik
SCPN	Subserebral projeksiyon nöronları
SMA	Spinal Müsküler Atrofi
SOD1	Süperoksit dismutaz 1
SP	Alt plaka
SPSS	Statistical Package for Social Sciences
SVZ	Subventriküler zon
TAR	Transactive Response
TARDP	Transactive response DNA binding protein
TDP-43	TAR DNA-Binding-Protein-43
Th	Thalamus
TİCAM	Tıbbi Cerrahi Hayvan Üretim ve Bakım Merkezi
VL	Thalamus'un ventral lateral çekirdeği
VP	Thalamus'un ventral posterior çekirdeği
VZ	Ventriküler zon
WM	Beyaz cevher

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Nörodejeneratif hastalıklar sinir sisteminin belirli bölgelerindeki nöronların progresif kaybına bağlı olarak motor ve bilişsel bozukluklarla seyreden bir grup hastalıktır. Bunlar arasında yer alan motor nöron hastalıkları (MNH), alt veya üst motor nöronları veya bazı durumlarda da her iki motor nöron grubunu birden etkileyen bir grup hastalığa verilen genel bir addır. İstemli hareketlerin gerçekleştirilmesinden sorumlu olan çizgili kasların kontrolünde görev alan bu nöron grupları, primer motor kortekste bulunanlar (üst motor nöron) ve omurilikte bulunanlar (alt motor nöron) olarak sınıflandırılmaktadır. Karakteristik olarak ve üst motor nöron tutulumuyla seyreden Amiyotrofik Lateral Skleroz (ALS), korteks ve omurilikteki motor nöronlarda ilerleyici seyreden kayıpla karakterize olup, nörodejeneratif hastalıklar içerisinde üçüncü sıklıkta görülmektedir. Hastalığın seyrinde ilk belirtiler istemli kaslarda zayıflama ve güçsüzlükle ortaya çıkar, daha sonra kas atrofisi ve spastisite ile devam eden ve tüm kas gruplarını etkileyerek solunum gibi hayati fonksiyonların yitimiyle ölümcül son bulur (Bäumer, Talbot, & Turner, 2014). ALS'de vakaların %90'ı sporadik iken %10'unun ailesel geçişli genetik mutasyonlardan kaynaklandığı bildirilmiştir (Renton et al., 2011). Sporadik ve ailesel geçişli olgularda ortak etiyopatogenezin bulunması yanı sıra fenotipik özelliklerin de benzerlik göstermesi tanıda ayrımı zorlaştırmaktadır. Sporadik vakaların büyük bir kısmının etkeni henüz bilinmezken kalıtsal geçişli vakalarda SOD1, fus, C9orf72, Alsin ve TDP43 gibi genlerdeki mutasyonlar rol oynamaktadır (Kaur, McKeown, & Rashid, 2016).

Nöronlarda hatalı katlanmış proteinler agregasyona yatkın hale gelerek hücre içi trafiğinde anormal bir yüklenmeye yol açmakta ve bu birikimler sonuçta nöronal dejenerasyona ve hücre kayıplarına neden olmaktadır (Han et al., 2013). Özellikle motor nöron hasarlarıyla birlikte ALS ve fronto-temporal lobar demans (FTLD) patolojilerinde görülen inklüzyon cisimciklerinin oluşumunda etkili olan TDP-43 proteinini kodlayan TARDP genindeki farklı mutasyonların bu şekilde bir mekanizmayla nöronlarda dejenerasyona neden olduğu gösterilmiş ve bu çalışmalardan sonra genetik ve epigenetik mekanizmaların nörodejenerasyon üzerindeki etkisi üzerine yapılan çalışmalar

hız kazanmıştır (Han et al., 2013; Neumann et al., 2009). TDP-43 evrimsel süreçte oldukça iyi korunan bir protein olup, farklı mutasyonları ve agregatlarıyla sadece motor nöron hastalıklarında değil FTLD, Alzheimer ve Parkinson hastalığı gibi birçok nörodejeneratif süreçte rol aldığı düşünülmektedir (Buratti, 2015). TARDP genindeki farklı mutasyonları hedef alan çalışmalar sonucunda TDP-43'ün hücre içindeki agregatlarının nörodejenerasyon sürecindeki etkileri ve hücre içi mekanizmaları üzerinde yoğunlaşan multidisipliner çalışmaların sayısında artış olmuştur (Silverman et al., 2016). Bununla birlikte klinikte hastalarda tespit edilen farklı mutasyonların deneysel hayvan modelleri göreceli olarak daha az sayıdadır. Özellikle de genomdaki değişikliklerin fenotipik karakterizasyonu üzerine yapılan çalışmalar oldukça sınırlıdır.

Son yıllarda geliştirilen gen aktarımı teknikleri sayesinde, insanlarda hastalığa neden olan genetik mutasyonların hayvan modelleri oluşturabilmektedir. Bu amaçla gen aktarımı yani transdüksiyonu yapılacak gen, hedeflenen hücre tipine özgü bir promotor genin kontrolü altında, ekspresyonu gösteren floresan belirteçler ile birlikte viral vektörler aracılığıyla doğrudan ilgili bölgeye veya sistemik dolaşıma enjekte etmek suretiyle deney hayvanlarına aktarılabilir. In utero elektroporasyon adı verilen teknik sayesinde nöral öncü hücrelere embriyonik dönemde spesifik bir zaman diliminde gen aktarımı yapılabilir. Bu teknik hedeflenen bölgedeki hücrelerin zarında kısa süreli elektrik akımı uygulanmak suretiyle nanometrik porlar açılarak, hücrenin geçirgenliği geçici bir süreyle arttırılmaktadır. Böylece aktarılacak istenilen DNA parçasının bu porlardan sitoplazmaya girişi sağlanmaktadır. Aktarılacak geni içeren plazmidin embriyoya enjekte edildikten sonra özel tasarımı elektrodlar aracılığıyla hedeflenen bölgeye doğru bir elektriksel akım gönderilmektedir. Böylece hedeflenen bölgedeki nöronlarda transdüksiyon gerçekleştikten sonra nöronların akıbeti morfolojik ve işlevsel olarak takip edilebilir (Szczyrkowska et al., 2016). Bu teknik literatürde genomdaki herhangi bir mutasyon sonucu eksprese edilen hatalı proteinlerin hücresel proliferasyon, göç ve farklılaşması üzerinde etkilerini veya

kortikogenezis süreçleri üzerindeki etkilerini araştırmak amacıyla kullanılmaktadır (Pacary et al., 2012).

Gen aktarımı amacıyla kullanılacak plazmidin tasarımında promotor seçimi önemli bir faktördür ve genin sadece hedeflenen hücrelerde eksprese edilmesini sağlamaktadır. Sinir sisteminde bulunan esas ve yardımcı sinir hücrelerinin ayırt edilebilmesi için her hücrenin membran proteinini hedefleyen bir promotor kullanılabilir. Birçok hücre tipini hedefleyen sitomegalovirüs (CMV) promotörü nöronlarda hızlı başlangıçlı ve giderek azalan bir ekspresyon sağlayabilirken, CBA promotörü nispeten daha uzun süreli bir ekspresyonu oluşturabilir ve gelişimsel olarak hastalık takibinin uzun vadede takibi için en uygun promotor seçimi olarak tercih edilmektedir (Chung et al., 2002; Jackson, Dayton, Deverman, & Klein, 2016).

Bu tez çalışmasında, in utero elektroporasyon yöntemi kullanılarak mutant TDP-43 proteinini kodlayan DNA parçalarının sıçan embriyolarının serebral motor korteks bölgesine aktarımı sayesinde motor nöron hasarına yol açan deneysel bir model oluşturulması amaçlanmıştır. Bu amaçla TDP-43 geninin en sık rastlanılan A315T ve NLS delesyonu mutasyonları ile nispeten daha nadir görülen ve genelde literatürde birkaç vakayla sunulan N267S mutasyonunu içeren genom parçaları, sıçanlarda kortikal motor nöronların gelişim dönemine denk gelen zaman dilimi içerisinde, motor korteks bölgesi hedeflenerek aktarılmıştır. Daha sonra motor nöronlarda hasar oluşup oluşmadığını incelemek amacıyla motor işlevler farklı davranış testleriyle değerlendirilerek, oluşan fenotipik değişikliklerin karşılaştırılması hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Serebral Korteksin Yapılanması

Serebral korteks içerdığı farklı nöronal ve glial hücre tiplerinin çeşitliliği ve çok sayıdaki bağlantıları ile merkezi sinir sisteminin (MSS) en karmaşık ve hücrel olarak da en heterojen bölgelerinden biridir. Bu bölgede bilişsel, duyuşsal işleme ve motor koordinasyon dahil olmak üzere en yüksek beyin fonksiyonları icra edilmektedir.

Neokorteks morfolojik olarak supragranüler (I / II-III. tabaka), granüler (IV. tabaka) ve infragranüler (V ve VI. tabaka) olmak üzere toplamda altı katmana özelleşmiştir. Farklı tabakalarda bulunan nöronlardan çıkan lifler, merkezi sinir sistemi (MSS) içerisinde aynı tarafta veya karşı tarafa doğru çaprazlaşarak, kortikal, subkortikal veya subserebral hedeflere ulaşmakta ve buralardaki hedef hücrelerde eksitasyon ya da inhibisyonu sağlamaktadır. Eksitasyonu sağlayan nöronlar nörotransmitter olarak glutamat kullanmakta ve dorsal telencephalon'un nöral öncü hücrelerinden gelişmekte iken (glutamaterjik projeksiyon nöronları); inhibisyonu sağlayan GABAerjik internöronlar ventral telencephalon'daki öncülerden gelişmektedir (Molyneaux, Arlotta, Menezes, & Macklis, 2007).

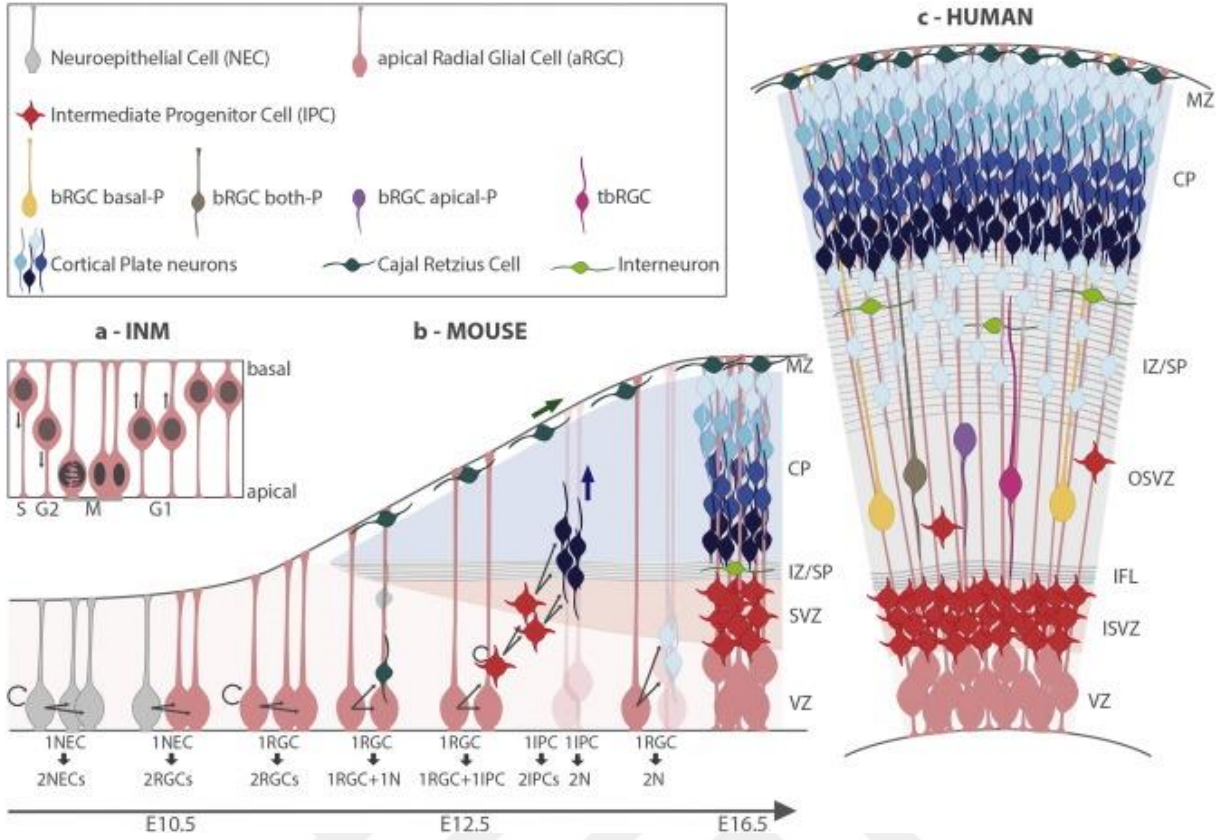
Serebral korteksteki karmaşık işlevlerin gerçekleştirilmesinde görev alan kortikal projeksiyon nöronlarının çoğunluğu eksitasyon yapma özelliğine sahiptir. Bu nöronlar ilk olarak Ram'ón y Cajal tarafından, 1909 yılında, liflerinin farklı boyanma özelliklerine göre sınıflandırılmıştır ve bu sınıflama hala geçerliliğini korumaktadır. Bununla birlikte son yıllarda yapılan çalışmalar sayesinde, bu nöronal çeşitliliğin üretimini yöneten gelişimsel mekanizmalar ve bu süreçte rol oynanan pek çok molekül de tanımlanmıştır (Greig et al., 2013).

2.1.1. Neokortikal Öncü Hücrelerin Gelişimi

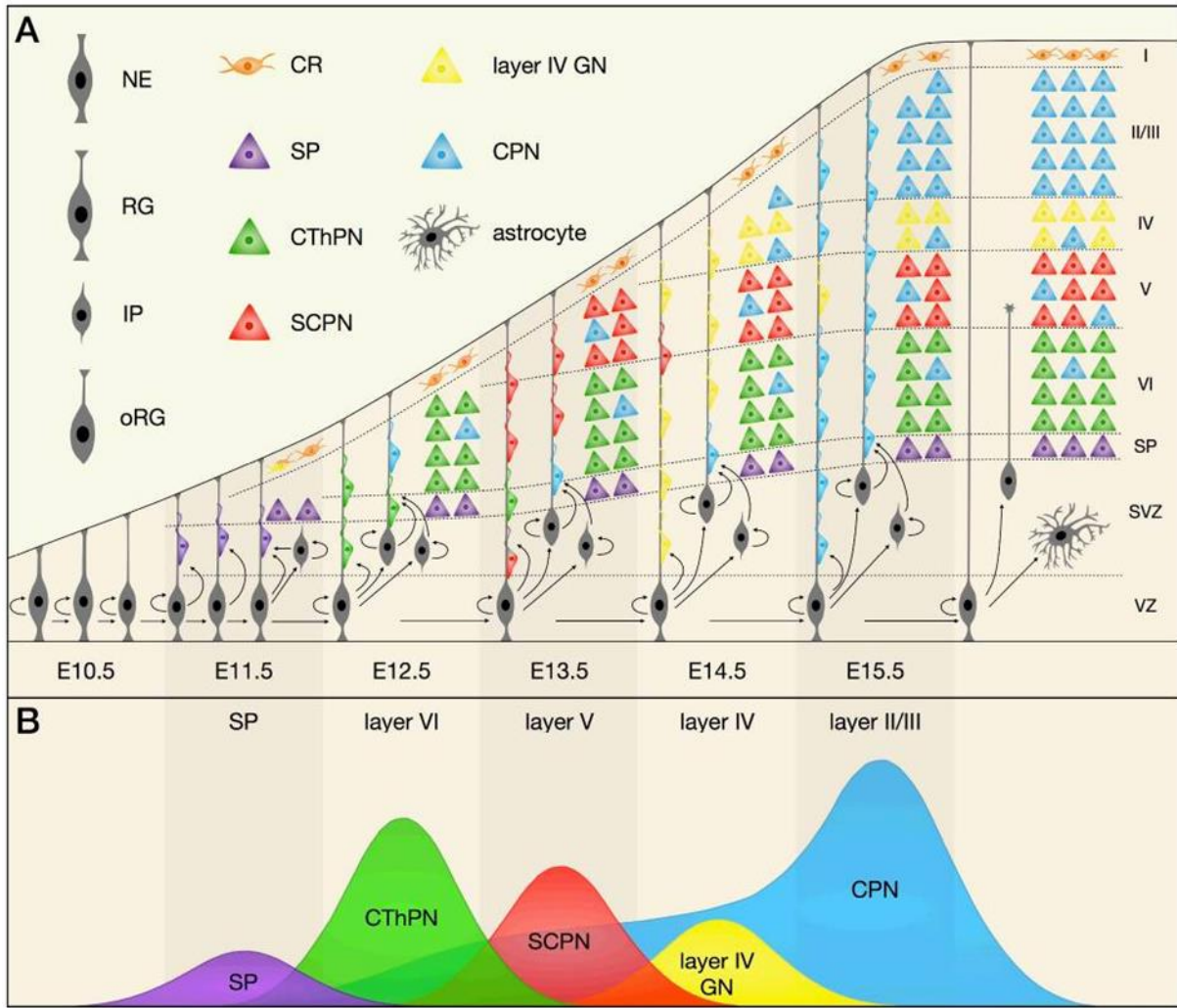
Erken gelişim evreleri sırasında, neokortikal projeksiyon nöronlarını oluşturacak rostral nöral tüpün dorsolateral duvarında nöroepitel dokusunda belirgin bir genişleme meydana gelmektedir. Ventriküle hemen bitişik olan bu tabaka ventriküler zon (VZ) olarak adlandırılmaktadır. Nörogenez ilerledikçe, VZ'nin üzerinde subventriküler zon (SVZ) olarak bilinen ek bir proliferatif

tabaka oluşmaktadır. VZ ve SVZ'de bulunan öncü hücrelerden farklı neokortikal tabakalarda yerleşecek olan projeksiyon nöronları gelişmektedir. Bu süreç farelerde 11.5 ila E17.5 embriyonik (E) günler arasında sıçanlarda ise yaklaşık olarak 1.5 ila 2 gün gecikmeyle gerçekleşmekte ve postmitotik nöronların gelişen neokorteksteki yerlerine konumlanması radyal ve teğet göç mekanizmaları aracılığıyla sıkı bir şekilde kontrol edilmektedir. Buna göre farelerde en erken doğan nöronlar yaklaşık E10.5 gün civarında görülmektedir. Daha sonra, yüzeysel olarak bulunan marjinal zon (MZ) ile daha derin yerleşimli olarak bulunan alt plakaya (subplate=SP) bölünecek olan katmanlı bir yapı oluşmaktadır. Çok tabakalı neokorteksi oluşturacak olan kortikal plaka (CP) ise bu iki tabaka arasında gelişmeye başlamaktadır (Şekil 2.1).

Kortikal plakadaki farklı projeksiyon nöron alt tipleri nörogenez boyunca sıralı dalgalar halinde doğmaktadır. Kortikal plakaya daha sonra doğarak gelen nöronlar, daha önce doğan nöronları geçecek şekilde konumlandıkları için “içten-dışa” olacak şekilde bir sıralanma meydana gelmektedir. Böylece erken doğan kortikal öncü hücreler derin tabaka nöronlarını (VI. tabaka ve sonrasında V. tabaka) oluştururken, daha sonra doğan öncülerden daha yüzeysel tabaka (IV. tabaka , sonra II / III tabaka) nöronları üretilmektedir. Alt plaka (SP) nöronların pik doğumları, E11.5 civarında meydana gelirken, kortikotalamik projeksiyon nöronlarının (CThPN) ve subserebral projeksiyon nöronlarının (SCPN) doğumları sırasıyla E12.5 ve E13.5'te meydana gelmektedir; IV. tabakadaki granüler nöronlar ise E14.5 civarında doğmaktadır. Bazı kallosal projeksiyon nöronları (CPN) E12.5'te doğduğu için CThPN ve SCPN ile eşzamanlı olarak derin tabakalara göç etmektedir. Öte yandan CPN'lerinin çoğunluğu E14.5 ve E16.5 arasında doğmakta ve bunlar yüzeysel kortikal tabakalara göç etmektedir (Şekil 2.2). Nöronların her gün içinde ulaştıkları pik değer, her alt tipe ait nöron sayısı ile yaklaşık olarak doğru orantılıdır.



Şekil 2. 1. Farelerde ve insanlarda serebral korteks gelişiminin şematik gösterimi. Farelerde simetrik bölünme ile kendini yenileyen nöroepitelyal hücreler (NEC'ler, gri), daha sonra kendi kendini yenilemek için simetrik olarak bölünen radyal glial hücrelere (RGC'ler, pembe) dönüşür. Bu hücrelerden asimetrik bölünmeyle oluşan Cajal-Retzius hücreleri (koyu yeşil) marjinal zonu (MZ) oluşturmak üzere kortikal yüzeye göç ederler. E12.5 ve sonrasında ise birincil nöronları oluşturacak ara öncü (progenitör) hücreleri (IPC) oluştururlar. IPC'ler subventriküler zonu (SVZ) doldurur ve RGC'lerin bazal uzantılarını takip ederek ara bölge veya alt plaka (IZ / SP) boyunca hedeflenen tabakaya doğru göç eden kortikal tabaka nöronlarını (koyudan açık maviye doğru) üretir. Daha sonraki aşamalarda, son simetrik bölünmelerle, bir RGC'den iki nöron üretilir (Jiang & Nardelli, 2016).



Şekil 2. 2. Neokortikal projeksiyon nöronlarının alt tipleri ve kortikal tabakaların gelişimi. SP: Subplate nöronları, CThPN: Kortikotalamik projeksiyon nöronları, SCPN: Subserebral projeksiyon nöronları, GN: Granüler nöronlar, CPN: Kallosal projeksiyon nöronları, RG: radial glia, IP:Ara öncü, NE: Nöroepitelyal hücre, WM: Beyaz cevher, SVZ: Subventriküler zon, VZ: Ventriküler zon. (Greig et al., 2013)

2.1.2. Serebral Korteksteki Projeksiyon Nöronlarının Sınıflandırılması

Erişkin neokorteksinde bulunan projeksiyon nöronlarının farklı işlevlere hizmet eden alt grupları farklı morfolojik özelliklere sahiptir ve farklı kortikal katmanlarda bulunurlar. Bu nöron alt tiplerinin morfolojik, elektrofizyolojik ve gen ekspresyonu gibi moleküler özellikleri bir araya getirildiğinde ortaya çıkan çeşitlilik ve karmaşıklık nedeniyle sınıflandırılma şemasının oluşturulması oldukça güçtür. Bununla birlikte projeksiyon nöronları genel olarak, aksonları

bir kortikal hemisferde uzanan (assosiyatif), orta hat boyunca kontralateral hemisfere uzanan (kommissural) veya korteks dışına uzanan (kortikofugal) projeksiyon nöronları olarak sınıflandırılmaktadır. Bazı nöronlar ise birden fazla hedefe uzanmakta ve bu nedenle birden fazla sınıfta yer almaktadır. Ayrıca, farklı kortikal alanlarda (motor, somatosensoriyel, görsel ve işitsel) bulunan belirli bir alt tipin nöronları anatomik ve fonksiyonel olarak farklı hedeflere projekte olmaktadır.

