

**T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI**



**NUSİNERSEN TEDAVİSİ ALMAKTA OLAN PEDIATRİK
SPİNAL MUSKÜLER ATROFİ (SMA) HASTALARININ
İZLEMİNDE POTANSİYEL BİYOBELİRTEÇLER OLARAK
MİR-155-5P, MİR-222-5P VE MİR-378B’NİN ARAŞTIRILMASI**

Yüksek Lisans Tezi

Sümeyye KAYAOĞLU

Danışman

Doç. Dr. Sercan ERGÜN

Bu çalışma Ondokuz Mayıs Üniversitesi tarafından PYO.TIP.1904.22.023 proje numarası ile desteklenmiştir.

SAMSUN
2023

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI

Hazırladığım Yüksek Lisans tezinin bütün aşamalarında bilimsel etiğe ve akademik kurallara riayet ettiğimi, çalışmada doğrudan veya dolaylı olarak kullandığım her alıntıya kaynak gösterdiğimi ve yararlandığım eserlerin Kaynaklar'da gösterilenlerden oluştuğunu, her unsurun enstitü yazım kılavuzuna uygun yazıldığını ve TÜBİTAK Araştırma ve Yayın Etiği Kurulu Yönetmeliği'nin 3. bölüm 9. maddesinde belirtilen durumlara aykırı davranılmadığını taahhüt ve beyan ederim.

Etik Kurul Gerekli mi ?

Evet ☒ (Gerekli ise ekler kısmına ekleyiniz)

Hayır ☐

24 /03 / 2022
Sümeyye KAYAOĞLU

TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI

Tez Başlığı : NUSİNERSEN TEDAVİSİ ALMAKTA OLAN PEDİATRİK SPİNAL MUSKÜLER ATROFİ (SMA) HASTALARININ İZLEMİNDE POTANSİYEL BİYOBELİRTEÇLER OLARAK MİR-155-5P, MİR-222-5P VE MİR-378B'NİN ARAŞTIRILMASI

Yukarıda başlığı belirtilen tez çalışması için şahsım tarafından24.02.2023.....tarihinde intihal tespit programından alınmış olan özgünlük raporu sonucunda;

Benzerlik oranı : % 12

Tek kaynak oranı : % 2 çıkmıştır.

24 /02 / 2023
Doç. Dr. Sercan ERGÜN

ÖZET

NUSİNERSEN TEDAVİSİ ALMAKTA OLAN PEDİATRİK SPİNAL MUSKÜLER ATROFİ (SMA) HASTALARININ İZLEMİNDE POTANSİYEL BİYOBELİRTEÇLER OLARAK MİR-155-5P, MİR-222-5P VE MİR-378B'NİN ARAŞTIRILMASI

Sümeyye KAYAOĞLU
Ondokuz Mayıs Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı
Yüksek Lisans, Ocak/2023
Danışman: Doç. Dr. Sercan ERGÜN

Amaç: Bu tez çalışmasında, in siliko analizler ile kasta ifade edilen ve SMN2-ekson 7 hedefleyebilen miRNA'ların belirlenmesi ilk hedefimiz oldu. Ardından, Nusinersen tedavisi alan SMA hastalarında her Nusinersen uygulamasından önce ve sonra SMA hastalarının Beyin Omurilik Sıvılarında belirlediğimiz miRNA'ların ekspresyon profillerini araştırarak Nusinersen etkinliğine dair bir bilgi/gösterge elde edilmesi amaçlanmaktadır.

Yöntem: İn siliko analizler sonucunda, hem kasta ifade edilmesine hem de SMN2-exon7 ile yüksek oranda bağlantı gösteren üç miRNA (miR-155-5p, miR-222-5p ve miR-378b) belirlendi. SMA tanısı almış 20 pediatrik hasta çalışmaya dahil edilmiş olup her Nusinersen uygulamasından önce ve sonra hastalardan totalde alınan 48 adet 5ml BOS örneğinde belirlenen miRNA'ların izolasyonu yapılarak RT-PCR ile ifade düzeylerinin analizi yapıldı. Her Nusinersen uygulaması öncesi ve sonrası arasındaki miRNA ekspresyon farklılığının anlamlılık analizi yapılarak ve hastaların klinik parametreleriyle ve özellikle SMA hastalarının tedavi yanıtıyla ilgili bilgi veren HFMSE skorlarıyla ilişkilendirilmiştir.

Bulgular: HFMSE skor ölçümleri Nusinersen tedavi ile birlikte ilk duruma göre artış gösterdiği bulundu. miR-222-5p'nin ifade düzeyi incelendiğinde, BOS1 ve BOS2 ölçümleri arasında anlamlılığa yakın bir artışın olduğu bulundu ($p=0,068$). miR-378b'nin ifade düzeyinde, BOS 1 ve BOS 3 ölçümleri arasında anlamlılığa yakın fark bulundu ($p=0,068$). HFMSE skorları ile miR-222-5p ve miR-378b ekspresyonları kıyaslanmış ancak herhangi bir korelasyon bulunamadı. Ancak ilk ve son durum karşılaştırmalarına baktığımızda hem HFMSE'nin hem de miR-222-5p ve miR-378b'nin zamanla (ilk duruma göre) artış gösterdiği bulunmuştur. HFMSE değişimi ile miR-222-5p ve miR-378b arasında negatif yönde istatistiksel olarak anlamlılığa yakın bir korelasyon olduğu bulundu.

Sonuç: MiRNA'lar Nusinersen ile birlikte hastalığın daha iyi anlaşılmasında, ilerlemesinde ve terapötik yanıtın izlenmesinde potansiyel biyobelirteçler olarak umut vericidir. Çalışmamız miRNA'ların Nusinersen tedavisi alan SMA hastalarında, hastalığın daha iyi anlaşılması, ilerlemesi ve terapötik yanıtın izlenmesi için non-invaziv ve klinik olmayan biyobelirteçler olarak etkinliğinin değerlendirilmesi üzerine yapılacak olan çalışmalara fikir olacaktır.

Anahtar Sözcükler: Spinal musküler atrofi, Nusinersen, MiRNA, Tedaviye yanıt, Nadir hastalık,

ABSTRACT

INVESTIGATION OF MİR-155-5P, MİR-222-5P AND MİR-378B POTENTIAL BIOMARKERS IN THE FOLLOW-UP PEDIATRIC SPINAL MUSCULAR ATROPHY (SMA) PATIENTS RECEIVING NUSINERSEN TREATMENT

Sümeyye KAYAOĞLU

Ondokuz Mayıs University

Institute of Graduate Studies

Department of Medical Biology

Master, January/2023

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Sercan ERGÜN

Aim: In this thesis, the first target was to identify miRNAs expressed in muscle and capable of targeting SMN2-exon 7 by in silico analysis. Next, it is aimed to obtain an information/indicator of Nusinersen performance by investigating the profiles of miRNAs that we spend in the Cerebrospinal Fluid (CSF) of SMA patients before and after Nusinersen capacity.

Method: As a result of in silico analysis, three miRNAs (miR-155-5p, miR-222-5p, and miR-378b) were identified, both expressed in muscle and highly correlated with SMN2-exon7. 20 pediatric patients diagnosed with SMA were included in the study and before and after each Nusinersen administration, the expression of expressions with RT-PCR was analyzed by isolation of the miRNAs determined in 48 5ml CSF sample taken from the patients. Significance analysis of the difference in miRNA expression between before and after each Nusinersen administration was performed and correlated with patients' clinical parameters and HFMSE scores, which provide information about the treatment response of SMA patients in particular. In addition, the effect of Nusinersen on miRNA profile changes according to SMA types was evaluated.

Results: HFMSE score was found to increase with Nusinersen treatment according to the first situation. When the expression level of miR-222-5p was examined, there was an increase between CSF1 and CSF2 measurements close to significance ($p = 0.068$). At the expression level of miR-378b, there was a difference close to significance between CSF1 and CSF3 measurements ($p = 0.068$). HFMSE scores and miR-222-5p and miR-378b expressions were compared, but no correlation was found. However, when we look at the first and final status comparisons, it was found that both HFMSE and miR-222-5p and miR-378b increased over time (according to the first situation). With the change of HFMSE, there was a negative statistical correlation between miR-222-5p and miR-378b

Conclusion: These non-coding RNA miRNAs, together with Nusinersen, are promising as potential biomarkers for better disease prevention, progression and capabilities of therapeutic response. Our study will be an idea of the studies to be carried out in SMA patients receiving Nusinersen treatment of MIRNAs, to better understand, progress and monitor the therapeutic response of the disease.

Keywords: Spinal muscular atrophy, Nusinersen, MiRNA, Response to treatment, Rare disease,

ÖN SÖZ VE TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans'a başladığım ilk günden bu yana bana her konuda yardımcı olan, tez konumun belirlenmesi ve çalışmam süresince bana yol gösteren, sabrını esirgemeyen, özgür çalışma ortamı sağlayan ve her zaman destek veren, değerli hocam Doç. Dr. Sercan ERGÜN'e teşekkür ederim.

Yüksek Lisans eğitimin süresince tecrübeleriyle bize daima yol gösteren anabilim dalı başkanımız Sayın Prof. Dr. Sezgin GÜNEŞ'e teşekkür ederim.

Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları ABD, Çocuk Nöroloji Bölümü'nden Sayın Prof Dr. Ayşe AKSOY, Dr. Öğr. Üyesi Gökçen Öz Tunçer ve Uzman Dr. Gülbahar KURT BAYIR'a tez çalışmam boyunca hasta örneklerinin toplanmasında ve klinik boyutta verdikleri bilimsel destekleri için teşekkür ederim.

Fizyoterapi ve Rehabilitasyon Bölümü'nden Öğr. Görevlisi Seda Nur KEMER'e tez çalışmam boyunca hastaların klinik değerlendirilmesine sağladığı katkılardan dolayı teşekkür ederim

Tez çalışmamın sonuçlarının istatistiksel değerlendirmesinde yardımları ve için Halk Sağlığı Ana Bilim Dalı'ndan Doç. Dr. Özlem Terzi'ye teşekkür ederim.

Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı'ndan Arş. Gör. Dr. Gülgez Neslihan TAŞKURT HEKİM'e tez çalışmam boyunca verdiği fikir, moral ve desteği için teşekkür ederim.

Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans ve Doktora yapan bölüm arkadaşlarıma moral ve destekleri için teşekkür ederim.

Hayatım boyunca her zaman yanımda olan, varlıklarıyla bana güç veren ve bu hayattaki en büyük destekçim olan canım aileme çok teşekkür ederim.

Bu süre içerisinde her zaman desteklerini ve sevgilerini hissettiğim, en yakın arkadaşlarım Ebru ZEREN ve Nuriye AKTÜRK'e teşekkür ederim.

Sümeyye KAYAOĞLU

İÇİNDEKİLER

TEZ KABUL VE ONAYI	i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI	ii
TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
TABLolar DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Spinal Musküler Atrofi	3
2.1.1. SMA Tanımı ve Tarihçesi:	3
2.1.2. Epidemiyoloji	5
2.1.3. Klinik Fenotiplerin Sınıflandırılması	6
2.1.4. Moleküler Genetiği	8
2.1.4.1. SMA Gen Bölgesi	8
2.1.4.2. SMN1 ve SMN2	9
2.1.4.3. SMN Proteini ve İşlevi	12
2.1.5. SMA Teşhis ve Tanı Yöntemleri	15
2.2. SMA İçin Terapötik Hedefler	17
2.2.1. Nusinersen	18
2.2.1.1. Klinik Çalışmalar	20
2.2.2. Gen Tedavisi	22
2.2.3. Küçük Moleküller	23
2.2.4. Hammersmith Functional Motor Scale Expanded (HFMSE):	23
2.3. SMA ve MikroRNA	24
2.3.1. MikroRNA'lar ve Keşfi:	24
2.3.2. MiRNA Biyogenezi ve İşlevi	25
2.3.3. SMA'da Potansiyel Biyobelirteç ve Terapötik Hedef Olarak MiRNA'lar	27
2.3.4. Analiz Ettiğimiz MiRNA'lar	32
2.3.4.1. MiR-155-5p	32
2.3.4.2. MiR-222-5p	32
2.3.4.3. MiR-378b	33
3. MATERYAL METOT	35
3.1. Çalışma Grubu	35
3.2. Materyal	36
3.3. Ön Çalışma: İn Siliko miRNA Analizi	38
3.4. Beyin Omurilik Sıvısı'ndan RNA İzolasyonu	39
3.5. cDNA Sentezi	40
3.6. RT-PCR ile Ekspresyon Analizi	41
3.7. Klinik Değerlendirme	42
3.8. İstatistiksel Analiz	43
4. BULGULAR	44
4.1. Hastaların Verileri	44
4.2. MiRNA İfade Değişimleri	45
4.3. SMN2 Kopya Sayısı ve MiRNA'lar	47
4.4. HFMSE ve MiRNA Tanımlayıcı Verileri	48
4.5. HFMSE Değerlendirmesi	50
4.6. BOS Örneklerinde MiR-222-5p ve MiR-378b Değerlendirmesi	51
4.7. HFMSE ve MiRNA Korelasyonu	52
4.8. Alt Tip Değerlendirmesi	54

5. TARTIŞMA.....	56
6. SONUÇ	61
KAYNAKÇA.....	64
EKLER	70
ÖZGEÇMİŞ.....	75



SİMGELER VE KISALTMALAR

AA	: Amino Asit
AGO	: Argonoute
ALS	:Amyotrofik Lateral Skleroz
ASO	: Antisens Oligonükleotit
BGOF	:Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu
BIC	:B Hücresi Entegrasyon Kümesi
BOS	:Beyin Omurilik Sıvısı
C	:Sitozin
CB	:Cajal Cisimcikler
cDNA	:Komplementer DNA
CK	: Serum Kreatin Kinaz
DGCR8	:DiGeorge Syndrome Critical Region 8
DNA	:Deoksiribonükleik Asit
DMD	:Duchenne Müsküler Atrofi
EKG	:Elektrokardiyograf
EMA	:Avrupa İlaç Ajansı
EMG	:Elektromiyografi
ESE	:Exonic Splicing Enhancer
ESS	:Exonic Splicing Silencer
FDA	:Gıda ve İlaç Dairesi
FL-SMN	:Tam Uzunlukta Fonksiyonel SMN
FMRP	:Fragile X Mental Reterdation Protein
FUS/TUS	:Fused İn Sarcome/Translocated İn Liposarcoma
HFMSE	:Hammersmith Functional Motor Scale Expanded
HINE 2	:Hammersmith Bebek Nörolojik Muayenesi-Bölüm 2
hnRNP	:Heterojen Ribonükleoprotein
ISS-NI	:Intronic splicing silencer
İPSC	:İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücreler
Kb	:Kilobaz
KBB	:Kan Beyin Bariyeri
KSRP	:KH-Type Splicing Regulatory Protein

MEF2A	:Miyojenik Güçlendirici Faktör 2
MiRISC	:miRNA Kaynaklı Susturma Kompleksi
MiRNA	:MikroRNA
MRNA	:Mesajcı RNA
MN	:Motor Nöron
MND	:Motor Nöron Dejenerasyonu
MSS	:Merkezi Sinir Sistemi
NAIP	:Neuronal Apoptosis İnhibitory Protein
NCALD	:Neurocalcin delta
NRN1	:Neuritin 1
NMJ	:Nöromusküler Kavşak
OMÜ	:Ondokuz Mayıs Üniversitesi
OMÜTF	:Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi
PCR	:Polimeroz Zincir Reaksiyonu
PLS3	:Plastin 3
Ppargc1 β	:Peroksizom Proliferatörü İle Aktive Olan Reseptör γ Koaktivatör 1- β
pre-miRNA	:Precursor :miRNA
pri-miRNA	:Primer miRNA
PTEN	:Phosphatase and Tensin Homolog
P44	: General Transcription Factor IIH
RAN-GTP	: Ras Associated Nuclear-Guanosine Triphosphate
RISC	:RNA-İnduced Silencing Complex
RNA Pol II	:RNA Polimeraz II
RNA	:Ribonükleik Asit
RT-PCR	:Real Time PCR
SMA	:Spinal Musküler Atrofi
SERF1	:Small EDRK-Rich Factor 1
SMN	: Survival Motor Neuron
Sm	:Smith Core
T	:Timin
ZPR1	:Çinko Parmak Proteini

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Normal kas ve sinir hücresi ile SMA'lı kas ve sinir hücresinin farkı	3
Şekil 2.2. SMA'daki gelişmelerin zaman göstergesi	4
Şekil 2.3. SMN genlerinin organizasyonu	8
Şekil 2.4. Hasta ve sağlıklı bireylerde SMN1 ve SMN2mRNA'dan splicing ve protein oluşumunu gösteren şematik diyagram	10
Şekil 2.5. SMN2 kopya sayıları ve SMA türlerinin dağılım grafiği	12
Şekil 2.6. FL-SMN proteininin şematik gösterimi.....	13
Şekil 2.7. SMN komplekslerini ve işlevlerini gösteren özet şematik diyagram	14
Şekil 2.8. SMA' da, omurilik, motor nöron, motor akson, nöromüsküler kavşak ve kasta SMN eksikliğinin neden olduğu temel fonksiyonel ve morfolojik anormalliklerin şematik gösterim	15
Şekil 2.9. SMA tedavisine yönelik geliştirilen terapötik stratejiler	17
Şekil 2.10. Nusinersen yapısı	18
Şekil 2.11. Nusinersen etki mekanizmasının şematik gösterimi.....	19
Şekil 2.12. miRNA biyogenezi ve etki mekanizması	26
Şekil 2.13. SMA'da yer alan muhtemel potansiyel biyobelirteçler ve SMA motor nöronlarında düzensiz miRNA'ların ekspresyon profillerinin gösterimi	28
Şekil 2.14. SMA'da miRNA terapötik stratejileri.....	x1
Şekil 3.1. Nusinersen Uygulama Şeması	36
Şekil 3.2. Çalışmanın akış şeması.....	37
Şekil 3.3. miR-155-5p, çekirdek dizisi (7mer) ile ISS-N1 içindeki Nusinersen bağlanma bölgesini hedeflemesi	38
Şekil 3.4. miR-222-5p'nin SMN2-exon7 hedeflemesi	38
Şekil 3.5. miR-378b'nin SMN2-exon7 hedeflemesi.....	39
Şekil 4.1. Her hastanın ayrı ayrı miR-222-5p ifade düzey farkını grafiksel gösterimi	46
Şekil 4.2. Her hastanın ayrı ayrı miR-378b ifade düzey farkını grafiksel gösterimi	46
Şekil 4.3. BOS 2'si çalışılan 5 hastanın SMN2 Kopya Sayısı	47
Şekil 4.4. BOS 2'si çalışılan 5 hastanın miR-378b ifade düzey değişikliği.....	47
Şekil 4.5. HFMSE skorlarının Nusinersen uygulaması alan hastalardaki değişimi	51
Şekil 4.6. Tüm gruplarda ayrı ayrı miR-222-5p'nin ifade değişiminin gösterimi	51
Şekil 4.7. Tüm gruplarda ayrı ayrı miR-378b'nin ifade değişiminin gösterimi.....	52
Şekil 4.8. HFMSE ile miR-222-5p ve miR-378b nin karşılaştırılması	53

TABLÖLER DİZİNİ

Tablo 2.1. 2020-2021 verilerine göre SMA insidansı.....	5
Tablo 2.2. SMA klinik sınıflandırması	6
Tablo 3.1. Çalışmaya Alınma ve Dışlanma Kriterleri.....	35
Tablo 3.2. cDNA sentezi için reaksiyon karışımının hazırlanması	40
Tablo 3.3. cDNA sentezi için PCR koşulları	41
Tablo 3.4. Ekspresyon analizi için RT-PCR reaksiyonunun hazırlanması.....	42
Tablo 3.5. Ekspresyon analizi için RT-PCR koşulları.....	42
Tablo 4.1. Hastaların demografik verileri.....	44
Tablo 4.2. Klinik Parametreler.....	45
Tablo 4.3. miR-222-5p, miR-378b ve HFMSE Tanımlayıcı Verileri	48
Tablo 4.4. HFMSE skorları ile BOS'taki miR-222-5p ölçümlerinin karşılaştırılması.....	48
Tablo 4.5. HFMSE skorları ile BOS'taki miR-378b ölçümlerinin karşılaştırılması.....	49
Tablo 4.6. SMA alt tiplerine göre HFMSE değerlendirme karşılaştırılması	54
Tablo 4.7. SMA alt tiplerine göre miR-222-5p değerlendirmesi.....	54
Tablo 4.8. SMA alt tiplerine göre miR-378b değerlendirmesi.....	55

1. GİRİŞ

Nöromüsküler hastalıkların bir çoğu genetik olarak kalıtsaldır ve bir kısmı motor nöronlardaki mutasyonlardan kaynaklanır(Iftikhar, Frey, Shohan, Malek, & Mousa, 2021). En yaygın nöromüsküler hastalıklardan biri olan Spinal Musküler Atrofi(SMA), motor nöron kaybına bağlı kas güçsüzlüğü ile sonuçlanan genetik bir hastalıktır(D'Amico, Mercuri, Tiziano, & Bertini, 2011). SMA halen bebek ve erken çocukluk ölümlerinin önde gelen nedenlerinden biridir(Bonanno et al., 2020). Hastalığa kromozom 5q13.2 üzerinde bulunan SMN (survival motor neuron) proteinin kodlanmasından sorumlu SMN1(survival motor neuron 1) geninin mutasyonu neden olmaktadır. SMN1 geni ile neredeyse aynı olan SMN2 geni sınırlı miktarda fonksiyonel protein üretir. Bu da SMN1 geninin kaybını telefi etmek için yetersiz olup SMA'ya neden olmaktadır. (Chiriboga et al., 2016; Singh, Ottosen, & Singh, 2020). SMA, klinik olarak beş alt tipe ayrılır: 0,I,II,III,IV(Kakazu et al., 2021).

Hastalığa neden olan SMN geninin tanımlanması, işlevsel SMN protein seviyelerinin artırılmasına yönelik terapötik hedeflerin geliştirilmesine yol açmıştır(Kolb & Kissel, 2015). Günümüzde, Nusinersen (Spinraza®,Biogen), onasemnogene abeparvoveç (Zolgensma,Norvatis) ve Risdiplam (Evrsdi™)hastalığın tedavisi için ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA)tarafından onaylanmıştır(Chong, Gandhi, Lee, Yeo, & Choi, 2021; Gandhi, Abdullah, Foad, & Yeo, 2021). Nusinersen, SMN2 pre-mRNA eklenmesini hedefler ve böylece ekson 7 dahil edilmesini arttırarak SMN proteinin oluşumunu arttırır(Brakemeier et al., 2021). İn utero ve erişkin başlangıçlı formlar hariç diğer SMA tiplerinde Nusinersen tedavisi ile motor fonksiyonlarda iyileşme olduğu görülmüştür(Bonanno et al., 2020).

SMA için hastalık modifiye edici tedavilerin geliştirilmesiyle birlikte, hastalığın ilerlemesini ve terapötik yanıtı izlemek için potansiyel biyobelirteçlerin tanımlanmasına olan ihtiyaç artmıştır (Pino, Rich, & Kolb, 2021). MikroRNA'lar(miRNA'lar)gen ekspresyonunun düzenlenmesinde rol oynayan yaklaşık 19-25 nükleotid uzunluğunda olan küçük endojen RNA'lardır. MiRNA'ların anormal ekspresyonu, SMA dahil olmak üzere birçok patolojik sürecin aydınlatılmasında yol göstericidir(Gandhi et al., 2021). miRNA'ların SMA, ALS gibi motor nöron hastalıkları için tanısal ve prognostik non-invaziv biyobelirteçler olarak geniş çapta incelendiğine dair kanıtlar artmaktadır(Bonanno et al., 2020). Bu tez çalışmasında; Nusinersen uygulamasından önce ve sonra (yani takip eden dozdan önce

ya da hastaların tedavileri devam ettiği sürece her Nusinersen uygulamasından önce) SMA hastalarının beyin omurilik sıvılarında (BOS) in siliko analizler ile belirlediğimiz üç miRNA'nın (miR-155-5p, miR-222-5p ve miR-378b) ekspresyon profillerini araştırmak ve bu sayede Nusinersen etkinliğine dair birbilgi/gösterge elde edilmesi amaçlanmaktadır.