Komissural projeksiyon nöronları, kontralateral kortikal hemisfere projekte olurlar. Bu nöronların çoğunluğu orta çizgiyi corpus callosum'dan (kallosal projeksiyon nöronları=CPN) geçerken, daha küçük bir popülasyon commissura anterior'dan geçmektedir. CPN öncelikle II / III tabakalarda (yaklaşık %80) bulunurken, daha az bir kısmı da (yaklaşık %20) V ve VI tabakalarda bulunmaktadır. Bu nöronlar aksonlarını kontralateral hemisferin aynı fonksiyonel alanındaki ayna görüntüsü konumlarına uzatırlar ve iletilen modaliteye özgü bilginin çift taraflı entegrasyonunu sağlarlar (Şekil 2.3A).

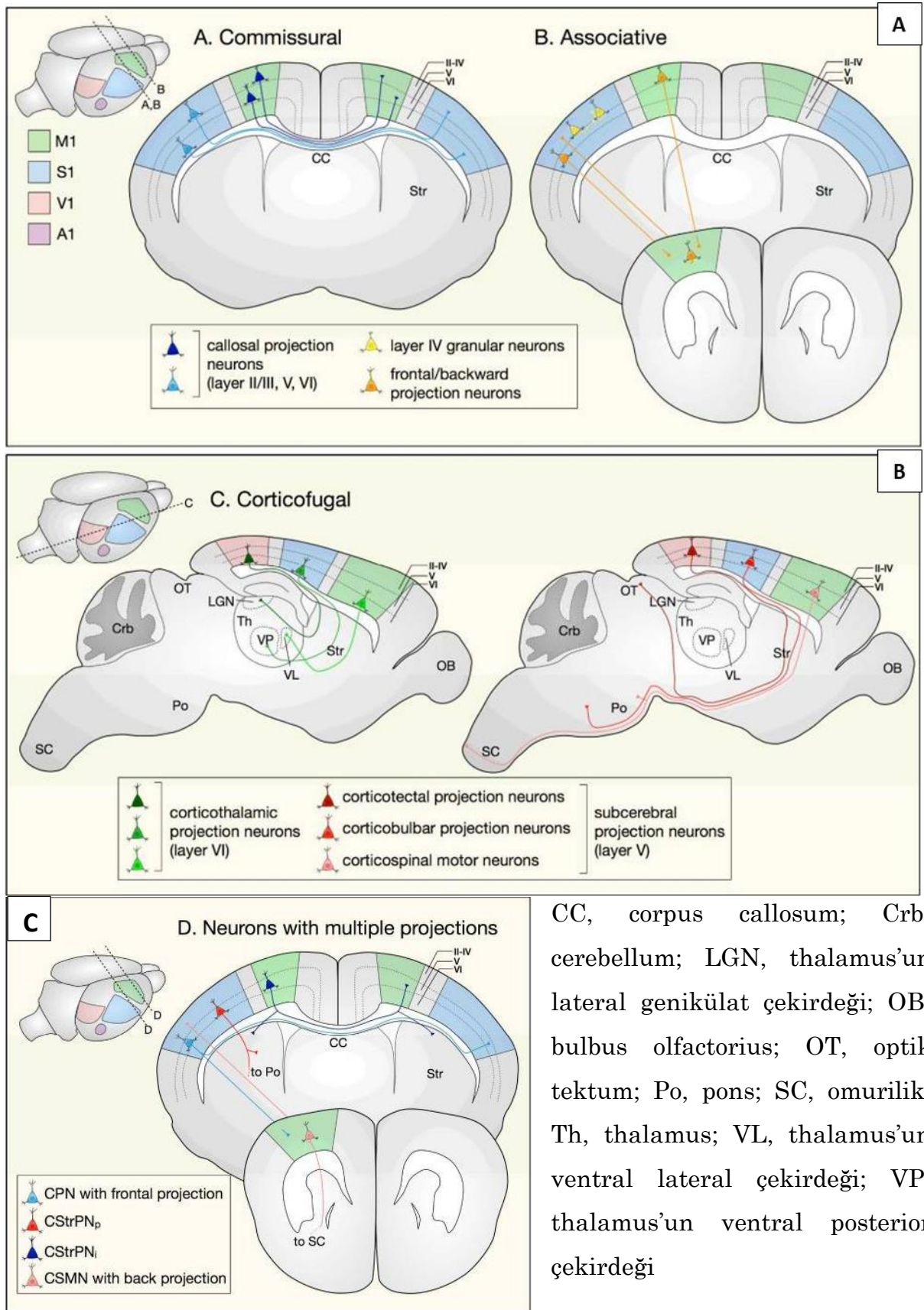
Neokorteksin tüm katmanlarında bulunan assosiyatif projeksiyon nöronlarının aksonları tek bir kortikal hemisferde bulunur. Bu gruptaki intra-hemisferik projeksiyon nöronlarının aksonları tek bir kortikal sütun içinde veya yakınındaki komşu kortikal sütunlara (IV. tabakadaki granüler nöronlar gibi) uzanacağı gibi ve aynı hemisferdeki uzak kortikal alanlara da (ileri ve geri projeksiyon nöronları olarak) uzanmaktadır (Şekil 2.3B).

Kortikofugal projeksiyon nöronları (CFuPN), korteksten subkortikal hedeflere doğru uzanır ve VI. tabakada bulunan kortikotalamik projeksiyon nöronlarını (CThPN) ve V. tabakada bulunan subserebral projeksiyon nöronlarını (SCPN) içerir. CThPN aksonlarını bölgeye özgün bir şekilde spesifik talamik çekirdeklere uzatır: motor kortekste CThPN ventral lateral ve ventral anterior çekirdeklerle, duyu kortekste CThPN ventral posterior çekirdekle, görsel kortekste CThPN ise lateral genikülat çekirdek ile bağlantı kurar (Şekil 2.3C).

SCPN aksonlarını buldukları alansal konumlarına bağlı olarak beyin sapındaki ve omurilikteki farklı birincil hedeflere uzatır. Genel olarak, motor kortekste SCPN, omuriliğe (kortikospinal motor nöronları) ve beyin sapındaki

motor çekirdeklere; somatosensoriyel korteksteki SCPN, trigeminal sinirin ana duyu çekirdeğine (nucleus principalis nervi trigemini) ve columna dorsalis'in medüller çekirdeğine (kortikobulbar projeksiyon nöronları) ve görsel korteksteki SCPN ise optik tectum'a (kortikotektal projeksiyon nöronları) uzanırlar.

Bunlardan başka birden fazla hedefe projeksiyon gönderen nöronlar da bulunur. Örneğin, aksonları hem ipsilateral frontal kortekse hem de karşı hemisfere uzanan CPN; aksonları subcerebral hedeflere ve ipsilateral kaudal kortekse uzanan geriye doğru projeksiyonlara sahip SCPN; kontralateral hemisfer ve ipsilateral striatum'a projekte olan intratelensefalik kortikostriatal projeksiyon nöronları (CStrPNi) gibi. Ek olarak, piramidal kortikostriatal projeksiyon nöronları (CStrPNp) gibi birden fazla hedefe uzanan diğer nöronlar da mevcuttur (Greig et al., 2013).



Şekil 2. 3. Serebral korteksteki projeksiyon nöron çeşitleri (Greig, Woodworth, Galazo, Padmanabhan, & Macklis, 2013).

2.2. Motor Sistemin Organizasyonu

Nöronlar diğer hücre tiplerine kıyasla oldukça karmaşık morfolojik özelliklere sahiptir ve MSS içindeki farklı nöronların morfolojik özelliklerinde de büyük ölçüde değişiklikler mevcuttur. Bunlar arasında motor nöronlar standartlara göre çok daha büyük olan hücre gövdeleri ve yetişkin bir insanda 1 metreye kadar varabilen çok uzun aksonları ile özel bir öneme sahip olan benzersiz hücrelerdir. Motor nöronlar MSS'deki konumlarına göre iki ana kategoriye ayrılmaktadır: Kortekste bulunan üst motor nöronlar ile beyin sapı ve omurilikte bulunan alt motor nöronlar. Omurilikteki motor nöronlar otonomik fonksiyonları kontrol eden torasik ve sakral bölgelerin viseral motor nöronları ve iskelet kaslarının kasılmasını düzenleyen ve böylece hareketi kontrol eden somatik motor nöronları içermektedir. Motor nöronlar innerve ettikleri hedeflerin yanı sıra çok çeşitli kas lifi tiplerinin de innervasyonunda görev almalarına bağlı olarak oldukça çeşitlilik gösterirler. Üst ve alt motor nöronların hücre gövdelerinin yerleşimindeki, salınan nörotransmitterlerindeki ve hedeflerindeki farklılıklar nedeniyle hasarlanmalarında ortaya çıkan semptomlar da farklılıklar göstermektedir.

2.2.1. Alt motor nöronların genel özellikleri

Hareketin planlanması ve başlatılmasında motor korteks, bazal gangliyonlar, beyincik ve beyin sapındaki bazı bölgeler doğrudan rol oynamaktadır. Buna karşılık, hareketin deseni ve hassas zamanlaması omurilikte bulunan alt motor nöronlar tarafından üretilir (Şekil 2.4). İnsanlardaki en büyük inen yolak tractus corticospinalis anterior ve lateralis'tir. Tractus corticospinalis lateralis gyrus precentralis'te yer alan primer motor korteksten kaynaklanır ve lifleri omurilikteki alt motor nöronlar aracılığıyla ekstremitelerdeki kasların innervasyonunu sağlar. Bu innervasyon esnasında liflerin büyük çoğunluğu çaprazlaştığı için sol motor korteks kontralateral uzuvların istemli hareketini kontrol ederken, sağ motor korteks de sol uzuvların hareketini kontrol eder (Javed & Lui, 2018). Motor nöronların uyarıcı liflerinin hedefleri sadece periferik kaslarla sınırlı değildir, aynı zamanda bir grup internöronda, Renshaw hücrelerinde ve diğer motor nöronlarda sonlanan eksitatör terminaller de içerir.

MSS'de bulunan motor nöronlar, farklı fizyolojik işlevlerine bağlı olarak farklı morfolojiler ve bağlantı modelleri sergilerler. Bu nedenle, tek bir bölgede, yakından ilişkili işlevleri yerine getiren motor nöronlar hem anatomik hem de fizyolojik olarak alt bölümlere ayrılabilir. Özgün motor nöron alt tiplerinin kimlikleri ve hedef projeksiyonları, özellikle Hox, LIM, Nkx6 ve ETS ailelerinin üyeleri olan transkripsiyon faktörlerinin selektif hücre tipi ifadesi ile kontrol edilmektedir (Stifani, 2014). Bu patern, alt motor nöronların çeşitlendirilmesi ve spesifik periferik kas hedefleri ile bağlantısının sağlanmasındaki temel mekanizmayı oluşturmaktadır. Böylece, motor nöronlar hareketi oluşturmak üzere duysal yapılardan gelen bilgileri entegre etmekte ve bunu hassas bir zamanlama ile kasların aktivasyonuna dönüştürmektedir.

Omurilikte bulunan bir alt motor nöron, bir kasta bulunan yüzlerce kas lifini innerve ederek bir motor ünite oluşturur. Akson boyunca yayılan aksiyon potansiyeli nöromusküler kavşakta asetilkolin salınmasına neden olur, bu da motor nöronun innerve ettiği kas liflerinde nikotinik reseptörleri aktive eder. Böylece, kas lifinde kasılmasına yol açan bir dizi sinyal olayı başlamış olur. Bir motor havuz, tek bir kası innerve eden tüm alt motor nöronlardan oluşur. Bir kas ünitesi (bir kas ve onun motor havuzu) ise alfa (α), beta (β) ve gama (γ) motor nöronlardan oluşan üç farklı tipteki fonksiyonel motor ünitelerden oluşmaktadır.

2.2.2. Omurilikteki motor nöronların özellikleri

Omurilikte bulunan alt motor nöronlar hedef kaslarının konumuna göre sütunlar halinde düzenlenmiştir. Her bir sütun içinde, her bir kasın içine giren motor nöronlar, innerve ettikleri kasın büyüklüğüne bağlı olarak, her biri 20-300 hücre içeren motor havuzlar şeklinde kümelenmiştir (McHanwell & Biscoe, 1981). Omurilikte bulunan α -motor nöronlar iskeleti hareket ettirmek için kuvvet yaratan ekstrasfasal kas liflerini innerve ederken; γ -motor nöronlar kas iğlerinin gerilmeye duyarlılığını modüle eden intrafusal lifleri innerve ederler (Kanning, Kaplan, & Henderson, 2010). β -motor nöronlar ise diğerleri kadar iyi karakterize edilmemekle beraber hem intrafusal hem de ekstrasfasal kas liflerini innerve ederler. Hem α - hem de γ -motor nöronların büyük dendritik ağaçları vardır, ancak γ -motor nöronların büyük dendritik dalları diğerlerine göre daha az

sayıdadır. Ayrıca somaları da daha küçüktür ve daha yavaş iletim hızlarına (α 'da yaklaşık olarak 70-90 m/s'ye karşı γ 'de <55 m/s) karşılık gelen daha ince aksonlara sahiptirler (Westbury, 1982). γ -MN'ler sadece dolaylı duyuşal girdiler aldıkları için omurilik reflekslerine doğrudan katılmazlar; ancak kas kasılmasının modülasyonuna katkıda bulunurlar (Stifani, 2014).

Sakral omurilikteki “Onuf’un nöronları” olarak adlandırılan özel bir motor nöron grubu, pudental sinir yoluyla, eksternal üretranın çizgili kaslarını, dış anal sfinkteri ve erkeklerde musculus ischiocavernosus ve bulbocavernosus’u innerve etmektedir. Bu motor nöronlar histolojik olarak uzuvları innerve eden α -motor nöronlara benzemekle birlikte, S1 segmentinin distal kısmı ile S3’ün proksimal kısmı arasında, anterolateral çekirdeğin ön iç kısmında yerleşim göstermekte ve okülomotor nöronlara benzer şekilde motor nöron hastalıklarının son evrelerine kadar hasarlanmadan korunmaktadırlar (Şekil 2.4).

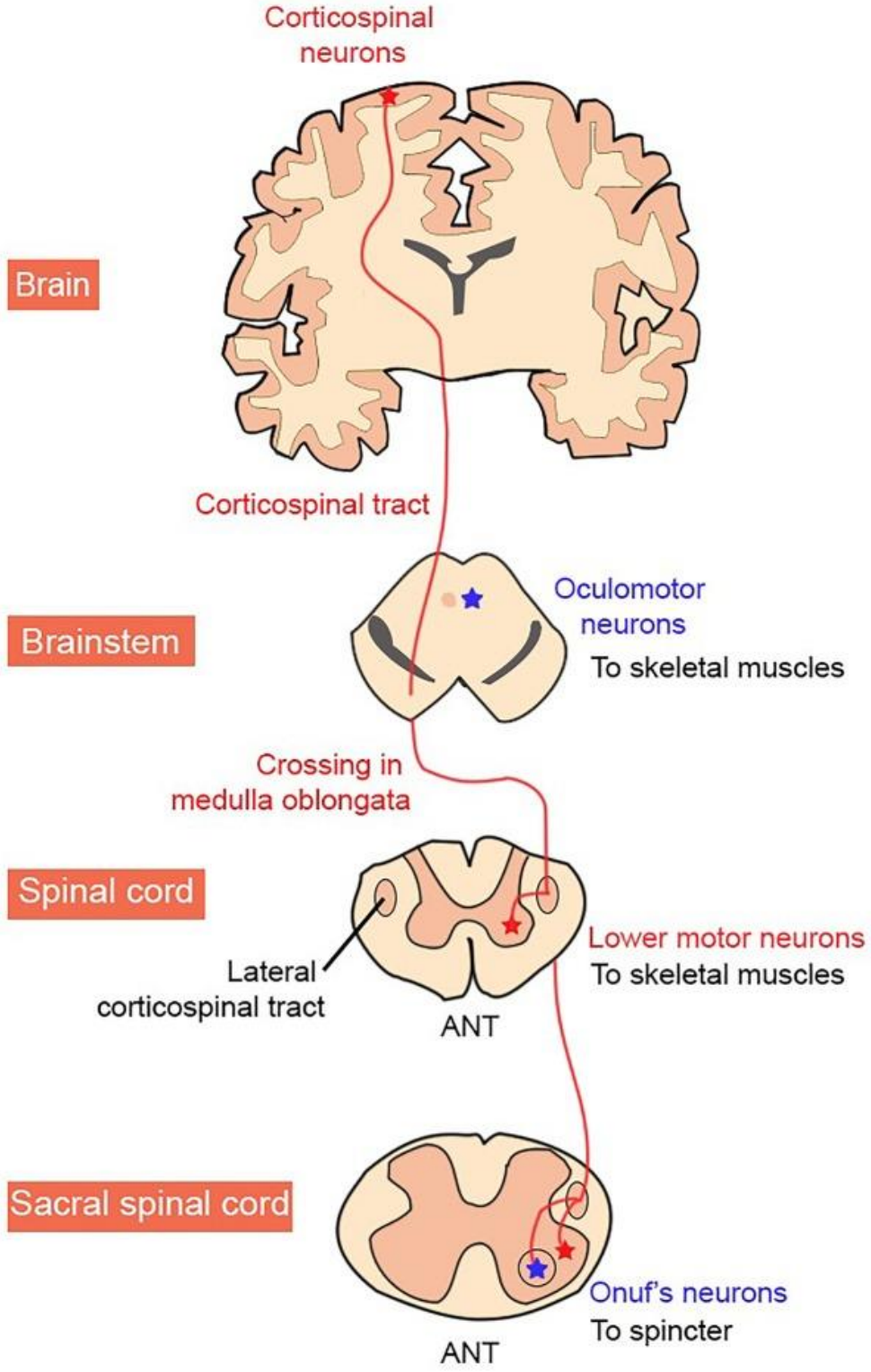
2.2.3. Beyin sapındaki motor nöronların özellikleri

Kranial sinir çekirdekleri, beyin sapındaki bir veya daha fazla kranial sinir ile ilişkili nöron popülasyonlarıdır. Baş ve boyun yapılarına afferent ve efferent (duyuşal, motor ve otonomik) innervasyon sağlarlar (Sonne & Lopez-Ojeda). Genellikle daha posterior ve lateral bölgelerde lokalize çekirdekler duyuşal olma eğiliminde iken daha anterior bölgelerde yerleşen çekirdekler motor çekirdeklerdir. Trigeminal motor nöronlar çiğneme kaslarının, fasiyal motor nöronlar yüzün mimik kaslarının ve nucleus ambiguus’taki nöronlar da yumuşak damak, yutak ve gırtlak kaslarının innervasyonunu sağlamaktadır. Okülomotor (III), troklear (IV) ve abduşens (VI) kranial sinirlerinin çekirdekleri, orbitadaki ekstraoküler kasları innerve eden somatik efferent lifler içermektedir. Bu kaslar, belirgin bir yorgunluk direncine sahip diğer iskelet kaslarından farklı lif tiplerinden oluşmaktadır. Motor nöron hastalıklarından ve yaşlanmadan etkilenmemeleri nedeniyle özel bir öneme sahip olan okülomotor üniteler, maksimum motor nöron deşarj oranlarına sahip iskelet kası motor ünitelerinin aksine, en küçük motor ünitelere sahiptir. Ayrıca okülomotor ünitelerdeki α -motor nöronlar omuriliktekilere göre (~ 70 mV) göre daha yüksek dinlenme membran potansiyellerine (~ 61 mV) sahiptir ve daha yüksek frekanslarda

(kararlı durumlarda ~100 Hz ve sakkadik göz hareketleri esnasında ~600 Hz) deşarj olurlar (Torres- Torrelo, Rodríguez- Rosell, Nunez- Abades, Carrascal, & Torres, 2012). Okülomotor nöronlar, göz pozisyonunu korurken neredeyse sürekli olarak yüksek frekanslarda aktiftir (De La Cruz ve diğeri, 1989) ve bu aktivite seviyesi bu hücrelere yüksek metabolik talep getirmektedir (Brockington et al., 2013).

2.2.4. Kortikal motor nöronların özellikleri

Motor korteks, serebral korteksin istemli hareketlerin icra edilmesinden sorumlu bölgesidir. Kemirgenlerde, primer motor korteks (M1) oldukça büyüktür ve frontal korteksin neredeyse tamamını içerirken; primatlarda özel premotor alt alanlara bölünmüştür ve M1 karşılaştırıldığında nispeten küçüktür (Paxinos, 2014). Hareketi kontrol etmede merkezi bir rol oynayan motor korteksin V. katmanında (Broadman bölgesi 4) bulunan dev Betz hücreleri veya kortikospinal motor nöronlara üst motor nöronlar adı verilmektedir. Bu motor nöronlar omuriliğe giden uzun menzilli projeksiyonları yoluyla hassas istemli hareketi başlatan ve modüle eden motor nöron devresinin kortikal bileşenini oluştururlar. Kortikospinal projeksiyonların yaklaşık %30-50'si M1'deki motor nöronlardan kaynaklanır ve uzuv hareketine başlamadan birkaç yüz ms önce ateşleme hızlarını modüle etmeye başlarlar (Porter & Lemon, 1993). Çoğu memelide, kortikal motor nöronların aksonları spinal internöronlarda sonlanır, ancak aynı zamanda alt motor nöronlarla da doğrudan bağlantı kurarlar (Rathelot & Strick, 2009). Bu şekilde hareketi oluşturmak veya bastırmak üzere kasta etkili son efferent yolağı oluşturur (Ramírez-Jarquín & Tapia, 2018).



Şekil 2. 4. Motor sistemi oluşturan nöronlar ve yerleşimi (Ragagnin, Shadfar, Vidal, Jamali, & Atkin, 2019).

2.3. Motor Nöron Hastalıkları

Piramidal sistemin iki ana motor nöron grubunun tutulumuyla tanımlanan motor nöron hastalıkları (MNH), bulbar tutulum veya ekstremitte kaslarının tutulumuyla başlayarak, nörodejenerasyon tablosunun ağırlaşmasıyla birlikte kaslarda atrofiye ve ölüme yol açan ilerleyici bir grup hastalıktır. İlk olarak “Progresif muskuler atrofi” terimi kullanılarak motor nöron hasarı tanımlanmış daha sonra hasarın farklı olarak alt ve üst motor nöronlarda ayrı ayrı görüldüğü bulgularla birlikte MNH'nin sınıflandırılması genişletilmiştir (Novarino et al., 2014)

Son yapılan çalışmalarla birlikte motor nöron hasarlarında travmatik lezyonların yanı sıra hücre içi mekanizmalarda meydana gelen bozukluklara da dikkat çekilmektedir. Protein konformasyon bozukluklarıyla birlikte yanlış kodlanan proteinin sitoplazma veya nükleus içerisinde birikimiyle nöron işlevselliğini kaybederek hücreyi apoptoza sürüklemekte ve büyük motor nöron gruplarının kaybına sebep olmaktadır. Bu hasarlar primer motor korteksten başlayarak elektriksel ve/veya kimyasal iletimin aksamasına ve belli kas gruplarında zayıflamayla birlikte motor nöron kayıplarına yol açmaktadır (Ramírez-Jarquín & Tapia, 2018).

2.3.1. Sınıflandırılması

MHN'lerin ayrıcı tanısında primer motor korteksteki “üst motor” veya omurilikteki “alt motor” nöron gruplarındaki dejenerasyon önemlidir. Saf alt motor nöron tutulumuyla karakterize olan Spinal Müsküler Atrofi (SMA)'de hücre gövdesi omuriliğin ön boynuzu içerisinde yerleşmiş olan alt motor nöron gruplarında kayıp meydana gelirken, saf üst motor nöron tutulumuyla karakterize olan Primer Lateral Skleroz (PLS)'da ise bozulma primer motor korteksde bulunan birinci motor nöron gruplarında oluşur veya omurilikteki ikinci motor nöronlara iletim yollarında dejenerasyon gözlenir. Bunun yanı sıra hem üst hem de alt motor nöronlarda bozulmaların görüldüğü Amiyotrofik Lateral Skleroz (ALS)'da ise motor nöron hasarı bütün piramidal sistem elemanlarında görülebilir (Tiryaki & Horak, 2014).

2.4. Amiyotrofik Lateral Skleroz

ALS korteks ve omurilik düzeyinde progresif motor nöron kaybıyla seyreden ölümcül bir motor nöron hastalığı olarak tanımlanmaktadır. İlk defa 1865-1869 yılları arasında Charcot ve meslektaşı Joffroy tarafından, tüm ekstremitelerde kas güçsüzlüğü olan fakat somatosensoryel kusuru olmayan, aynı zamanda bilişsel fonksiyonlarında da herhangi bir bozulma gözlenmeyen histerik bir vakadan üzerinden tanımlanmıştır. Bu yıllar arasında yaptıkları çalışmalarda; omuriliğin columna lateralis'inde kas atrofisi olmaksızın felç durumu gözlenirken, omuriliğin ön boynuzunda oluşan lezyonlarda kontraktür olmadan felç durumu ve aynı zamanda da kas atrofisi gözlemlenmiştir. İsimlendirme omurilikte kas güçsüzlüğü, atrofisi ve fasikülasyonları tanımlarken aynı zamanda kas sertliğini de ifade etmektedir.

ALS her yıl 2/100.000 bireyi etkileme oranı ve 100.000 kişide 5.4 prevalansı ile tüm nörodejeneratif hastalıklar içerisinde en sık görülen üçüncü, motor nöron hastalıklar içerisinde ise ilk sıradadır. Hastalık tipik olarak geç-orta yaşta başlar ve başlangıçtan sonra ortalama yaşam süresi 2-4 yıldır. Hastaların yaşam süresi hastalığın ortaya çıkmasından sonra 1-20 yıl arasında değişmektedir (Chio et al., 2009). Hastalığın oluşumunda genetik mutasyonların önemi bilinmesine rağmen, hastalığın oluşumu ve gelişimde etkili olan gen varyantlarının büyük bir çoğunluğu henüz keşfedilememiştir. Hastalığın etiyopatogenezine bakıldığında, olguların %5-10'unda aile öyküsü görülmekle birlikte %90'ında ailesel geçişe rastlanmamaktadır (Renton, Chiò, & Traynor, 2014). Ailesel geçişli olgularda hastalığın ilk belirtilerini gösterdiği ortalama yaş 56, sporadik olgularda ise ortalama yaşın 46 olduğu tespit edilmiştir. Bugüne kadar aile öyküsü bulunmayan olguların sadece %10'una yakın kısmı çeşitli mutasyonlarla açıklanmıştır (Mejzini et al., 2019).

2.4.1. Hastalığın oluşumu ve gelişimi (etiyopatogenezi)

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda, ALS patogenezinde temelde, RNA metabolizmasını etkileyerek hücrenin proteaz dengesini bozucu etkiye yol açan gen varyantlarının etkili olduğuna işaret edilmekle birlikte hastalığın oluşum ve

gelişim sürecine dahil olan hücrel mekanizmaların kompleks bir yapıya sahip olduğu vurgulanmaktadır (Bose, Wang, Hung, Tarn, & Shen, 2008).

Hastalardan alınan kan ve beyin-omurilik sıvısı üzerinde yapılan genetik çalışmalar sonucunda tanımlanan 50'den fazla gen bölgesi ALS ile ilişkilendirilmiştir. Ailesel geçişli vakalarda gen varyasyonlarının büyük çoğunluğunun otozomal dominant bir şekilde aktarıldığı bulunmuştur. Hastalığın fenotipik özelliklerinin homojen bir yapı göstermiyor oluşu bireysel farklılıkların varlığına işaret etmektedir (Andersen & Al-Chalabi, 2011). Hastalığın nedeni temelde genetik materyaldeki kalıcı bozukluklara bağlanmaktadır. Bununla birlikte ALS'nin ortaya çıkış mekanizması hala belirsizliğini korumaktadır. Son yapılan çalışmalar epigenetik faktörlerin de hastalıkla ilişkisi olabileceğine ve tedavi sürecinde çevresel faktörlerin gen ifadesi üzerindeki etkisinin dikkate alınması gerektiğine işaret etmektedir (Al-Chalabi et al., 2013; Bennett, Tanaz, Cobos, & Torrente, 2019). Beyindeki glutamat seviyesindeki artışın da hastalığın gelişimde etkili olabileceğine dair görüşler bulunmaktadır (Torres-Torrelo et al., 2012). Glutamat hipotezine göre sinir dokusunun bileşenleri olan nöronlar ve glia hücreleri üzerinde çok sayıda glutamat reseptörleri bulunmaktadır ve bu reseptörlerin çok fazla uyarılması uzayan bir eksitasyona ve sinaptik fonksiyon bozukluklarına yol açmaktadır. Uzamış eksitasyon sinir hücreleri için toksik etki yaratmakta ve sinir dokusuna zarar vermektedir.

2.4.2. ALS'de Klinik Özellikler

ALS alt ve üst motor nöron kaybının gözlemlendiği bir hastalık olmasına rağmen, ALS'de ilk belirtiler başlangıç bölgesi itibariyle her olgu için farklılık gösterebilmektedir. Vakaların büyük bir çoğunluğunda ilk tutulum spinal düzeyde iken kortikal motor nöronlarda hasarlanma hastalığın geç evrelerinde görülmektedir. Hastalığın başlangıcında kas güçsüzlüğü ve derin tendon reflekslerinde artışa eşlik eden spastisite ve kas atrofisinde progresif artışın olduğu bir tablo gözlenmektedir. Alt ve üst ekstremitelerde tutulum distal, proksimal veya asimetric olarak görülebilirken genellikle, proksimal kaslar ön planda etkilenmektedir. Hastaların ilk yakınmaları genellikle merdiven çıkarken

zorlanma ve ince motor becerilerde azalma şeklindedir. Hastalığın ileriki aşamalarında patolojik reflekslerde artışla birlikte solunum ve yutma güçlüğü gibi hayati fonksiyonlarda bozulmalar ortaya çıkmaktadır. Tüm vakaların yaklaşık %25'ini kapsayan bulbar tutulumla başlayan ALS vakalarında ise ilk yakınmalar konuşmadaki bozulmalardır. Hastalık başlangıçta konuşma, yutma ve çiğneme kaslarını, bununla birlikte ekstremitelerdeki kasları da etkiler. Üst motor nöron tutulumuyla birlikte yüzün alt yarısındaki kaslarda güçsüzlük ve dilde fasikülasyonlar oluşmaktadır. En belirgin semptomlardan bir diğeri de boyun fleksiyon kaslarında güçsüzlüktür (Donaghy, 1999).

ALS temelde motor fonksiyon kayıpları ile karakterize bir hastalık olarak tanımlanmakla birlikte, hastalığın gelişiminde, motor dışı klinik semptomların da oluşabileceği bilinmektedir. Primer motor korteksteki etkilerine ek olarak frontal ve temporal alanlarda da bozulmalara sebebiyet vereceğine dair bilgiler bulunmaktadır. Bulbar tutulum ile bilişsel fonksiyonlarda bozulmalar arasında anlamlı bir ilişkinin olduğunu destekleyici çalışmalar bulunmaktadır. ALS vakalarının %14'ünde bozulmalar frontotemporal demans (FTD) tanı kriterleri ile benzerlik göstermektedir (Consonni et al., 2013; Montuschi et al., 2015; Murphy et al., 2016). Bilişsel gerileme, bu olgularda sürdürülebilir dikkat ve çalışma belleği gibi yürütücü işlevlerde eksiklik ile konuşma ve sözel akıcılık gibi sosyal bilişteki bozulmaları temsil etmektedir (Beeldman et al., 2016; Phukan et al., 2012). Bilişsel bozulmalara ek olarak, bulbar tutulumun depresyon ve emosyonel dalgalanmalarla da ilişkili olduğuna dair çalışmalar bulunmaktadır (Turner et al., 2010).

2.4.3. ALS'de rol oynayan genetik mutasyonlar

Bugüne kadar ALS ile ilişkili olduğu tespit edilen 50 gen bölgesi içerisinde varyantlarının fenotipik değişiklikler oluşturmada en etkili olduğu düşünülen genler SOD1 (süperoksit dismutaz 1'i [Cu / Zn] kodlayan), TARDBP (TDP-43 kodlayan), C9ORF72 ve FUS'tur. Bunlardan 1993 yılında tanımlanan SOD1, ALS ile ilişkilendirilen ilk gen olarak bilinmektedir. SOD1 geni üzerinden tanımlanmış 185'ten fazla mutasyon tipi bulunmaktadır ve gendeki bu varyant genişliği ailesel ALS vakalarının sadece %15-30'u ile sporadik ALS vakalarının

yaklaşık %2'sini açıklamaktadır (Zou et al., 2017). SOD1 hücre solunumu sırasında üretilen süperoksit radikallerinin oksijen ve hidrojen peroksite katalize eden superoksit dismutaz enziminin kodlanmasından sorumludur. Bu katalizasyon sonucunda hücrenin sağaltımı açısından oldukça önemli olan antioksidan savunma mekanizması oluşmaktadır. Dolayısıyla bu enzim ifadesindeki düşüş hücrede oksidatif hasarı artırarak hücre ölümüne yol açmaktadır. SOD1 ifadesindeki bu değişimin enzim aktivitesi üzerinde %50-80'lik bir azalışa neden olduğu gösterilmiş, fakat daha sonra yapılan bir çalışmada dismutaz aktivitesindeki azalışın hastalığın şiddetiyle korelasyon göstermediği bulunmuştur (Wong et al., 1995). Hücre metabolizmasını etkileyecek şekilde bir toksik kazanımın hastalığın patogenezinde daha etkili olabileceğine görüş daha sonra yapılan transgenik hayvan modelleriyle de desteklenmiştir (Reaume et al., 1996). SOD1 genindeki mutasyonların protein ifadesinde oluşturduğu fonksiyonel ve konformasyonel bozuklukların hücre içerisinde inklüzyon cisimciklerinin oluşturarak eksitotoksititeye neden olabileceği gösterilmiştir.

ALS hasta gruplarından toplanan omurilik örnekleri üzerinde yapılan histolojik analizlerde, nöronal ubikitine inklüzyon cisimciklerinin varlığına rastlanması hastalık patogenezinde hücre içi protein birikimine bağlı proteinopatik hasarlanmanın önemine dikkat çekmektedir. Sporadik ALS vakalarında ubikitine protein agregatlarının ana bileşenleri incelendiğinde bu yapının oluşumda TARDBP tarafından kodlanan TDP-43 proteininin etkili olduğu keşfedilmiştir (Neumann et al., 2006). TDP-43, RNA ve DNA bağlayıcı bölgeler içermesinden dolayı gen ekspresyonunda düzenleyici olarak işlev görmektedir ve hücre içi RNA metabolizması üzerinde düzenleyici görevi bulunmaktadır. Buna bağlı olarak ALS'de TDP-43 patolojisi; ubikitinasyon, proteolitik bölünme ve fosforilasyon gibi çeşitli translasyon sonrası maruziyetlerle birlikte proteininin konformasyonel bozulmalar neticesinde sitoplazmada anormal dağılışıyla ilişkilendirilmiştir (Vance et al., 2009).

2009 yılında 197 ailesel ALS vakası üzerinde yapılan bir araştırmada FUS (fused in sarcoma) proteinini kodlayan gen dizisindeki kayıp mutasyonların

hastalığın bir alt formuna neden olduğu bulunmuştur (Vance ve ark., 2009). Sarkomada kaynaşmış olarak bulunan bu proteinini kodlayan gen dizisinin patojenik varyantlarının özellikle erken başlangıçlı ALS olgularıyla ilişkilendirilmiştir. Çalışmada ALS-FUS olgusunun bulunduğu hastalarda alt motor nöronlarda sitoplazmik FUS immunoreaktif inklüzyonlarına rastlanmıştır. FUS, DNA/RNA bağlanma bölgesi içeren 156 amino asitlik proteinin kodlanmasından sorumlu gen ve aynı zamanda bu proteine verilen ismi temsil eder. FUS normal şartlarda nükleus içerisinde lokalizedir fakat RNA metabolizmasındaki görevi sebebiyle çekirdek ile sitoplazma arasında gerekli olduğunda transportu gerçekleşmektedir (Zinszner, Sok, Immanuel, Yin, & Ron, 1997). FUS agregat oluşturma özelliğine ek olarak DNA onarımı sırasında hem homolog hem de homolog olmayan uçların birleştirilmesini sağlayarak çift zincirli yapının korunmasında da rol alır (Mastrocola, Kim, Trinh, Rodenkirch, & Tibbetts, 2013).

FUS ile TDP-43 patolojisinin mekanizmaları, RNA taşıma ve translasyonun düzenlenmesi, mRNA öncesi ekleme ve transkripsiyon gibi gen ifadesinin düzenlenmesi üzerinden birçok benzer fizyolojik özellikleri paylaşmakla birlikte (Ratti & Buratti, 2016), bu iki protein farklı RNA mekanizmalarını ve bağlanma bölgelerini hedeflemektedir (Lagier-Tourenne et al., 2012; Vicario et al., 2015). FUS ve TDP-43'ün hücre metabolizmasının düzenlenmesi sürecinde farklı hedeflere sahip olması ve TDP-43 agregasyonun FUS varlığında gözlenmemiş oluşu ALS'de FUS'un ayrı bir patoloji olarak tanımlanmasını gerektirmektedir (Vance et al., 2009).

2011 yılında yapılan bir çalışmayla birlikte C9ORF72 geninin kodlamayan bölgesinde bir hekzanükleotid "GGGGCC" adacığının tekrar eden genişlemesinin ailesel ALS vakalarında artmış sayıda bulunduğu keşfedilmiştir (DeJesus-Hernandez et al., 2011; Renton et al., 2011). Patolojik olmayan durumlarda 5 ile 10 arasında olması gereken hekzanükleotid "GGGGCC" tekrarlarının hem ailesel hem sporadik ALS'de binlerce olduğu gözlenmiştir. Tekrarlı genişlemenin olduğu gruplarda C9ORF72 mRNA ve protein ekspresyon düzeylerinde azalış gözlenmesi hastalık mekanizmasında belirgin protein kaybıyla seyreden hücre ölümleri

olduğu düşünölmüştür. Fakat daha sonra transgenik fare modelleriyle yapılan çalışmalarda anlamlı bir motor nöron kaybının gözlenmemiş olması hastalık mekanizmalarında farklı açıklamalara başvurulmasını gerekli kılmıştır (Renton vd., 2011).

2.5. TDP-43 Geni ve Agregasyonu

Evrimsel açıdan hemen hemen tüm ökaryatlarda iyi şekilde korunmuş olarak bulunan TDP-43 [TAR (Transactive Response) DNA-Binding-Protein-43] ilk olarak HIV-1 virüsünün TAR-DNA bileşenine bağlanarak transkripsiyonu inaktive etme özelliğiyle tanımlanmıştır. TARDBP geni tarafından kodlanan 414 aminoasit uzunluğundaki TDP-43 proteini 43kDa moleköl ağırlığına sahiptir. Kromozom 1 üzerinde yerleşik olan TAR-DNA kırılma sırasında farklı izoformlar oluşturmak üzere altı ekzon barındırmaktadır. Bununla birlikte TDP-43 proteinini kodlayan bu genin aynı zamanda fare ve sıçanlarda singenik örneklerine de rastlanmaktadır (Kuo, Doudeva, Wang, Shen, & Yuan, 2009) Ayrıca genin homologlarına *Drosophila melanogaster*, *Xenopus laevis* ve *Caenorhabditis elegans* gibi uzak türlerde dahi rastlanıyor oluşu TDP-43 proteininin evrimsel öneminin bir diğere kanıtıdır (H.-Y. Wang, Wang, Bose, & Shen, 2004). Bu durum farklı hayvan modellerinin oluşturulmasına olanak sağlamaktadır.

TDP-43 proteinini kodlayan genler ağırlıklı olarak pankreas, plasenta, dalak, testis, yumurtalık, akciğere ve böbrek dokularında da eksprese edilmektedir ve protein düzeyi genel olarak tüm dokularda ve plazmada tespit edilebilmektedir. Ancak bununla birlikte türler arasında organ ve dokulardaki ekspresyon düzeylerinde farklılıklar gözlenmektedir. Sıçanlar üzerinde yapılan çalışmalarda, gerçek zamanlı PCR taramasında, kalp hariç, akciğere, dalak, timüs ve beyinde hem protein hem de mRNA ekspresyonunun baskın olduğu tespit edilmiştir (The Human Protein Atlas, 2020).

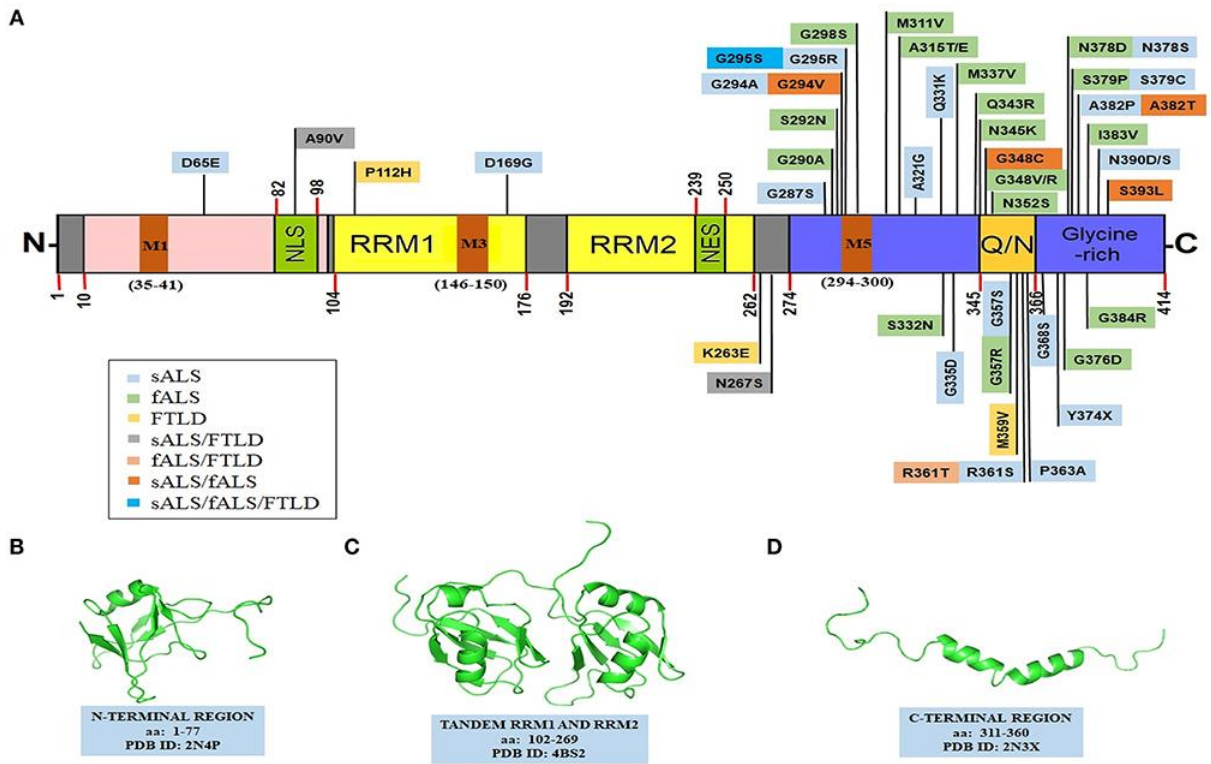
TDP-43 proteini, DNA ve RNA bağlayıcı özelliği dolayısıyla hücre metabolizmasının düzenlenmesinde önemli işlevlere sahiptir. Heterojen ribonükleoprotein grubuna (hnRNP'ler) ait olan TDP-43, RRM1 ve RRM2 olmak üzere iki adet RNA tanıma motifi içeren nükleik asitlere bağlanma bölgesi,

nükleer eksport ve nükleer lokalizasyon sinyal bölgelerinin bulunduğu N-terminal ve glisin amino asidince zengin olan C-terminal domaini içermektedir. İki RNA tanıma motifine sahip olması dolayısıyla TDP-43 proteini hücre içi RNA metabolizmasının düzenlenmesinde ve mikro RNA oluşum sürecinde önemli rol oynamaktadır (şekil 2.5). TDP-43 proteini, RNA metabolizmasının düzenlenmesinde, kodlanmamış RNA (ncRNA) parçalarının kodlayıcı parçalara entegrasyonunu sağlar ve özellikle nöronun gelişimi ve hayatta kalmasını sağlayan birtakım proteinlerin sentezinde görev alan mRNA'ların yapımında da rol almaktadır. Nükleik asitlere bağlanma bölgeleri barındırmasından dolayı genetik materyal taşıyan organellerin metabolik faaliyetlerinde de öneme sahiptir. Mitokondride kısmen lokalize olduğu bildirilmesine rağmen mitokondri homeostazında rol oynadığına ve mitokondriyal stres cevabının oluşmasını indüklediğine dair çalışmalar bulunmaktadır (P. Wang et al., 2019).

Patojenik olmayan hücrelerde genellikle çekirdekte yerleşiktir ancak sitoplazmada da dağılmış şekilde bulunmaktadır. Üzerinde bulundurduğu nükleer lokalizasyon (NLS) ve nükleer eksport sinyal bölgeleri (NES), TDP-43 proteinin hücre çekirdeğine giriş ve çıkışını kontrol etmektedir. Son çalışmalar NLS varlığına rağmen TDP-43'ün hücre çekirdeğine transferinin daha çok difüzyon aracılığıyla gerçekleştiğine işaret etmektedir (Pinarbasi et al., 2018). Bunun yanı sıra sitoplazmaya da dağılmış şekilde bulunan TDP-43 ise endoplazmik retikulum (ER) ve mitokondri gibi hücre organelleriyle birlikte lokalize olabilir, böylelikle ER-mitokondri bağlantısı ve mitokondriyal protein transferinde rol oynar. Ayrıca hücre iskeleti elamanlarıyla birleşerek nöritlerde de RNA granülleri ile birikimler oluşturabilme kabiliyetine sahiptir. Bu şekilde sitoplazmada RNA taşınması ve okunmasında görev almaktadır (Davis et al., 2018).