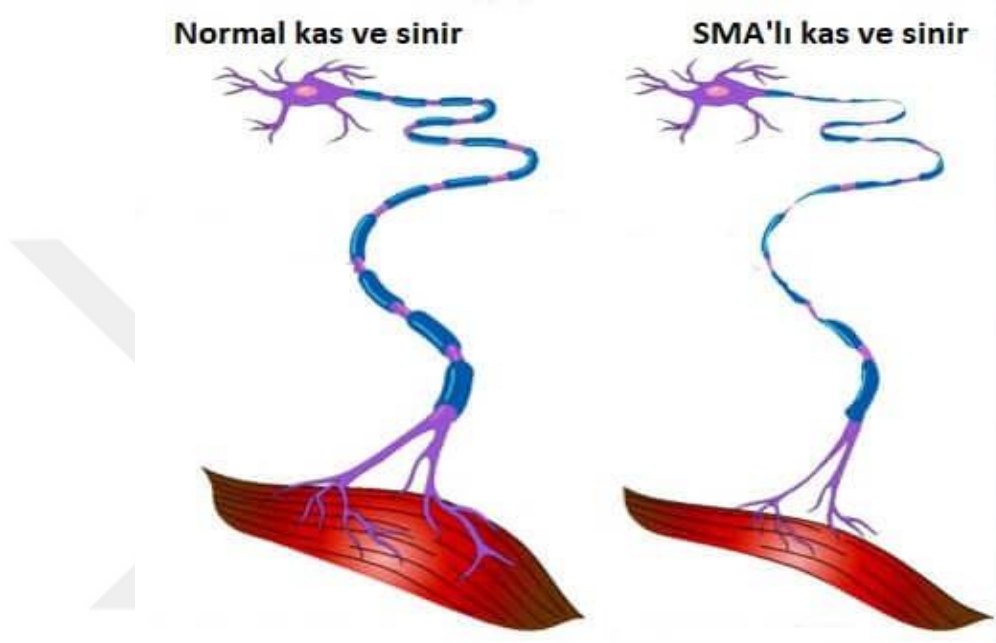


2. GENEL BİLGİLER

2.1. Spinal Musküler Atrofi

2.1.1. SMA Tanımı ve Tarihçesi:

Otozomal resesif olarak kalıtılan SMA, omuriliğin ön boynuzundaki α motor nöronların dejenerasyonuna bağlı olarak ilerleyici kas güçsüzlüğü ve atrofi ile sonuçlanan nöromusküler bir hastalıktır.(Abiusi et al., 2021; Bonanno et al., 2020).

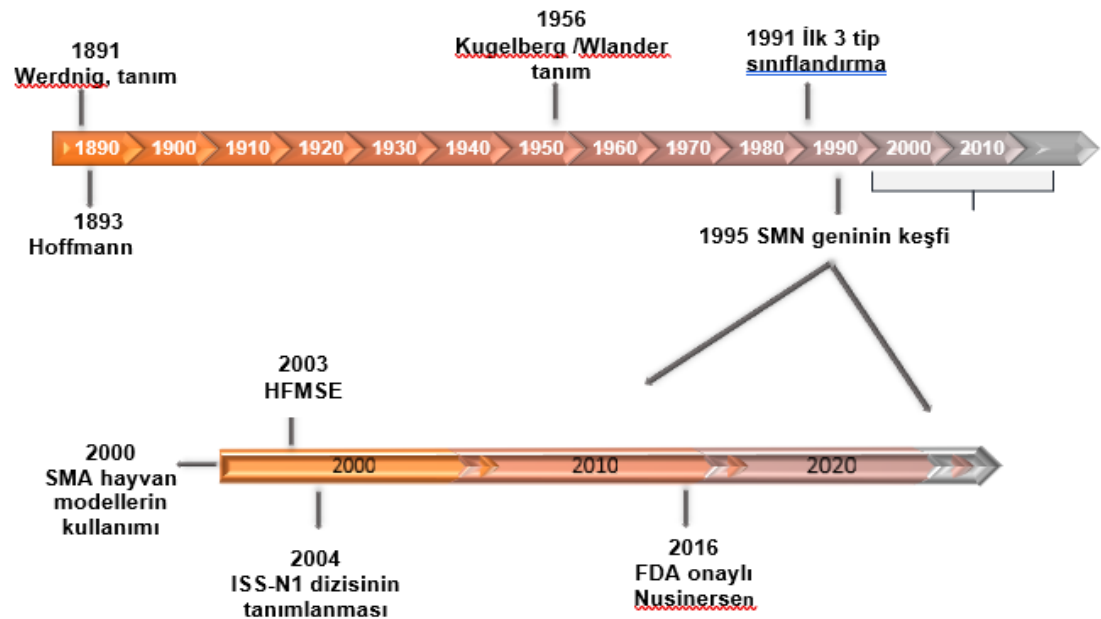


Şekil 1. Normal kas ve sinir hücresi ile SMA'lı kas ve sinir hücresinin farkı (nkfu.com/sma nedir-belirtileri-tipleri-tedavisi, Erişim Tarihi:23.02.2023)

SMA ilk olarak 1890'larda Viyana Üniversitesi'nden Guido Werdnig tarafından 2 bebek kardeşle ve Almanya Heidelberg Üniversitesi'nden Johann Hoffman tarafından 7 ek vakada tanımlanmıştır(Kolb & Kissel, 2015). Werdnig- Hoffman, SMA' yı erken bebeklik dönemi başlangıçlı, değişen yaşlarda ölümle sonuçlanan ve patolojik olarak ön boynuz hücre kaybı ile karakterize ilerleyici bir kas güçsüzlüğü olarak tanımladılar(Russman, 2007). Hastalığın klinik şiddeti ile ilgili ilk çalışmalar 1899'da Sylvestre ve 1903'te Beevor tarafından yapılmıştır.1950'lerde Wohlfart ve ark. ile Kugelberg ve Wlander hastaların ayakta durma ve yürüme yeteneklerini korudukları uzun süreli sağkalım ile daha hafif SMA formunu tanımladılar(Kolb & Kissel, 2015). 1961' de Byers ve Banker prognozu kolaylaştırmak için hastaları 3 gruba ayırarak ilk SMA sınıflandırmasını yaptılar(Ross & Kwon, 2019). 1964' te Dubowitz, bebeklik döneminde başlayan ve Werdnig- Hoffman tarafından tanımlanan infantil formdan daha uzun sağkalımı olan ve neredeyse ilerleyici olmayan 12 vakalık

seri bildirmiştir. Bu seri, bebeklik döneminde başlayan ancak yavaş bir ilerleme ile ilişkili yeni bir fenotip olan “ara/intermediate” formunun ilk sistematik tanımını sağlar(Mercuri, 2021). Çoklu fenotipler ilk olarak 1991 yılında Spinal Musküler Atrofi Konsorsiyumu tarafından başlangıç ve ulaşılan maksimum motor beceriye göre 3 tipe sınıflandırılmıştır. Daha sonra erişkin başlangıçlı hastalar için tip IV ve doğum öncesi başlangıçlı olup haftalar içinde ölen hastalar için tip 0 eklenmiştir(Kolb & Kissel, 2015).

1990 yılında kromozom 5 üzerinde hastalığa neden olan SMN geninin yerinin keşfedilmesinden 5 yıl sonra yani 1995 yılında SMA hastalarının %95’nin 5q13 üzerindeki SMN1 genindeki homozigot bir delesyondan kaynaklandığı keşfedilmiştir(Kolb & Kissel, 2015; Mercuri, 2021). SMN geninin tanımlanması, SMA patogenezinin anlaşılmasında kullanılan hayvan modellerinin ve SMN protein seviyelerinin artırılmasına yönelik terapötik hedeflerin geliştirilmesine öncülük etmiştir(Kolb & Kissel, 2015). Bir motor fonksiyon ölçeği olan Hammersmith Functional Motor Scale Expanded (HFMSE) 2003 yılında geliştirilmiş olup günümüzde tedavi değerlendirmelerinde kullanılmaktadır(Main, Kairon, Mercuri, & Muntoni, 2003; Maria C Pera et al., 2017). 2004 yılında exon 7 atlamasını hedef alan ISS-N1 dizisinin tanımlanması, SMA tedavisinde kullanılan Nusinersen’in gelişimine yol açtı. Nusinersen Aralık 2016’da FDA tarafından SMA için onaylanan ilk tıbbi tedavi olup şu anda dünya çapında 10.000’den fazla kişinin tedavisinde kullanılmaktadır (Ross & Kwon, 2019; Brunhilde Wirth, 2021).



Şekil 2.2. SMA'daki gelişmelerin zaman göstergesi (Ramdas & Servais, 2020)

2.1.2. Epidemiyoloji

SMA, bebek ve erken çocukluk ölümlerinin en yaygın kalıtsal nöromusküler hastalık nedenlerinden biridir ve tahmini insidansı 1/6000 ila 1/10.000 arasındadır(D'Amico et al., 2011). SMA taşıyıcı sıklığının ise, etnik kökene göre farklılık göstermekte olup genel popülasyonda 1/40 ila 1/60 arasında olduğu bildirilmiştir(Carré & Empey, 2016; D'Amico et al., 2011). SMA, nadir görülen bir hastalık olduğu için coğrafyalara göre prevalansı ve insidansı üzerinde yapılan çalışmalar oldukça azdır ve farklılık göstermektedir. Çalışmaların çoğu genetik tanıdan ziyade klinik tanıya dayanmakta olup çoğunlukla Avrupa merkezli çalışmalar bulunmaktadır(Verhaart et al., 2017).Hem genetik laboratuvarlarından (TREAT-NMD)hem de uluslararası kayıttan edilen verilere göre Avrupa'daki insidansın,100.000 canlı doğumda ortalama 11.9 (~1/3.900–16.000'dir)olduğu tahmin edilmektedir(Mercuri, Sumner, Muntoni, Darras, & Finkel, 2022).

Tablo 2.1. 2020-2021 verilerine göre SMA insidansı(Mercuri et al., 2022)

Nüfus	İnsidans
Masachusetts	1:18.957
New York	1:28.137
New South Wales	1:11.554
Almanya	1:6.910

SMA hastaları değerlendirildiğinde , 2004 verilere göre; ~%58'ni SMA tip I, ~%29'ni SMA tip II ve~%13'ni SMA tip III hastalarının oluşturduğu görülmüştür. 2017 verilerine göre ise, ~%60'nı SMA tip I, ~%20'ni SMA tip II ve yine ~%20'ni SMA tip III hastalarının oluşturduğu görülmüştür(Mercuri et al., 2022). SMA, pediatrik nöromusküler hastalıklar arasında Duchenne Musküler Distrofi (DMD)' den sonra en sık görülen ikinci hastalıktır(BORA, 2007). Ancak, hamilelik öncesi taşıyıcı tarama, doğum öncesi teşhis ve gelişmiş üreme teknolojilerine erişim ile dünyanın birçok bölgesinde SMA insidansının azalacağı ön görülmektedir(Mercuri et al., 2022). Ülkemizde de Ocak 2023'den itibaren yeni doğan tarama programı ve evlilik öncesi taraması başlamıştır.

2.1.3. Klinik Fenotiplerin Sınıflandırılması

SMA klinik olarak semptomların başlangıç yaşı, ulaşılan en yüksek motor fonksiyonu ve ölüm yaşına göre beş alt tipte sınıflandırılmaktadır(Kakazu et al., 2021)

Tablo 2.2. SMA klinik sınıflandırma (Faravelli et al., 2015; Keinath, Prior, & Prior, 2021; Mercuri et al., 2022; Monani, 2005)

SMA Tip	Vaka yüzdesi	Hastalığın Başlangıcı	Ulaşılan kilometre taşı	Klinik Belirtiler	Yaşam Süresi
Tip 0 (Tip I varyantı)	<%1	Prenatal ve doğum	Yok(oturamaz, baş kontrolü yok)	Şiddetli zayıflık, hipotoni, solunum yetmezliği, yetersiz beslenme kontraktürler	Doğumdan sonraki haftalarda ölüm
Tip I	%50	Doğum ila 6 ay	Oturamaz, baş kontrolü yok.	Baskın proksimal kas zayıflığı, solunum yetmezliği hipotoni, dil fasikülasyonları, yetersiz beslenme	Ölüm <2
Tip II	%27	6-18 ay	Destekli oturabilir, baş kontrolü var	Proksimal kas güçsüzlüğü, motor gelişiminde gecikme, skolyoz, desteğe ihtiyaç duyarlar.	Ortalama >20 yıl
Tip III	%30	Tip IIIa: 18 ay-3 yıl Tip IIIb: 3-30 yıl	Bağımsız olarak oturabilir ve yürüyebilir	Proksimal kas güçsüzlüğü, normal yaşam beklentisi	Normal yaşam
Tip IV	<%5	>30 yıl	Bağımsız yürüyebilir.	Normal yaşam	Normal yaşam

SMA Tip 0: Tip I varyantı (tip Ia,) olarak da bilinen tip 0, SMN2 geninin en az oranda bulunmasıyla ortaya çıkan en nadir ve şiddetli formudur(Chong et al., 2021). Bu nadir vakalar, genellikle artrogripozis multipleks konjenita ile birlikte azalmış fetal hareketle doğum öncesi (in utero) başlangıcı ile ortaya çıkar(Burr & Reddivari, 2021). Hastalar doğumdan hemen sonra derin hipotoni, şiddetli zayıflık ve ciddi solunum sıkıntısına sahiptir(T.-H. Chen, 2020b). Ölüm genellikle doğumda ya da yaşamın ilk ayında meydana gelir(Burr & Reddivari, 2021). SMA tip 0'lı hastalara ilişkin

Nusinersen ya da gen tedavisi ile tedavi edildiğine dair kesin bir bilgi henüz bilinmemektedir(Prior, Leach, & Finanger, 2020).

SMA TİP I: Werdnig Hoffmann hastalığı olarak da bilinen SMA tip I tüm vakaların yaklaşık %50'si oluşturan ve en yaygın formdur(Faravelli et al., 2015). Bazı kaynaklarda tip I SMA, intra uterin yaşamda başlayan ve doğumda görülen tip I a (SMA tip 0), semptomları 3 aylıktan önce başlayan tip Ib ve 3 ila 6 aylıkken başlayan tip Ic olmak üzere üç alt gruba ayrılır(Darras, Markowitz, Monani, & Darryl, 2015). Bebekler doğumda normaldir, ancak kısa bir süre sonra (doğum ila 6 ay arasında) hipotoni, güçsüzlük, yetersiz beslenme ve solunum yetmezliğine görülür(Chiriboga, 2017). Dilde atrofi veya fasikülasyonlar, yutma güçlüğü, baş tutamama, simetrik proksimal kas zayıflığı, motor becerilerinin olmaması, derin tendon reflekslerinin azalması ya da olmaması ve zayıf kas tonusu başlıca klinik belirtileri arasındadır(Burr & Reddivari, 2021). Ayrıca interkostal kasların zayıflığı ve korunmuş diyafram işlevi paradoksik solunuma(ya da karın solunuma) çan şeklinde bir göğüs deformitesine yol açar(Burr & Reddivari, 2021). Bilişsel işlev normaldir. Son yıllarda hastalara, yardımcı ventilasyon ve diğer müdahalelerin kullanımıyla sağkalımda bir miktar artış sağlandığı bildirilmiştir(Darras et al., 2015). Ancak herhangi bir dış müdahale yokluğunda(solunum desteği olmadan)genellikle 2 yaşından önce kaybedilirler(Mercuri, Pera, Scoto, Finkel, & Muntoni, 2020).

SMA Tip II: Dubowitz hastalığı olarak bilinen SMA tip II hastaları tüm vakaların %27'sini oluşturlar(Chiriboga, 2017; Gandhi et al., 2021). Hastalığın başlangıcı genellikle 6 ila 18 aylıkken güçsüzlük başlangıcı ile karakterizedir(Mercuri et al., 2020). Hastalar desteksiz oturabilir, bazıları ayakta durabilir ancak hiçbir zaman desteksiz/bağımsız yürüme becerisini kazanamazlar(Chiriboga, 2017). Klinik belirtiler arasında kaba motor becerileri kazanımının çok yavaş olması, derin tendon reflekslerinin olmaması, üst ekstremitelerde ince tremorlar ve yüz güçsüzlüğü bulunur(D'Amico et al., 2011; Faravelli et al., 2015). İlave olarak tip II hastalarda yaşamın ilk yıllarında eklem kontraktürleri ve kifoskolyoz görülebilir(D'Amico et al., 2011). Skolyoz ve interkostal kas zayıflığı, solunum yetmezliğine yol açarak yaşam kalitesini ve prognozu etkiler. SMA tip II hastalarının yaklaşık %70'i 25 yaşına kadar yaşarken bir kısmı ise 3. dekada kadar yaşayabilir(Burr & Reddivari, 2021).

SMA Tip III: Kugelberg Welander sendromu olarakta bilinen SMA tip III tüm vakaların yaklaşık %30'unu oluşturur(Chong et al., 2021). Tip III SMA, 18 ay ila 3 yıl arasında başlayan tip IIIA ve 3 yıldan sonra başlayan tip IIIB olmak üzere iki alt gruba

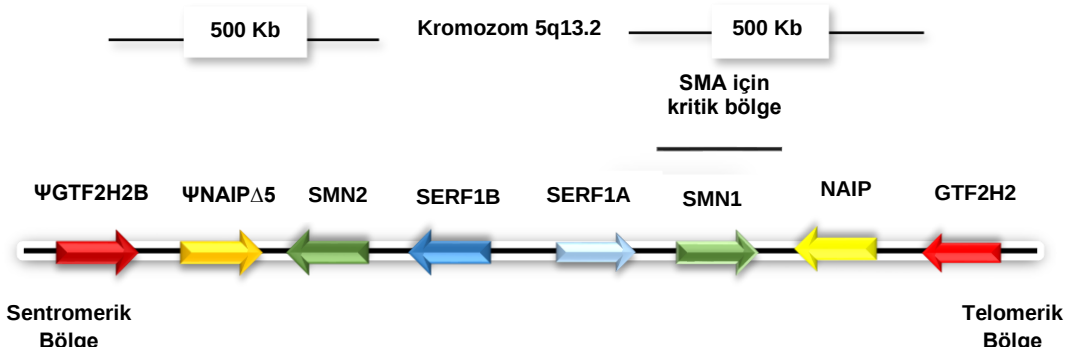
ayrılır(Faravelli et al., 2015). Hastalar tipik olarak tüm önemli motor kilometre taşlarına ulaşırlar ve bazıları bağımsız yürüme yeteneği kazanırlar. Ancak bebeklik döneminde özellikle kollardan daha çok bacakların etkilendiği proksimal kas zayıflığı geliştirirler. Bu nedenle hastaların bir kısmı tekerlekli sandalyeye ihtiyaç duyarken bir kısmı ise hafif kas zayıflığı ile yürümeye devam edebilir(D'Amico et al., 2011). Bağımsız yürümeyi kaybeden hastalarda sıklıkla skolyoz deformitler, obezite ve harekette azalmaya bağlı olarak osteoporoz gibi ilave problemlerde gelişebilir(D'Amico et al., 2011). Buna karşın kardiyak ve bilişsel fonksiyonlar normaldir ve solunum sıkıntısı az ya da hiç yoktur(Prior et al., 2020).

SMA Tip IV: Tüm vakaların %5'inden azını oluşturan SMA tip IV, yetişkinlikle (20'li - 30' lu yaşlarda) başlar ve kas güçsüzlüğü ile kendini gösterir(Chong et al., 2021; Prior et al., 2020). Klinik belirtiler arasında hipotoni, kas distrofisi, azalmış derin tendon refleksleri görülebilir. Gelişim basamaklarını normal sürede kazanırlar ve klinik seyir daha hafiftir.(Faravelli et al., 2015; Prior et al., 2020)

2.1.4. Moleküler Genetiği

2.1.4.1. SMA Gen Bölgesi

SMA' ya neden olan hastalık geni 1990 yılında kromozom 5q bölgesine genetik bağlantı analizi ile haritalanmıştır. Duplikasyon ve inversiyonlar için kromozom 5' in bu bölgesi(500kb'lık) telomerik ve sentromerik olmak üzere 2 kopyası bulunan en az 4 gen içermektedir: SMN (SMN1/SMN_T ve SMN2/SMN_C), NAIP(neuronal apoptosis inhibitory protein, NAIP_T/NAIP_C), GTF2H2(P44, general transcription factor IIH) ve SERF1 (H4F5, small EDRK-rich factor 1)(Butchbach, 2016; Sumner, 2006). SMA'lı hastalarda tüm bu genlerin homozigot delesyonları görülse de NAIP,P44, SERF1 genleri hastalığa neden olmamaktadır(Brunhilde Wirth, 2000). Bu üç gen hastalığın şiddeti ve süresi ile ilişkili hastalık modifiye edici gen olarak tanımlanmaktadır(He et al., 2013). Hastalığa asıl neden olan gen SMN1'dir(Brunhilde Wirth, 2000).



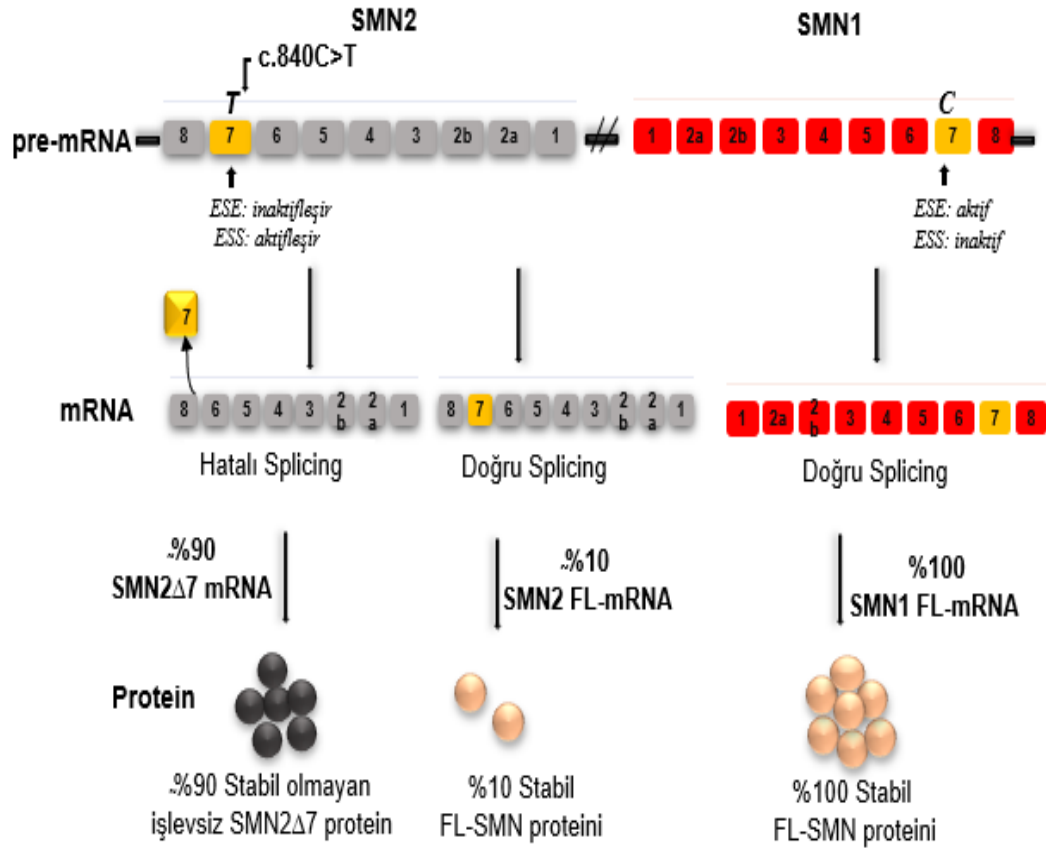
Şekil 2.3. SMN genlerinin organizasyonu. Kromozom 5'in (500 Kb)bu bölgesinde SMN, NAIP, P44 ve SERF1 olmak üzere 4 adet protein kodlayan gen bulunur (Butchbach, 2016)