TDP-43 proteinin bir diğer domaini olan glisin amino asidince zengin C-terminal bölgesi, daha çok mutasyonlarla ilişkili bölge olarak gösterilmektedir. N-terminal ve C-terminal bölgesi hücre içi protein-protein etkileşimlerinden sorumludurlar ve genellikle protein agregasyonlarıyla ilişkilendirilirler. Çeşitli çalışmalarda TARDBP genindeki mutasyonlar sonucunda hiperfosforilize ve

ubikütine olan TDP-43 proteininin C-terminal fragmanlarının hücre sitoplazmasında ve nadiren çekirdekte agregatlar oluşturularak hücreyi hiperekstiyasyona sürüklediği gösterilmiştir (İgaz et al., 2009). Oluşan bu agregatlar ise hücre içerisinde rastlanan tipik fibriler yapı göstermedikleri için genotipteki değişimlerle birlikte mevcut bozulmalar proteine özgü TDP-43 patolojisi olarak isimlendirilmektedir (Baloh, 2011).



Şekil 2. 5. TDP-43 proteininin C-terminal ve N-terminal fragmanları ve yaygın mutasyonları (Prasad, Bharathi, Sivalingam, Girdhar, & Patel, 2019).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanları

In utero elektroporasyon işlemi uygulanacak 7 adet dişi Sprague-Dawley cinsi yetişkin (70 günlük) sıçanlar Eskişehir Osmangazi Üniversitesi (ESOGÜ) Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu onayı ile TICAM'dan (Tıbbi Cerrahi Hayvan Üretim ve Bakım Merkezi) çiftleştirilmek üzere temin edildi. Deney hayvanları deney süresince 19-21°C sabit sıcaklıkta, 12 saat aydınlık/karanlık periyodu sağlanarak merkezdeki bakım odalarında barındırıldı.

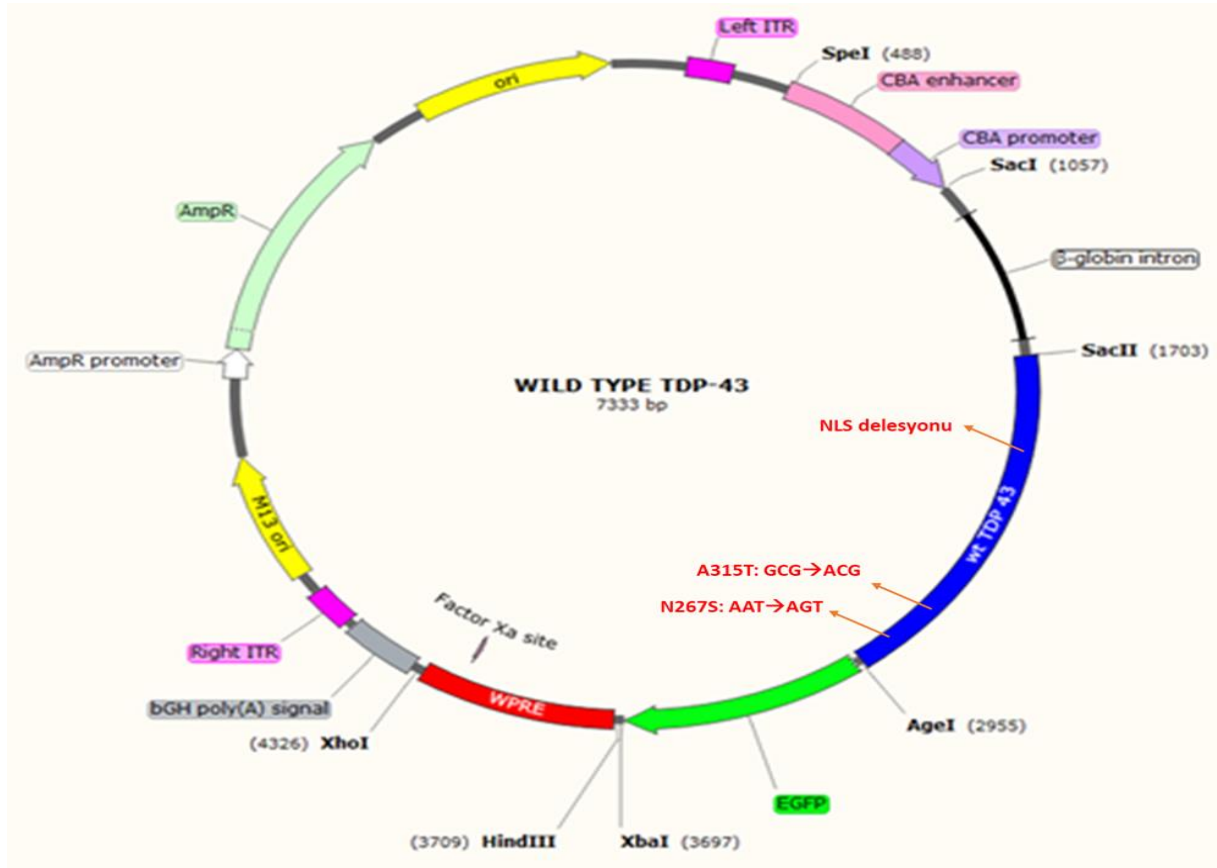
3.1.1. Çiftleştirme protokolü

Çiftleştirme gebelik ihtimalini artırmak için her seferinde bir erkek sıçanla iki dişi olacak şekilde gerçekleştirildi. İki kafeste 2 dişi bir erkek, son bir kafeste ise bir dişi bir erkek sıçan olacak şekilde kafeslerde eşleştirme yapıldı. Hayvanlar çiftleştirme kafeslerine alındıktan 12 saat sonra E0 (hamileliğin ilk günü) tayini yapabilmek için dişi sıçanlardan vajinal simirleri alınarak mikroskop altında inceleme yapıldı. Örneklerde sperm pozitif çıkan dişiler farklı kafeslere alındı. Protokol her bir sıçanda sperm pozitifliği tespit edilene kadar tekrarlandı. Çiftleştirme protokolü toplamda 7 gün sürdü.

3.3. In Utero Elektroporasyon Uygulaması

3.3.1. Enjeksiyon için fast green ve DNA çözeltisinin hazırlanması

In utero elektroporasyon için kullanılacak saflaştırılmış DNA plazmidleri Northwestern Üniversitesi Feinberg Tıp Fakültesi Nöroloji Bölümü öğretim üyesi Doç. Dr. Hande Özdinler'in laboratuvarında üretilerek deneylerde kullanılmak üzere bağış olarak temin edildi. İnsanda TDP43 proteinin kodlayan TARDBP geninin farklı mutasyonlarını kodlayan DNA dizisi içeren plazmidlerin enjekte edileceği üç farklı deney grubu TDP-43^{A315T}, TDP-43^{NLS}, TDP-43^{N267S} şeklinde adlandırıldı (Şekil 3.1).



Şekil 3. 1. TDP-43 gen mutasyonu olan DNA plazmid tasarımı

Plazmidler enjeksiyon zamanına kadar her bir tüpte 10 µl olacak şekilde bölünerek -20 °C saklandı. Cerrahi operasyon öncesinde çıkarılarak son konsantrasyonu 1-4 µg/µl arasında olacak şekilde distile su ile seyreltikten sonra filtre edilerek sterilize edildi. Enjeksiyon sırasında hem enjekte edilen yeri görebilmek hem de enjekte edilen sıvının akış yönünü tespit edebilmek için DNA çözeltisinin içerisine 0,3 mg/ml konsantrasyonunda Fast Green FCF çözeltisi eklenerek 1/10 oranında DNA+Fast Green FCF çözeltisi hazırlandı. İnsanda TDP43 proteinin kodlayan TARDBP geninin farklı mutasyonlarını kodlayan DNA dizisi içeren plazmidlerin enjekte edileceği üç farklı deney grubu TDP 43^{A315T}, TDP43^{NLS}, TDP 43^{N267S} şeklinde adlandırıldı.

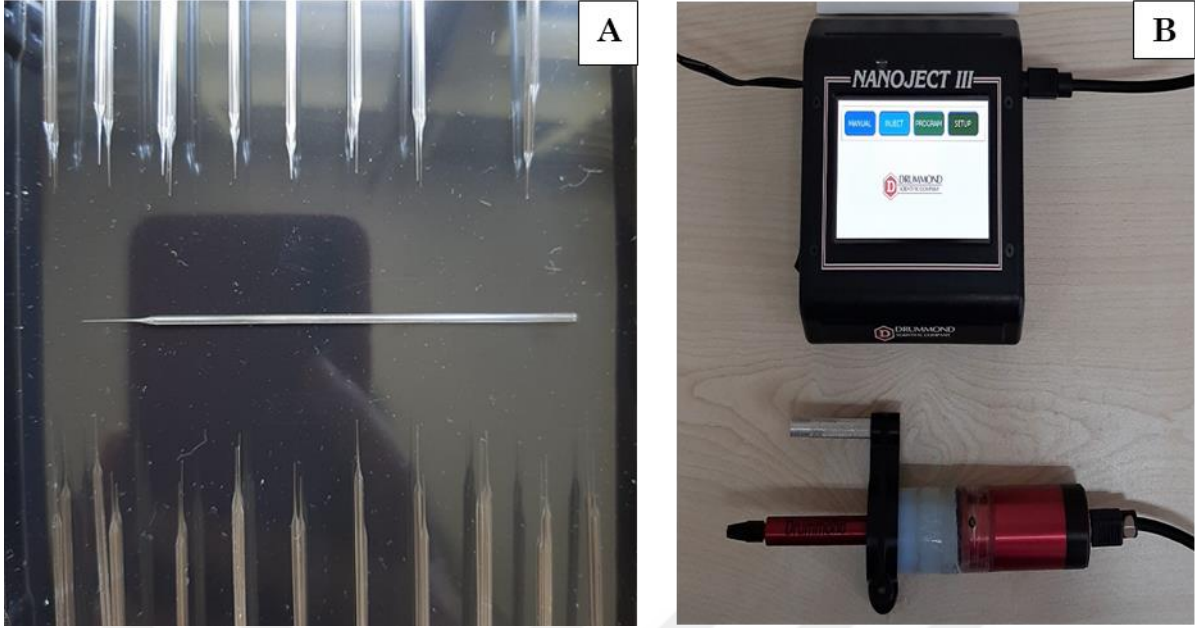
3.3.2. Cerrahi işlem sırasında kullanılan materyallerin sterilizasyonu

Cerrahi operasyon esnasında kullanılacak bütün materyaller bir gün öncesinden Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık, Uygulama ve Araştırma Hastanesi bünyesinde hizmet veren sterilizasyon bölümünde otoklav ile sterilize edildi. Bu yöntemle bütün materyaller basınçlı su buharı altında 121°C sıcaklıkta yaklaşık 20 dakika sterilizasyona maruz bırakıldı.

3.3.3. Mikroenjeksiyon pipetlerinin hazırlanması

Filamentli borosilikat cam kapiller pipetler (şekil 3.2.a) eşit boylarda kesildi (10 cm) ve uçları çektirilerek inceltildi (çektirme işlemi için önceden ayarlanmış şu program kullanıldı: Basınç, 200; sıcaklık, 635-645; hız,150). Kapiller ucunun geniş olması halinde hedeflenen bölgeye enjeksiyon zorlaşacağı için uç kısmından yaklaşık 1,5 cm kesilerek kalan kısım törpüledi ve nihai uç uzunluğu 5 mm olacak hale getirildi. Bu işlem sırasında, uçların fazlaca keskin olması durumunda embriyoya zarar vereceğinden optimum açıklığa gelene kadar törpüleme işlemi sürdürüldü.

Kullanıma hazır cam kapillerin içerisine, enjekte edilecek solüsyonun akışkanlığını sağlaması için, ince uçlu bir enjektör yardımıyla sıvı vazelin dolduruldu. Tamamı sıvı vazelinle dolu kapiller nanojektörün (Şekil 3.2.b) ucuna yerleştirildikten sonra bir miktar sıvı vazelin yerine DNA çözeltisi çekilmek üzere boşaltıldı. Her bir gebe sıçan için, bir ameliyat boyunca kullanılmak üzere, yaklaşık 20 µl DNA çözeltisi kapillere yüklendi.



Şekil 3. 2. Cam kapiller; 10cm boyunda 5mm'lik (A), nanojektör (B)

3.3.4. Cerrahi operasyon için hazırlık

Gebe sıçanlar hamileliğin 16. gününün (E16) sabahında (6.00-12.00 arası) elektroporasyon işlemini gerçekleştirmek üzere deneye alındı. Anestezik olarak steril insülin enjektörlerine çekilen ketamin (80 mg/kg) ile ksilazin (12 mg/kg) intraperitoneal olarak uygulandı, anestezinin derinleşene kadar sıçanlar kafeslerinde bekletildi. Pençe sıkıştırma refleksi kaybolan deney hayvanının karın bölgesi önce %70 etanol ile temizlendikten sonra tüy dökücü krem yardımıyla tüylerden arındırıldı (Şekil 3.3). Daha sonra antiseptik solüsyon ile kesi yapılacak bölge temizlendi ve gözlerine, operasyon sırasında açık kaldığı için, pamuk yardımıyla göz merhemi sürüldü. Deney sırasında anestezinin derinliğinin azalmasına karşın 1/3'lük idame dozu ve inhalasyonla verilecek sevoflouran hazır bekletildi.

Anestezisi sağlanan gebe sıçan, vücut ısısının düşmesini önlemek amacıyla, operasyon boyunca ısıtma pedinin (37°C) (şekil 3.4) üzerinde tutuldu. Isıtma pedinin üzeri ve sadece operasyon bölgesini açıkta bırakacak şekilde deney hayvanının üzeri sterilize bezler ile kapatıldı.



Şekil 3. 3. Sıçanın karın bölgesinin tüylerden arındırılması.

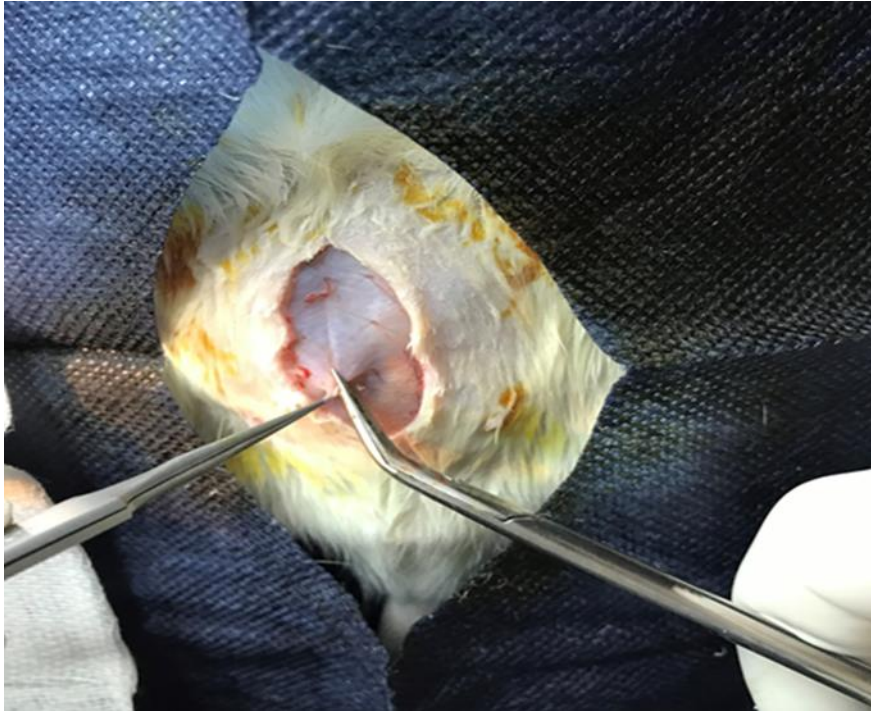


Şekil 3. 4. Isıtma pedi

3.3.5. Cerrahi operasyon

Gebe sıçanın tüylerden arındırılmış karın bölgesi, kontaminasyonu önlemek amacıyla, batikonlu steril pamuk çubuk yardımıyla merkezden dışa doğru temizlendi. Embriyolara zarar vermemek amacıyla açılı uçlu makasla karın bölgesine küçük bir kesi atılarak, processus xiphoideus'un yaklaşık 2 cm altından itibaren, abdomen orta hattan uzunlamasına açıldı (şekil 3.5). Bu işlem sırasında aşırı kanamayı önlemek amacıyla linea alba kesi bölgesi olarak takip edildi. Kesilen bölgenin altında embriyo bulunmadığından emin olmak için karın kasları dişli penset yardımıyla kaldırılarak kontrol edildi. Karın kaslarına yapılan kesinin uterus boynuzlarını rahatça çıkarabilecek şekilde optimum boyutta olmasına özen gösterildi.

Kesilen bölge etrafına ılık SF ile ıslatılmış steril gazlı bez serilerek uterus boynuzları için nemli ve sıcak bir yüzey oluşturuldu. Halka uçlu penset (şekil 3.6) yardımıyla uterus boynuzları abdomen dışına çıkartıldı. Bu işlem sırasında pensetin embriyoları ve besleyen damarları sıkıştırmadan uterus tüpleri içindeki boğumlara denk gelecek bölgelerden kullanımına dikkat edildi. Ameliyat süresince uterus ve uterus boynuzları ılık SF ile ıslak tutuldu.



Şekil 3. 5. Gebe sıçanda linea alba takip edilerek yapılan batın diseksiyonu.



Şekil 3. 6. Elektroporasyon sırasında dişli penset ile embriyoların çıkarılması.

3.3.6. DNA enjeksiyonu ve elektroporasyon

Önceden hazırlanmış DNA çözeltisi (%0,1) nanojektör yardımıyla, her embriyo için yaklaşık 1-3 μ l olacak şekilde, embriyoların lateral ventrikülüne enjekte edildi. Her bir uterus boynuzu nazikçe halka uçlu penset ile çıkarıldıktan sonra düşük riskini minimuma indirmek amacıyla her boynuzdaki ilk iki embriyo atlanarak işlem sürdürüldü. Telencephalon'u rahatça açığa çıkartmak amacıyla amniyon kesesi fiber optik ışık kaynağı ile aydınlatıldı. Nanojektör ucuna takılan cam kapillerin ucu amniyon kesesini deldikten sonra, neokortekse 2-3 mm derinlikte penetrasyonu sağlandı ve DNA çözeltisi her bir embriyonun lateral ventrikülü dolana kadar enjekte edildi (Şekil 3.7). Bu işlem sırasında renksiz DNA materyalini görünür kılmak için kullanılan Fast Green FCF ile lateral ventrikülün dolarak yarım ay benzeri bir görüntüye ulaştığı gözlemlendiğinde enjeksiyon durduruldu.

DNA enjekte edilen embriyolar, DNA içeriğinin beyinde hedeflenen alana yönlendirilmesini sağlamak amacıyla, halka penset ile antero-posterior ekseninde tutularak tripod yapılı elektrotun negatif podu DNA çözeltisinin enjekte edildiği yere, pozitif podu ise motor kortekse denk gelecek şekilde yerleştirildi. Embriyolara hafif parametrelerde elektroporasyon ile düşük elektrik akımı verildi (Yoğunluk; 50V, uzunluk; 50ms, aralık; 150 ms) (Şekil 3. 8). Düşük riskin azaltmak için bir batında maksimum 3-4 embriyoya elektroporasyon işlemi tamamlandıktan sonra uterusun dışı ve boynuzları ılık SF ile yıkandı ve embriyolar halka penset yardımıyla nazikçe uterus yan duvarlarına doğru itilerek karın içine yerleştirildi. Daha sonra karın katları önce ince ipek sütür ile sonra kalın sütür ile dikilerek kapatıldı. Sütürlerin olduğu bölge batikon ile temizlenerek antibakteriyel krem sürüldü ve anestezi etkisi sonlanana kadar hayvanlar 37°C'de ısıtma pedi üzerinde bekletildi. Sonraki gün tek doz analjezik (İM; verilen madde) uygulandı. Tüm gebe sıçanlar doğuma kadar izole kafeslerde tutularak gözlemlendi.



Şekil 3. 7. Lateral ventriküle DNA solüsyonunun enjeksiyonu



Şekil 3. 8. Embriyolara elektrotlarla hafif elektrik akımı verilmesi.

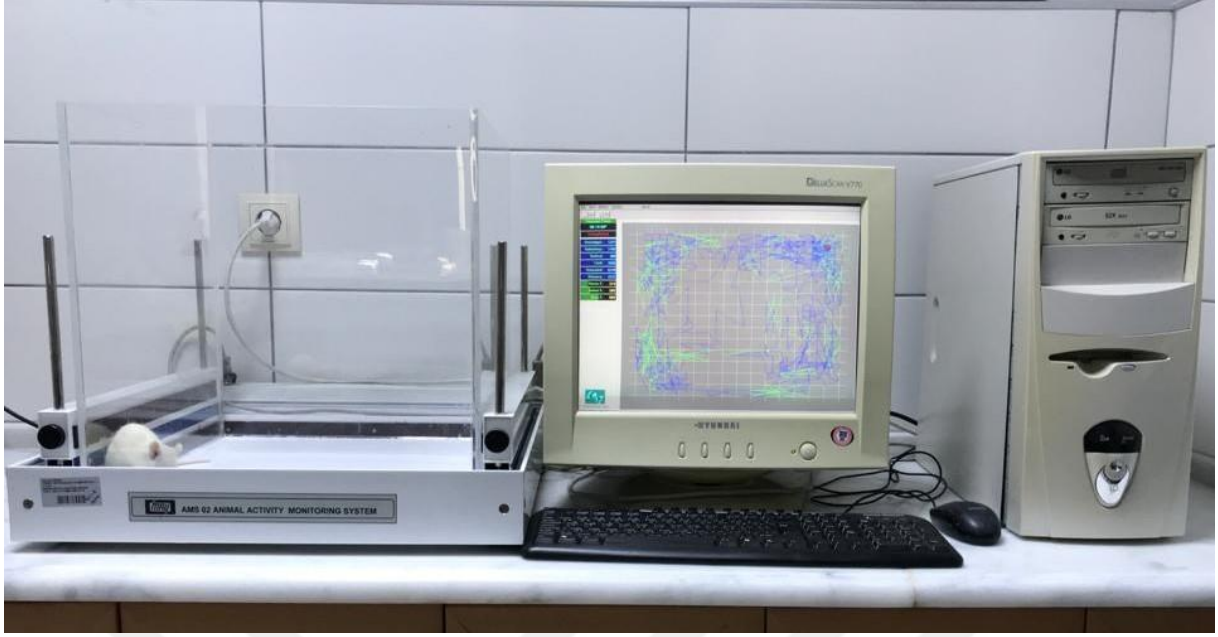
3.4. Motor Davranışın Değerlendirilmesi

Deney ve kontrol hayvanlarında gelişimsel bozulmanın izlenebilmesi için davranış ölçümleri haftalık olarak tekrar edildi. Patolojinin ortaya çıkış aralığı gözetilerek belirlenen dönemlerde tekrar edilen ölçümler analize tabii tutuldu.