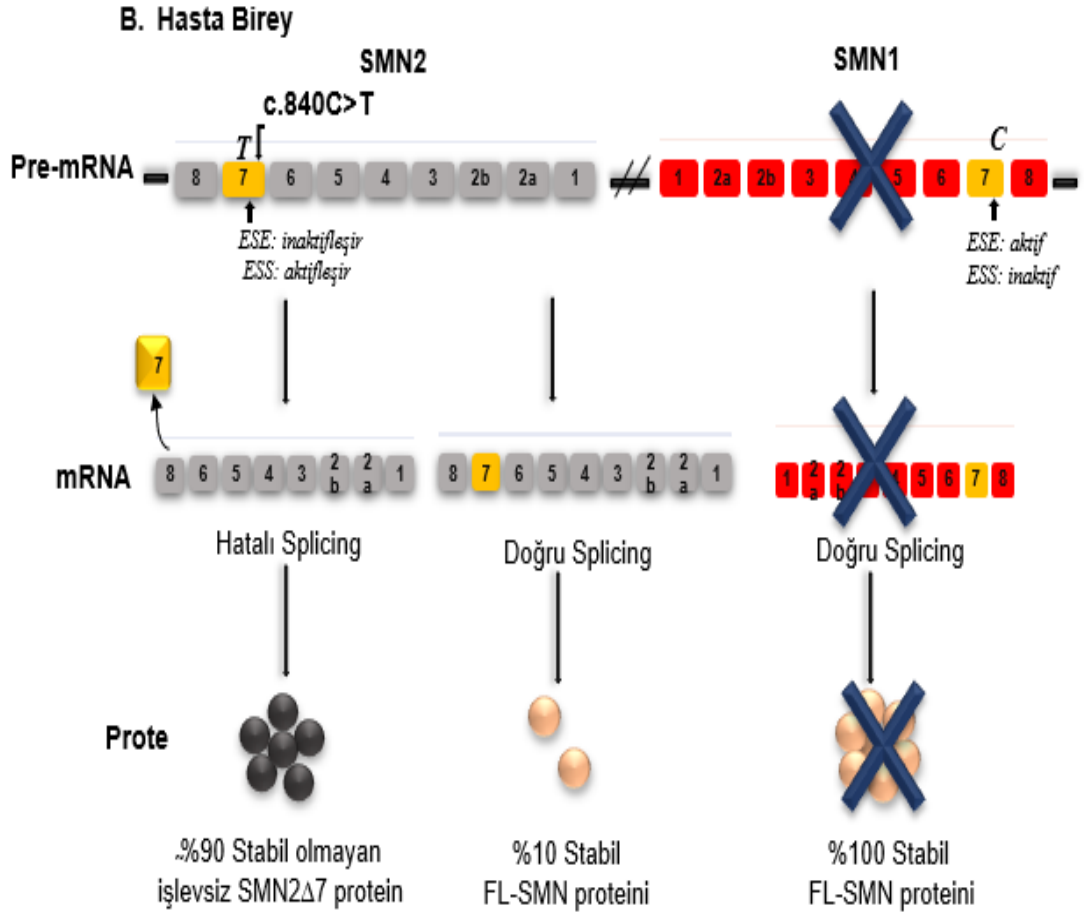
2.1.4.2. SMN1 ve SMN2 Genleri

SMA'nın 5q13 üzerinde tanımlanmasının ardından 1995 yılında Levebvre ve ark. hastalığa neden olan SMN genlerini (SMN1 ve SMN2) tanımlamışlardır(Sumner, 2006). Tüm SMA vakalarının ~%95'nin SMN1 geninin ekson 7 ve 8'de ya da sadece ekson 7'de homozigot delesyondan kaynaklandığı görülürken %5'nde intragenik ya da de novo mutasyonlardan(%2) kaynaklandığı görülmüştür(Carré & Empey, 2016; Mercuri et al., 2022). SMN geninin SMN1 ve SMN2 olmak üzere iki fonksiyonel kopyası bulunur ve her iki kopya da insanda eksprese edilmektedir(Sendtner, 2010). SMN1 ve SMN2 geni, omuriliğin motor nöronlarında bulunan SMN proteinini kodlamaktadır(D'Amico et al., 2011). Yaklaşık olarak 20 kb uzunluğunda genomik bölgeye yayılan ve 9 eksondan (ekson 1,2a,2b,3,4,5,6a,7,8)oluşan SMN genleri (SMN1 ve SMN2) %99 oranında homoloji göstermektedir(Keinath, Prior, & Prior, 2021; Lunn & Wang, 2008). Ancak SMN2 geni SMN1 geninden ekson 7, ekson 8, intron 6'da 1nt'lik, intron 7 de ise 2 nt'lik bir fark gösterir(B Wirth, Mendoza-Ferreira, & Torres-Benito, 2017). Bu farklılıklardan en kritik olanı ekson 7'nin 6. Konumunda bulunan Sitozin (C) nükleotidinin Timin (T) nükleotidine (C>T, c840 C>T) dönüşümüdür(Shababi, Lorson, & Rudnik-Schöneborn, 2014). SMN2-ekson 7'deki bu C6T geçişi, ekson 7'nin SMN transkriptlerine dahil edilmesini düzenleyen bir Exonic Splicing Enhancer (ESE) dizisinin ortasına denk gelmektedir(Butchbach, 2016). Ekson 7' deki C6T geçişi ile ESE dizisi(CAGACAA) etkisiz hale gelirken aynı anda SMN2 geninin son kodlama eksonu için Exonic Splicing Silencer (ESS(UAGACAA)) dizisi oluşmaktadır(Mercuri et al., 2022). Bu yüzden, ESE'ye bağlanması gereken, serin ve arginin bakımından zengin SR protein ailesinin bağlantısı bozulur(Singh et al., 2020). Yeni oluşan ESS dizilerine ise pre-mRNA paketlenmesi ve stabilizasyonundan sorumlu olan RNA baskılayıcı bir protein olan heterojen ribonükleoprotein (hnRNP)A1 bağlanır(Q. Li, 2020). Kısaca, C6T geçişi translasyonel olarak sessizdir ve beklenen herhangi bir aa değişikliğine yol açmamaktadır(Lunn & Wang, 2008; Mercuri et al., 2022). Ancak post-transkripsiyonel bir mekanizma olan Alternatif Splicing işleminde bir hataya neden olur ve ekson 7 atlanır(Prior et al., 2020). Dolayısıyla, SMN2 transkriptlerinin çoğu ekson 7'den yoksundur ve C terminal ucunda 16 aa içermeyen kesilmiş, stabil ve işlevsel olmayan bir protein (SMN Δ 7) oluşmaktadır(Mercuri et al., 2022).Sonuç olarak, SMN2 yetersiz FL-SMN proteinini

üretrek SMN1 kaybını tam olarak telafi edemez ve SMA'yı engelleyemez((İftikhar et al., 2021; Q. Li, 2020) .

A. Sağlıklı Birey

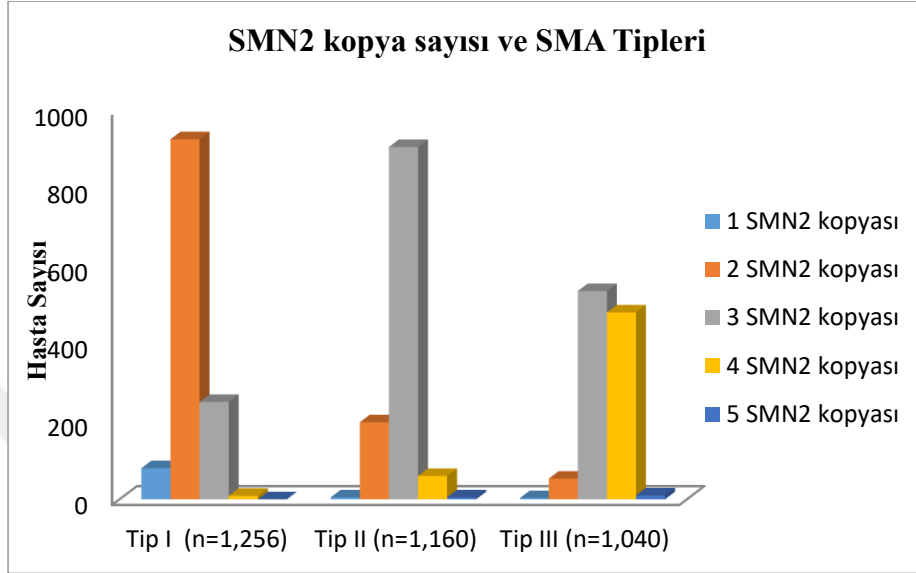




Şekil 2.4. Hasta ve sağlıklı bireylerde SMN1 ve SMN2 mRNA'dan splicing ve protein oluşumunu gösteren şematik diyagram. (Chong et al., 2021; Mercuri et al., 2022; Monani, 2005).

Her SMN2 kopyası tarafından oluşturulan proteinin yaklaşık %10 kadarı işlevseldir, bu da onu hastalık modifiye edici gen yapmaktadır(Keinath et al., 2021). Artan SMN2 kopya sayısı, daha hafif seyreden bir fenotip ile ilişkilendirilmiş olup hastalığın şiddeti ve ilerlemesi modüle edilebilmektedir(Bonanno et al., 2020; Keinath et al., 2021). Tip 0 SMA hastaları, en az sayıda SMN2 kopyası ile karakterizedir ve tipik olarak 1 SMN2 kopyası bulundurulur(Neil & Bisaccia, 2019). Tip I SMA hastalarının %80'ni iki SMN2 kopyası bulundurulur. Ancak, bu hastalar bazen bir ya da üç SMN2 kopyası da bulundurabilirler. Tip II SMA hastalarının %78'ni üç SMN2 kopyası bulundurulur. Bu hastalar bazen 2 ya da 4 SMN2 kopyasını da bulundurabilirler. Tip III SMA hastalarının %93' ü istisnalar hariç 3 ile 4 SMN2 kopyası bulunur. Tip IV hastaları ise, tipik olarak 4 SMN2 kopyası taşırlar. Farklı çalışmalarda da benzer frekanslar bulunmuştur(Mercuri et al., 2022; Neil & Bisaccia, 2019). Ancak, SMA'nın klinik şiddeti özellikle SMA tip II ve III hastalarında, sadece SMN2 kopya sayısına bakılarak ön görülemez. İncelemelerde iki ya da üç SMN2 kopyasına sahip bireysel SMA tip I,II ya da III hastaları bildirilmiştir. Sonuç olarak,

bu veriler dikkate alındığında SMN2kopya sayısının hastalık şiddetinin tek değiştiricisi olmadığı görülmüştür(Mercuri et al., 2022). Ek olarak, PLS3 (Plastin 3), NCALD (Neurocalcin delta) ZPR1 (çinko parmak proteini), NRN1 (Neuritine 1), H4N4, IGF1 ve UBA1 dahil olmak üzere bir çok faktörün SMA şiddetini modifiye ettiği öne sürülmüştür(Singh, Howell, Ottesen, & Singh, 2017; Singh et al., 2020).

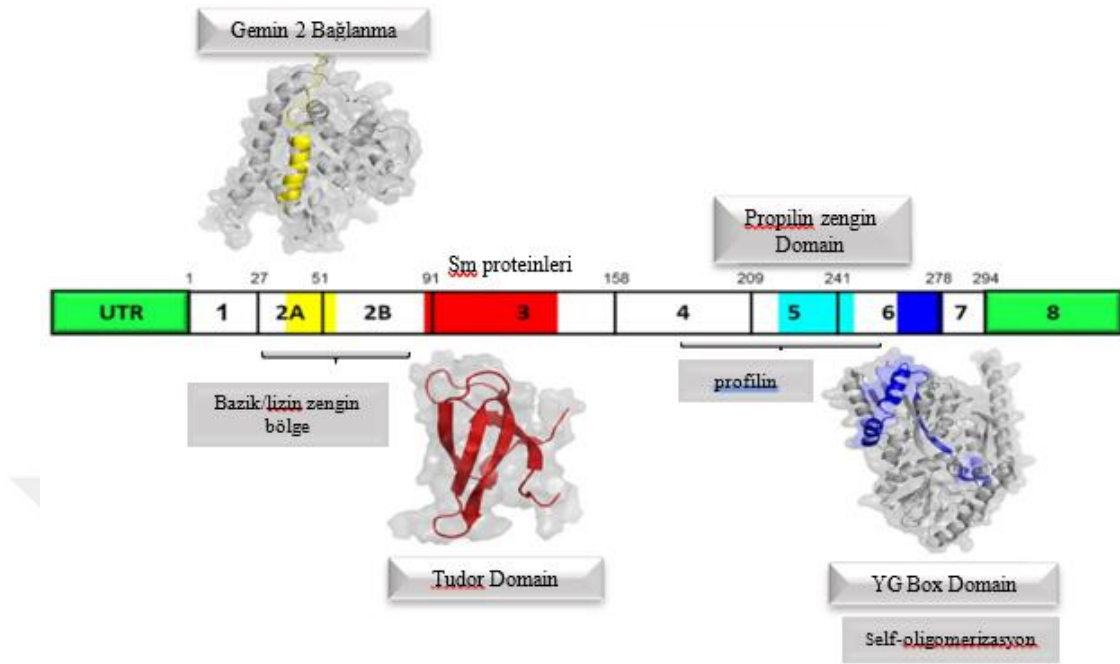


Şekil 2.5. SMN2 kopya sayıları ve SMA türlerinin dağılımını gösteren grafik (Mercuri et al., 2022).

2.1.4.3. SMN Proteini ve İşlevi

SMN genleri tarafından kodlanan FL-SMN proteini, daha önce tanımlanan hiçbir protein ile homoloji göstermeyen 294 aa'ten oluşan 38kDa'lık bir proteindir(Monani, 2005). SMN proteini, stoplazmada ve çekirdekte "Cajal" ve "gem" adı verilen yapılarda lokalizedir(D'Amico et al., 2011). SMN proteini "housekeeping" işlevleriyle tutarlı olarak memeli hücrelerinin tüm dokularında eksprese edilir(D'Amico et al., 2011; Fan & Simard, 2002). Embriyogenez sırasında yüksek oranda eksprese edilen SMN proteinin, doğum sonrası dönemde ekspresyonunun azaldığı gözlemlenmiştir(Gandhi et al., 2021). Ayrıca beyin, karaciğer ve böbrekte yüksek seviyede eksprese edilirken, kalp ve iskelet kasında orta seviyede, fibroblast ve lenfositlerde ise düşük seviyede eksprese edildiği bulunmuştur(Coover et al., 1997). 9 ekson tarafından kodlanana SMN proteini, farklı fonksiyonel bağlayıcı alanları bulunmaktadır: Ekson 2 tarafından kodlanan lizin bakımından zengin bir bazik bölge, ekzon 3 tarafından kodlanan bir Tudor motifi, ekzon 4 ve 5 tarafından kodlanan propilin (P) bakımından zengin bölge ve ekzon 6

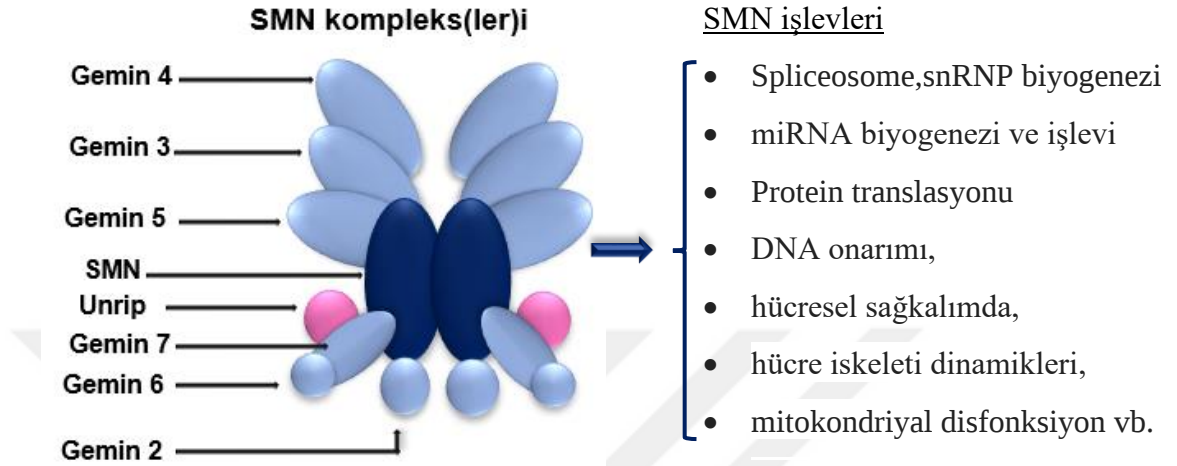
tarafından kodlanan bir tirozin/glisin (YG)kutuusna sahip bölge (Chong et al., 2021; Paul, Gushue, Kotha, & Shell, 2021).



Şekil 2.6. FL-SMN proteininin şematik gösterimi(Chong et al., 2021; Mercuri et al., 2022).

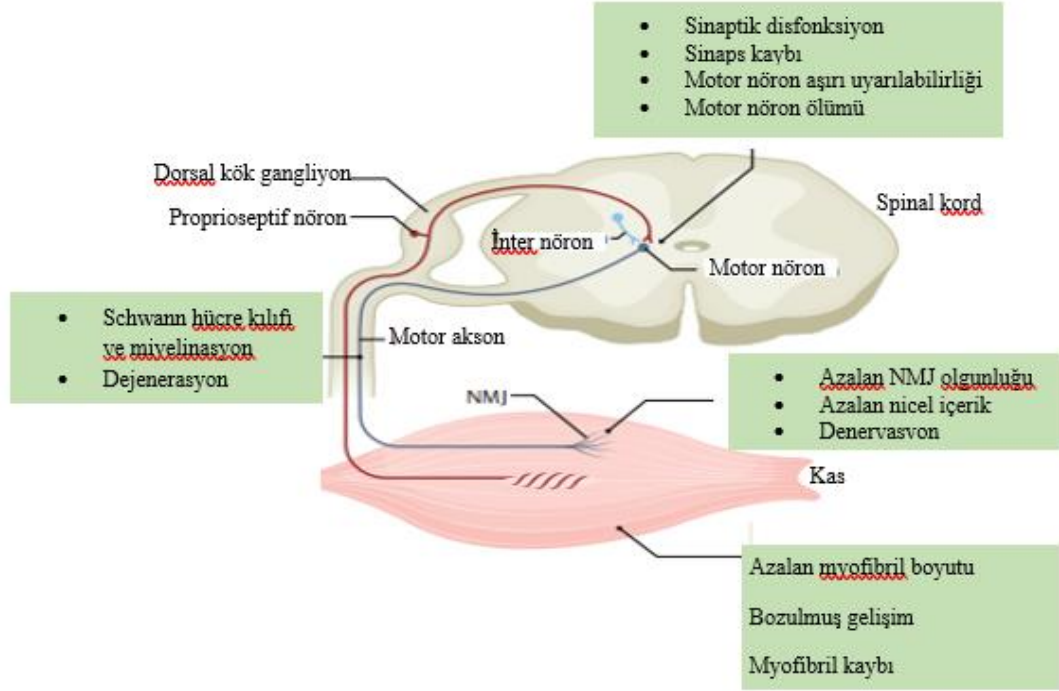
Genellikle oligomerize formda bulunan SMN, Gemin 2-8 ve üridin bakımından zengin unrip proteinleri dahil olmak üzere birçok proteine bağlanarak multiprotein yapıda bir kompleks oluşturmaktadır(Mercuri et al., 2022; Tisdale & Pellizzoni, 2015). SMN kompleksi, RNA işlenmesinin farklı kısımlarında yer alan Sm proteinleri(Smith core proteinleri), RNA helikaz, A fibrilların, GAR1, RNP'ler hnRNP U, hnRNPQ ve hnRNP R gibi pek çok proteinle de etkileşime girmektedir. Buna bağlı olarak SMN kompleksi, pre-mRNA splicing işleminde yer alan Spliceosome'un kritik bir bileşeni olan küçük nükleer ribonükleoproteinlerin (snRNP'lerin) biyogenezinde rol oynamaktadır(Sumner, 2006). Çoğunlukla RNA ile ilişkili proteinlerde bulunan SMN Tudor motifi, Sm core proteinlerinin arginin ve glisin bakımından zengin bölgelerine(RGG alanı) bağlanarak snRNP biyogenezinde işlev görür ve spliceosome birleşmesini kolaylaştırır. SMN ve Sm proteinlerin ilişkisini bozan bu alandaki mutasyonlar genellikle SMA hastalığına neden olabilir(Chaytow, Huang, Gillingwater, & Faller, 2018; Coover et al., 1997). Bunun yanı sıra Tudor motifinin, snRNP biyogenezinde gerekli olan cajal cisimciklerin (CB'ler) bir belirteci olarak gösterilen coilin etkileşimlerinden sorumlu olduğu da bildirilmiştir(Coover et al., 1997). SMN protein eksikliği, snRNP birleşmesinin azalmasına bağlı olarak splicing

işleminde hataya ve motor nöron hasarına neden olur(Faravelli et al., 2015; Reed & Zanoteli, 2018). Aynı zamanda SMA hayvan modelleri üzerinde yapılan çalışmalarda, snRNP'lerin birleştirme yeteneği ile SMA fenotiplerinin ilişkili olduğu da bildirilmiştir(T.-H. Chen, 2020b).



Şekil 2.7. SMN komplekslerini ve işlevlerini gösteren özet şematik diyagram(Faravelli et al., 2015; Mercuri et al., 2022; Singh et al., 2017).

SMN proteininin, aksonlarda, motor nöronların nörit ve büyüme konilerinde lokalize olduğu bilinmektedir(Oskoui & Kaufmann, 2008). Dolayısıyla SMN proteindeki azalma, motor nöron kaybı, nöranal hücrelerde farklılaşma, nörit uzantısı NMJ gelişimi ve işlevindeki anormalliklerle de ilişkilendirilmiştir(Karasu et al., 2022). Ayrıca SMN proteininin, çizgili kaslardaki Z bantlarında da yer alması, patogenezin sadece motor nöron gövdesini içermediğini düşündürmektedir(Oskoui & Kaufmann, 2008).



Şekil 2.8. SMA' da, omurilik, motor nöron, motor akson, nöromüsküler kavşak ve kasta SMN eksikliğinin neden olduğu temel fonksiyonel ve morfolojik anormalliklerin şematik gösterimi. SMA' da motor sisteminin birçok yönü bozulmaktadır. (Mercuri et al., 2022; Tisdale & Pellizzoni, 2015)

Çalışmalarda, düşük SMN düzeyinin iskelet kası, kalp, karaciğer, dalak ve kemik gibi yapıları da etkileyen SMA'nın multisistem bir hastalık olduğu gözlemlenmiştir (Gandhi et al., 2021). SMN proteinin işlevi ve SMA'daki motor nörona özgü patolojisinin nedeni üzerine çalışmalar yapılsa da hala anlaşılamayan kısımlar vardır. Bu nedenle SMN proteinin işlevi ve SMA patogenezinin aydınlatılmasına dair daha fazla çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır. Günümüzde bu alanda yapılan çalışmalar devam etmektedir.

2.1.5. SMA Teşhis ve Tanı Yöntemleri

Daha önceleri, SMA tanısı için elektromiyografi ve kas biyopsisi yaygın olarak kullanılmaktaydı. (Mercuri et al., 2022). Ancak moleküler genetik testlerdeki ilerlemelerle birlikte bu yöntemler günümüzde çok tercih edilmemektedir. Hastalar, klinik muayenenin ardından ilk olarak genetik testlerden geçmelidir (Mercuri et al., 2022).

Genetik Tanı : Genetik tanı oldukça ucuz ve basittir. (Mercuri et al., 2022) SMA hastalarının yaklaşık %95'inde SMN1 geni ekson 7'deki (ve ekson 8) homozigot delesyonlar görülmektedir. SMA'nın tanısında, hastalığın fenotipi ile ilgili bilgi veren SMN2 kopya sayısının da ölçülmesi gerektiği vurgulanmış olup genetik testler ile

ölçülebildiği gösterilmiştir. Hem SMN1 genindeki delesyon hemde SMN2 kopya sayısı, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), yeni nesil dizileme yöntemi (NGS) ve multipleks ligasyon probu amplikasyonu (MLPA) gibi yöntemlerle belirlenmektedir. Testler, %95 duyarlılık ve %100 özgüllük ile güvenilir sonuçlar vermektedir(Burr & Reddivari, 2021; Mercuri et al., 2022). Tarama programlarında, taşıyıcı testi ve doğum öncesi tarama mevcuttur(Faravelli et al., 2015).

Taşıyıcılık Testi : Tek bir SMN1 kopyasının saptanması taşıyıcılık durumunu göstermektedir. Taşıyıcılık testi SMN1 kopya sayısının belirlenmesini sağlayan Kantitatif gen dozajı analizleri ile (Kantitatif PCR , MLPA. CMA gibi) yapılabilmektedir(691, 2017).

Prenatal tanı; Koryonovillus örnekleme ya da amniyosentez ile yapılmaktadır(Mercuri et al., 2022). Ancak prenatal klinik sonucu, SMN2 kopya sayısının her bir SMA alt tipine özgü olmamasından dolayı hastalığın ciddiyetini ön göremez(Faravelli et al., 2015).

Diğer Testler : Atipik SMA vakaları ve SMN1 ekson 7 delesyonları tespit edilemeyen kişilerin teşhisi için , EMG, kas biyopsisi ve serum kreatin kinaz (CK) seviyelerinin ölçümü gibi testler kullanılmaktadır (Faravelli et al., 2015).

- Kan örneklerinde bakılan ve kas hasarının bir göstergesi olan serum CK seviyeleri SMA hastalarında 2 ila 4 kat arasında artış gösterebilmektedir. Ancak birçok nöromusküler hastalıkta artış göstermesinden dolayı hastalığın kesin teşhisinde kullanılamaz.
- EMG, çoğunlukla denervasyonu doğrulamaktadır. Bu, fibrilasyon poansiyelleri, pozitif keskin dalgalar ve ara sıra fasikülasyonlar dahil olmak üzere anormal spontan aktivitelerden oluşur.
- Kas biyopsisi, önceden SMA hastalığının tanısında tercih edilse de yöntemin invaziv olması ve genetik testlerdeki ilerlemelerle birlikte günümüzde çok tercih edilmemektedir.

Bu elektrofizyolojik testler klinik fenotip ve motor performansı ile korelasyon göstermiştir(Burr & Reddivari, 2021).

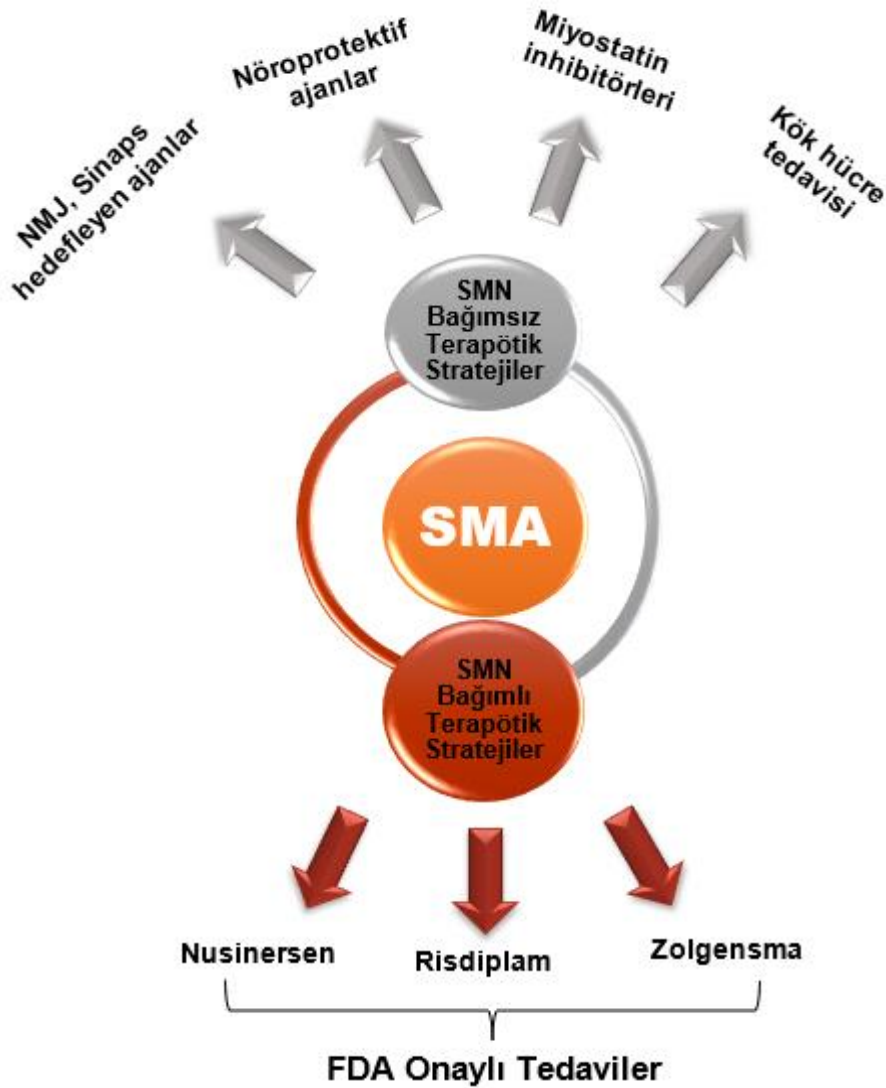
Yeni doğan taraması SMA ile doğan bebeklerin %95`ini tanımlar. SMA yeni doğan taraması uygulaması, SMA gerçek insidansı daha iyi tahmin edilmesi, semptomların başlangıcından önce tedaviye başlanma imkanı prognostik ve predictive biyobelirteçlerin tedaviye nasıl yanıt verdiğinin daha iyi anlaşılması için imkan

sağlayacaklar(Mercuri et al., 2022). Aynı zamanda, SMA biyobelirteçlerinin ve güvenilir somut ölçütlerinin geliştirilmesi, terapötik yanıt değerlendirilmesi için yol gösterici olacaktır. Bu nedenle biyobelirteçlerin tanımlanması için çalışmalar hala devam etmektedir(Faravelli et al., 2015).

2.2. SMA İçin Terapötik Hedefler

Günümüzde SMA için kesin bir tedavi yöntemi yoktur. Bu yöndeki çalışmalar hız kaybetmeden devam etmektedir. SMA için geliştirilen terapötik hedefler, SMN bağımsız ve SMN bağımlı terapötik stratejiler olarak iki grupta incelenebilir.

SMN bağımsız terapötik hedefler arasında Nöroprotektif ajanlar, Miyostatin inhibitörleri, NMJ, Sinaps hedefleyen ajanlar, Sinaps ya da Nörotransmitteri hedefleyen ajanlar ve kök hücre tedavisi gibi yöntemler bulunmaktadır(T.-H. Chen, 2020b).



Şekil 2.9. SMA tedavisine yönelik geliştirilen terapötik stratejiler(T.-H. Chen, 2020b)

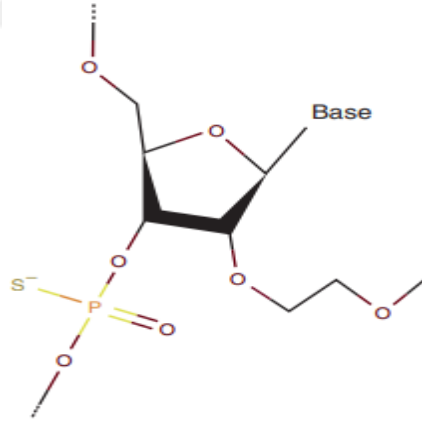
Hastalığın altında yatan genetik mekanizmaların anlaşılması ve hastalığın fenotipinin SMN protein seviyeleri ile ilişkili olduğunun anlaşılmasıyla, SMA'yı tedavi etme çabaları FL-SMN protein üretimini arttırmak üzerine olmuştur(Keinath et al., 2021). Şuanda SMN bağımlı FL-SMN protein düzeylerini arttırmaya yönelik birkaç farklı yaklaşım/hedef bulunmaktadır:

- I. SMN2 transkriptlerine ekson 7'nin dahil edilmesini arttırmak
- II. SMN2 gen ekspresyonunu arttırmak
- III. SMN proteininin stabilize edilmesi ya da SMN geninin değiştirilmesidir (Scoto, Finkel, Mercuri, & Muntoni, 2017).

Bu amaçla son zamanlarda SMN bağımlı ve FDA onaylı, antisens oligonükleotit (ASO) nusinersen , Risdiplam ve onasemnogene abeparvovec (Zolgensma AVXS-101) tedavileri SMA hastaları için uygulanabilir hale gelmiştir(Messina & Sframeli, 2020)

2.2.1. Nusinersen

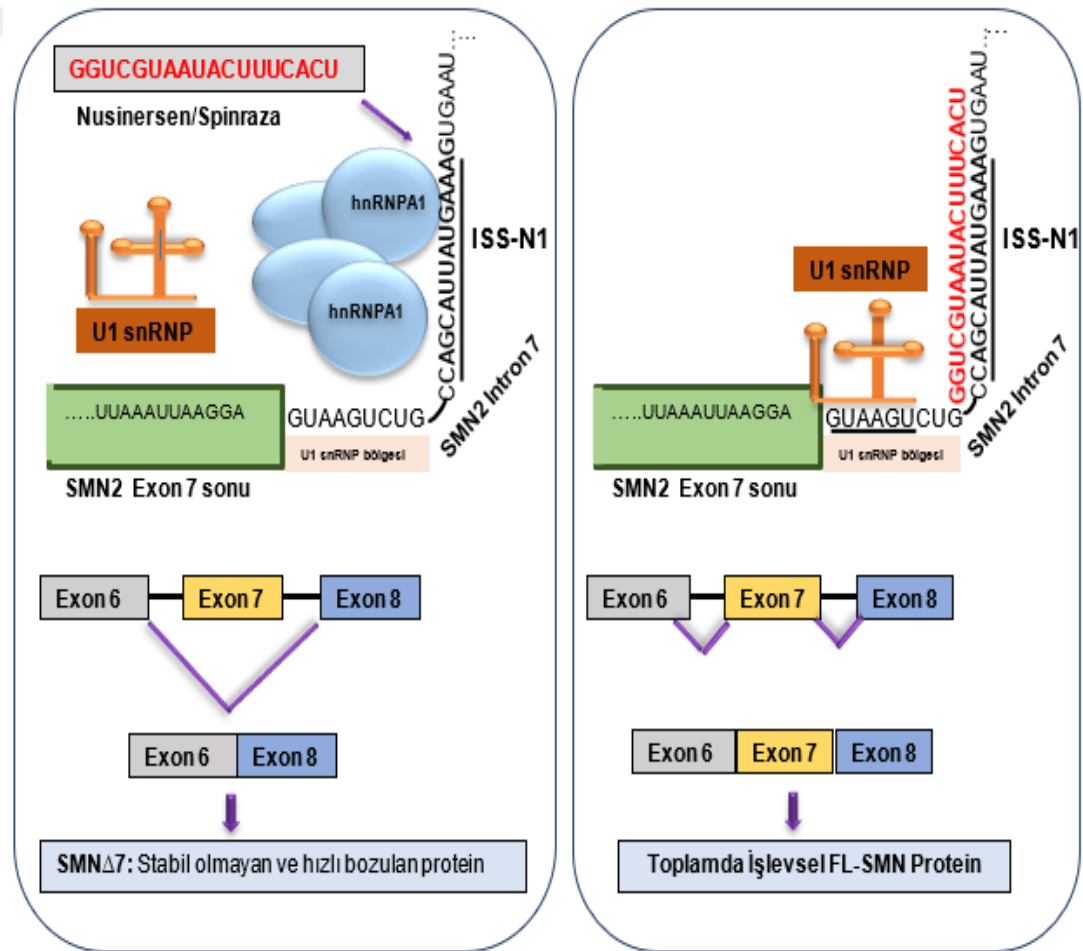
Biogen'den Nusinersen (Spinraza) pediatrik ve yetişkin SMA hastalarının tedavisi için hem FDA (Aralık 2016'da) hem de Avrupa İlaç Ajansı (EMA) (Haziran 2017'de) tarafından onaylanan ilk tıbbi tedavidir (T.-H. Chen, 2020b).



Şekil 2.10. Nusinersen yapısı(Goodkey, Aslesh, Maruyama, & Yokota, 2018)

Nusinersen'nin gelişimi, Singh Labratuvarı'nda, splicing işlemi sırasında mRNA ekson 7 atlamasında yer alan SMN2'nin ISS-NI dizisinin tanımlanmasıyla başlamıştır(Ross & Kwon, 2019). 15 nt uzunluğunda ISS-NI dizisi SMN2 ekson 7 dahil edilmesi üzerinde güçlü bir inhibitör etkiye sahiptir. Bu nedenle, ASO tedavisi için bir hedeftir(Goodkey et al., 2018). ASO' ların kimyasal modifikasyonları ve uygulama yöntemleri üzerinde yapılan ilerlemeler sayesinde nörodejeneratif hastalıkların tedavisi için ideal adaylardır(Schoch & Miller, 2017). Daha fonksiyonel

bir protein üretmek için, ilgili proteini kodlayan RNA'ya baz eşleştirme hibridizasyonu yoluyla seçici olarak bağlanmak üzere tasarlanan ASO'lar, kısa modifiye edilmiş sentetik nükleotid dizileridir(Chiriboga, 2017). Nusinersen, SMN2 pre-mRNA'da spesifik bir diziye bağlanmak üzere tasarlanmış splicing'ini(eklenmesini) değiştiren 2'-0-metiloksietil (2'MOE) ile modifiye edilmiş bir ASO'dur. Nusinersen ekson7'nin dışlanmasını uyaran heterojen nükleoproteinlerini (hnRNP A1/2 proteinleri) alınımlarını bloke etmek için SMN2 pre-mRNA'nın intron7'inde bulunan, ISS-N1 bölgesine bağlanır ve hnRNP'lerin alınımlarını sterik olarak engeller. Böylece, SMN2'nin ekson 7 alternatif eklenmesini düzenleyerek daha fazla FL-SMN protein üretilmesini sağlamaktadır(Bonanno et al., 2020; Mercuri et al., 2022).



Şekil 2.11. Nusinersen etki mekanizmasının şematik gösterimi(Talbot & Tizzano, 2017)

Nusinersen kan beyin bariyerini (KBB)geçemediği için BOS'a(Beyin Omurilik Sıvısı) intratekal olarak uygulanır ve merkezi sinir sistemi (MSS) hedef almaktadır (Albrechtsen, Born, & Boesen, 2020). Nusinersenin eliminasyon yarı ömrü, plazmada ortalama 63 ila 87 gün, MSS'nde ise ortalama 135 ila 177 gündür. Nusinersenin

metabolizması ve eliminasyonu, 3' ve 5' ekzonükleaz hidrolizi ve idrar atılımı ile gerçekleşmektedir. Klinik çalışmalarda, yaş ya da toplam vücut ağırlığı ile BOS konsantrasyonlarına dayalı dozlama kullanılsa da farmakokinetik çalışmalar, Nusinersen'in eliminasyonunun, yaş ve vücut ağırlığından bağımsız olduğunu göstermiştir(Albrechtsen et al., 2020; Ramos et al., 2019). Bu nedenle, tüm yaş ve ağırlıklar için 12mg olacak şekilde sabit bir doz uygulanması önerilmiştir (Keinath et al., 2021)

Nusinersen tedavisi günümüzde dünya çapında 10.000'den fazla kişinin tedavisinde kullanılmakta olduğu bilinmektedir. Ancak, Nusinersen'in hem çok pahalı olması hem de intratekal enjeksiyonla uygulanması tedaviyi zorlaştırmaktadır(T.-H. Chen, 2020b; Brunhilde Wirth, 2021).

2.2.1.1. Klinik Çalışmalar

Faz I Çalışması: Faz I denemesi, Chirboga ve ark. tarafından SMA tanısı almış tip II ve III hastalarında yapılmıştır. Çalışmada, tek bir intratekal nusinersen dozunun güvenilirliği, tolere edilebilirliği, farmakokinetiği, MSS SMN protein seviyeleri ve klinik sonuç ölçütleri değerlendirilmiştir. Çalışmaya 2 ila 14 yaş arasında olmak üzere 28hasta dahil edilmiştir. Hastalar 4 gruba ayrılarak, intratekal enjeksiyon ile BOS'a tek doz ilaç (1mg, 3mg, 6mg ve 9mg) uygulanmıştır. Hastalara, fiziksel ve nörolojik muayeneler, klinik laboratuvar testleri (hematoloji-idrar tahlili vs.), BOS sitokinleri, BOS laboratuvar testleri (hücre sayımı vs.) ve elektrokardiyografıtlar (EKG)uygulanmıştır. Klinik sonuç ölçütleri ise HFMSE motor ölçek analizleri ile değerlendirilmiştir. Değerlendirmeler sonucunda, hastalarda hiçbir ciddi yan etkilere rastlanmamıştır. En sık bildirilen yan etkiler arasında baş ağrısı ve sırt ağrısı bulunmakta olup bu yan etkilerin Nusinersen kaynaklı olmadığı düşünülmüştür. İntratekal enjeksiyon ile uygulanan Nusinersen hastalar tarafından iyi tolere edildi. Hastalarda, Nusinersen uygulaması öncesi seviyelere göre 6mg ve 9mg dozlarda nusinersen uygulaması yapıldıktan sonra SMN protein seviyeleri artmıştır. Ek olarak, 9mg tek bir intratekal nusinersen dozu HFMSE skorundaki klinik olarak anlamlı bir artış göstermiş ve hastaların motor fonksiyonlarında iyileşmeler gözlemlenmiştir. Bu çalışmadan elde edilen veriler, SMA tedavisi için Nusinersen'in kullanımını desteklemektedir(Chiriboga et al., 2016; Claborn, Stevens, Walker, & Gildon, 2019; Gidaro & Servais, 2019).

Faz II Çalışması: Faz II açık etiketli artan doz klinik çalışmasında, Finkel ve ark. infantil başlangıçlı SMA hastalarında çoklu intratekal nusinersen dozlarının, güvenilirliğini, tolere edilebilirliğini farmakokinetik ve farmakodinamik etkilerini değerlendirmiştir. Çalışma 20 hastadan oluşmaktadır ve dahil edilen hastalar, SMA semptom başlangıcı ve SMN1 homozigot gen delesyonu ya da mutasyonu olan 3 hafta ve 7 aylık arasında bebeklerdir. 20 katılımcıdan 4'üne, 1, 15 ve 85. günlerde her biri 6mg'lık yükleme dozları ardından ise 253. günde ve bundan sonraki her 4 ayda bir 12 mg idame dozlar verildi. 16 katılımcıya ise, aynı programa göre 12 mg yükleme ve idame dozlar uygulandı. Hastalara, fiziksel ve nörolojik muayeneler, klinik laboratuvar testleri, BOS laboratuvar testleri ve EKG uygulandı. Klinik sonuçlar, Hammersmith Bebek Nörolojik Muayenesi-Bölüm 2 (HINE 2) ve Philadelphia Çocuk Hastahanesi Nöromüsküler Bozukluklar Bebek Testi (CHOP INTEND) testleri değerlendirildi. Çalışma sonucunda, 16 katılımcıda 77 ciddi yan etki bildirilmiş ve en yaygın olarak solunum yolu enfeksiyonu ve solunum sıkıntısı ya da yetmezliği görüldüğü gözlemlenmiştir. Aynı zamanda, SMA I'in doğal klinik seyri ile karşılaştırıldığında 19 hastanın 16'nda motor fonksiyon puanlarında (HINE 2 ve CHOP INTEND) ve gelişimsel motor kilometre taşlarında iyileşme olduğu da gözlemlenmiştir. Bu olumlu sonuçlar nedeniyle, bu çalışma faz III çalışmasına ışık tutmuştur (Finkel et al., 2016; Q. Li, 2020; Neil & Bisaccia, 2019).

Faz III Çalışması: Finkel ve ark. SMA'lı 121 bebekte Nusinersen'in etkinliğini ve güvenilirliğini değerlendirmek için faz III çalışması (ENDEAR) yürütmüşlerdir. ENDEAR randomize, çift kör, sham kontrollü faz III çalışması, tarama sırasında ≤ 7 aylık SMA tanısı almış tip I bebekler üzerinde gerçekleştirilmiştir. Çalışmada hastalar, intratekal Nusinersen uygulaması ya da plasebo olacak şekilde 2:1 oranında randomize edildi. Nusinersen grubuna, intratekal enjeksiyonla 1., 15., 29., 64. günlerde yükleme dozlar, 183. ve 302. günlerde ise idame dozlar uygulanmıştır. Kontrol grubuna aynı günlerde sham işlemleri uygulanmıştır. Nusinersen'in dozu, dozun uygulandığı gün hastanın yaşına ve tahmini BOS hacmine göre (12mg ve eşdeğer dozlar) ayarlanmıştır. Klinik değerlendirme HINE2 ve CHOP-INTEND motor ölçek analizleri kullanılarak yapılmıştır. Değerlendirme sonucunda Nusinersen uygulaması alan hastalar, almayanlara kıyasla (%0'a kıyasla %51) daha fazla motor kilometre taşı yanıtına sahip oldukları bulunmuştur. Sonuç olarak, SMA'lı hastalar arasında Nusinersen grubunun, sağkalımı ve motor fonksiyonlarda iyileşme olma olasılığı kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Tüm bu çalışmalardan elde edilen veriler

değerlendirildiğinde Nusinersen 23 Aralık 2016'da SMA tedavisi için FDA onayı almıştır(Claborn et al., 2019; Finkel et al., 2017).

Mercuri ark. 6 aydan sonra semptom başlangıcı olan 126 SMA'lı çocukta Nusinersen'in etkinliğini ve güvenilirliğini değerlendirmek için faz III çalışması (CHERISH) yürütmüşlerdir. Bu çok merkezli, randomize, çift kör, sham kontrollü faz III çalışmasında hastalar, intratekal Nusinersen uygulaması ya da plesebo olacak şekilde 2:1 oranında randomize edildi. Hastalara, intratekal enjeksiyonla 1., 29., 85., ve 274. günlerde 12mg doz plesebo grubu da olmak üzere uygulaması yapılmıştır. Klinik değerlendirme HFMSE motor ölçek analizi ile yapılmış olup değerlendirme sonucunda, klinik olarak ≥ 3 puanlık artışla anlamlı bir iyileşme gözlemlenmiştir. Ayrıca, Nusinersen ve kontrol grubunda benzer oranlarda yan etkiler görülmüş olup bunlar arasında, baş ağrısı, sırt ağrısı, bulantı gibi semptomlar bulunmaktadır. Çalışmada sonunda, geç başlangıçlı SMA hastalarında, Nusinersen grubunun, kontrol grubuna kıyasla, motor fonksiyonlarda anlamlı bir klinik iyileşme gösterdiği sonucuna varmışlardır(Q. Li, 2020; Mercuri et al., 2018).

2.2.2. Gen Tedavisi

Bir başka terapötik yaklaşım olan gen replasman tedavisi, SMN1 geninin nöral hücrelere aktarılmasını hedeflemektedir(T.-H. Chen, 2020b). Klinik öncesi çalışmalarda, viral aracılı SMN1 geninin iletiminin başarılı bir şekilde gerçekleştiği görülmüştür(Tisdale & Pellizzoni, 2015). Novartis şirketi tarafından geliştirilen Zolgensma (Onasemnogene Aporvece; eskiden AVXS-101 olarak bilinir) , 2 yaşın altındaki SMA tip I hastaların tedavisi için, Mayıs 2019'da FDA tarafından, Mayıs 2020'de ise EMA tarafından onay almıştır(Chong et al., 2021; Menduti, Rasà, Stanga, & Boido, 2020). Zolgensma, SMN1 geninin fonksiyonel bir kopyasını motor nöronlara verimli bir şekilde iletmek üzere adeno-ilişkili virüs vektörünü(scAAV9) kullanan bir gen terapisi(Messina & Sframeli, 2020). AAV9 vektörü KBB'ni geçtiği için Zolgensma, Nusinersen'den farklı olarak tek seferlik intravenöz enjeksiyon ile uygulanmaktadır(Chong et al., 2021). Bu tedavi yöntemi, yalnızca tek doz uygulama gerektirmesi ve klinik deneylerde umut verici sonuçlar elde edilmesiyle ön plana çıkmaktadır. Ancak, tedavinin maliyetinin çok yüksek olması (2 milyon dolar) en büyük dezavantajıdır(Kakazu et al., 2021).

2.2.3. Küçük Moleküller

Günümüzde, Risdiplam (Evrysdi™ RG7916) ve Branaplam (LMI070) gibi küçük moleküller, ekson 7'nin SMN2 mRNA'ya dahil edilmesini ve böylece FL-SMN protein üretimini arttırmaya yönelik geliştirilen tedavi yöntemidir(Dangouloff & Servais, 2019). Risdiplam, 2 ay ve daha büyük SMA hastalarının tedavisi için ilk Ağustos 2020'de FDA ve Mart 2021'de EMA tarafından onay almıştır(Hahn et al., 2022). Risdiplam, KBB'ni geçer ve oral olarak uygulanan ilk ilaçtır(Schorling, Pechmann, & Kirschner, 2020). Bu durum Risdiplam için avantaj sağlamaktadır. Şöyle ki, Nusinersen intratekal enjeksiyon ile uygulanmakta olup etkisi MSS'nde motor nöronlar ile sınırlı kalmaktadır. Ancak, Risdiplam oral olarak uygulandığı için sadece MSS ile sınırlı kalmayıp periferik dokulara da etki edebilmektedir(Messina & Sframeli, 2020).

SMA hastalığının tedavisinde kullanılan tüm bu yöntemleri ve olası katkılarını değerlendirebilmek adına çeşitli fonksiyonel gibi testler kullanılmıştır. Nusinersen tedavisinin motor fonksiyonlara olası katkısını değerlendirmek için HFMSE ölçeği kullanılmaktadır. Bizim çalışmamızda da Nusinersen'in motor fonksiyonlara olası katkısını değerlendirmek için HFMSE ölçeği kullanılmış değerlendirme bu konuda eğitim almış uzman Fizyoterapist tarafından gerçekleştirilmiştir.