3.4.1. Lokomotor spontan aktivite testi

Spontan lokomotor aktivite ölçer (Aktivite metre, 40cmx40cmx35cm; MAY Commat) (Şekil 3.9) kızılötesi algılayıcılarla plastik cam bir kutunun içine konan hayvanın horizontal ve vertikal hareketlerini algılayarak kaydetmektedir. Kafes yanlarına yerleştirilmiş yatay konumda önden arkaya ve sağdan sola olacak şekilde fotoseller yerleştirilmiştir. Kafes içerisine yerleştirilen hayvan yandaki fotosellerden yayılan ışınların kırılmasına neden olarak X-Y düzleminde bir yer değiştirme paterni oluşturulup kaydedilmesini sağlar. Kayıt bir bilgisayar yazılımı sayesinde verilere dönüştürülür. Yazılım hayvanın kafes içerisinde bulunduğu süre boyunca toplam mesafe, yatay aktivite (horizontal aktivite), dikey aktivite (vertikal aktivite), yer değiştirme, kendine bakım hareketlerinin ifade edildiği stereotipik hareketlerin toplamıyla bu hareketlerin her biri için geçirilen süre ile ilgili ölçümleri kaydeder.

Lokomotor aktivitemetre kafesine konulan her bir sıçan 10 dakika boyunca kafesin içerisinde serbest bırakılmış ve bu süre boyunca yukarıda bahsedilen kayıtlar toplanmıştır. Lokomotor aktivite ölçümü diğer yapılan davranış ölçümlerinden önce yapılmış ve test sonucunda örneklemin normal dağılım gösterip göstermediği araştırılmıştır. Aktivite ölçümleri benzer olan kontrol ve deney gruplarına daha sonra rota-rod, modifiye grip ve Cat-walk yürüme testleri uygulandı.



Şekil 3. 9. Lokomotor aktivite metre cihazı.

3.4.2. Rota-rod testi

Rota-rod testi sabit ya da artan hızda dönen bir çubuk üzerinde durmaya zorlanan deney hayvanının düşmeden kalma süresinin ölçülmesi ile motor performansları ve koordinasyon düzeylerinin değerlendirilmesi esasına dayanmaktadır. Rota-rod cihazı sabit veya rampalı olacak şekilde hız ayarı yapılabilen dönen bir silindir ile deney hayvanının yerleştirildiği bölmelerden oluşmaktadır (Şekil 3.10).

Bu çalışma için modifiye edilen Rota-rod testi alıştırmaya, deneme ve testin tekrarı aşmalarından oluşmaktadır. Deney hayvanlarının bölmelerde veya silindir üzerinde durmaya karşı direnç göstermeleri ya da dönen silindirde ters dönmeleri gibi durumların elimine edilmesi için iki dakikalık alıştırmaya süresi tanındı. İki dakika boyunca ölçüm alınmadı ve hayvanların rottan düşmeleri ya da ayrılmaları durumunda elle manipülasyon yapılarak hayvanların silindir üzerinde durmaları sağlandı. Daha sonraki aşamalarda deneyin sonlandırma süresi 300 sn olarak belirlenmiş ve silindirin hızı sabit olarak 20 rpm'e ayarlandı. Bu süre boyunca sıçanların dönen çubuk üzerindeki kalış süreleri ve düşme sayıları haftalık olarak kaydedildi.



Şekil 3. 10. Rota-rod cihazı

3.4.3. Modifiye grip testi

Modifiye grip testi için yerden 45 cm yükseklikte iki tahta destek arasına 50cm uzunluğunda bir ip gerilerek bir düzenek oluşturuldu. İpin altında bulunan tahta zemine, sıçanların düşme durumunda darbeyi hafifletmesi için yumuşak bir bez serildi. Sıçanlar iki destek çubuğunun tam ortasına gelecek şekilde ön pençeleriyle gergin ip üzerine yerleştirilerek test başlatıldı. Testi sonlandırma süresi 150sn olmakla birlikte iki tekrar şeklinde uygulandı. Sıçanın en iyi performans sergilediği tekrardan aldığı puan istatistikî analizlerde kullanıldı.

Modifiye grip testinde deney hayvanlarının iki tip davranış sergilediği gözlenmektedir. Birinci tip davranışta sıçanlar ipin üzerinde hareket ederek bir desteğe ulaşırlar, desteğe tırmandıktan sonra kayarak aşağıya inerler. Bu davranış kaçma olarak tanımlanmaktadır. Diğer davranışta ise düşmeden ipin üzerinde durmaya çalışan sıçanlar çabalama davranışı sergilemektedir. Bir kronometre yardımıyla test süresince sıçanların kaçma ve düşmeden ipin üzerinde kalma süreleri kaydedildi. Kaçma ve çabalama davranışları esas

alınarak deney hayvanlarının motor becerileri aşağıdaki kriterler çerçevesinde puanlandı (Şekil 3.12).



Şekil 3. 11. Modifiye grip test aparatı ve testin puanlaması 0=İpten düşme; 1=Sadece bir ön pençeyle asılı kalma; 2= Ön pençeleriyle asılı kalma; 3= Ön pençelere ek olarak ipe tırmanmaya çabalama ve arka pençelerden biri veya ikisi ile tutunma; 4=Ön ve arka pençelere ek olarak kuyruk yardımıyla ipe tırmanma; 5=Düzenekten kaçma; 6= İpte 150 sn.den uzun süre asılı kalma veya düzenekten 40 sn.den sonra kaçma; 7= Düzenekten ilk 31-40 sn. içinde kaçma; 8=Düzenekten ilk 21-30 sn. içinde kaçma; 9=Düzenekten ilk 10-21 sn. içinde kaçma; 10= Düzenekten ilk 10 sn. içinde kaçma.

3.4.4. Cat-walk yürüme testi

Deney hayvanlarının motor performanslarında ağırlıklı olarak koordinasyon ve denge ile ilgili parametreleri analiz etmek amacıyla Cat-walk yürüme desenleri kullanılmaktadır. Sıçanların ön ve arka ayakları gıda boya ile farklı renkte boyandıktan sonra emici bir yüzey (kâğıt) üzerinde bir doğrultuda yürümelerine izin verildi. Adım aralıkları için puanlama, kâğıt üzerinde oluşan ilk 4 adımın ön ve arka pati izleri arasındaki mesafenin bir cetvel yardımıyla her adım için ayrı ayrı ölçülerek kaydedilmesiyle yapıldı. Puanlama, kâğıt üzerinde oluşan ilk 4 adımın ön ve arka pati bası izlerinin alanı ve bası izleri arasındaki mesafenin Image J (NIH 1.6 versiyon) programı yardımıyla her adım için ayrı ayrı ölçülerek kaydedilmesiyle yapıldı.

3.5. İstatistiksel Analizler

Davranış deneylerinden elde edilen sonuçlar analizinde SPSS (Statistical Package for Social Sciences, 22. sürüm) paket programı ile analiz edildi. Verilerin normal dağılım gösterip göstermedikleri Kolmogorov-Smirnov ve Shapiro-Wilk testleri ile incelendikten sonra davranış çıktıları non-parametrik ve parametrik testlerle analiz edildi.

4. BULGULAR

Gebe annelerin sahip oldukları fetüs sayısında farklılıklar olduğu için ve uterus tüpleri yerleşen fetüslerden ilkin ve sonuncusuna işlem yapılamadığından tüm annelerde benzer sayıda elektroporasyon işlemi gerçekleştirilemedi. Ayrıca bazı gebelerde özellikle mutasyonlu plazmidlerin kullanıldığı işlemler sonrasında abortus ya da rezorbsiyon oluştuğundan deney grupları ile kontrol grubundaki hayvan sayılarında farklılıklar meydana geldi.

4.1. Lokomotor Aktivite Testi Sonuçlarının Karşılaştırılması

In utero elektroporasyon işlemi yapılan annelerden doğan yavruların spontan lokomotor aktivitelerinin değerlendirilmesi amacıyla yapılan aktivitemetre testinde deney hayvanlarının horizontal, vertikal, stereotipik ve toplam hareket sayıları ile test süresince ambulasyonda veya dinlenmede geçirdikleri zaman ve toplam kat ettikleri mesafeler ölçüldü.

Aktivitemetre cihazında farklı test günlerinde elde edilen veriler istatistiksel testlerle karşılaştırıldığında; P90 (Tablo 4.1), P120 (Tablo 4.2), P150 (Tablo 4.3), P180 (Tablo 4.4) ve P300'üncü (Tablo 4.5) günlerdeki horizontal, vertikal, stereotipik hareketler ile dinlenme zamanı için harcadıkları zamanlar açısından gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı. Sadece P120'de TDP-43^{N267S} grubundaki sıçanların toplam hareket sayıları (2827,25±279,06) kontrol grubundakilere (3161,80±213,05) kıyasla anlamlı (p<0,05) olarak düşük bulundu (Tablo 4.2).

Kontrol ve deney gruplarındaki hayvanların işlem sonrasında farklı zamanlarda tekrarlanan aktivitemetre ölçümlerinde horizontal (Şekil 4.1), vertikal (Şekil 4.2) ve stereotipik (Şekil 4.3) hareket sayıları incelendiğinde bazı farklılıklar gözlemlense de bireysel farklılıklar ve n sayılarındaki azlığa bağlı olarak standart sapma değerlerinin yüksekliği nedeniyle gözlenen farklılıklar anlamlı düzeyde değildi. Benzer şekilde test süresince cihazda kat edilen toplam mesafede de gruplar arasında anlamlı bir fark saptanmadı (Şekil 4.4).

Tablo 4. 1. Postnatal 90. gündeki lokomotor aktivite test sonuçları

P90	KONTROL (n=5)	TDP^{NLS} (n=3)	TDP-43^{A315T} (n=2)	TDP-43^{N267S} (n=4)
Horizontal	10155,20±1231,75	7739,66±925,927	6166,50±2082,42	11693,00±2791,27
Vertikal	219,40±154,78	108,66±38,00	99,50±24,74	131,50±102,66
Stereotipik	1103,40±214,95	1245,66±221,64	993,50±663,97	1007,00±223,38
Ambulatuvar	2286,60±368,19	1614,33±196,02	1450,50±999,14	2274,50±318,84
Toplam hareket	3615,40±373,80	2968,66±413,65	2543,50±359,91	3413,00±349,07
Toplam mesafe	8360,80±1280,64	5749,66±691,01	4853,00±3436,53	9791,75±2165,64
Stereotipik (sn)	110,400±22,68	126,00±20,78	99,00±63,63	100,50±20,42
Ambulatuvar (sn)	229,20±36,09	160,00±18,330	144,00±101,82	226,50±32,63
Dinlenme (sn)	260,40±27,36	314,00±36,66	354,00±33,94	262,50±47,59

Tabloda verilen değerler ortalama ve standart sapma değerlerini göstermektedir.

Tablo 4. 2. Postnatal 120. gündeki lokomotor aktivite test sonuçları

P120	KONTROL (n=5)	TDP^{NLS} (n=3)	TDP-43^{A315T} (n=2)	TDP-43^{N267S} (n=4)
Horizontal	8164,00±821,22	5436,00±972,21	4903,50±3341,07	6202,75±1821,00
Vertikal	195,20±135,28	66,00±25,00	139,50±61,52	177,50±82,76
Stereotipik	1220,20±289,47	1129,67±306,52	969,50±580,53	1708,00±689,68
Ambulatuvar	1746,40±265,65	1067,33±187,01	1104,50±1191,47	1191,75±464,70
Toplam hareket	3161,80±213,05	2263,00±394,46	2213,50±549,42	2827,25±279,06
Toplam mesafe	6450,20±1119,57	3747,33±552,29	3923,00±4299,21	4086,25±1734,78
Stereotipik (sn)	300,00±16,43	380,00±35,16	393,00±63,64	336,00±33,59
Ambulatuvar (sn)	174,00±26,15	106,00±17,32	108,00±118,79	120,00±48,25
Dinlenme (sn)	122,40±29,88	114,00±33,41	96,00±59,40	147,00±24,74

Tabloda verilen değerler ortalama ve standart sapma değerlerini göstermektedir.

Tablo 4. 3. Postnatal 150. gündeki lokomotor aktivite test sonuçları

P150	KONTROL (n=5)	TDP^{NLS} (n=3)	TDP-43^{A315T} (n=2)	TDP-43^{N267S} (n=4)
Horizontal	7635,40±3444,51	6631,00±927,58	16226,00±8488,11	4125,00±2084,91
Vertikal	165,00±101,91	39,67±11,93	107,00±121,62	127,25±74,67
Stereotipik	1142,40±337,48	1406,67±78,45	1566,00±929,14	1069,50±392,36
Ambulatuvar	1452,80±731,81	1182,67±206,35	1955,50±706,40	680,25±330,11
Toplam hareket	2760,20±761,64	2629,00±160,39	3628,50±101,12	1877,00±752,41
Toplam mesafe	5951,80±3631,89	4326,33±928,27	11535,00±3583,62	2625,25±1468,11
Stereotipik (sn)	115,20±33,24	140,00±9,17	156,00±93,34	106,50±39,91
Ambulatuvar (sn)	145,20±73,17	120,00±21,63	195,00±72,12	67,50±32,26
Dinlenme (sn)	340,80±66,87	340,00±13,86	249,00±21,21	424,50±69,69

Tabloda verilen değerler ortalama ve standart sapma değerlerini göstermektedir.

Tablo 4. 4. Postnatal 180. gündeki lokomotor aktivite test sonuçları

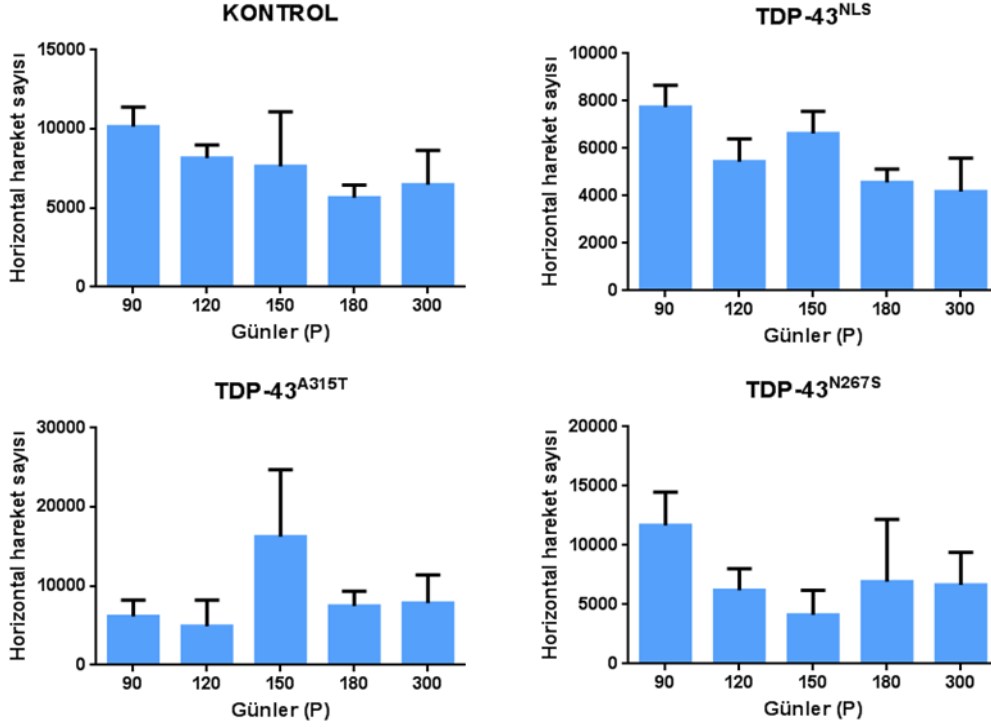
P180	KONTROL (n=5)	TDP^{NLS} (n=3)	TDP-43^{A315T} (n=2)	TDP-43^{N267S} (n=4)
Horizontal	5659,20±798,29	4566,67±563,56	7495,00±1859,69	6927,75±5259,92
Vertikal	178,80±152,17	35,00±1,00	98,00±89,10	105,75±89,67
Stereotipik	1386,60±143,41	1167,67±71,79	1504,00±453,96	1544,75±195,27
Ambulatuvar	1000,00±196,71	809,33±185,13	1339,50±852,06	859,25±464,83
Toplam hareket	2565,40±268,53	2012,00±158,61	2941,50±487,20	2509,75±680,76
Toplam mesafe	3682,80±937,45	2539,00±511,96	5092,50±2822,06	4093,25±4073,44
Stereotipik (sn)	139,20±13,68	116,00±9,17	150,00±42,43	154,50±19,82
Ambulatuvar (sn)	5659,20±798,29	4566,67±563,56	7495,00±1859,69	6927,75±5259,92
Dinlenme (sn)	178,80±152,17	35,00±1,00	98,00±89,10	105,75±89,67

Tabloda verilen değerler ortalama ve standart sapma değerlerini göstermektedir.

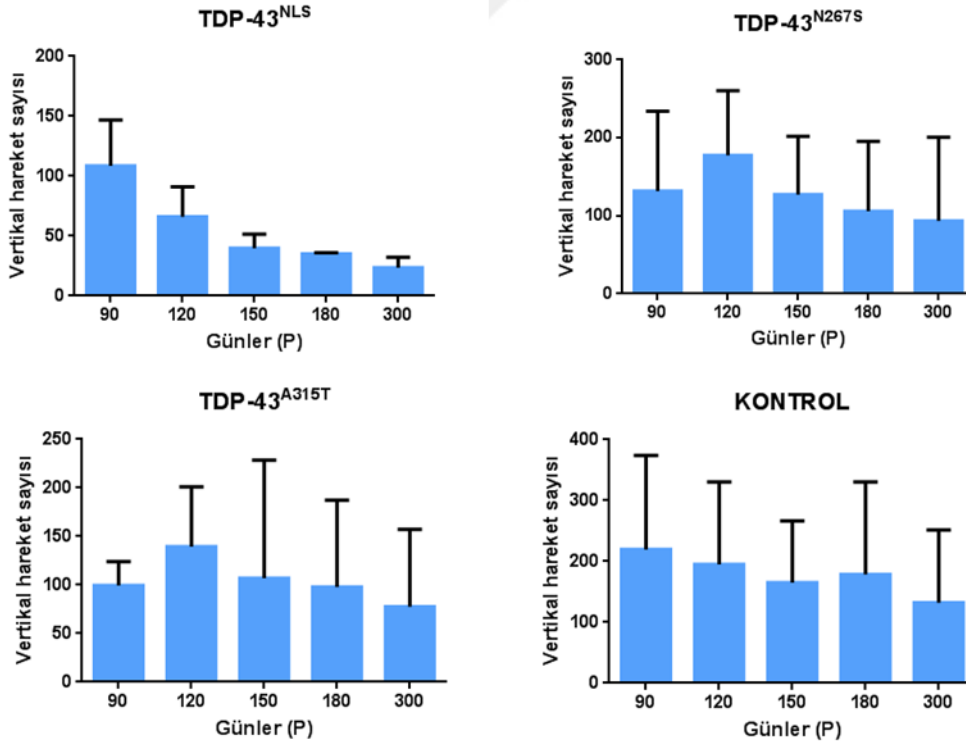
Tablo 4. 5. Postnatal 300. gündeki lokomotor aktivite test sonuçları

P300	KONTROL (n=5)	TDP^{NLS} (n=3)	TDP-43^{A315T} (n=2)	TDP-43^{N267S} (n=4)
Horizontal	6487,20±2172,50	4177,67±1419,05	7832,00±3590,69	6659,25±2743,68
Vertikal	132,00±119,66	23,67±8,50	77,50±79,90	93,50±107,26
Stereotipik	1300,20±313,73	1358,00±321,65	1915,50±166,17	1532,50±204,62
Ambulatuvar	1220,20±495,39	575,33±189,74	1318,50±700,74	1105,25±585,34
Toplam hareket	2653,20±713,83	1957,00±512,20	3311,50±614,48	2731,25±656,91
Toplam mesafe	4388,20±1865,66	1855,67±822,07	4565,50±3397,65	4050,75±2673,11
Stereotipik (sn)	129,60±31,35	136,00±33,05	192,00±16,97	153,00±18,65
Ambulatuvar (sn)	122,40±50,66	58,00±18,33	132,00±67,88	109,50±59,47
Dinlenme(sn)	339,60±63,30	406,00±51,03	276,00±50,91	336,00±60,99

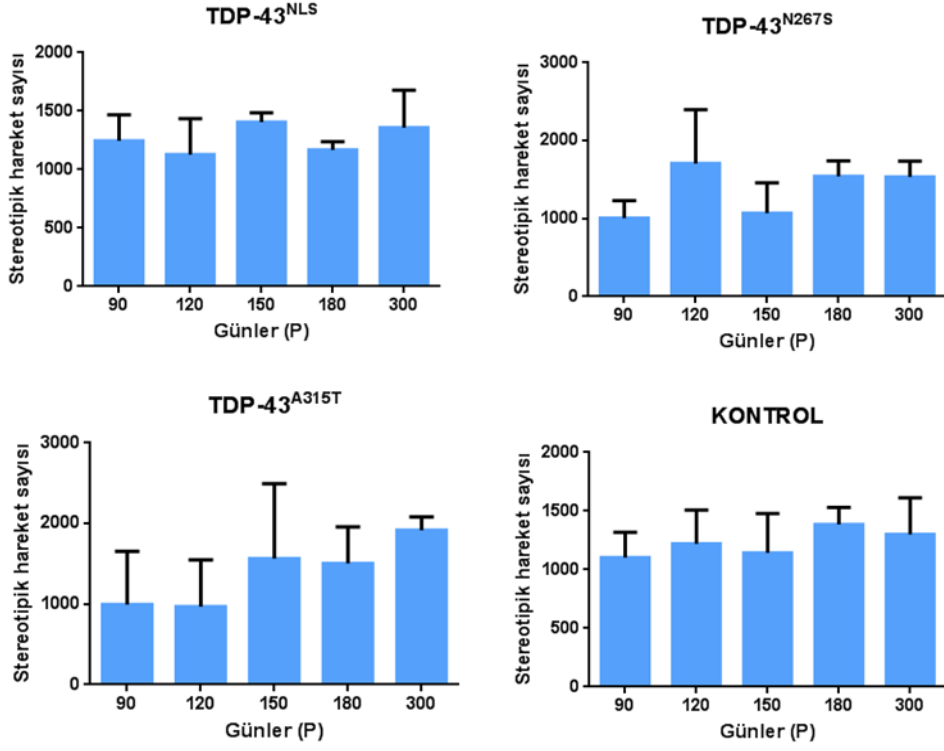
Tabloda verilen değerler ortalama ve standart sapma değerlerini göstermektedir.