2.2.4. Hammersmith Functional Motor Scale Expanded (HFMSE):

Son zamanlarda, SMA hastaları için hastalığa spesifik sonuç ölçütlerini belirleyebilmek adına çeşitli çalışmalar yapılmıştır. HFMSE, SMA tip II ve III hastaları için özel olarak tasarlanmış olup klinik değerlendirme ve rehabilitasyon aracı olarak yaygın olarak kullanılmaktadır(Maria C Pera et al., 2017). HFMSE'nin güvenilirliği, geçerliliği ve değişimlere duyarlılığı tartışılmış ve gerekli görülen kriterlerin çoğunu karşılayarak ölçeğin kullanılma uygun olduğu sonucuna varılmıştır(Ramsey et al., 2017). HFMSE, SMA hastaları için kullanılan 20 maddeden oluşan HFMS(Hammersmith Fonksiyonel Motor Ölçeği) ve 13 maddeden oluşan GMFM (Kaba Motor Fonksiyon Ölçümü)ölçeklerinin birleştirilmesi ile oluşturulmuştur(Pierzchlewicz, Kępa, Podogrodzki, & Kotulska, 2021). Ölçek 33 maddeden ve 66 puandan oluşmaktadır(Maria Carmela Pera et al., 2021).33 madde içerisinde; destekli/desteksiz oturabilme , ellerini kafasına götürebilme, yana yuvarlanma, yüz üstü pozisyonda başını kaldırabilme, destekli ayakta durabilme, adım atabilme, zıplayabilme gibi aktiviteler bulunmaktadır(Maria C Pera et al., 2017). Her

madde 3 puan üzerinden değerlendirilir ve “destek almadan yapar”², “destek alarak yapar”¹ ve “yapamaz” için 0 puan olmak üzere toplamda 0 ila 66 puan arasında değişen bir skora yapılmaktadır(Maria Carmela Pera et al., 2021). HFMSE, SMN2 kopya sayısı, bileşik kas aksiyon potansiyeli (CMAP), zorlu vital kapasite (FVC) ve kas kuvveti ile pozitif korelasyon olduğu gösterilmiştir(Ramsey et al., 2017). HFMSE skoru, kısa sürede ve kolay uygulanması, en az miktarda ekipmana ihtiyaç duyulması, hastayı daha az yorması, diğer klinik değerlendirmelerle yüksek oranda ilişkili ve güvenilir olması yönüyle avantajlıdır(O’Hagen et al., 2007).

HFMSE skorunun kullanımı genel anlamda avantajlı olarak bulunsa da bazı dezavantajları da bulunmaktadır. İlk olarak, SMA klinik olarak oldukça heterojen bir hastalık olması zorluklardan biridir. Diğer bir dezavantaj ise, hastalık progresyonunu etkileyen, farklı yaş ve işlevsel düzey gibi çeşitli faktörlere bağlı olarak klinik olarak anlamlı değişkenliğin belirlenmesindeki zorluktur. Bu zorluklar dikkate alındığında ölçeğin kullanımın faydalı olduğuna dair destekleyici daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.(Maria C Pera et al., 2017).

2.3. SMA ve MikroRNA

2.3.1. MikroRNA’lar (MiRNA’lar) ve Keşfi:

MiRNA’lar, hedef genlerin transkripsiyon sonrası susturulmasında düzenleyici olarak işlev gören yaklaşık 19 ila 25 nükleotid uzunluğundaki tek iplikli kodlamayan RNA molekülleridir(Bhaskaran & Mohan, 2014; Lu & Rothenberg, 2018). MiRNA genleri, eksonik ya da intronik bölgelerde ve intergenik (genler arası) bölgelerde bulunurlar. MiRNA’lar insan genomunda tek yada kümelenmiş şekilde (polisistronik) yer alır ve Y kromozomu hariç tüm kromozomlar üzerinde tanımlanmıştır(Fridrichova & Zmetakova, 2019).

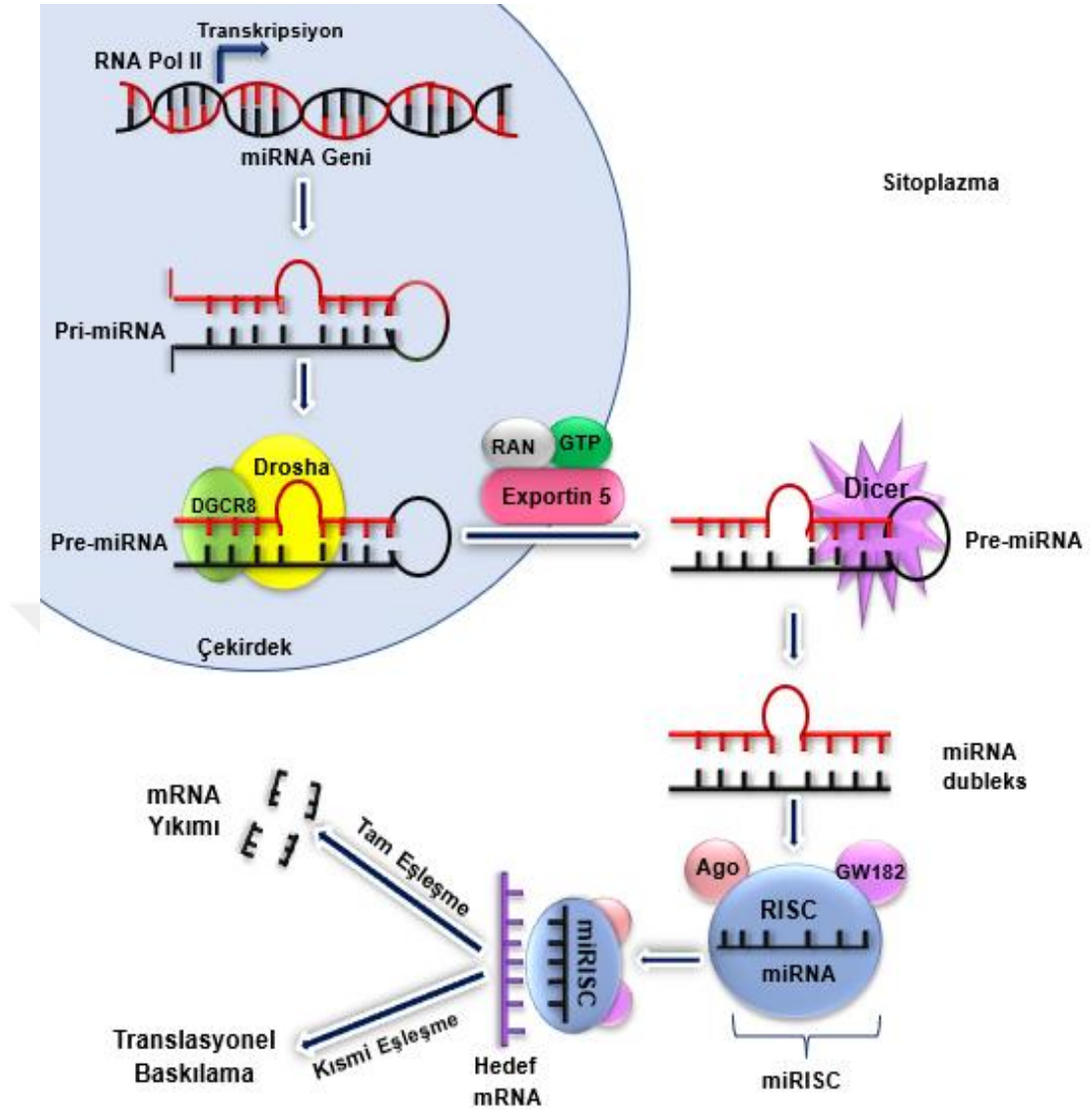
MiRNA’lar ilk olarak Lee ve ark. (1993)tarafından *Caenorhabditis elegans* larvalarında, temel düzenleyici olarak işlev gören küçük endojen RNA lin-4 geninin tanımlanmasıyla keşfedilmiştir(Hammond, 2015; Lu & Rothenberg, 2018; O’carroll & Schaefer, 2013). Daha sonra Ruvkun ve Ambros Laboratuvarlarında başlangıçta protein kodladığına inanılan lin-4 geninin aslında protein kodlamadığı bunun yerine 22 nt uzunluğunda bir RNA’yı transkribe ettiğini bulunmuştur(Hammond, 2015; Lee & Dutta, 2009). Ambros ve ark. lin-4 RNA’nın, lin-14’ün 3’ UTR(untranslated region) bölgesine bağlanarak gen ifadesini negatif yönde düzenlediğini gözlemlemişlerdir. Ancak bu gelişme ikinci bir miRNA olan let-7’ nin henüz keşfedilmemesinden dolayı

sınırlı ölçüde öneme sahip olmuştur(Hammond, 2015; O'carroll & Schaefer, 2013). MiRNA'ların gen ifadesini düzenleme yeteneğine ilişkin ek bir kanıt, ilk memeli miRNA geni olan let-7'nin keşfiyle elde edilmiştir(O'carroll & Schaefer, 2013). 2000 yılında Renihart ve ark. *C. elegans*'ta larva döneminden erişkin döneme geçişi kontrol eden 22 nükleotid uzunluğundaki let-7 RNA'yı keşfetmişlerdir.(Di Leva, Garofalo, & Croce, 2014). Canlının gelişim aşamasını düzenleyen bir miRNA olan let-7 insanlar da dahil olmak üzere birçok organizmada korunmaktadır. Buna bağlı olarak bu küçük düzenleyici RNA sınıfının biyolojik olarak pek çok işleve sahip olduğu görülmüştür(Hammond, 2015). Daha sonra bilim insanları bu bilgiler ışığında diğer küçük kodlanmayan RNA'ları aramaya başlamıştır. Araştırmaları sonucunda, 2001 yılında küçük ncRNA'ları farklı organizmalarda ve hücresel sistemlerde de tanımlayarak miRNA'lar olarak isimlendirilen büyük bir ncRNA sınıfının varlığına dair kanıtlar sağlamışlardır. Let-7'nin gelişiminden bu zamana kadar, alglerden insanlara kadar hemen hemen bütün organizmalarda 1000'den fazla farklı miRNA tanımlanmıştır(O'carroll & Schaefer, 2013).

2.3.2. MiRNA Biyogenezi ve İşlevi

MiRNA biyogenezi, çekirdekten stoplazmaya kadar uzanır ve pri-miRNA'nın(birincil transkript)sentezlenmesiyle başlar(Lee & Dutta, 2009). RNA polimeraz II (RNA Pol II) tarafından oluşturulan pri-miRNA'lar, saç tokası yapısı içermekte olup 5' kap yapısı ve 3' pol(A) kuyruğu gibi mRNA özelliklerini de korumaktadır(Di Leva et al., 2014). pri-miRNA'ların olgun miRNA'ya dönüşebilmesi için öncesinde iki endonükleaz işleme adımı geçirmesi gerekir(Hammond, 2015). İlk işleme adımında pri-miRNA'lar, Drosha ve kofaktörü olan DiGeorge sendromu kritik bölge geni 8'den(DGCR8 ya da Pasha) oluşan mikroişlemci tarafından kesilir. Bu kesim ile ~ 60-70 nükleotid saç tokası şeklindeki prekürsör miRNA (pre-miRNA) oluşturulur. İkinci aşamada ise yeni kopyalanan 5' fosfat ve ~2nt 3' çıkıntısına sahip pre-miRNA'lar bir Ran-GTP'ye bağımlı olan Exportin5 (XPO5) tarafından stoplazmaya aktarılır(Bhaskaran & Mohan, 2014; Hammond, 2015; Lin & Gregory, 2015). Burada pre-miRNA'lar 5' ve 3' uçlarından ölçüm yapan RNase II enzimi olan endonükleaz Dicer 1 tarafından ~ 18 ila 23 nt uzunluğunda olgun çift iplikli miRNA dubleksleri halinde işlenir(Hammond, 2015; Lee & Dutta, 2009; Lin & Gregory, 2015). Çift iplikli miRNA'dan sadece bir tanesi olgun miRNA'ya dönüşmektedir. 5' ucunda en dengesiz baz eşleşmesi olan miRNA ipliği klavuz iplik görevi görürken 5' ucunda sabit baz eşleşmesi olan miRNA ipliği ise degrade olur(Bhaskaran & Mohan,

2014). Olgun miRNA ipliği(klavuz iplik), katalitik Argonoute proteini (AGO1, AGO2, AGO3 ve AGO4) ile bağlanır ve GW182 protein ailesinin üyeleriyle birlikte miRNA kaynaklı susturma kompleksi(miRISC) olarak adlandırılan mikronükleer protein kompleksi oluşturulur(Lin & Gregory, 2015). Olgun miRNA, RISC kompleksini baz eşleşmesi ile hedef mRNA'nın ekspresyonunu 3' UTR'sine yönlendirerek mRNA'nın yıkılmasına ya da translasyonunun inhibisyonuna neden olur(Finnegan & Pasquinelli, 2013). İstisnai durumlarda miRNA'ların 5' UTR ve açık okuma çerçevesine (ORF) bağlandığı da bildirilmiştir. MiRNA'lar, kısa miRNA-mRNA bağlanma bölgeleri nedeniyle, tek bir miRNA' nın yüzlerce mRNA'yı hedefleyebilir(Gavrilov & Saltzman, 2012; Tai & Gao, 2017).Tek bir miRNA'nın birçok genin ekspresyonunu düzenlemesi dikkate alındığında aynı anda birden fazla hücresel sinyal yolunu düzenleyebilir. Bu nedenle miRNA'ların doğrulanmış hedeflerinin belirlenmesi önemlidir(Tai & Gao, 2017; Whitehead, Langer, & Anderson, 2009).



Şekil 2.12. .miRNA biyogenezi ve etki mekanizması(Magri, Vanoli, & Corti, 2018; Zhang et al., 2022).

Bununla birlikte, son kanıtlar alternatif olarak mikroişlemciden bağımsız (kanonik olmayan) miRNA biyogenez yollarının da olabileceğini göstermiştir(Bhaskaran & Mohan, 2014). En yaygın görülen varyasyonu mironlardır. MiRNA'ların alt sınıfı olan mirtonlar, ekson birleşme yerlerindeki intronlarda bulunur ve Drosha sindiriminden bağımsızdır(Hammond, 2015; Lin & Gregory, 2015). Burada prekürsör uçlar, birleştirme ve yarıma olayları ile oluşturulur. Elde edilen öncül gövde döngüsü Dicer tarafından işlenir ve RISC'e yüklenir(Hammond, 2015).

MiRNA'ların çoğu memeli hücrelerinde korunmakta olup hücre gelişimi, farklılaşması, hücre proliferasyonu ve hücre ölümlerinin de dahil olduğu birçok hücrel ve sinyal yollarının düzenlenmesinde önemli rol oynar(Tai & Gao, 2017). Bunların yanı sıra, bağışıklık tepkisi, insülin salgılanması, nörotransmitter sentezi, sirkadiyen ritim, viral replikasyon gibi biyoloji süreçlerde de işlev gördüğü

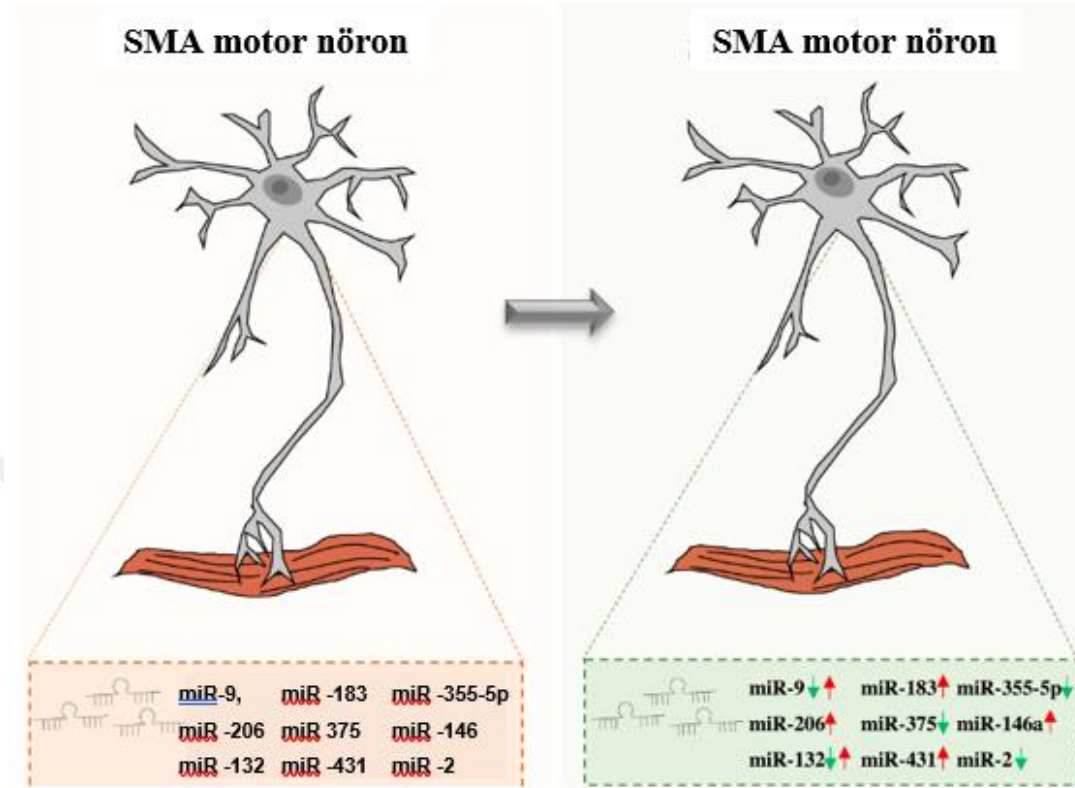
gözlemlenmiştir(Lee & Dutta, 2009). Dolaşımdaki miRNA düzeyindeki düzensizlikler, kanser, kardiyovasküler hastalıklar, obezite, kemik hastalıkları, otoimmün bozukluklar, nörodejeneratif hastalıklar dahil olmak üzere çeşitli hastalıklar ile ilişkilendirilmiştir(Mori, Ludwig, Garcia-Martin, Brandão, & Kahn, 2019).

2.3.3. SMA’da Potansiyel Biyobelirteç ve Terapötik Hedef Olarak MiRNA’lar

Günümüzde yeni tedavilerinin geliştirilmesiyle birlikte hastalığın anlaşılmasında, ilerlemesinde ve terapötik yanıtın izlenmesinde non-invaziv ve klinik olmayan biyobelirteçlerin tanımlanması önemli tıbbi ihtiyaçlar arasında yer almaktadır(Magri et al., 2018). MiRNA’lar, plazma, BOS, tükürük, idrar gibi biyosıvılarda stabildir ve non-invaziv yöntemlerle klinik olarak saptanabilir. Bu nedenle, kolay erişilebilir bir biyobelirteç olarak oldukça dikkat çekmiştir(T.-H. Chen & Chen, 2019). Son zamanlarda, miRNA’ların SMA patogenezinde tanısallık ve prognostik potansiyel biyobelirteçler olarak incelendiğine dair yapılan araştırmalar dikkat çekmiştir (Gandhi et al., 2021). MiRNA’lar aynı anda birden çok geni kontrol edebilme özelliği ile SMN kaybından etkilenen birçok yolu aydınlatılmasında etkili olabilir(Magri et al., 2018) SMN proteininin miRNA’ların biyogenezi, işlenmesi ve RNA metabolizmasındaki temel rolü nedeniyle MiRNA’lar, SMA patogenezinde potansiyel biyobelirteçler olarak umut verici moleküller arasındadır(Magri et al., 2018). SMN, FMRP (fragile X mental retardation protein), KSRP (KH-type splicing regulatory protein) ve FUS/TUS (fused in sarcome/translocated in liposarcoma)gibi miRNA biyogenezi ve işlevi ile ilgili proteinlere, direkt olarak bağlanabilir(Magri et al., 2018).

MiRNA’ların birçoğu MSS’nde yüksek oranda ifade edilmekte olup nöronal gelişim ve farklılaşmaya katılmaktadır. Aynı zamanda, aksonal büyüme, hücre iskeleti yapısı, sinaps oluşumu ve genel aktivite içinde miRNA’ların gerekli olduğu da bildirilmiştir(Magri et al., 2018). MiRNA’ların motor nöronlarda düzenlenmesinin önemini ve bunların SMA ile olan ilişkisini gösteren ilk gözlem spinal motor nöronlarda, Dicer işlevinde kayıp içeren transgenik farelerde yapılmıştır. Dicer, miRNA biyogenezinde işlev gören bir RNaz’dır. Çalışmada, farelerde Dicer işlevinin kaybı ile miRNA biyogenezinin bozulması sonucu, motor nöron disfonksiyonu ve ölümüyle birlikte SMA benzeri bir fenotipe neden olduğu gözlemlenmiştir. Bu da spinal motor nöronlardaki miRNA’ların, motor nöron fonksiyonu ve sağ kalım için önemli olduğu göstermektedir(T.-H. Chen & Chen, 2019; Kye & Goncalves, 2014).

Bu temel roller nedeniyle, motor nöron dejenerasyonunda rol oynayan RNA işleme ve miRNA düzensizliğinin görülmesi şaşırtıcı değildir(Magri et al., 2018).



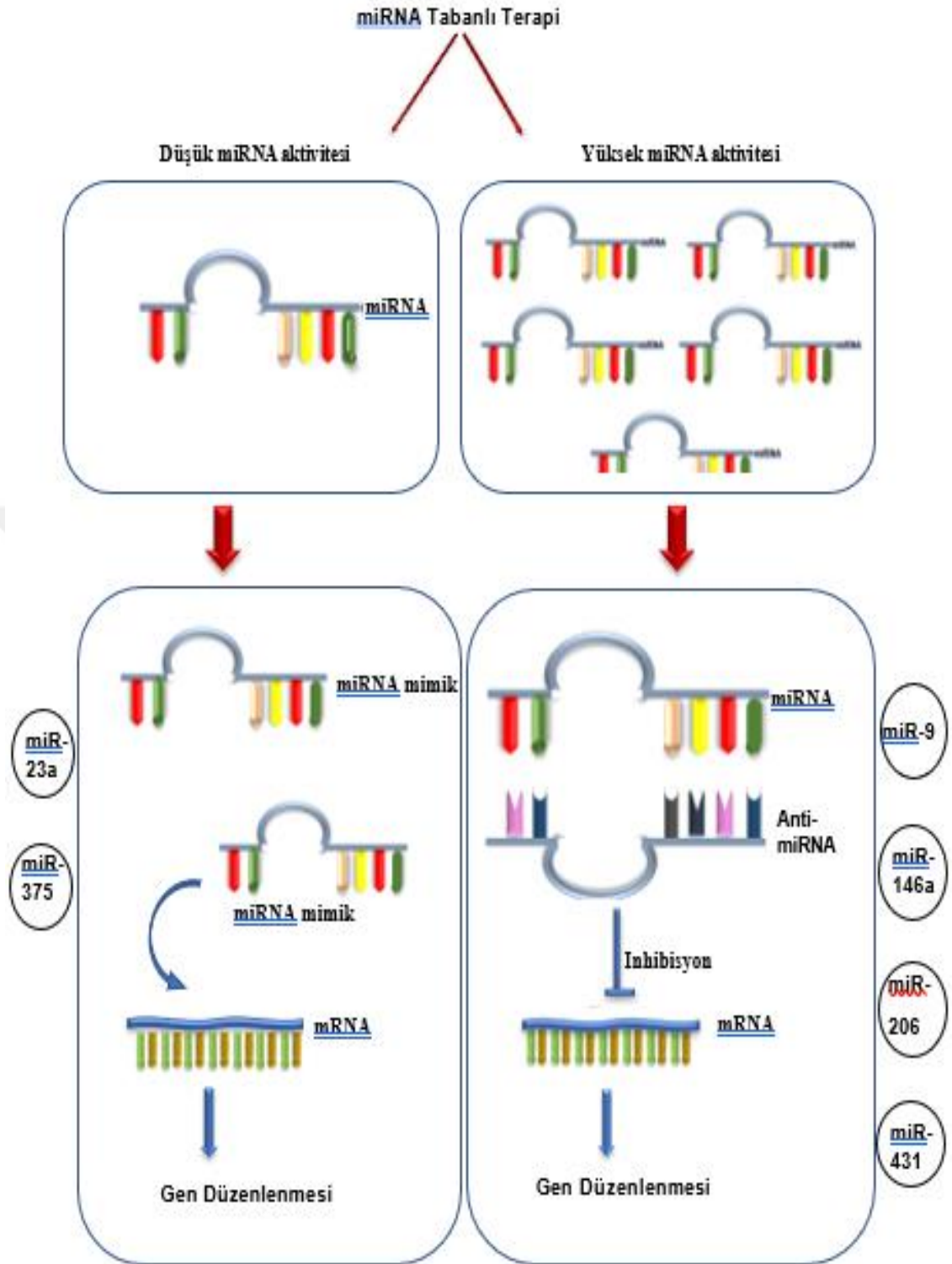
Şekil 2.13. SMA’da yer alan muhtemel potansiyel biyobelirteçler (soldaki resim) ve SMA motor nöronlarında düzensiz miRNA’ların ekspresyon profillerinin gösterimi(sağdaki resim). Kırmızı oklar hastalıkta up regüle edilen miRNA’ları gösterirken yeşil oklar ise down-regüle edilen miRNA’ları göstermektedir. SMA’da miR-9 ve -123 ekspresyonunun omurilikte ve iskelet kasında diferansiyel olarak düzensiz olduğu görülmüştür. Ekspresyonları omurilikte artarken iskelet kasında azalmıştır (çift oklar)(De Paola, Verdile, & Paronetto, 2019; Magri et al., 2018)

Potansiyel biyobelirteç olarak aday miRNA’lar arasından miR-183 ve -375, fibroblastlarda ve motor nöronlarda aksonal büyümeyi ve p53’ü inhibe eder. Böylece apoptozdan korunabilir ve bu rolleri nedeniyle tanısal biyobelirteçler ve terapötik hedef olarak umut vericidir(Gandhi et al., 2021).Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, SMA’da yer alan bazı miRNA’ların anormal ekspresyonu gözlemlenmiş ve bu miRNA’lar kas ve/veya nörona spesifik miRNA’lar olarak ifade edilmiştir(Chong et al., 2021). Bonanno ve ark. (2019) çalışmalarında, pediatrik SMA hastalarında dolaşımdaki MyomiR seviyelerinin hastalık seyri boyunca azaldığı ve miR133a’nın serum seviyelerinin hastanın tedaviye yanıtını tahmin ettiğini öngörmüşlerdir. Bu da dolaşımdaki MyomiR’lerin hastalığın ilerlemesini ve terapötik yanıtı izlemek için non-invaziv biyobelirteçler olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir(Bonanno et al., 2020). Catapano ve ark. ise çalışmalarında, SMA hastalarından alınan serumda ve

transgenik farelerden alınan omurilik, iskelet kası ve serumda, nöronla ilişkili miR-9'un ve miR-206'nın (MyomiR) anormal ekspresyon seviyelerini gözlemlemişlerdir. Bir başka çalışmada, motor nöron hastalığı olan hayvanların ve hastaların dokusunda MyomiR ekspresyonunun değiştiği gözlemlenmiştir. Bu gözlem, miRNA'ların kas dejenerasyon ve rejenerasyon süreçlerinde rolünün olduğunu göstermektedir. Aynı zamanda, SMA hayvan modelinde, hastalığın ilerlemesi ve ASO tedavisine yanıtı izlemeye miRNA'ların potansiyel bir biyobelirteç olarak işlev gördüğü görülmüştür(Bonanno et al., 2020), Günümüzde, SMA da yer alan spesifik miRNA'ların çeşitli işlevlerine yönelik devam eden araştırmalar, miRNA'ların hastalığın ilerlemesini ve terapötik yanıtı izlemek için potansiyel biyobelirteçler olarak kullanımı üzerine umut verici sonuçlar gösterdi(Gandhi et al., 2021).