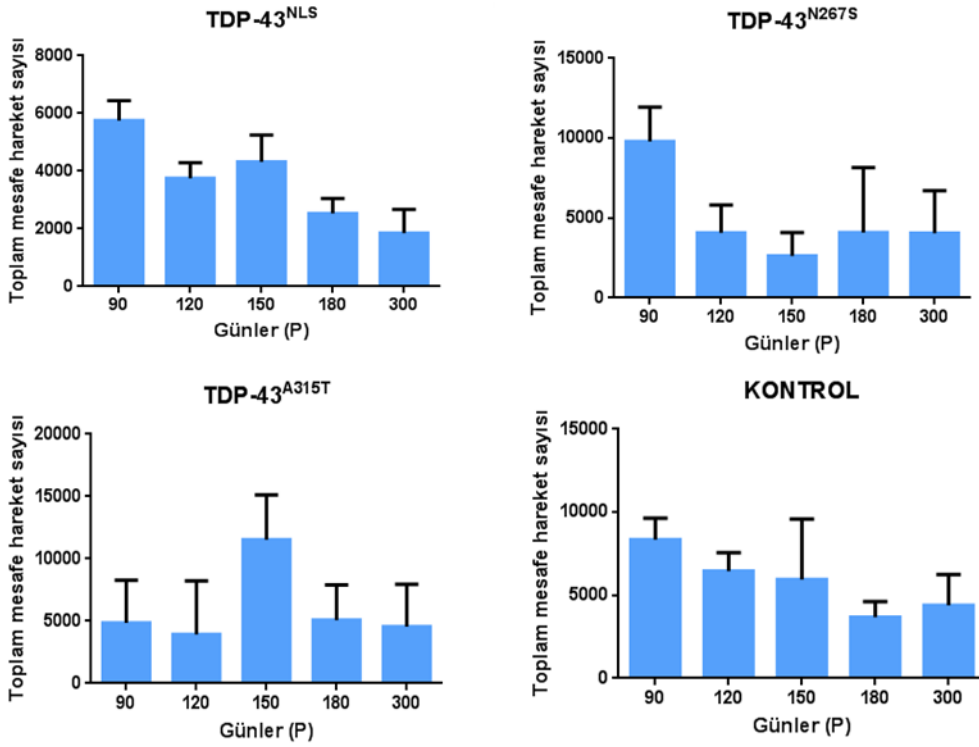
Şekil 4. 1. Lokomotor aktivite testindeki horizontal hareket sayılarının farklı günlere göre karşılaştırılması.



Şekil 4. 2. Lokomotor aktivite testindeki vertikal hareket sayılarının farklı günlere göre karşılaştırılması.



Şekil 4. 3. Lokomotor aktivite testindeki stereotipik hareket sayılarının farklı günlere göre karşılaştırılması.



Şekil 4. 4. Lokomotor aktivite testi süresince kat edilen toplam mesafenin farklı günlere göre karşılaştırılması

4.2. Rota-rod Testi Sonuçlarının Karşılaştırılması

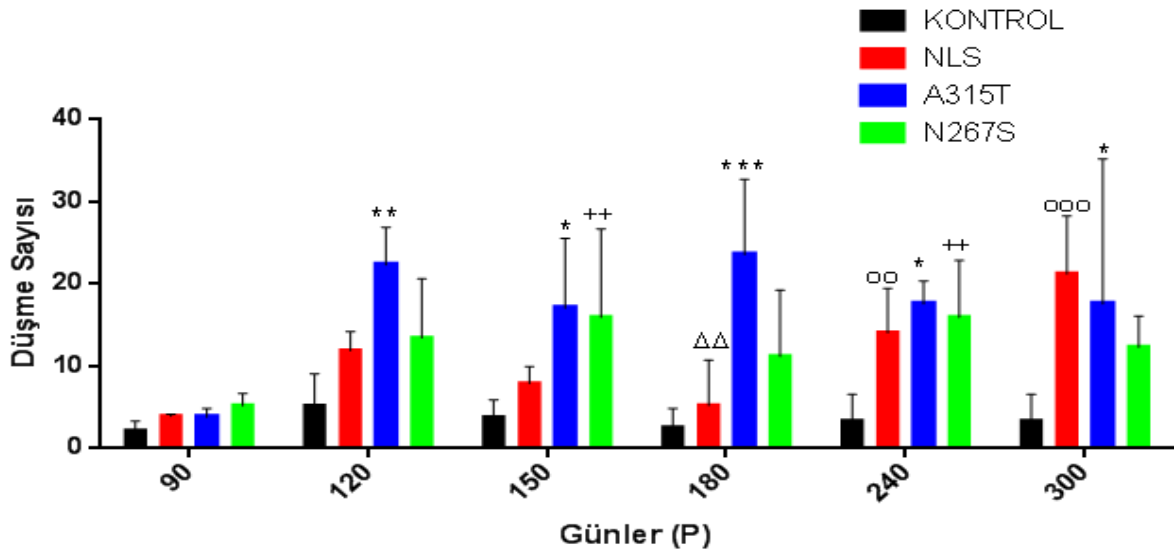
Aktivitemetre ölçümleri arasında anlamlı bir farklılık göstermeyen deney hayvanlarının motor performansını, direnme gücünü ve koordinasyon kabiliyetlerini değerlendirmek amacıyla rota-rod ve modifiye grip testleri kullanıldı. Farklı günlerde yapılan rota-rod testinde her hayvan için ikişer ölçüm yapılarak ortalama değerler hesaplandı. Her deneme için deney hayvanının test süresince dönen mil üzerinden düşme sayılarının ortalaması hesaplandı. Deney ve kontrol gruplarının P90, P120, P150, P180 ve P300'üncü günlerdeki ortalama rottan düşme sayıları ve standart sapma değerleri Tablo 4.6'de gösterildi.

Ortalama düşme sayıları non-parametrik testlerle karşılaştırıldığında; P120, P150, P180, P240 ve P300'de grubun temel etkisi bulunmakla birlikte ($p<0,05$) P90'da gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığı bulundu. Daha sonra yapılan ikili karşılaştırma test sonuçlarına göre; P120'deki farklılıkların, TDP-43^{A315T} ($22,25\pm4,60$) grubundaki deney hayvanlarının düşme sayılarının kontrol grubundakilere ($5,10\pm3,93$) göre anlamlı düzeyde ($p<0,05$) yüksek olmasından kaynaklandığı bulundu. Aynı şekilde P150'de TDP-43^{A315T} ($17,00\pm8,49$) ve TDP-43^{N267S} ($15,88\pm10,77$) grubunun kontrol ($3,70\pm2,17$) grubuna göre, P240'ta TDP-43^{NLS} ($14,00\pm5,41$), TDP-43^{A315T} ($14,00\pm5,41$) ve TDP-43^{N267S} ($15,88\pm6,94$) deney gruplarının hepsinin düşme sayılarının kontrol ($3,30\pm3,23$) grubuna kıyasla anlamlı düzeyde ($p<0,05$) yüksek olduğu bulundu. P300'de ise TDP-43^{A315T} ($17,50\pm17,68$) ve TDP-43^{N267S} ($12,25\pm3,80$) gruplarının kontrol ($3,30\pm3,23$) grubuna göre düşme sayılarının anlamlı düzeyde yüksek olduğu saptandı ($p<0,05$). Bununla birlikte P180. gündeki veriler TDP-43^{A315T} ($23,50\pm9,19$) grubundaki hayvanların düşme sayılarının hem kontrol ($2,50\pm2,32$) hem de TDP-43^{NLS} ($5,17\pm5,51$) grubundaki hayvanlardan anlamlı düzeyde ($p<0,05$) yüksek olduğunu gösterdi (Şekil 4.5).

Tablo 4. 6. Kontrol ve deney gruplarının farklı günlerdeki rota-rod test sonuçları

ROTA-ROD TEST GÜNÜ	KONTROL (n=5)	TDP ^{NLS} (n=3)	TDP-43 ^{A315T} (n=2)	TDP-43 ^{N267S} (n=4)
P90	2,10±1,14	3,83±0,29	3,75±1,06	5,13±1,49
P120	5,10±3,93	11,83±2,31	22,25±4,60	13,38±7,22
P150	3,70±2,17	7,83±2,08	17,00±8,49	15,88±10,77
P180	2,50±2,32	5,17±5,51	23,50±9,19	11,13±8,08
P240	3,30±3,23	14,00±5,41	17,50±2,83	15,88±6,94
P300	3,30±3,23	21,17±7,02	17,50±17,68	12,25±3,80

Tabloda verilen değerler ortalama ve standart sapma değerlerini göstermektedir.



Şekil 4. 5. Rota-rod testindeki ortalama düşme sayılarının farklı günlere göre karşılaştırılması Rota-rod testindeki ortalama düşme sayılarının farklı günlere göre karşılaştırılması.*: p<0,05, **: p<0,01,***: p<0,001: Kontrol ile TDP-43^{A315T} ; ++: p<0,01 Kontrol ile TDP-43^{N267S}; ΔΔ: p<0,01 TDP-43^{A315T} ile TDP-43^{NLS}; °°:p<0,01,°°°:p<0,001 Kontrol ile TDP-43^{NLS} arasındaki farklılıkları göstermektedir.

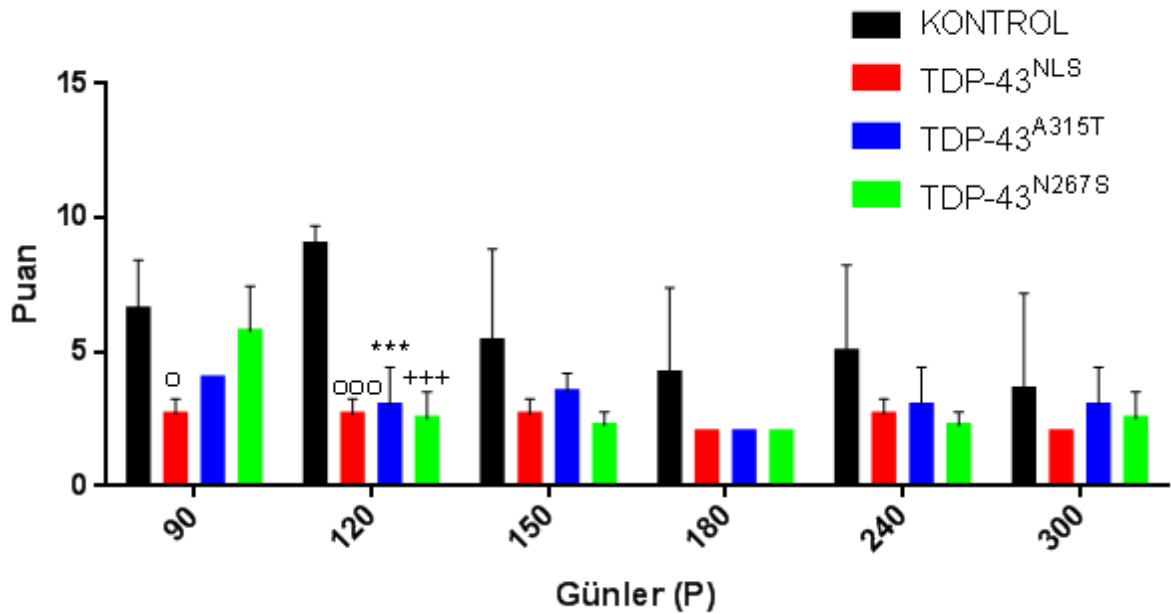
4.3 Modifiye Grip Testi Sonuçlarının Karşılaştırılması

Deney hayvanlarının motor koordinasyon yetenekleri ve dayanıklılığını ölçmek üzere kullanılan bir diğer test olan modifiye edilmiş grip testindeki performans skorları karşılaştırıldığında da rota-rod testine benzer şekilde mutasyonlu hayvanların kontrollere göre daha düşük skorlar aldığı gözlemlendi. Deney hayvanlarının P90, P120, P150, P180, P240 ve P300'üncü günlerde aldığı ortalama puanlar ile standart sapma değerleri Tablo 4.7'de gösterildi. Bu test sonuçları özellikle erken evrelerde (P90 ve P120) kontrol ve TDP-43NLS grubundaki sıçanların skorları arasında anlamlı farklılıklar olduğunu gösterdi. P90'da sadece TDP-43NLS grubundaki hayvanların skorları kontrol grubundakilerden daha düşük iken, P120. günde tüm mutasyon gruplarının testten aldıkları puanların kontrol grubuna göre daha düşük olduğu gözlemlendi. P150. günden sonraki testlerde de kontrol grubundaki hayvanlar genel olarak daha iyi performans sergilemekle birlikte, bireysel farklılıklar ve bazı kontrol hayvanlarının test aparatından kaçış yolu olarak düşme hareketini gerçekleştirmeleri nedeniyle test skorlarında varyasyonlar gözlemlendi. Bu nedenle standart sapma değerlerindeki yüksekliklere bağlı olarak kontrol ile mutasyonlu gruplar arasında gözlenen farklılıklar anlamlılık düzeyine ulaşmadı.

Tablo 4. 7. Deney ve kontrol gruplarının modifiye grip testinden aldıkları puanlar

Modifiye Grip Test Günü	KONTROL (n=5)	TDP-43 ^{NLS} (n=3)	TDP-43 ^{315T} (n=2)	TDP-43 ^{N267S} (n=4)
P90	6,60±1,82	2,67±0,58	4,00±0,00	5,75±1,71
P120	9,00±0,71	2,67±0,58	3,00±1,41	2,50±1,00
P150	5,40±3,44	2,67±0,58	3,50±0,71	2,25±0,50
P180	4,20±3,19	2,00±0,00	2,00±0,00	2,00±0,00
P240	5,00±3,24	2,67±0,58	3,00±1,41	2,25±0,50
P300	3,60±3,58	2,00±0,00	3,00±1,41	2,50±1,00

Tabloda verilen değerler ortalama ve standart sapma değerlerini göstermektedir.



Şekil 4. 6. Modifiye grip testi puanlarının farklı günlere göre karşılaştırılması. Modifiye grip testi puanlarının farklı günlere göre karşılaştırılması. (***: p<0,001: Kontrol ile TDP-43^{A315T}; °: p<0,05 °°°: p<0,001 Kontrol ile TDP-43^{NLS}; +++: p<0,001 Kontrol ile TDP-43^{N267S} arasındaki anlamlı düzeyde fark)

4.4 Cat-walk Testi Sonuçları

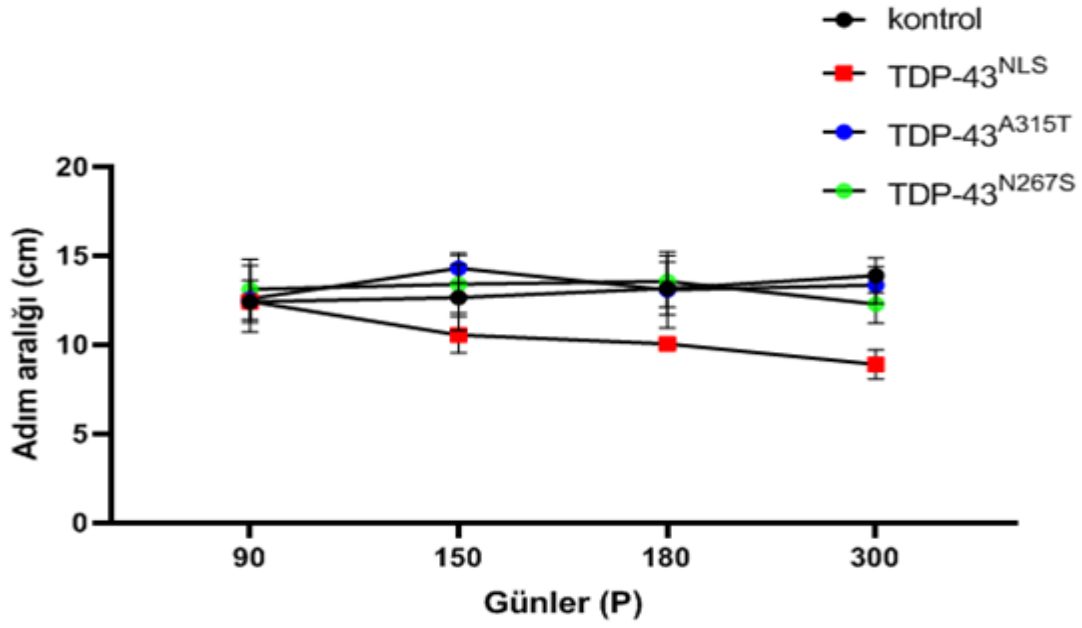
Deney hayvanlarının P90, P120, P150, P180, P240 ve P300'üncü günlerinde sergiledikleri Cat-walk yürüyüş desenleri sağ ve sol, ön ve arka olacak şekilde ardışık iki adım arası mesafe (Tablo 4.8), aynı şekilde her bir ayak için zeminle temas etiği maksimum ayak izi alanı (Tablo 4.9) ve ardışık iki adımın üst üste binme sıklığı (Tablo 4.10) ölçülerek her bir değişken için ortalama ve standart sapma değerleri tablolarla gösterildi.

Ardışık adım aralıkları gruplar arasında karşılaştırıldığında hiçbir ölçüm gününde farklılık ortaya çıkmadığı bulundu ($p>0,05$). Aynı şekilde maksimum ayak izi alanlarının ön ve arka ayaklar için ayrı ayrı gruplar arasında karşılaştırılması sonucunda deney gruplarının herhangi birisinin kontrol grubuyla arasında anlamlı bir fark bulunmadığı tespit edildi. P90-P300 P120-P180 günleri arasında yapılan ölçümlerde de TDP-43^{A315T} grubundaki hayvanların hayvanların koordinasyon düzeylerinin kontrol grubuna göre giderek daha fazla etkilendiği ardışık iki adımın üst üste binme sıklığındaki azalmalardan gözlenebilmekle birlikte verilerin istatistiksel analizlerinde bu farklılıklar gösterilemedi (Şekil 4.12).

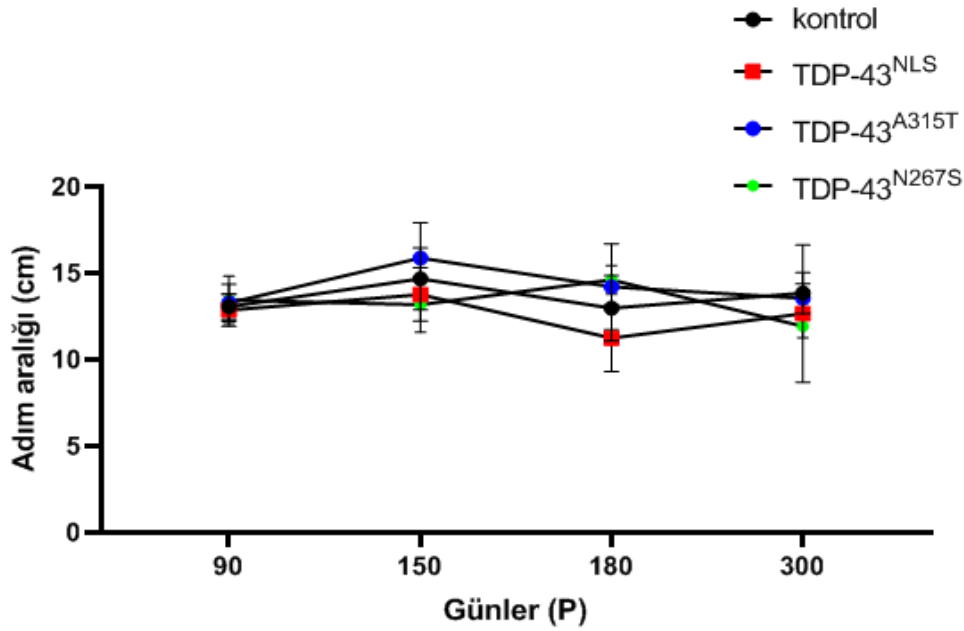
Tablo 4. 8. Deney ve kontrol gruplarının Cat-walk testindeki iki ardışık adım arasındaki mesafe ölçümlerinin ortalama±standart sapma değerleri

Adım Aralıkları (cm)		KONTROL	TDP-43 ^{NLS}	TDP-43 ^{A315T}	TDP-43 ^{N267S}
P90	Sağ arka ayak	13,39±1,2	13,05±0,72	12,85±0,92	13,3±1,24
	Sağ ön ayak	13,49±1,66	12,42±0,14	12,44±1,18	12,02±1,54
	Sol arka ayak	12,86±2,29	12,74±1,01	14,11±0,79	12,89±1,12
	Sol ön ayak	12,73±1,37	13,33±1,61	12,72±1,76	13,73±0,85
P150	Sağ arka ayak	13,9±2,13	14,67±1,79	13,76±1,54	15,64±2,28
	Sağ ön ayak	13,39±1,41	12,66±1,86	10,57±1,01	14,57±0,72
	Sol arka ayak	14,41±1,95	13,83±0,99	12,51±1,36	16,66±2,45
	Sol ön ayak	13,65±2,23	12,82±0,95	10,88±1,1	13,36±1,1
P180	Sağ arka ayak	15,25±1,62	12,98±1,88	11,24±1,93	13,31±1,65
	Sağ ön ayak	12,99±1,8	13,17±1,49	10,05±0,25	13,7±1,92
	Sol arka ayak	14,07±2	13,08±1,84	12,19±1,51	14,01±1,89
	Sol ön ayak	13,41±0,95	13,02±1,77	10,33±1,09	13,21±3,15
P300	Sağ arka ayak	12,42±1,23	13,84±1,19	12,66±3,97	13,33±0,81
	Sağ ön ayak	12,6±1,14	13,9±0,98	8,92±0,82	13,24±1,15
	Sol arka ayak	12,44±0,99	13,74±1,02	12,43±4,49	12,99±1,77
	Sol ön ayak	12,8±0,92	13,86±0,6	10,53±0,74	13,38±1,39

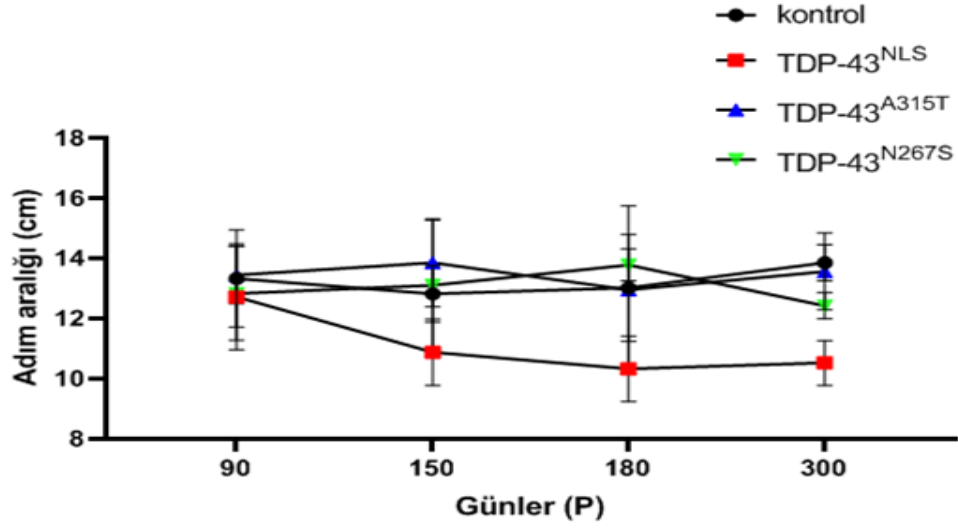
Tabloda verilen değerler ortalama ve standart sapma değerlerini göstermektedir.