Bu araştırmalar, miRNA'ların terapötik bir hedef olarak kullanılıp kullanılmayacağı sorusunu gündeme getirmiştir. Önceki çalışmalarda, miRNA'ların SMA'da nöroprotektif yeteneklerini göstermesi ve miRNA'nın pleiotropik özelliği ile SMA için çekici bir terapötik stratejidir(Gandhi et al., 2021). Son zamanlarda gen ifadesinin düzenleyicileri olarak miRNA'lar, nörodejeneratif hastalıklar için umut verici terapötik hedefler olarak önerilmiştir(Magri et al., 2018). Aynı zamanda, miRNA'ların hastalıkta ekspresyonun değişmesi, terapötik hedef olarak kullanılmak üzere muazzam bir potansiyele sahiptir.(Gandhi et al., 2021) Bu sebeple, SMN işlevini geri kazandırmak için miRNA tabanlı terapi, tedavi stratejisi olarak kullanılabilir. SMA'da miRNA tabanlı terapinin mantığı şu kriterlere dayanmaktadır: İlk olarak, SMA'da miRNA'ların düzensiz ya da işlevsiz olması ve tanımlanan miRNA'ların up/down regüle edilebilmesi, ikincisi ise, hastalık fenotipini değiştirebilmesidir(Gandhi et al., 2021). Birçok çalışma, miRNA ekspresyonunun modüle edilebildiğini göstermiştir. MiRNA'ları modüle etmek için olası iki yaklaşım bulunmaktadır:

1. miRNA mimikeri kullanarak miRNA seviyelerin düzenlenmesi/restore edilmesi
2. Hastalık kaynaklı ver-eksprese miRNA'ların ekspresyonunu,miRNA inhibitörü ASO (anti-miR) aracılığıyla down regüle edilmesi(Magri et al., 2018).



Şekil 2.14. SMA’da miRNA terapötik stratejileri(Gandhi et al., 2021)

Çalışmalar miRNA’ların kullanımı hakkında umut verici görüşler sağlasa da, miRNA’ların terapötik amaçla kullanılması beraberinde bazı zorluklarda getirmektedir(Magri et al., 2018). Bu zorluklardan biri uygulama yoludur; bu nedenle en makul uygulama yolu belirlenmelidir. Moleküllerin KBB’ni geçme kapasitesi düşünüldüğünde intratekal enjeksiyon yöntemi kullanılabilir fakat invazivdir (T.-H.

Chen, 2020a). Bir başka zorluk ise, miRNA'ların hücelere güvenli ve verimli bir dağıtım sisteminin bulunmamasıdır. Bu da miRNA'ları genetik terapi olarak kullanılmalarında engel oluşturmaktadır(Magri et al., 2018).

2.3.4. Analiz Ettiğimiz MiRNA'lar:

Literatürü incelediğimizde özellikle son zamanlarda miRNA'ların, Nusinersen tedavisi alan SMA hastalarında, hastalık ilerlemesini ve terapötik yanıtı izlemek için non-invaziv ve klinik olmayan potansiyel biyobelirteçler olarak etkisinin gözlemledik araştırıldığını gözlemledik. Her ne kadar mevcut çalışmalar bu alanda bizlere fikirler sağlasa da hala araştırılması gereken bir çok aday miRNA'lar bulunmaktadır. Bizde literatüre katkı sağlamak ve yeni çalışmalara yol göstermesi açısından miRNA'ların, Nusinersen tedavisi alan SMA hastalarında Nusinersen etkinliğine dair birbilgi/gösterge elde edilmesi amacıyla potansiyel biyobelirteç olarak etkisini araştırdık. Bunun için ilk hedef noktamız in siliko analizler ile aday potansiyel miRNA'ları tespit etmektir. Bölüm 3.3. Ön Çalışma kısmında STarmiR ve miRDB veritabanlarını kullanarak belirlediğimiz(miR-155-5p, miR-222-5p ve miR-378b) ve detaylı bir şekilde gösterdiğimiz miRNA'ların SMN2-ekson 7'yi hedefleyebildiğini gözlemledik. Aynı zamanda literatürü incelediğimizde bu belirlediğimiz bu miRNA'ların kasta ifade edildiğine dair çalışmaların yapıldığını da gözlemledik. Belirlediğimiz miRNA'lar ile ilgili literatür çalışmalarına aşağıda yer verilmiştir.

2.3.4.1. MiR-155-5p

MiR-155 kromozom 21'de yer alan B hücresi entegrasyon Kümesi (BIC) kopyalanan kodlayıcı olmayan RNA transkriptinden türetilen bir miRNA'dır. miR-155'in ekspresyonu farklı hücre tiplerinde ve dokularda değişiklik göstermektedir. Bunun yanı sıra, miR-155 hücrel sinyallere yanıt olarak çoklu yollarla koordineli bir şekilde düzenlenmektedir. Bu nedenle miR-155'in farklı doku ve gelişim evrelerinde ya da hastalıklardaki rolünü anlayabilmek için ekspresyon seviyelerini analiz etmek önemlidir(M. Chen, Wang, Xia, & Yao, 2021). Son zamanlarda, miR-155 iskelet kasında bir rolü olduğuna dair kanıtlar ortaya çıkmaktadır. Bir çalışmada iskelet kasında, miR-155'in C2C12 hücrelerinde MEF2A'yı (miyogenik güçlendirici faktör 2 transkripsiyon faktörleri ailesinin bir üyesi) hedeflediği ve ekspresyonunu baskılayarak miyoblast farklılaşmasında önemli rol oynadığı görülmüştür(Seok et al., 2011). Jung ve ark. çalışmalarında, bir ALS modeli olan SOD1^{G93A} (süperoksit

dismutaz 1) kemirgenlerine, antisens miR-155 ile uygulama yaptıklarında anti-miR-155 ile uygulama yapılan farelerde kontrole kıyasla 10 gün daha uzun bir sağ kalım ve 15 gün daha kısa hastalık süresinin olduğunu gözlemlemişlerdir. Bu da miR-155'in, kastaki yaşlanma fenotiplerini tersine çevirebileceğini düşünmelerine yol açmıştır (Jung, Lee, Kwon, & Suh, 2019). Bunun yanı sıra, insan aort düz kas hücrelerinin osteojenik farklılaşması ve kalsifikasyon RCN2/STAT3/miR-155-5p ile geri bildirim döngüsü (feedback loop) tarafından indüklendiği de bildirilmiştir (Zhao, Liu, & Chang, 2021). Başka bir çalışmada, TNF- α (tümör nekroz faktör- α) ve IGF1 (insülin benzeri büyüme faktörü-1) maruziyetinin iskelet kası farklılaşmasının miRNA-hedef etkileşimleri üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Çalışma sonucunda, miyoblast farklılaşması sırasında up regüle edilen miR-155 hedefleri aşırı eksprese edildiği görülmüş ve böylece miR-155'in anti-miyojenik rolü de doğrulanmıştır (Meyer et al., 2015). Tüm bu literatür verilerini değerlendirdiğimizde miR-155-5p'nin kasta ifade edildiğini söyleyebiliriz.

2.3.4.2. MiR-222-5p

miR-222-5p, insan genomunda kromozomu Xp11.3 üzerinde yer alan non-coding miRNA'lardır (D. Wang et al., 2021). miR-222, farklı hücre tiplerinde farklı hücresel süreçlerin düzenlenmesinde rol oynamaktadır. miR-222 omurgalılar arasında evrimsel olarak korunmaktadır ve her yerde eksprese edilmektedir (Chung, Rao, & Wang, 2021). Bir çalışmada, miR-222'nin miyojenik farklılaşmasının düzenlenmesinde rol oynayan bir RNA bağlayıcı protein olan "Rbm24" hedeflediği görülmüştür. Çalışma sonucunda, Rbm24'ün, miR-222 tarafından inhibisyonu, kasa özgü alternatif eklenmeyi bozduğu ve miyoblast füzyonunun inhibisyonu neden olduğu görülmüştür (Cardinali et al., 2016). Kas gen ekspresyonunu modüle eden miRNA'ların tanımlanması, iskelet kası farklılaşmasının ve onarımını kontrol eden mekanizmalarının anlaşılması için önemlidir. Cardinali ve ark. miR-222'nin miyogenez sırasında modüle edildiğini ve hem miyoblastlardan miyositlere ilerlemede hem de tamamen farklılaşmış fenotipin elde edilmesinde işlev gördüğü gözlemlemişlerdir (Cardinali et al., 2009). Tüm bu literatür verilerini değerlendirdiğimizde miR-222-5p'nin kasta ifade edildiğini söyleyebiliriz.

2.3.4.3. MiR-378b

MiR-378b, miR-378 ailesinin bir üyesi olup 3. Kromozom üzerinde yer almaktadır. Bir çok dokuda yaygın olarak eksprese edilen miR-378b, özellikle yağ dokuları kalp ve iskelet kaslarında yüksek oranda eksprese edilmektedir(X.-l. Wang et al., 2015). Ppargc1 β (peroksizom proliferatörü ile aktive olan reseptör γ koaktivatör 1- β) geninin ilk intronunda bulunan miR-378, iskelet kası hücrelerinin farklılaşması ve kas yenilenmesinin düzenlenmesinde rol oynar(Kang et al., 2020). Önceki çalışmalar, mir-378'in hücreSEL farklılaşmasının düzenlenmesinde rol oynadığı doğrulanmaktadır(X.-l. Wang et al., 2015). Bir çalışmada, MyoD tarafından C2C12 hücrelerinde miyojenik farklılaşma esnasında up regüle edilen miR-378'in, inhibitörü MyoR'yi hedefleyerek MyoD'nin aktivasyonunda rol oynadığını gözlemlemişlerdir(Gagan, Dey, Layer, Yan, & Dutta, 2011). Metabolik strese duyarlı iskelet kası miR-378'in, hem otofaji ve apoptozu koordine eden bir modülatör olarak normal kas homeostazısını sürdürmede çok önemli olduğu bildirilmiştir(Y. Li et al., 2018). Podkalicka ve ark. çalışmalarında, miR-378'in Duchenne Musküler Atrofi (DMD) ve mürin modelinde (mdx farelerinde) rolünü incelemişlerdir. İncelemelerinin sonucunda, miR-378'den yoksun distrofik farelerin, mdx farelerine oranla daha iyi fiziksel performans ve gelişmiş kas kuvveti gösterdiğini gözlemlemişlerdir. Aynı zamanda, miR-378'i hedeflemenin mdx farelerinde DMD patolojisini iyileştirme potansiyeline sahip olduğu ve miR-378 ekspresyon seviyesini modüle eden ajanların araştırılmasının DMD hastaların tedavisinde yardımcı olabileceği öne sürülmüştür(Podkalicka et al., 2020). Tüm bu literatür verilerini değerlendirdiğimizde miR-378b'nin kasta ifade edildiğini söyleyebiliriz.

3. MATERYAL METOT

3.1. Çalışma Grubu

Bu çalışma, T.C. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi' nde (OMÜ Klinik Etik Kurul'nun 24.03.2022 tarih ve 2022/140 karar no ile onay alınarak) Helsinki Deklarasyonu Kurallarına uygun olarak yapılmıştır. Çalışmaya, Mayıs 2022 ile Ekim 2022 tarihleri arasında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi (OMÜTF), Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD, Çocuk Nöroloji BD da SMA tanısı almış 20 hastadan Nusinersen uygulamasından önce ve sonra (bir sonraki doz öncesi ya da takipte hastaların tedavileri devam ettiği sürece her Nusinersen uygulamasından önce) alınan 48 adet 5 ml BOS örneği dahil edilmiştir. Nusinersen SMA tanılı hastalarda Sağlık Bakanlığı onayı alındıktan sonra 0,14,28,63. günlerde yükleme ve ardından dört ayda bir idame dozlar şeklinde lomber ponksiyon ile uygulanmıştır. İlaç uygulanımı öncesi hastalardan rutin olarak biyokimyasal tetkikler yapılmakta, sonrasında hastalara lomber ponksiyon yapılmakta, ilacın hacmi kadar BOS alınmakta ve ilaç intratekal aralığa verilmektedir. Hastaların yasal temsilcilerinden BGOF(Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu) imzası alındıktan sonra çalışmaya dahil edilmiştir. Ayrıca, daha önce çalışmaya uygun SMA hastalarından başka tetkikler için ilk Nusinersen uygulamasından önce ve bir sonraki Nusinersen uygulamasından önce alınmış BOS örnekleri de hastaların yasal temsilcilerinden BGOF imzalatılarak çalışmaya dahil edilmiştir. (Bahsi geçen hastalardan bazılarının ise Nusinersen tedavileri halihazırda başlamış ve devam etmektedir).

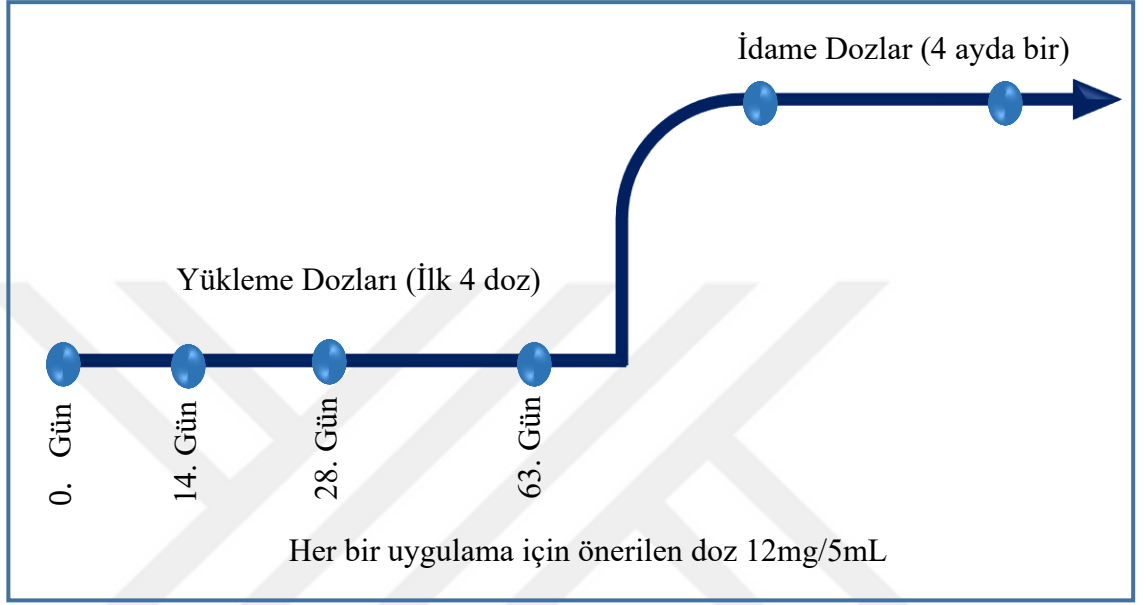
Çalışmaya Alınma ve Dışlanma Kriterleri

Tablo 3.1. Çalışmaya Alınma ve Dışlanma Kriterleri

Çalışmaya Alınma Kriterleri
• SMA tanısı almış olması • Hastaların pediatrik olması • Nusinersen tedavisi almaya elverişli olması
Çalışmadan Dışlanma Kriterleri
• Nusinersen tedavisi almaya elverişli olmaması / tedaviyi reddetmiş olması

3.2. Materyal

Çalışmada uygulamalardan artan biyolojik numuneler kullanılmıştır. Çalışma grubu bireylerden alınan toplamda 48 adet BOS örnekleri 5 ml olarak ağız kapaklı uygun biyokimya tüplerine alınmış ve -20°C'ye kaldırılmıştır. Alınan BOS örnekleri çalışma tarihine kadar -80°C'de muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.1. Nusinersen Uygulama Şeması. 2 ay boyunca ilk 4 doz yükleme dozu uygulanmakta, daha sonra ise idame dozlar her 4 ayda bir şeklinde uygulanmaktadır(Keinath et al., 2021)

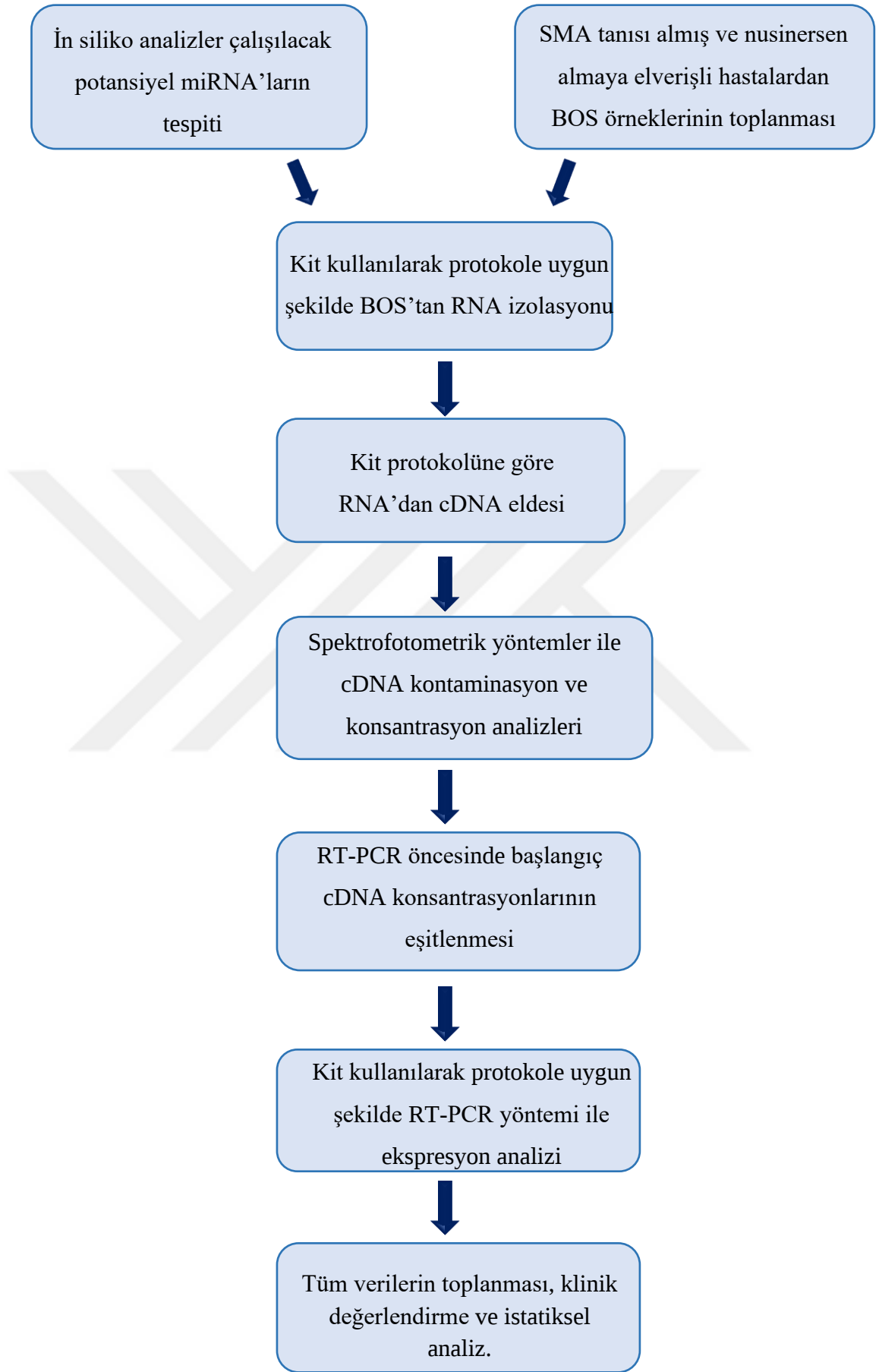
Çalışmada;

- BOS1: hiç Nusinersen uygulaması almamış ‘‘Baseline’’
- BOS 2: ilk dozu almış ancak 2. dozu almamış durumu
- BOS 3: 2. dozu almış ancak 3. dozu almamış durumu
- BOS 4: 3. dozu almış ancak 4. dozu almamış durumu
- BOS 5/6: 4 ve 5. dozu almış ancak 6. dozu almamış durumu
- BOS7/8: 6 ve 7. dozu almış ancak 8. dozu almamış durumu
- BOS9/10: 8 ve 9. dozu almış ancak 10. dozu almamış durumu ifade etmektedir.

Bunun yanı sıra;

- HFMSE1: BOS1(Baseline)’den hemen önce,
- HFMSE5/6: BOS 5/6.’dan hemen önce,
- HFMSE7/8: BOS 7/8.’dan hemen önce,
- HFMSE9/10: BOS 9/10.’dan hemen önce yapılan ölçümleri göstermektedir.

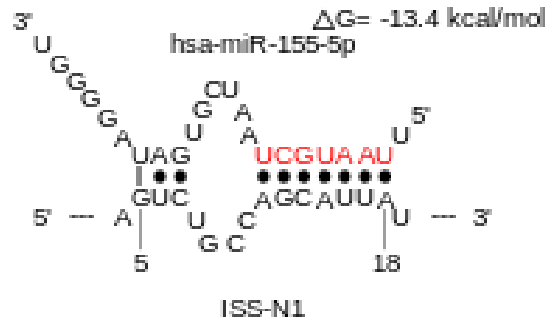
Çalışmamızda aşağıdaki adımlar izlenmiştir:



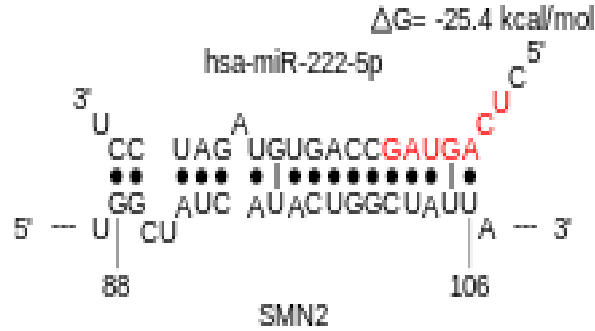
Şekil 3.2. Çalışmanın akış şeması

3.3. Ön Çalışma: İn Siliko miRNA Analizi

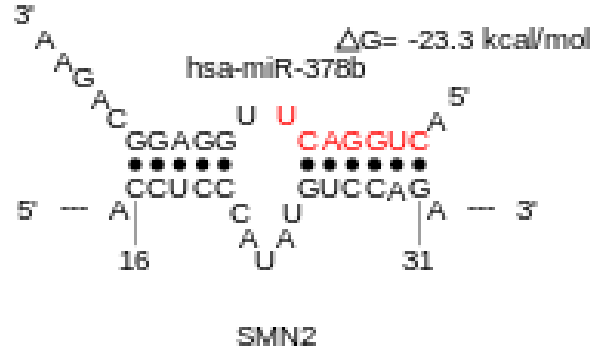
Literatürü incelediğimizde, Bonanno ve ark. (2020). “*Circulating myomiRs as potential biomarkers to monitor response to nusinersen in pediatric SMA patients*” konulu makalesinde kas dokusunda ifade edilen 4 miRNA'nın SMA'da Nusinersen etkinliği ile ilgili bilgi verici potansiyeli ölçüldüğünü ve bu sayede SMA hastalarında hastalık ilerlemesini ve terapötik yanıtı izlemek için potansiyel biyobelirteçler olarak araştırıldığını gördük. Bizde projemizde bu makaleyi referans alarak, BOS örneklerinde, yine kasta ifade edilen üç farklı miRNA'yı (miR-155-5p, miR-378, miR-222-5p) STarmiR ve miRDB veri tabanları kullanarak belirledik.