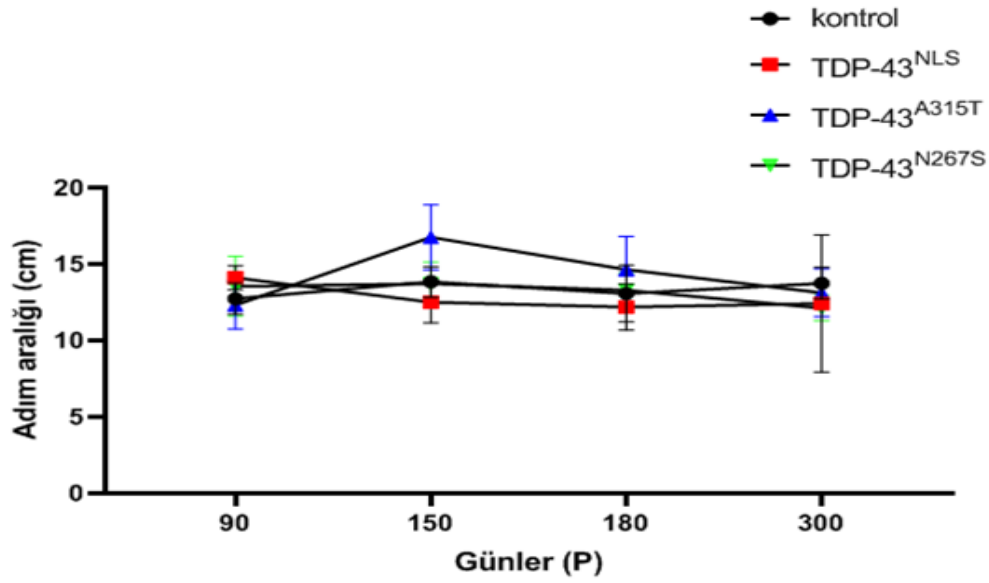
Şekil 4. 7. Cat-walk testi sağ ön ayak adım aralığı mesafesinin farklı günlere göre karşılaştırılması.



Şekil 4. 8. Cat-walk testi sağ arka ayak adım aralığı mesafesinin farklı günlere göre karşılaştırılması.



Şekil 4. 9. Cat-walk testi sol ön ayak adım aralığı mesafesinin farklı günlere göre karşılaştırılması.

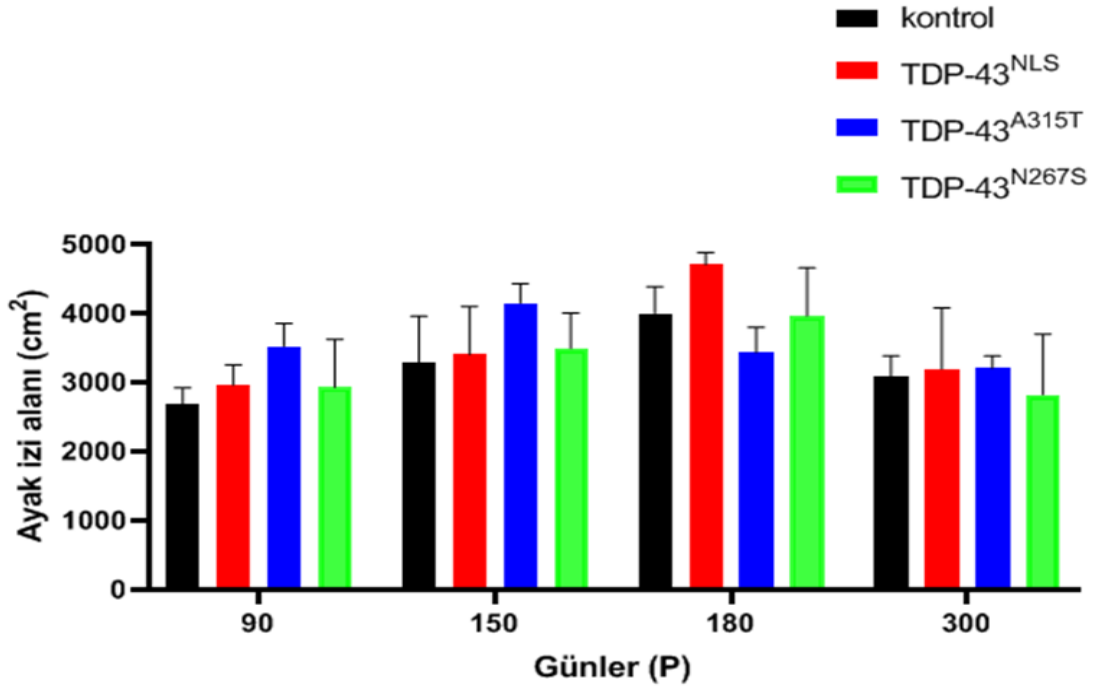


Şekil 4. 10. Cat-walk testi sol arka ayak adım aralığı mesafesinin farklı günlere göre karşılaştırılması.

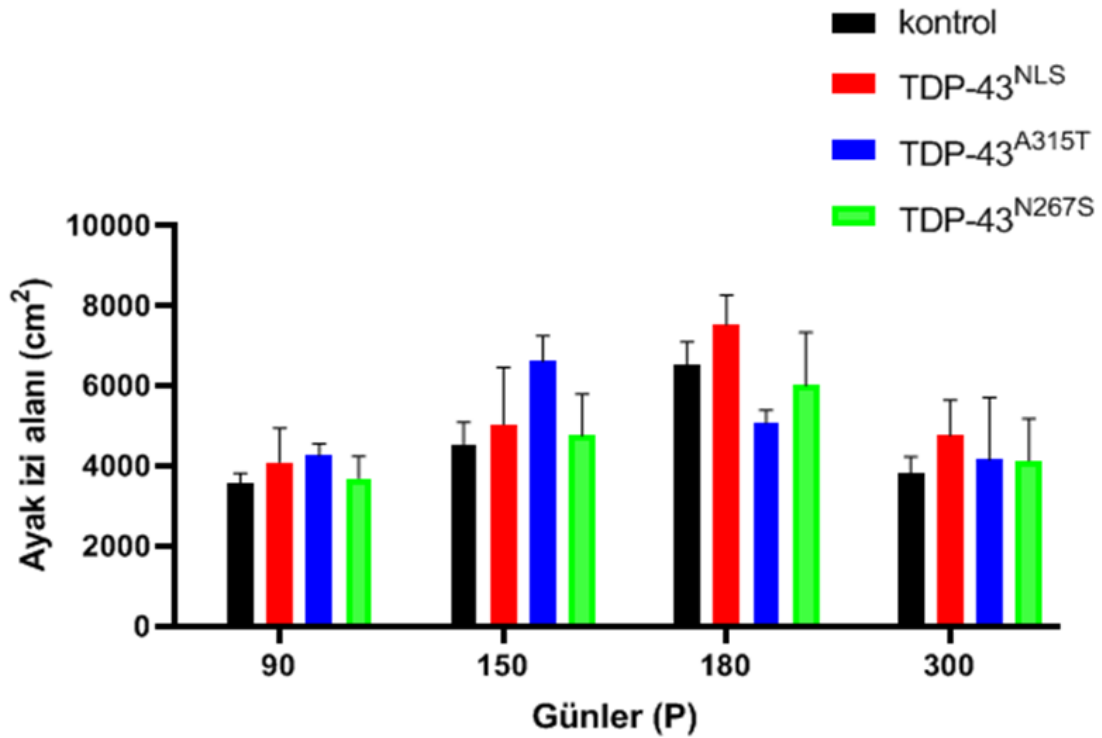
Tablo 4. 9. Deney ve kontrol gruplarının Cat-walk testindeki ayak izi alan değerleri

GÜNLER	AYAK İZİ	KONTROL	TDP-34^{NLS}	TDP-43^{A315T}	TDP-43^{N267S}
P90	Ön Ayaklar	3,7±0,54	3,56±0,26	4,26±0,29	4,09±0,85
	Arka Ayaklar	2,93±0,7	2,68±0,24	3,52±0,33	2,96±0,29
P150	Ön Ayaklar	4,75±1,03	4,53±0,55	6,6±0,64	5,03±1,42
	Arka Ayaklar	3,49±0,51	3,29±0,67	4,15±0,28	3,4±0,7
P180	Ön Ayaklar	6±1,33	6,52±0,56	5,07±0,31	7,52±0,74
	Arka Ayaklar	3,96±0,69	4±0,39	3,43±0,36	4,7±0,17
P300	Ön Ayaklar	4,14±1,04	3,82±0,41	4,16±1,55	5,08±1,04
	Arka Ayaklar	2,82±0,87	3,08±0,31	3,21±0,18	3,5±1,01

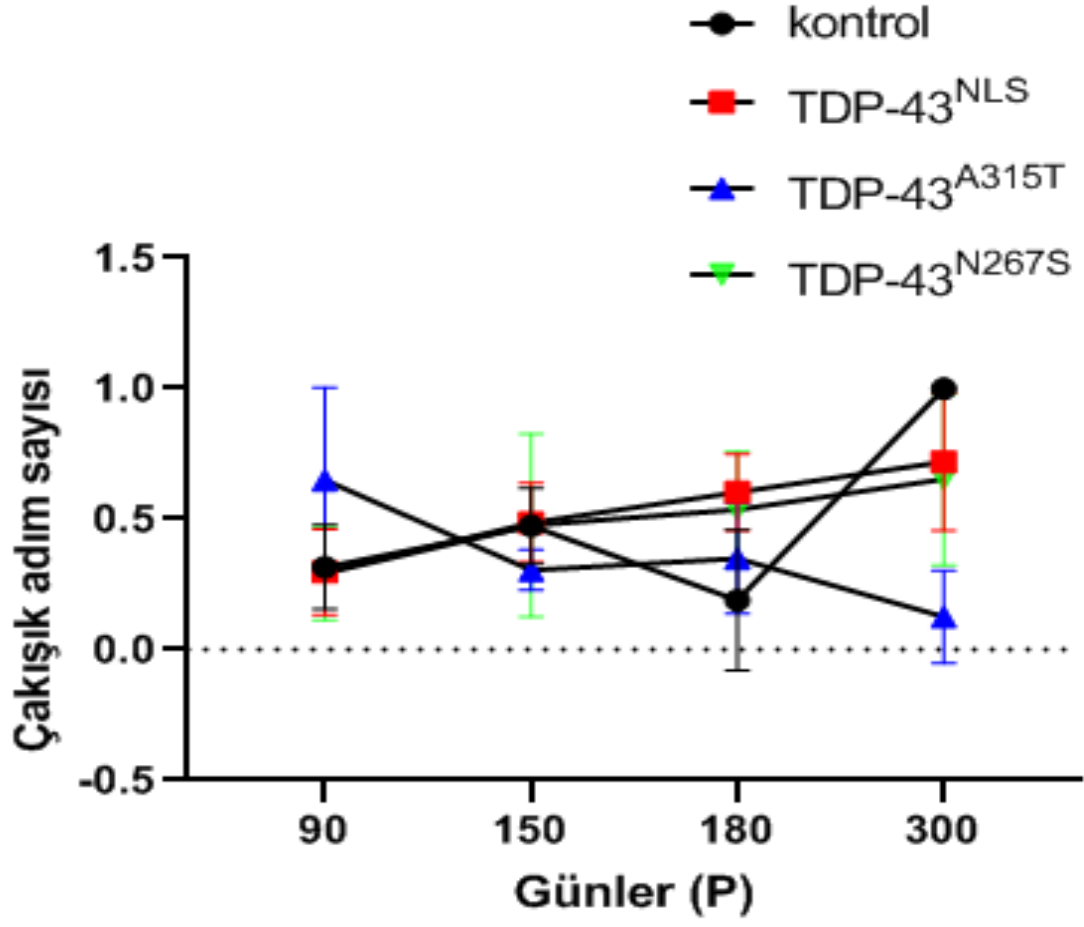
Tabloda verilen değerler ortalama ve standart sapma değerlerini göstermektedir.



Şekil 4. 11. Cat-walk testi ön ayak izi alanının farklı günlere göre karşılaştırılması.



Şekil 4. 12. Cat-walk testi arka ayak izi alanının farklı günlere göre karşılaştırılması.



Şekil 4. 13. Cat-walk testinde çakışık adım sayısının normal adım sayısına oranının farklı günlere göre karşılaştırılması.

5. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında, insanlarda TDP-43 proteinini kodlayan gendeki mutasyonlara bağlı olarak oluşan motor nöron hasarını taklit etmek üzere sıçanlarda in utero elektroporasyon metodu ile farklı birkaç mutasyona ait deneysel modellerin oluşturulması ve meydana gelen motor işlev bozukluklarının fenotipik analizlerle değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, insanlarda TDP-43 proteinini kodlayan TARDBP genindeki mutasyonlardan sık veya nadir görülen A315T ve N267S nokta mutasyonları ile NLS delesyonu mutasyonu seçilerek, bu özelliklere sahip genom parçaları in utero elektroporasyon yöntemi ile sıçanlara aktarılmıştır. Postnatal dönemde 90. günden itibaren farklı dönemlerde yapılan davranış testleriyle de motor fonksiyon becerilerindeki değişiklikler takip edilmiş ve birbirleriyle karşılaştırmalı olarak analiz edilmiştir. Gen aktarımı yapılan sıçan yavrularında özellikle rota-rod testi ile gösterilen motor defisitler, bu yöntemin sıçanlarda proteinopatik hasar modeli oluşturmak için kullanılabileceğini göstermektedir.

ALS ve FTLD etiyopatogenezinde ana protein bileşeni olarak TDP-43 proteininin birikime meyilli inklüzyon cisimciklerinin hücre protein homeostazının bozulmasına sebebiyet verdiği ve bunun da hastalığın oluşumu ve gelişiminde etkin bir rol oynadığının gösterilmesiyle birlikte, bu proteini kodlayan TARDBP genindeki yeni mutasyonların da tanımlanması TDP-43 patolojisini bir çok nörodejeneratif hastalık araştırmalarının merkezine yerleştirmiştir. TDP-43'ün hücre içerisindeki agregasyonunun ve inklüzyon pozitif birikimlerinin oluşumundaki düzenleyici rolünün tanımlanmasıyla birlikte daha çok ALS/FTLD de etkili mekanizmaların açığa çıkarılmasına odaklanılmıştır. TDP-43 mutasyonları olan hastaların bir çoğunun tipik olarak ALS patolojisinde görülen motor semptomlara eş olarak demans ve benzeri yakınmalarla kliniğe başvurdukları belirtilmektedir (Barbara Borroni et al., 2009). Bugüne kadar, ALS ile komorbid olabilecek FTLD veya Parkinsonizm gibi birden çok patolojiye ait olabileceği düşünülen klinik tablolar sadece tek örneği olan vakalarda veya daha ziyade küçük ailelerde sporadik olarak tanımlanmıştır (Gijssels vd., 2009).

Nörodejeneratif hastalıklar içerisinde geniş bir skalada etkili olduğu düşünülen TDP-43'ün tek bir nokta mutasyonunun farklı ALS fenotipine neden olması, genotip ile fenotipik bozulmalar arasında pozitif yönlü bir ilişkinin kesinliğini zorlaştıran ve yaşa bağlı eksik penetrasyonların varlığı hastalıkta rol oynayan farklı patojenik mekanizmalarının aydınlatılmasını zorlaştırmaktadır. Tez çalışmamızda bizim de gözlemlediğimiz bu durum, TDP-43'ün farklı mutasyonlarının hastalığın erken ve geç evreleri arasında farklı fenotipik bulgular vermesiyle birlikte, yaşlanmanın da etkisiyle motor fonksiyon bozulmalarının kontrol grubuna göre karşılaştırılmasını ve farklı motor koordinasyon parametrelerini değerlendiren davranış testi bulguları arasında anlamlı bir ilişkinin tespitini zorlaştırmıştır. Çalışmamızın rota-rod testi bulgularına bakıldığında, gittikçe hızlanan rottan düşme sayısının kontrol grubuna göre anlamlı şekilde arttığı ve yaşlanmanın etkisiyle bu tablonun daha da ağırlaştığı gözlenmektedir. Bu bulguya rağmen motor koordinasyon becerisi azalan deney hayvanlarının spontan lokomotor aktivite bulgularının özellikle dinlenme durumunda geçirilen zaman açısından hem deney ve kontrol grupları açısından hem de zamana bağlı olarak anlamlı farklılıklar göstermediği gözlemlenmiştir. Ayrıca deney ve kontrol grubu hayvanlarının yaşla birlikte dinleme durumunda daha çok zaman geçirmesi beklenirken, yaşlanmayla birlikte, kontrol grubundaki hayvanların da deney gruplarına benzer şekilde bu yönde bir eğilime sahip olması nedeniyle gruplar arasındaki farklılıkların ortaya çıkarılması zorlaşmıştır.

Aralarında kan bağı bulunan ALS tanısı almış hastalar arasındaki genetik heterojenite ve fenotipteki farklılıklarla birlikte hastalık süresindeki ve penetrasyonundaki değişikliklerin yanlış tanı olasılığını artırdığı ve DNA dizilenmesinin hastalığın kesin tanısı için yeterli veri sağlamadığı konusunda görüşler bulunmaktadır. Temelde motor fonksiyon bozulmasıyla karakterize olan ALS'nin demansla veya Parkinson benzeri yakınmalarla birlikte görüldüğü durumlarda, hastalığın geç evrelerindeki bozulmalar özellikle yaşlanmaya bağlı motor becerilerdeki düşüş ile ayırt edilemeyecek hastalık öykülere neden olabilmektedir. Ailesel geçişli olgularda tek nükleotid polimorfizmlerinin incelendiği ilk FTLD vaka gruplarında yaygın gen varyasyonlarının analizi

sonucunda hastalık için ortak kalıtsal bir tablo çizilememiştir (Gijssels et al., 2009; Rollinson et al., 2007; Schumacher et al., 2009). Bununla birlikte, TDP-43 genindeki mutasyonlarının ALS'nin sporadik ve ailesel formlarının yaklaşık % 2-3'ünde nedensel rolünün olduğuna ilişkin kanıtlara rağmen (Banks, Kuta, Isaacs, & Fisher, 2008; Corrado vd., 2009), FTLD'nin monojenik formları henüz tarif edilmemiştir. Ancak kesin tanısı olan FTLD ile motor nöron kayıplarına rastlanan iki olgu tanımlanmıştır (Benajiba et al., 2009). Bizim de çalışmamızda kullandığımız TDP-43'ün bir nokta mutasyonu olan N267S tipinde, TDP-43 patolojisi görülen ve motor nöron kayıplarının eşlik ettiği FTLD olgularında hücreseviyelerde dejenerasyonların olduğu rapor edilmiştir. Bununla birlikte ALS ile ilişkili TDP-43'ün N267S mutasyonu bulunan bir olguda ise bunama, ardından Parkinsonizm ve davranış değişiklikleri ile seyreden nadir bir tipinin sunulduğu bir çalışmada, olgunun bu farklı nörodejeneratif yakınmalarına diğer aile fertlerinin hiçbirinde rastlanmaması; N267S varyantının hastalığın seyrinde protein seviyelerinin düşmesine neden olabilecek yeni bir fosforilasyon bölgesi oluşturduğuna kanıt olabilir (B. Borroni vd., 2009). Bütün bu bulgular, özellikle N267S varyantında TDP-43 patolojisinin hem motor hem de bilişsel açıdan bütüncül bir yaklaşımla incelenmesi gerektiğini düşündürmektedir (Rayaprolu et al., 2013).

ALS etiopatogenezinde bugüne kadar sıkça tanımlanmış bir diğer nokta mutasyonu olan A315T varyantının görüldüğü vakalarda ise özellikle omuriliğin ön boynuzundaki alt motor nöronlarda şiddetli nöron kayıpları görülürken; üst motor nöronların nispeten korunduğu rapor edilmiştir (Ke vd., 2015). Ayrıca neokortikal, arkikortikal ve subkortikal çekirdeklerde nöronal ve glial hücre gruplarında değişen sayılarda inklüzyon cisimciklerine rastlanmıştır. TDP-43 geninin bu mutasyonunu barındıran gruplarda, özellikle motor nöron kayıplarının çok fazla olması sebebiyle, omuriliğin farklı segmentlerindeki inklüzyon cisimciklerinin TDP-43 ile ilişkili olabileceği ve bu mutasyonun daha ziyade ALS benzeri motor defisitlerle karakterize davranış çıktıları ile birliktelik gösterdiğine dair kanıtlar bulunmaktadır (Cairns vd., 2010). Literatürdeki bu bilgilerden yola çıkarak bizim de tez çalışmamızda TDP-43 geninin A315T nokta mutasyonunu içeren bir modelinin sıçanlarda oluşturulması hedeflenmiştir.

Transdüksiyonun gerçekleştiği sıçan yavrularında A315T varyantının fenotipik çıktılarını incelediğimizde, özellikle rota-rod performansında kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir düşüş olduğu ve bu düşüşün şekilde hastalığın seyrine paralel olarak progresif bir şekilde devam ettiği gözlenmiştir. Bununla birlikte cat-walk yürüme patterni analizlerinde anlamlı bir fark gösterilememiş olsa da özellikle spinal motor nöron kaybına bağlı olarak motor koordinasyon ve motor fonksiyon bozukluklarının olduğu gözlenmiştir. Bu deneylerdeki istatistiksel analizlerde karşılaşılan en önemli problem n sayısının veri analizi için yeterli olmamasından kaynaklanmaktadır. Bu durum embriyolara yapılan cerrahi müdahaleler esnasındaki komplikasyonlara bağlı olarak bazı yavruların abortus ile kaybindan dolayı meydana gelmiştir. Bununla birlikte doğumu gerçekleştiren A315T mutasyonuna sahip deney hayvanlarının P300. güne kadar farklı günlerde yapılan takiplerinde, ardışık iki ön veya arka ayakları arasındaki adım mesafelerinde progresif olarak değişkenlik gözlenmesi bu testteki motor fonksiyon bozukluğunun omuriliğin farklı segmentlerindeki nöron kayıplarına bağlı olarak ortaya çıkabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca cat-walk testi sonuçlarına göre, istatistiksel olarak anlamlı olmasa da, iki ardışık ön ve arka ayak adımları arasındaki senkronizasyonu ve koordinasyonu gösteren ardışık adım sayısı verilerinde de hastalığının geç safhalarında giderek azalma eğiliminin görülmesi de yine bu modelin üst motor fonksiyon kayıplarının az veya hiç görülmediği bir TDP-43 patolojisinden kaynaklandığına işaret etmektedir. Bu nedenle, bu mutasyon baz alınarak oluşturulan deneysel model alt motor nöron hastalığı oluşturmada tercih edilebilir.

TDP-43 mutasyonlarına bağlı oluşturulması hedeflenen motor nöron hasarı patolojisinin gelişimsel süreçlerin izlenebilmesi için embriyonun motor korteks gelişiminin gerçekleştiği dönemin hedef alınması bu çalışmada kritik bir önem arz etmektedir. Bu anlamda sıçan embriyolarının kullanılması çok daha küçük olan fare embriyolarına göre girişimsel açıdan daha avantajlı sayılabilir. Ayrıca sıçanlarda kortikal gelişimi genellikle farenin 1-1,5 gün ilerisinde olduğundan hedeflenen gelişim döneminde embriyolara erişim göreceli olarak daha kolaydır. Omurgalı nörolojik sistemlerinde görülen tüm evrelere sıçanlarda çok iyi bir şekilde tanımlanmış olduğundan, bu tez çalışmasında in utero gen aktarımı

uygulamasının sıçanlar üzerinde yapılmasa karar verilerek, deney hayvanı olarak Sprague-Dawley sıçanlar tercih edilmiştir.