Şekil 3.3. miR-155-5p, çekirdek dizisi (7mer) ile ISS-N1 içindeki Nusinersen bağlanma bölgesini hedeflemesi (miRDB ve STarmiR (ISS-N1 için) veri tabanına göre)



Şekil 3.4. miR-222-5p'nin SMN2-exon7 hedeflemesi (STarmiR veri tabanına göre)



Şekil 3.5. miR378b'nin SMN2-exon7 hedeflemesi (STarmiR veri tabanına göre)

Hem literatür verilerini hem de STarmiR ve miRDB veritabanlarını tarayarak belirlediğimiz bu üç miRNA da (miR-155-5p, miR-222-5p ve miR-378b) hem kasta ifade edilmesine hem de SMN2-exon7 ile yüksek oranda bağlantı göstermesine rağmen SMA hastalığındaki rolü henüz araştırılmamıştır. Bu nedenle, bu eksikliği giderebilmek adına çalışmamızda tercih edilmiştir.

3.4. Beyin Omurilik Sıvısı'ndan RNA İzolasyonu

- BOS' tan miRNA izolasyonunu gerçekleştirmek için SanPrep Column MicroRNA Mini-Prep Kiti(Bio Basic) kullanıldı.
- Kit protokolüne başlanmadan önce -80°C' de saklanan örnekler yaklaşık 10 dakika bekletilerek erimesi sağlandı.
- Kit protokolüne göre, BOS örneklerin tamamen parçalanmasını sağlamak için tüpe 1000µl miRNAExtractor eklendi ve oda sıcaklığında 10dk inkübe edildi.
- İnkübasyon işleminden sonra 200µl kloroform eklenerek 30 saniye vorteks uygulandı. 4°C'de 14.000 rpm'de 11 dakika sanrifuj edildi.
- Santifuj işleminden sonra oluşan süpernatant (üst renksiz faz) 1.5 ml'lik yeni bir ependorf tüpe aktarıldı. Üzerine süpernatantın 1/3 hacim kadar %100 etanol (600 µl için yaklaşık 200µl) eklendi ve birkaç kez pipetaj yapıldı.
- Ependorf içindeki solüsyon, Spin Column TR'ye aktarılarak 14.000 rpm'de 3 dk santrüfuj edildi.
- Toplama tüpü içerisindeki süpernatant (üst renksiz faz) 1.5 ml'lik yeni bir ependorf tüpe aktarıldı.
- Üzerine aktarılan hacmin 2/3'ü kadar (690µl için yaklaşık 460 µl)%100 etanol eklendi ve birkaç kez pipetaj yapıldı.

- Ependorf içindeki solüsyon, Spin Column MR'a aktarıldı ve 14.000 rpm'de 3 dk santrüfuj edildi.
- Toplama tüpü içerisindeki sıvı kısım boşaltıldı.

Dipnot: Lizat hacminin 750 µl'yi aşması durumunda Spin Column MR'a ependorf içindeki solüsyonun 750 µl kadarı eklendi. Ependorf içinde kalan solüsyon santrifuj işlemi yapıp sıvı kısım döküldükten sonra eklenerek tekrar 14.000 rpm'de 1 dk santrifuj yapıldı. Ardından toplama tüpü içerisindeki sıvı kısım boşaltıldı.

- Spin Column'a 500 µl etanol ile seyreltilmiş RPE Solüsyonu eklendi ve 14.000 rpm'de 1 dakika santrüfuj edildi.
- Toplama tüpü içerisindeki sıvı kısım boşaltıldı.
- Tekrar Spin Column'a 500 µl etanol ile seyreltilmiş RPE Solüsyonu eklendi ve 14.000 rpm'de 1 dakika santrüfuj edildi.
- Toplama tüpü içerisindeki sıvı kısım boşaltıldı.
- Etanolun tamamen uzaklaştırılması için tekrar boş bir şekilde Column 14.000 rpm'de 1 dakika santrüfuj edildi.
- Toplama tüpü içerisindeki sıvı ile beraber atıldı ve Column 1.5 ml'lik yeni ependorf tüpe aktarıldı
- Üzerine 35 µl RNase-free Water eklenerek 2 dakika boyunca inkübe edildi.
- 14.000 rpm'de 1 dakika boyunca santrüfuj edildi.
- Elde edilen RNA örnekleri komplementer DNA (cDNA) eldesine kadar -20°C' de muhafaza edildi. RNA izolasyonu ve cDNA eldesi çalışmamız boyunca aralıksız olarak gerçekleştirildi.

3.5. cDNA Sentezi

İzole edilen miRNA'lardan cDNA sentezi için abm miRNA All-In-One Cdna Synthesis Kit (Bio Basic) kullanıldı. Kullanılan kitin protokolüne uygun şekilde komplementer DNA (cDNA)'ya PCR ile çevrildi. Her hasta için toplam hacim 20 µl olacak şekilde hazırlandı.

Tablo 3.2. cDNA sentezi için reaksiyon karışımının hazırlanması

RT PCR komponentleri	Reaksiyon için hacim
2X miRNA cDNA Synthesis SuperMix	10µl

Enzyme Mix	2µl
Nuclease-free H ₂ O	6 µl
RNA	2 µl
Total Hacim	20 µl

Oluşturulan karışım dikkatli bir şekilde hazırlanarak kısa süreli santrifuj işlemi uygulandı ve GeneAmp PCR system 9700(Applied Biosystems, foster City, CA) cihazında kit protokolüne uygun sıcaklık ve sürelerde bırakıldı. cDNA için PCR protokolü aşağıdaki tablodaki gibi uygulandı.

Tablo 3.3. cDNA sentezi için PCR koşulları

PCR	1.Basamak	2.Basamak	3.Basamak	4.Basamak
Sıcaklık °C	37	50	85	4
Süre	30 dk	15 dk	5 dk	∞

Elde edilen cDNA'ların RT-PCR deneyleri öncesinde Spektrofotometre (Multiscan GO, Thermo Scientific, USA) cihazı kullanılarak kalite ve miktar tayini gerçekleştirildi. cDNA kalite ölçümünde A260/A280 oranının 1,8'e yakın olması beklendi. RT-PCR deneyleri öncesi örneklerden elde edilen cDNA konsantrasyonları 500ng/µl' dilüe edildi.

3.6. RT-PCR ile Ekspresyon Analizi

Araştırdığımız hsa-miR-155-5p, hsa-miR-222-5p, hsa-miR-378b'nin ekspresyon analizleri için cDNA'lara RT-SYBR Green qPCR kiti kullanılarak denatürasyon, hibridizasyon ve polimerizasyon basamaklarından oluşan 38-40 tekrarlık PCR protokolü uygulandı (Rotor-gene Q 5 PLEX HRM Qiagen). Seçilen üç miRNA'nın (miR-155-5p, miR-222-5p ve miR-378b) nispi ekspresyon seviyeleri Housekeeping gen SNORD48'e göre normalleştirildi.

Real Time PCR, nükleik asit miktarının tayininde oldukça tercih edilen ve DNA amplifikasyonu ile aynı zamanda artış gösteren floresans sinyalin ölçülmesi ile nicel sonuçlar elde edilen bir yöntemdir(Gunel, 2007). Real Time PCR, oldukça hassas ve hızlı olmasından dolayı oldukça avantajlı ve tercih edilen bir yöntemdir. SYBR Green Real Time PCR' da en çok tercih edilen boya olup çift zincirli DNA(dsDNA)'ya bağlanması sonucunda floresans ışımaya yayarak PCR ürün miktarının tayinine imkan sağlamaktadır(Bio-Rad Laboratuvarları A.Ş., 2022., Erişim Tarihi:20.12.2022).

Reaksiyonlar, hedef amplifikasyon ilk tespit edildiği andaki nokta (ya da döngü) ile karakterize edilir ve bu değere genellikle Ct değeri denilir. Bu floresan yoğunluğu arka plan floresansından daha büyük olduğu andır. Sonuçta, başlangıç materyalindeki hedef DNA miktarı ne kadar büyükse floresan sinyali o kadar hızlı, belirgin bir artış gösterecek ve daha düşük Ct değeri oluşturacaktır(Wong & Medrano, 2005). Bunun yanı sıra erime eğrisi analizi ile SYBR Green analizlerinde amplifiye olan DNA'nın hedef bölge olup olmadığı kesinleştirilebilir(anatoliagenetworks. Erişim Tarihi:20.12.2022).

Tablo 3.4. Ekspresyon analizi için RT-PCR reaksiyonunun hazırlanması

1 Reaksiyon	
Nükleaz-free su	3,4 µl
BrightGreen miRNA qPCR MasterMix	5 µl
Primer Forward	0,3 µl
Primer Reverse	0,3 µl
Dilüe cDNA	1 µl
Toplam Hacim	10 µl

Tablo 3.5. Ekspresyon analizi için RT-PCR koşulları

Aşamalar	Sıcaklık°C	Süre	Döngü
Enzim Aktivasyonu	95°C	10 dk	1
Denatürasyon	95°C	10 sn	
Annealing	63°C	15 sn	40
Uzama	72°C	5-30 sn	
Erime Eğrisi	Cihaz prensiplerine göre		

3.7. Klinik Değerlendirme

Nusinersen'in motor fonksiyonlara olası katkısını değerlendirmek için veren HFMSE skoru kullanılmıştır. SMA hastalarının tedavi yanıtıyla ilgili bilgi veren HFMSE skorları bu konuda eğitim almış Fizyoterapist tarafından yapılmıştır. HFMSE değerlendirmesinde 3 puan üzerinde bir gelişme, daha önceki çalışmalarda bildirildiği gibi klinik olarak anlamlı kabul edilmiştir. İstatistiksel olarak her Nusinersen uygulaması öncesi ve sonrası arasındaki miRNA ekspresyon farklılığının anlamlılık analizi yapılmış ve istatistiksel olarak hastaların klinik parametreleriyle (SMN2 gen

kopya sayısı ve SMA tipleri) ve özellikle SMA hastalarının tedavi yanıtıyla ilgili bilgi veren HFMSE skorlarıyla ilişkilendirilmiştir. Ayrıca SMA tiplerine göre Nusinersen'in miRNA profil değişikliklerine etkisi değerlendirilmiştir.

3.8. İstatiksel Analiz

Çalışmada, Nusinersen tedavisi alan SMA hastalarının, her Nusinersen uygulamasından önce ve sonra (yani bir sonraki doz uygulamasından önce ya da hastaların tedavileri devam ettiği sürece her Nusinersen uygulamasından önce) BOS'tan izole edilen miR-155-5p, miR-222-5p ve miR-378b ekspresyon seviyesindeki değişimler kıyaslandı. Kısmi miktarlara dayalı yöntemde ifade ölçümü yapılan miRNA ölçüm değerleri SNORD48 ile normalize edildi. Referans olarak alınan SNORD48 belirli şartlar altında her zaman sabit düzeylerde eksprese olan, doku ya da hücrede bazal düzeyde ve hücreler arası değişiklik göstermeden ifade edilen housekeeping genlerdir. qRT-PCR yönteminde, bahsi geçen gruplardan elde edilen Ct (Cp, Crossing points) değerleri kullanılarak ilgili miRNA RNA ifade düzeyleri istatistiksel olarak kıyaslanmıştır. Nusinersen uygulamasından önce elde edilen ifade değişim oranları kontrol olarak aynı hastanın bir sonraki Nusinersen tedavisi öncesi elde edilen ifade değişim oranlarıyla kıyaslanmıştır. Bu kıyaslama yapılırken elde edilen $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülü kullanılmıştır.

Formül 1: $2^{-\Delta Ct}$ formülü uygulanmıştır.

$$2^{-\Delta Ct} = 2^{-(\text{Örnek } \Delta Ct - \text{Gen-Referans } \Delta Ct)}$$

Bu formül kullanılarak hem kontrol grubun(Baseline-BOS1) hem de Nusinersen uygulaması alan grubun BOS örneklerinde ilgilenilen miRNA'ların referans gene kıyasla kaç kat değişim gösterdiği ayrı ayrı hesapladı. Formül sonucunda elde edilen gen ifadesindeki değişimlerin istatistiki analizleri yapıldı.

SPSS 21 programı (IBM software, Pointe Claire, Quebec, Kanada) ifade düzeyleri ölçülen miRNA'ların istatistiki analizi için kullanılmıştır. Normal dağılım değişimlerinde Shapiro Wilk testi kullanıldı ve verilerin parametrik olmadığı belirlendi. İstatistiki analizler olarak, tekrarlı karşılaştırmalarda Wilcoxon Signed Ranks Test, ikiden fazla karşılaştırmalarda ise Kruskal Wallis, iki grup karşılaştırmada Mann Witney U testi uygulanmıştır. Değerlerin korelasyon analizleri için Spearman korelasyon analizi kullanıldı. $p < 0,05$ değeri istatistiki olarak anlamlı kabul edilerek, 0,95 güven aralığında değerlendirme yapıldı.

4. BULGULAR

Çalışmamızda, hasta grubu olarak Nusinersen tedavisi alan SMA tanısı almış 20 pediatrik hasta seçilmiş ve bu hastalardan toplanan fazla BOS (48 BOS) örneği üzerinde çalışıldı. Çalışmanın ilk aşamasında literatür ve STarmiR-mirDB veritabanları taranarak SMA hastalarının BOS örneklerinde çalışılmak üzere 3 miRNA tespit edildi. Bu miRNA'lar hem kasta ifade edilen hem de SMN2-ekson 7 hedefleyebilen miRNA'lardır. Belirlenen miRNA'ların ifade düzeyleri, Nusinersen tedavisi alan SMA hastalarının, her Nusinersen uygulamasından önce ve sonrasındaki değişimleri kıyaslandı. miRNA ifade farklılığı, hastaların klinik parametreleriyle ve SMA hastalarının tedavi yanıtıyla ilgili bilgi veren HFMSE skorlarıyla ilişkilendirilmiştir. Ayrıca SMA tiplerine göre Nusinersen'in miRNA profil değişikliklerine etkisi değerlendirilmiştir.

4.1. Hastaların Verileri

Çalışmaya dahil edilen Nusinersen tedavisi alan 20 SMA hastasına ait demografik verilere Tablo 4.1'de ve klinik parametrelere ise Tablo 4.2'de yer verildi.

Tablo 4.1. Hastaların demografik verileri

		Hasta (n=20)
Cinsiyet	Erkek	11(%55,0)
	Kadın	9 (%45,0)
Yaş Ortalaması (Ay)		53,5± 57,3
Yaş Ortancası (Ay)		34,5 (3-200)
SMA Tipi	SMA tip I	7(%35,0)
	SMA tip II	10(%50,0)
	SMA tip III	3(%15'i)

Tablo 4.2 Klinik Parametreler

Hasta	SMA tipi	Cinsiyet	Yaş/Ay*	Örnekler	SMN2 kopya sayısı
1. Hasta	SMA 1	K	3	BOS 1,2,3,4,5	2
2. Hasta	SMA 1	K	6	BOS 1.3.4.6	2
3. Hasta*	SMA 1	K	6	BOS 4 ve 5	2
4. Hasta*	SMA 1	E	5	BOS 4	2
5. Hasta	SMA 1	K	11	BOS 6 ve 8	2
6. Hasta	SMA 1	E	7	BOS 1,2,3	2
7. Hasta	SMA 1	K	8	BOS 5 ve 7	2
8. Hasta	SMA 2	E	129	BOS 7 ve 10	3
9. Hasta	SMA 2	K	14	BOS 6, 7, 9	3
10. Hasta	SMA 2	E	17	BOS 6,7, 10	3
11. Hasta	SMA 2	E	151	BOS 1 ve 2	3
12. Hasta	SMA 2	K	200	BOS 1	3
13. Hasta	SMA 2	E	86	BOS 8	3
14. Hasta	SMA 2	E	52	BOS 8	5
15. Hasta	SMA 2	E	13	BOS 1,2,3,4,5.	3
16. Hasta	SMA 2	E	58	BOS 6 ve 7	3
17. Hasta	SMA 2	K	61	BOS 7ve 9	3
18. Hasta	SMA 3	K	70	BOS 2,6,7	3
19. Hasta	SMA 3	E	53	BOS 6,7, 10.	3
20. Hasta	SMA 3	E	120	BOS 6	4

*Başlangıç yaşı

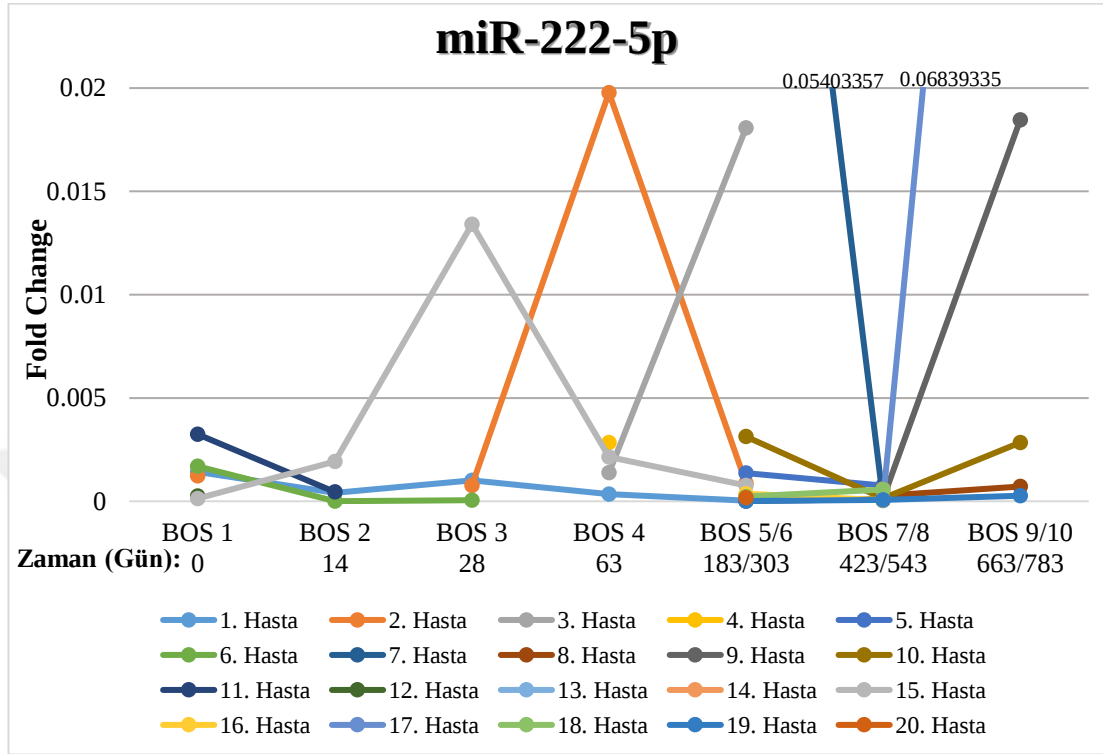
*3.hasta: 20 aylıkken ex

*4. hasta: 11 aylıkken ex

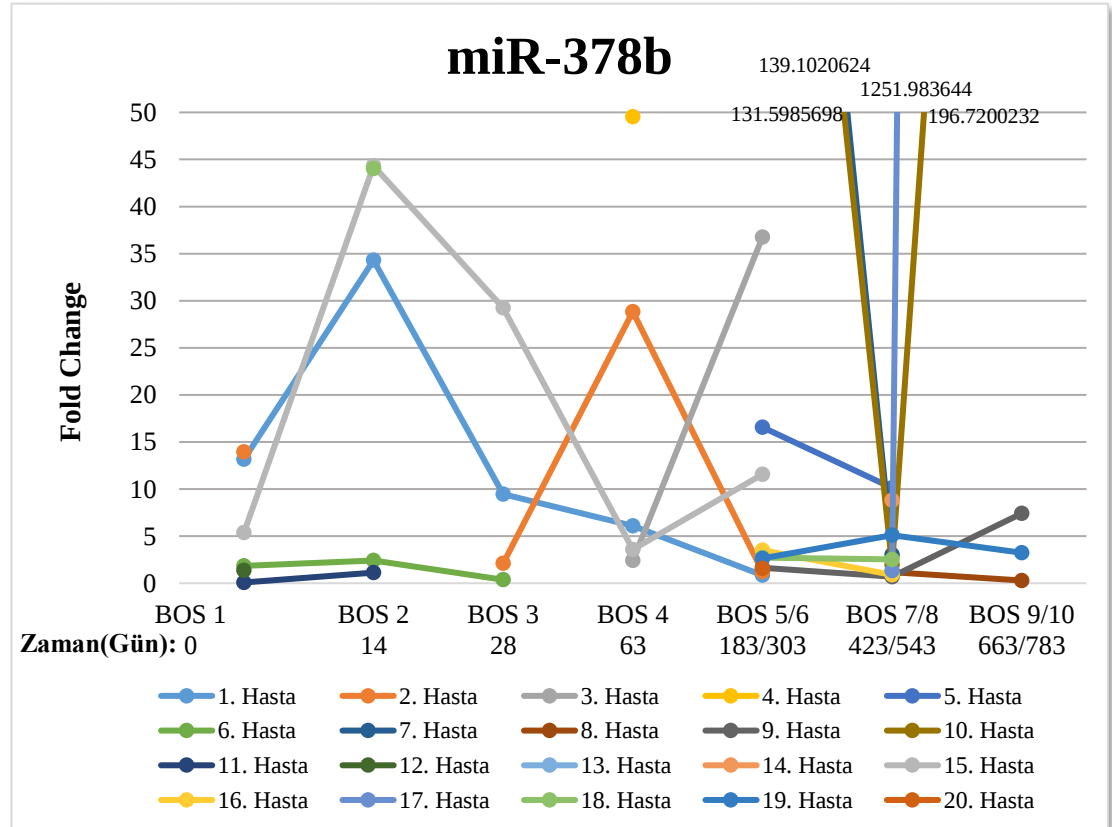
4.2. MiRNA İfade Değişimleri

SMA'lı 20 hastanın her Nusinersen uygulaması öncesi ve sonrasında çalışılan 48 BOS örneğinin incelendiği çalışmamızda qRT-PCR analiz ile Ct değerleri elde edildi. miR-155-5p'nin ifade edilmediğini tespit ettik (Ct değeri tespit edilmedi). Bu nedenle sadece miR-222-5p ve miR-378b'nin ifade düzey farklılıkları değerlendirildi.

Ayrı ayrı her hastanın tüm gruplarda (BOS1,2,3..) miR-222-5p ifade düzey farkının grafiksel gösterimine Şekil 4.1’de, miR-378b’nin ifade düzey farkını grafiksel gösterimine Şekil 4.2’de, yer verildi.



Şekil 4.1: Her hastanın ayrı ayrı miR-222-5p ifade düzey farkını grafiksel gösterimi



Şekil 4.2: Her hastanın ayrı ayrı miR-378b ifade düzey farkını grafiksel gösterimi

4.3. SMN2 Kopya Sayısı ve MiRNA'lar

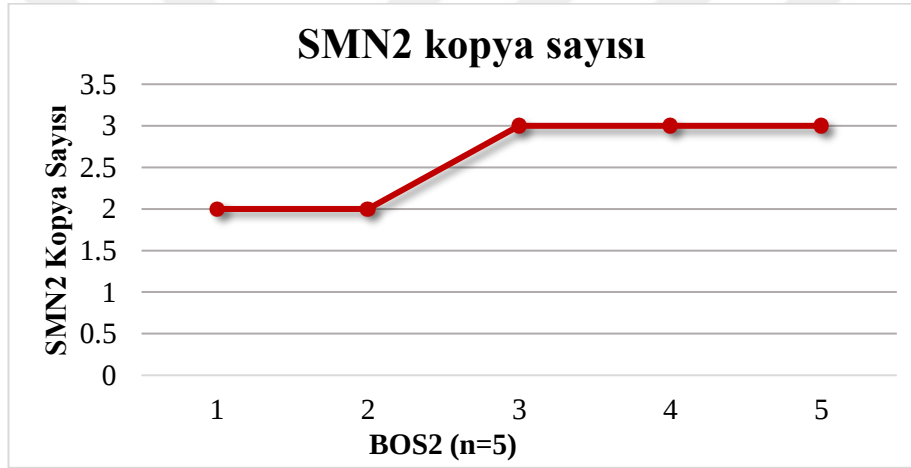
SMN2 kopya sayısı hastalığın fenotipi ile ters orantılı şekilde ilişkilendirilmekte olup kopya sayısı ne kadar fazla ise fenotipin o kadar hafif olduğu bilinmektedir.