Tez çalışmasının temel metodolojik yaklaşımını oluşturan *in utero* elektroporasyon yöntemi; embriyonik sıçan neokorteksine *in vivo* ortamda mutant DNA parçalarının aktarımını yapmak amacıyla kullanılmıştır. Enjeksiyonun yapıldığı lateral ventrikül duvarında lokalize olan nöronal öncü hücrelerin doğum tarihlerindeki ve migrasyondan sonra lokalize oldukları neokorteks tabakalarındaki farklılıklar sayesinde gen aktarımının önceden belirlenen spesifik bir nöron popülasyonuna özgün olarak gerçekleştirilmesi mümkün olabilmektedir. Bu teknik literatürde daha ziyade gen ifadesindeki aşırı artış veya azalışın hücresel proliferasyon, göç ve hücre farklılaşması üzerindeki etkilerini incelemede ve kortikogenezdeki süreçleri incelemede kullanılmaktadır. Ancak mevcut tez çalışmasında olduğu gibi farklı mutant genlerin aktarımıyla oluşturulan transgenik sıçan modelleri, geleneksel null mutant (nakavt) veya transgenik fare modeli stratejilerine kıyasla, belirli bir temporal pencere esansında spesifik bir hücre popülasyonuna genetik olarak manipülasyon için çok daha hızlı, ucuz ve oldukça etkili bir metodolojik yaklaşım imkanı sağlamaktadır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

In utero elektroporasyon tekniğiyle sıçanlarda nöral öncü hücrelere embriyonik dönemde gen aktarımı yapılabilmektedir. Özellikle neokorteks bölgesine yapılacak gen aktarımlarında istenilen genin, hedeflenen bölgeye ve doğru bir zamanda enjekte edilmesi sonucunda, sadece belirlenen spesifik bir nöron popülasyonuna özgün transdüksiyon gerçekleştirilebilmektedir.

Bu teknik literatürde genellikle genomdaki herhangi bir mutasyon sonucu eksprese edilen hatalı proteinlerin hücrel proliferasyon, göç ve farklılaşması üzerinde etkilerini veya kortikogenezis süreçleri üzerindeki etkilerini araştırmak amacıyla kullanılmakla birlikte, mevcut tez çalışmasında kortikal motor nöronlarda proteinopatik bir hasar oluşturmak amacıyla kullanılmıştır.

Doğan yavruların takipleri esnasında gözlenen motor defisitler bu teknikle oluşturulan transdüksiyon işleminin başarı ile gerçekleştirilebileceğini göstermiştir. Bununla birlikte embriyonik dönemde oluşturulan bu cerrahi müdahalenin beklenen komplikasyonlarına bağlı olarak bazı gebelerde abortus veya embriyolarda rezorbsiyonlar meydana gelmesi kaçınılmazdır. Bu durum deney gruplarındaki n sayılarında azlığa ve farklılıklara yol açmıştır. Bu nedenle de istatistiksel analizlerde standart sapma değerlerinin yüksekliği nedeniyle davranışsal olarak gözlenen farklılıklar anlamlılık düzeyine ulaşamamıştır. Benzer şekilde deney hayvanları arasında döden kaynaklanan bireysel farklılıkları en aza indirgeyebilmek için, istatistiksel analizlerin farklı annelerden doğan yavruların bir araya getirildiği gruplarda yapılması büyük önem arz etmektedir. Çalışmamızdaki en önemli, kısıtlılıklardan biri deney ve kontrol gruplarında bu standardizasyonun sağlanamamış olmasıdır. Bu nedenle farklı zamanlarda tekrarlanan aktivitemetre ölçümlerinde olduğu gibi özellikle horizontal hareket sayıları gibi bazı parametreler incelendiğinde gruplar arasında farklılıklar gözlene de istatistiksel testlerde anlamlılık gösterilememiştir. Buna rağmen farklı günlerden alınan ölçümler değerlendirildiğinde, deney gruplarının spontan lokomotor aktivitelerinde düşme eğiliminin olduğunun gözlenmesi çalışmanın geniş bir örneklemede tekrarlanmasının gerekliliğine işaret etmektedir.

Modifiye grip testindeki skorların kontrol ve deney hayvanlarında P150. gün itibariyle aynı düzeyde düşme eğilimi göstermesi, testin problem çözme becerileriyle bağlantılı olarak hayvanların bilişsel becerilerini değerlendirmesiyle ilgili olabileceğini düşündürmektedir. Bu nedenle bundan sonra yapılacak çalışmalarda modifiye grip ölçümlerinin P90 ile P120. günler arasında haftalık olarak tekrarlanması halinde motor fonksiyon becerisi ölçümlerinde daha sağlıklı veriler elde edilebilir.

Bu tez çalışmasında elde edilen sonuçlar, TDP-43 nokta mutasyonlarının klinik vaka örnekleri üzerinden deneysel bir hayvan modeli oluşturulabilmesine örnek teşkil etmektedir. In utero elektroporasyon yöntemi ile transgenik sıçan modeli oluşturulması yönüyle de ülkemizdeki nadir örnekler arasında yer almaktadır. Ortaya çıkan davranış çıktıları ve motor fonksiyon kayıpları her ne kadar dar bir örneklem çerçevesinde değerlendirilmiş olsa da, deney gruplarında kontrol grubuna kıyasla önemli motor defisitler meydana geldiği gösterilmiştir. Bundan sonra yapılacak çalışmalarda örneklem sayısı artırılarak, farklı TDP-43 mutasyonlarda ortaya çıkan fenotipik değişikliklerin yanı sıra morfolojik ve işlevsel bozuklukların da güncel metodolojik yaklaşımlarla incelenmesi hedeflenmektedir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Al-Chalabi, A., Kwak, S., Mehler, M., Rouleau, G., Siddique, T., Strong, M., & Leigh, P. N. (2013). Genetic and epigenetic studies of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener*, *14 Suppl 1*, 44-52. doi:10.3109/21678421.2013.778571
- Andersen, P. M., & Al-Chalabi, A. (2011). Clinical genetics of amyotrophic lateral sclerosis: what do we really know? *Nature Reviews Neurology*, *7*(11), 603-615.
- Baloh, R. H. (2011). TDP-43: the relationship between protein aggregation and neurodegeneration in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal lobar degeneration. *The FEBS journal*, *278*(19), 3539-3549.
- Banks, G. T., Kuta, A., Isaacs, A. M., & Fisher, E. M. (2008). TDP-43 is a culprit in human neurodegeneration, and not just an innocent bystander. *Mammalian Genome*, *19*(5), 299.
- Bäumer, D., Talbot, K., & Turner, M. R. (2014). Advances in motor neurone disease. *Journal of the Royal Society of Medicine*, *107*(1), 14-21.
- Beeldman, E., Raaphorst, J., Twennaar, M. K., de Visser, M., Schmand, B. A., & de Haan, R. J. (2016). The cognitive profile of ALS: a systematic review and meta-analysis update. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, *87*(6), 611-619.
- Benajiba, L., Le Ber, I., Camuzat, A., Lacoste, M., Thomas-Anterion, C., Couratier, P., . . . Decousus, M. (2009). TARDBP mutations in motoneuron disease with frontotemporal lobar degeneration. *Annals of neurology*, *65*(4), 470-473.
- Bennett, S. A., Tanaz, R., Cobos, S. N., & Torrente, M. P. (2019). Epigenetics in amyotrophic lateral sclerosis: a role for histone post-translational modifications in neurodegenerative disease. *Transl Res*, *204*, 19-30. doi:10.1016/j.trsl.2018.10.002
- Borroni, B., Bonvicini, C., Alberici, A., Buratti, E., Agosti, C., Archetti, S., . . . Gennarelli, M. (2009). Mutation within TARDBP leads to frontotemporal dementia without motor neuron disease. *Human mutation*, *30*(11), E974-E983.
- Borroni, B., Bonvicini, C., Alberici, A., Buratti, E., Agosti, C., Archetti, S., . . . Padovani, A. (2009). Mutation within TARDBP leads to frontotemporal dementia without motor neuron disease. *Hum Mutat*, *30*(11), E974-983. doi:10.1002/humu.21100
- Bose, J. K., Wang, I.-F., Hung, L., Tarn, W.-Y., & Shen, C.-K. J. (2008). TDP-43 overexpression enhances exon 7 inclusion during the survival of motor neuron pre-mRNA splicing. *Journal of Biological Chemistry*, *283*(43), 28852-28859.
- Brockington, A., Ning, K., Heath, P. R., Wood, E., Kirby, J., Fusi, N., . . . Shaw, P. J. (2013). Unravelling the enigma of selective vulnerability in neurodegeneration: motor neurons resistant to degeneration in ALS show distinct gene expression characteristics and decreased susceptibility to excitotoxicity. *Acta neuropathologica*, *125*(1), 95-109.
- Buratti, E. (2015). Functional Significance of TDP-43 Mutations in Disease. *Adv Genet*, *91*, 1-53. doi:10.1016/bs.adgen.2015.07.001

- Cairns, N., Perrin, R., Schmidt, R., Gru, A., Green, K., Carter, D., . . . Baloh, R. (2010). TDP-43 proteinopathy in familial motor neuron disease with TARDBP A315T mutation: a case report. *Neuropathology and applied neurobiology*, *36*(7), 673.
- Chio, A., Logroscino, G., Hardiman, O., Swingler, R., Mitchell, D., Beghi, E., . . . Consortium, E. (2009). Prognostic factors in ALS: a critical review. *Amyotrophic Lateral Sclerosis*, *10*(5-6), 310-323.
- Chung, S., Andersson, T., Sonntag, K. C., Björklund, L., Isacson, O., & Kim, K. S. (2002). Analysis of different promoter systems for efficient transgene expression in mouse embryonic stem cell lines. *Stem cells*, *20*(2), 139-145.
- Consonni, M., Iannaccone, S., Cerami, C., Frasson, P., Lacerenza, M., Lunetta, C., . . . Cappa, S. F. (2013). The cognitive and behavioural profile of amyotrophic lateral sclerosis: application of the consensus criteria. *Behav Neurol*, *27*(2), 143-153. doi:10.3233/BEN-2012-110202
- Corrado, L., Ratti, A., Gellera, C., Buratti, E., Castellotti, B., Carlomagno, Y., . . . Taroni, F. (2009). High frequency of TARDBP gene mutations in Italian patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Human mutation*, *30*(4), 688-694.
- Davis, S. A., Itaman, S., Khalid-Janney, C. M., Sherard, J. A., Dowell, J. A., Cairns, N. J., & Gitcho, M. A. (2018). TDP-43 interacts with mitochondrial proteins critical for mitophagy and mitochondrial dynamics. *Neuroscience letters*, *678*, 8-15.
- DeJesus-Hernandez, M., Mackenzie, I. R., Boeve, B. F., Boxer, A. L., Baker, M., Rutherford, N. J., . . . Adamson, J. (2011). Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron*, *72*(2), 245-256.
- Donaghy, M. (1999). Classification and clinical features of motor neurone diseases and motor neuropathies in adults. *Journal of neurology*, *246*(5), 331-333.
- Gijssels, I., Sleegers, K., Engelborghs, S., Robberecht, W., Martin, J.-J., Vandenberghe, R., . . . van der Zee, J. (2009). Neuronal inclusion protein TDP-43 has no primary genetic role in FTD and ALS. *Neurobiology of aging*, *30*(8), 1329-1331.
- Greig, L. C., Woodworth, M. B., Galazo, M. J., Padmanabhan, H., & Macklis, J. D. (2013). Molecular logic of neocortical projection neuron specification, development and diversity. *Nature Reviews Neuroscience*, *14*(11), 755-769.
- Han, J. H., Yu, T. H., Ryu, H. H., Jun, M. H., Ban, B. K., Jang, D. J., & Lee, J. A. (2013). ALS/FTLD-linked TDP-43 regulates neurite morphology and cell survival in differentiated neurons. *Exp Cell Res*, *319*(13), 1998-2005. doi:10.1016/j.yexcr.2013.05.025
- Igaz, L. M., Kwong, L. K., Chen-Plotkin, A., Winton, M. J., Unger, T. L., Xu, Y., . . . Lee, V. M. (2009). Expression of TDP-43 C-terminal Fragments in Vitro Recapitulates Pathological Features of TDP-43 Proteinopathies. *J Biol Chem*, *284*(13), 8516-8524. doi:10.1074/jbc.M809462200
- Jackson, K. L., Dayton, R. D., Deverman, B. E., & Klein, R. L. (2016). Better Targeting, Better Efficiency for Wide-Scale Neuronal Transduction with the Synapsin Promoter and AAV-PHP.B. *Front Mol Neurosci*, *9*, 116. doi:10.3389/fnmol.2016.00116

- Javed, K., & Lui, F. (2018). Neuroanatomy, Lateral Corticospinal Tract.
- Kanning, K. C., Kaplan, A., & Henderson, C. E. (2010). Motor neuron diversity in development and disease. *Annual review of neuroscience*, *33*, 409-440.
- Kaur, S. J., McKeown, S. R., & Rashid, S. (2016). Mutant SOD1 mediated pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Gene*, *577*(2), 109-118.
- Ke, Y. D., van Hummel, A., Stevens, C. H., Gladbach, A., Ippati, S., Bi, M., . . . Ittner, L. M. (2015). Short-term suppression of A315T mutant human TDP-43 expression improves functional deficits in a novel inducible transgenic mouse model of FTLD-TDP and ALS. *Acta Neuropathol*, *130*(5), 661-678. doi:10.1007/s00401-015-1486-0
- Kuo, P.-H., Doudeva, L. G., Wang, Y.-T., Shen, C.-K. J., & Yuan, H. S. (2009). Structural insights into TDP-43 in nucleic-acid binding and domain interactions. *Nucleic acids research*, *37*(6), 1799-1808.
- Lagier-Tourenne, C., Polymenidou, M., Hutt, K. R., Vu, A. Q., Baughn, M., Huelga, S. C., . . . Mazur, C. (2012). Divergent roles of ALS-linked proteins FUS/TLS and TDP-43 intersect in processing long pre-mRNAs. *Nature neuroscience*, *15*(11), 1488.
- Mastrocola, A. S., Kim, S. H., Trinh, A. T., Rodenkirch, L. A., & Tibbetts, R. S. (2013). The RNA-binding protein fused in sarcoma (FUS) functions downstream of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) in response to DNA damage. *J Biol Chem*, *288*(34), 24731-24741. doi:10.1074/jbc.M113.497974
- McHanwell, S., & Biscoe, T. J. (1981). The sizes of motoneurons supplying hindlimb muscles in the mouse. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences*, *213*(1191), 201-216.
- Mejzini, R., Flynn, L. L., Pitout, I. L., Fletcher, S., Wilton, S. D., & Akkari, P. A. (2019). ALS Genetics, Mechanisms, and Therapeutics: Where Are We Now? *Front Neurosci*, *13*, 1310. doi:10.3389/fnins.2019.01310
- Molyneaux, B. J., Arlotta, P., Menezes, J. R., & Macklis, J. D. (2007). Neuronal subtype specification in the cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci*, *8*(6), 427-437. doi:10.1038/nrn2151
- Montuschi, A., Iazzolino, B., Calvo, A., Moglia, C., Lopiano, L., Restagno, G., . . . Cammarosano, S. (2015). Cognitive correlates in amyotrophic lateral sclerosis: a population-based study in Italy. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, *86*(2), 168-173.
- Murphy, J., Factor-Litvak, P., Goetz, R., Lomen-Hoerth, C., Nagy, P. L., Hupf, J., . . . Heitzman, D. (2016). Cognitive-behavioral screening reveals prevalent impairment in a large multicenter ALS cohort. *Neurology*, *86*(9), 813-820.
- Neumann, M., Rademakers, R., Roeber, S., Baker, M., Kretzschmar, H. A., & Mackenzie, I. R. (2009). A new subtype of frontotemporal lobar degeneration with FUS pathology. *Brain*, *132*(11), 2922-2931.
- Neumann, M., Sampathu, D. M., Kwong, L. K., Truax, A. C., Micsenyi, M. C., Chou, T. T., . . . Clark, C. M. (2006). Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *science*, *314*(5796), 130-133.
- Novarino, G., Fenstermaker, A. G., Zaki, M. S., Hofree, M., Silhavy, J. L., Heiberg, A. D., . . . Mansour, L. (2014). Exome sequencing links corticospinal motor neuron disease to common neurodegenerative disorders. *science*, *343*(6170), 506-511.

- Pacary, E., Haas, M. A., Wildner, H., Azzarelli, R., Bell, D. M., Abrous, D. N., & Guillemot, F. (2012). Visualization and Genetic Manipulation of Dendrites and Spines in the Mouse Cerebral Cortex and Hippocampus using *In utero* Electroporation. *Journal of Visualized Experiments*(65). doi:10.3791/4163
- Phukan, J., Elamin, M., Bede, P., Jordan, N., Gallagher, L., Byrne, S., . . . Hardiman, O. (2012). The syndrome of cognitive impairment in amyotrophic lateral sclerosis: a population-based study. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 83(1), 102-108.
- Pinarbasi, E. S., Cagatay, T., Fung, H. Y. J., Li, Y. C., Chook, Y. M., & Thomas, P. J. (2018). Active nuclear import and passive nuclear export are the primary determinants of TDP-43 localization. *Sci Rep*, 8(1), 7083. doi:10.1038/s41598-018-25008-4
- Porter, R., & Lemon, R. (1993). *Corticospinal function and voluntary movement*: Oxford University Press, USA.
- Prasad, A., Bharathi, V., Sivalingam, V., Girdhar, A., & Patel, B. K. (2019). Molecular mechanisms of TDP-43 misfolding and pathology in amyotrophic lateral sclerosis. *Frontiers in molecular neuroscience*, 12, 25.
- Ragagnin, A. M., Shadfar, S., Vidal, M., Jamali, M. S., & Atkin, J. D. (2019). Motor neuron susceptibility in ALS/FTD. *Frontiers in Neuroscience*, 13, 532.
- Ramírez-Jarquín, U. N., & Tapia, R. (2018). Excitatory and inhibitory neuronal circuits in the spinal cord and their role in the control of motor neuron function and degeneration. *ACS Chemical Neuroscience*, 9(2), 211-216.
- Rathelot, J.-A., & Strick, P. L. (2009). Subdivisions of primary motor cortex based on cortico-motoneuronal cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(3), 918-923.
- Ratti, A., & Buratti, E. (2016). Physiological functions and pathobiology of TDP-43 and FUS/TLS proteins. *J Neurochem*, 138 Suppl 1, 95-111. doi:10.1111/jnc.13625
- Rayaprolu, S., Fujioka, S., Traynor, S., Soto-Ortolaza, A. I., Petrucelli, L., Dickson, D. W., . . . Ross, O. A. (2013). TARDBP mutations in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*, 19(3), 312-315. doi:10.1016/j.parkreldis.2012.11.003
- Reaume, A. G., Elliott, J. L., Hoffman, E. K., Kowall, N. W., Ferrante, R. J., Siwek, D. R., . . . Brown, R. H. (1996). Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury. *Nature genetics*, 13(1), 43-47.
- Renton, A. E., Chiò, A., & Traynor, B. J. (2014). State of play in amyotrophic lateral sclerosis genetics. *Nature neuroscience*, 17(1), 17-23.
- Renton, A. E., Majounie, E., Waite, A., Simón-Sánchez, J., Rollinson, S., Gibbs, J. R., . . . Myllykangas, L. (2011). A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD. *Neuron*, 72(2), 257-268.
- Rollinson, S., Snowden, J. S., Neary, D., Morrison, K. E., Mann, D. M., & Pickering-Brown, S. M. (2007). TDP-43 gene analysis in frontotemporal lobar degeneration. *Neuroscience letters*, 419(1), 1-4.

- Schumacher, A., Friedrich, P., Diehl-Schmid, J., Ibach, B., Perneczky, R., Eisele, T., . . . Riemenschneider, M. (2009). No association of TDP-43 with sporadic frontotemporal dementia. *Neurobiology of aging*, *30*(1), 157-159.
- Silverman, J. M., Fernando, S. M., Grad, L. I., Hill, A. F., Turner, B. J., Yerbury, J. J., & Cashman, N. R. (2016). Disease mechanisms in ALS: misfolded SOD1 transferred through exosome-dependent and exosome-independent pathways. *Cellular and molecular neurobiology*, *36*(3), 377-381.
- Sonne, J., & Lopez-Ojeda, W. Mechanism of Action.
- Stifani, N. (2014). Motor neurons and the generation of spinal motor neurons diversity. *Frontiers in cellular neuroscience*, *8*, 293.
- Szczurkowska, J., Cwetsch, A. W., dal Maschio, M., Ghezzi, D., Ratto, G. M., & Cancedda, L. (2016). Targeted in vivo genetic manipulation of the mouse or rat brain by in utero electroporation with a triple-electrode probe. *Nat Protoc*, *11*(3), 399-412. doi:10.1038/nprot.2016.014
- Tiryaki, E., & Horak, H. A. (2014). ALS and other motor neuron diseases. *CONTINUUM: Lifelong Learning in Neurology*, *20*(5), 1185-1207.
- Torres-Torrelo, J., Rodríguez-Rosell, D., Nunez-Abades, P., Carrascal, L., & Torres, B. (2012). Glutamate modulates the firing rate in oculomotor nucleus motoneurons as a function of the recruitment threshold current. *The Journal of Physiology*, *590*(13), 3113-3127.
- Turner, M. R., Scaber, J., Goodfellow, J. A., Lord, M. E., Marsden, R., & Talbot, K. (2010). The diagnostic pathway and prognosis in bulbar-onset amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of the neurological sciences*, *294*(1-2), 81-85.
- Vance, C., Rogelj, B., Hortobagyi, T., De Vos, K. J., Nishimura, A. L., Sreedharan, J., . . . Shaw, C. E. (2009). Mutations in FUS, an RNA processing protein, cause familial amyotrophic lateral sclerosis type 6. *science*, *323*(5918), 1208-1211. doi:10.1126/science.1165942
- Vicario, A., Colliva, A., Ratti, A., Davidovic, L., Baj, G., Gricman, L., . . . Bardoni, B. (2015). Dendritic targeting of short and long 3' UTR BDNF mRNA is regulated by BDNF or NT-3 and distinct sets of RNA-binding proteins. *Frontiers in molecular neuroscience*, *8*, 62.
- Wang, H.-Y., Wang, I.-F., Bose, J., & Shen, C.-K. J. (2004). Structural diversity and functional implications of the eukaryotic TDP gene family. *Genomics*, *83*(1), 130-139.
- Wang, P., Deng, J., Dong, J., Liu, J., Bigio, E. H., Mesulam, M., . . . Lee, A. Y.-L. (2019). TDP-43 induces mitochondrial damage and activates the mitochondrial unfolded protein response. *PLoS genetics*, *15*(5), e1007947.
- Westbury, D. (1982). A comparison of the structures of α - and γ -spinal motoneurons of the cat. *The Journal of Physiology*, *325*(1), 79-91.
- Wong, P. C., Pardo, C. A., Borchelt, D. R., Lee, M. K., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., . . . Price, D. L. (1995). An adverse property of a familial ALS-linked SOD1 mutation causes motor neuron disease characterized by vacuolar degeneration of mitochondria. *Neuron*, *14*(6), 1105-1116.
- Zinszner, H., Sok, J., Immanuel, D., Yin, Y., & Ron, D. (1997). TLS (FUS) binds RNA in vivo and engages in nucleo-cytoplasmic shuttling. *Journal of cell science*, *110*(15), 1741-1750.

Zou, Z.-Y., Zhou, Z.-R., Che, C.-H., Liu, C.-Y., He, R.-L., & Huang, H.-P. (2017). Genetic epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 88(7), 540-549.