MiR-222-5p ve SMN2 Kopya sayısı:

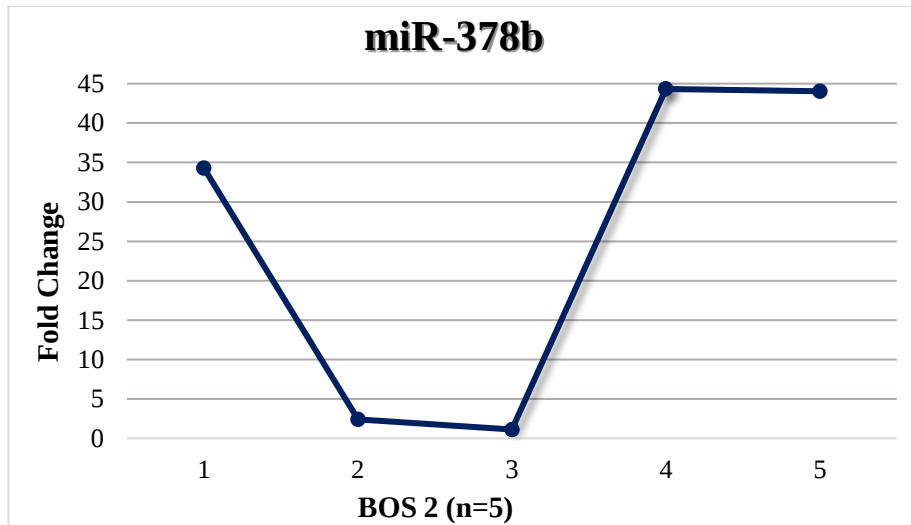
Spearman korelasyon analizinde, miR-222-5p ve SMN2 kopya sayısı arasında doğrusal ilişki olmadığı bulundu ($p>0,05$)

MiR-378 b ve SMN2 Kopya sayısı:

Spearman korelasyon analizinde, BOS 2 ölçümünde ki miR-378b düzeyi ile SMN2 kopya sayısı arasında istatistiksel olarak anlamlılığa yakın yüksek bir korelasyon olduğu bulundu ($r:0,86$; $p=0,058$). Diğer ölçümlerde ise korelasyon bulunmadı ($p>0,05$). Şekil 4.3 ve 4.4'te BOS2' si çalışılan hastalarda SMN2 kopyası ve miR-378b ifade düzey farkı arasındaki ilişki gösterilmiştir.



Şekil 4.3. BOS 2'si çalışılan 5 hastanın SMN2 kopya sayısı.



Şekil 4.4. BOS 2'si çalışılan 5 hastanın miR-378b ifade düzey değişikliği

4.4. HFMSE ve MiRNA Tanımlayıcı Verileri

, BOS'ta ki miR-222-5p, miR-378b ölçümlerine ve HFMSE ölçümlerine Tablo 4.3'de yer verilmiştir. HFMSE skorları ile BOS'taki miR-222-5p ölçümlerinin karşılaştırılmasına Tablo 4.4'de HFMSE skorları ile BOS'taki miR-378b ölçümlerinin karşılaştırılması Tablo 4.5'da yer verilmiştir.

Tablo 4.3. miR-222-5p, miR-378b ve HFMSE Tanımlayıcı Verileri

	miR-222-5p	miR-378b	HFMSE
BOS 1	25,4 (22,1-28,3)	13,7 (11,2-17,5)	13,0 (4-30)
BOS 2	28,0 (24,5-32,3)	13,7 (11,7-14,1)	
BOS 3	26,8 (24,0-28,8)	14,7 (12,5-16,2)	
BOS 4	24,6 (22,4-27,5)	12,7 (11,9-13,9)	
BOS 5/6	26,5 (24,1-33,0)	13,5 (10,2-17,1)	29,0 (6-60)
BOS 7/8	27,0 (25,4-31,4)	13,9 (11,7-18,1)	28,0 (10-63)
BOS 9/10	27,9 (24,3-27,9)	14,3 (11,8-17,2)	29,0 (7-52)

Tablo 4.4. HFMSE skorları ile BOS'taki miR-222-5p ölçümlerinin karşılaştırılması

	1. Gözlem (Baseline) ^a	2. Gözlem ^b	3. Gözlem ^c	4. Gözlem ^d	5/6. Gözlem ^e	7/8. Gözlem ^f	9/10. Gözlem ^g	P Değeri
HFMSE	13,0 (4-30)				29,0(6-60)	28,0(10-63)	29,0(7-52)	a-e=0,068 a-f=0,109 a-g=* e-f=0,007 e-g=0,066 f-g=0,159

BOS (miR-222-5p)

25,4(22,1-28,3)	28,0(24,5-32,3)	26,8(24,0-28,8)	24,6(22,4-27,5)	26,5(24,1-33,0)	27,0(25,4-31,4)	27,9(24,3-27,9)	a-b=0,068
							a-c=0,715
							a-d=0,285
							a-e=0,593
							a-f=*
							a-g=*
							b-c=0,109
							b-d=0,180
							b-e=1,000
							b-f=*
							b-g=*
							c-d=0,109
							c-e=0,593
							c-f=*
							c-g=*
							d-e=0,068
							d-f=*
							d-g=*
							e-f=0,176
							e-g=0,109
							f-g=0,500

HFMSE1: BOS1(Baseline)'den hemen önce, HFMSE5/6: BOS 5/6.'dan hemen önce, HFMSE7/8: BOS 7/8.'dan hemen önce, HFMSE9/10: BOS 9/10.'dan hemen önce yapılan ölçümleri göstermektedir.
*: Veri yetersizliğinden dolayı değerlendirme yapılamadı.

Tablo 4. 5 : HFMSE skorları ile BOS'taki miR-378b ölçümlerinin karşılaştırılması

	1.	2.	3.	4.	5/6.	7/8.	9/10.	P Değeri
	Gözlem	Gözlem ^b	Gözlem ^c	Gözlem ^d	Gözlem ^e	Gözlem ^f	Gözlem ^g	
	(Baseline) ^a							
HFMSE	13,0 (4-30)				29,0(6-60)	28,0(10-63)	29,0(7-52)	a-e=0,068
								a-f=0,109
								a-g=*
								e-f=0,007
								e-g=0,066
								f-g=0,159
BOS (miR-378b)	13,7 (11,2-17,5)	13,7 (11,7-14,1)	14,7 (12,5-16,2)	12,7 (11,9-13,9)	13,5 (10,2-17,1)	13,9 (11,7-18,1)	14,3 (11,8-17,2)	a-b=0,144
								a-c=0,068
								a-d=0,285
								a-e=0,285
								a-f=*
								a-g=*
								b-c=0,109
								b-d=0,655
								b-e=1,000
								b-f=*
								b-g=*
								c-d=,109
								c-e=1,000
								c-f=*

c-g=*
d-e=0,465
d-f=*
d-g=*
e-f=0,310
e-g=1,000
f-g=0,080

HFMSE1: BOS1(Baseline)'den hemen önce, HFMSE5/6: BOS 5/6.'dan hemen önce, HFMSE7/8: BOS 7/8.'dan hemen önce, HFMSE9/10: BOS 9/10.'dan hemen önce yapılan ölçümleri göstermektedir.

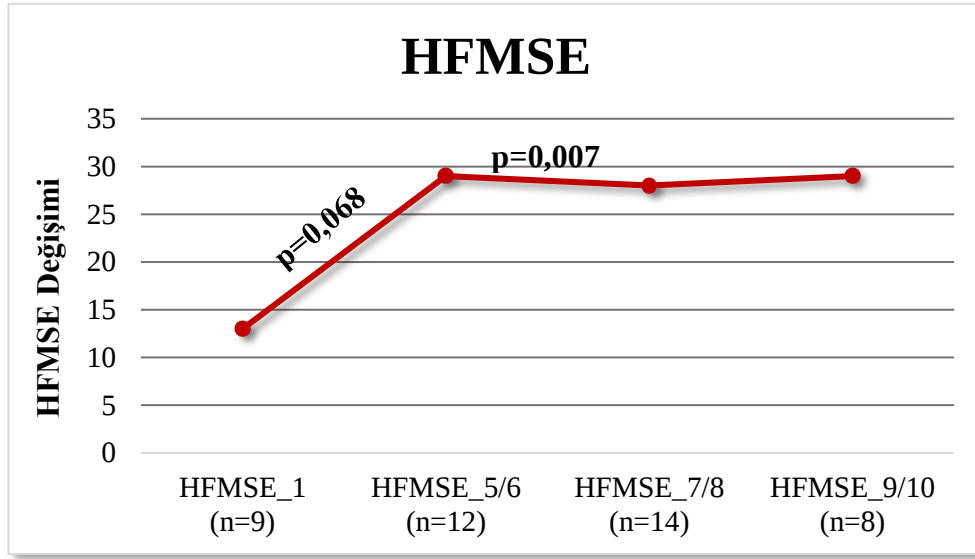
*: Veri yetersizliğinden dolayı değerlendirme yapılamadı.

4.5. HFMSE Değerlendirmesi

Çalışmamızda, Nusinersen uygulaması alan SMA hastalarında, Nusinersen'in motor fonksiyonlara olası katkısını değerlendirmek için HFMSE kullanıldı. Wilcoxon Signed Ranks Test ile uygulanan her HFMSE skorları kıyaslanarak istatistiksel analiz yapıldı. Test sonucuna göre;

- HFMSE-1(ortanca değer=**13,0**) ve HFMSE-5/6 (ortanca değer=**29,0**). arasında istatistiksel olarak anlamlılığa yakın bir fark gösterdiği bulundu (**p=0,068**)
- HFMSE-1 (ortanca değer=**13,0**) ve HFMSE-7/8 (ortanca değer=**28,0**) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p>0,05$).
- HFMSE-1 (ortanca değer=**13,0**) ve HFMSE-9/10 (ortanca değer=**29,0**) veri yetersizliğinden dolayı ölçülemedi.
- HFMSE-5/6 (ortanca değer=**29,0**) ve HFMSE7/8 (ortanca değer=**28,0**) arasında istatistiksel olarak net bir korelasyon olduğu bulundu (**p=0,007**).
- HFMSE-5/6 (ortanca değer=**29,0**) ve HFMSE-9/10 (ortanca değer=**29,0**) istatistiksel olarak arasında anlamlı fark bulunmadı ($p>0,05$)
- HFMSE-7/8 (ortanca değer=**28,0**) ve HFMSE-9/10 (ortanca değer=**29,0**) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı.

Sonuç olarak; İlk ölçüm(HFMSE-1 -baseline) skor puanının 4 yükleme dozdan sonra yapılan 2. ölçüm (HFMSE-5/6) arasında istatistiksel olarak anlamlılığa yakın bir artışı görüldü ($p=0,068$). Daha sonra 4 ay sonra yapılan 2. ölçüm (HFMSE-5/6) skor puanının bir sonraki uygulama öncesinde yapılan 3. ölçüm (HFMSE-7/8) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir artışı görüldü ($p=0,07$). 3. ölçüm (HFMSE-7/8) ile bir sonraki uygulama öncesinde yapılan 4. ölçüm (HFMSE-9/10) arasında istatistiksel olarak arasında anlamlı fark bulunmadı ve dolayısıyla bu anlamlı artışın devam ettiği görüldü. Nusinersen uygulaması alan hastalardaki HFMSE skorlarının değişimine şekil 4.5'de yer verildi.



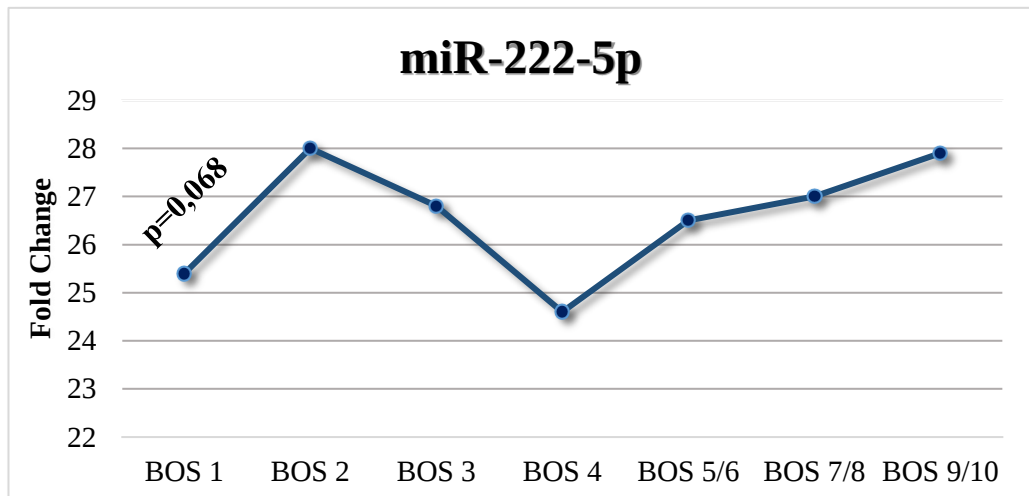
Şekil 4.5. HFMSE skorlarının Nusinersen uygulaması alan hastalardaki değişimi.

4.6. BOS Örneklerinde MiR-222-5p ve MiR-378b Değerlendirmesi

MiR-222-5p ve miR-378b'nin ifade düzeyleri, Nusinersen tedavisi alan SMA hastalarının, her Nusinersen uygulamasından önce ve sonrasındaki değişimleri(her biri ayrı ayrı) tekrarlı ölçüm testi (Wilcoxon Signed Ranks Test) kullanılarak istatistiksel olarak kıyaslandı.

MiR-222-5p ifade değişimi:

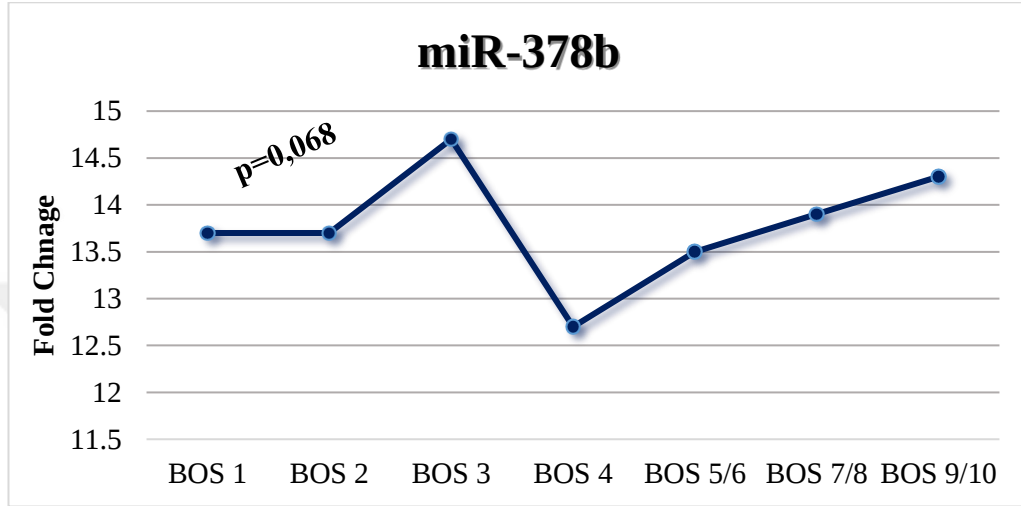
MiR-222-5p ifade düzeyinde, BOS1'de (25,4 (22,1-28,3)) ve BOS2 (28,0 (24,5-32,3)) arasında bir artışın olduğu ve bunun istatistiksel olarak anlamlılığa yakın olduğu bulundu ($p=0,068$). Diğer tüm BOS grupları da karşılaştırıldı, ancak istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı bulundu. Tüm gruplarda ayrı ayrı miR-222-5p'nin ifade değişiminin gösterimine Şekil 4.6'da yer verildi.



Şekil 4.6. Tüm gruplarda ayrı ayrı miR-222-5p'nin ifade değişiminin gösterimi

MiR-378b ifade değişimi;

MiR-378b ifade düzeyinde BOS 1 (13,0 (4-30)) ve BOS 3(14,7 (12,5-16,2)) arasında istatistiksel olarak anlamlılığa yakın fark bulundu ($p=0,068$). Diğer tüm BOS grupları da karşılaştırıldı, ancak istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı bulundu . Tüm gruplarda ayrı ayrı miR-378b'nin ifade değişiminin gösterimine şekil 4.7'de yer verildi



şekil 4.7. Tüm gruplarda ayrı ayrı miR-378b'nin ifade değişiminin gösterimi

4.7. HFMSE ve MiRNA Korelasyonu

Hastaların klinik değerlendirmedeki HFMSE skorları ile hastalardan toplanan BOS örneklerindeki miR-222-5p-miR-378b ekspresyonları kıyaslanmış ancak herhangi bir korelasyon bulunmamıştır. Ancak ilk ve son durum karşılaştırmalarına baktığımızda, hem HFMSE'nin hem de miR-222-5p-miR-378b'nin zamanla (ilk duruma göre) artış gösterdiği bulunmuştur. şekil 4.8'de HFMSE ile miR-222-5p ve miR-378b nin karşılaştırılmasına yer verildi.

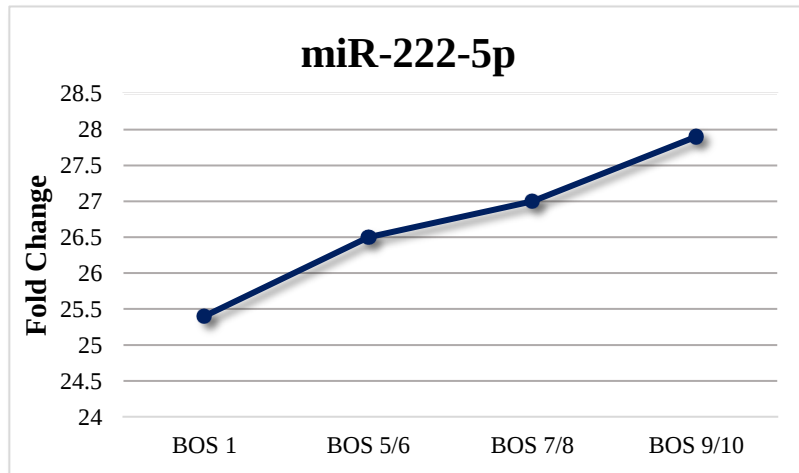
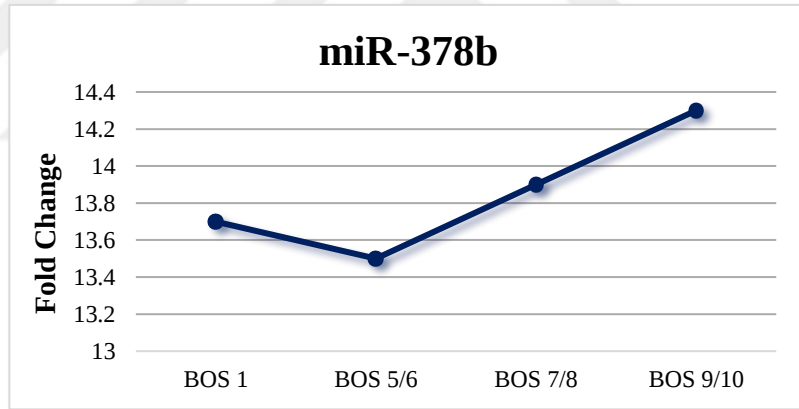
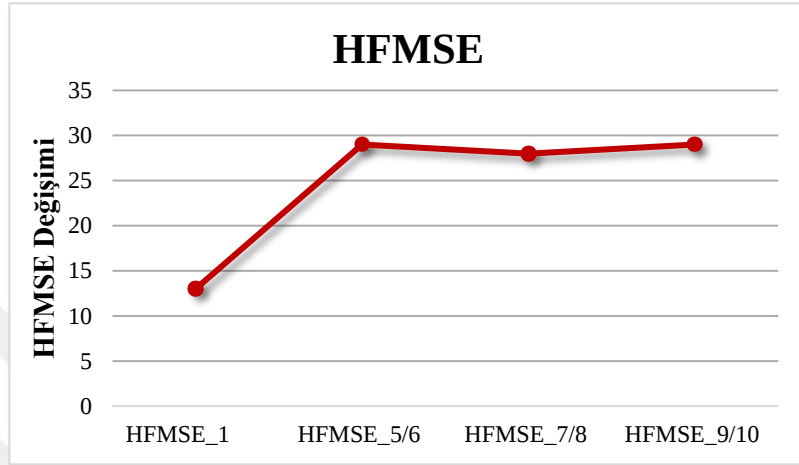
*HFMSE skor değişimleri ile BOS taki miRNA ekspresyon düzeyleri arasındaki korelasyon değerlendirildi. Buna göre;

* HFMSE ve miR-222-5p'nin BOS 4  l m değeri ile HFMSE skor değişim puanı (HFMSE 5/6 -HFMSE1)arasında negatif yönde orta düzeyde korelasyon vardı, ancak istatistiksel anlamlı değildi ($r=-0,40;p=0,30$)

*HFMSE ve miR-222-5p; miR-222-5p'nin BOS5/6  l m değeri ile HFMSE skor değişim puanı (HFMSE 7/8 -HFMSE 5/6)arasında negatif yönde orta düzeyde korelasyon vardı, ancak istatistiksel anlamlı değildi ($r=-0,31;p=0,18$)

* HFMSE ve miR-378b'nin BOS 4 ölçüm değeri ile HFMSE skor değişim puanı (HFMSE 5/6 -HFMSE1) arasında negatif yönde orta düzeyde korelasyon vardı, ancak istatistiksel anlamlı değildi ($r=-0,38;p=0,061$)

*HFMSE ve miR-378b'nin BOS5/6 ölçüm değeri ile HFMSE skor değişim puanı (HFMSE 5/6 -HFMSE1) arasında negatif yönde orta düzeyde korelasyon vardı, ancak istatistiksel anlamlı değildi ($r=-0,24;p=0,050$)



Şekil 4.8. HFMSE ile miR-222-5p ve miR-378b nin karşılaştırılması

4.8. Alt Tip Değerlendirmesi

SMA alt tiplerine göre değerlendirme yapıldığında HFMSE 5/6 ölçümlerine göre SMA tip I ve II arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu (**P=0,019**). SMA Tip I ve III arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı bulundu. SMA tip II ve III arasında anlamlı fark bir olduğu bulundu. HFMSE 7/8 ölçümlerine göre SMA tip I ve tip II arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu bulundu. SMA Tip I ve III arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı bulundu. SMA tip II. ve III arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu bulundu (**P=0,009**). Dolayısıyla farkı oluşturan grup SMA tip II'nin olduğu sonucuna varıldı.

SMA alt tiplerine göre miR-222-5p ve miR-378b ölçümlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı. SMA alt tiplerine göre HFMSE karşılaştırılması Tablo 4.6' de, miR-222-5p karşılaştırılmasına Tablo 4.7' de, miR-378b karşılaştırılmasına ise Tablo 4.8' de yer verilmiştir.

Tablo 4.6. SMA alt tiplerine göre HFMSE değerlendirme karşılaştırılması

	SMA I	SMA II	SMA III	P Değeri
HFMSE -1	13,0 (7-27)	6,0 (4-20)	30 (30-30)	0,19
HFMSE-5/6	31,0 (25-38)	19,0(6-26)	47,0 (36-60)	P=0,019 P(1-2)=0,027 P(1-3)=0,101 P(2-3)=0,034
HFMSE-7/8	29,0 (28-39)	20,5 (10-28)	49,0 (37-63)	P=0,009 P(1-2)=0,023 p (1-3)=0,127 p(2-3)=0,014
HFMSE-9/10	-	29,0 (7-30)	52,0 (52-52)	0,11

Tablo 4.7. SMA alt tiplerine göre miR-222-5p değerlendirmesi

MiR-222-5p	SMA I	SMA II	SMA III	P Değeri
------------	-------	--------	---------	----------

BOS 1	24,6 (24,5- 26,2)	25,8 (22,1- 28,3)	-	0,51
BOS 2	30,1 (28,0- 32,3)	26,8 (25,0- 28,6)	24,5 (24,5- 24,5)	0,30
BOS 3	27,5 (24,0- 28,8)	26,1 (26,1- 26,1)	-	0,65
BOS 4	25,6 (22,4- 27,5)	23,4 (23,4- 23,4)	-	0,48
BOS 5/6	24,9 (24,5- 31,8)	28,3 (24,1- 32,8)	26,6 (26,5- 33,0)	0,35
BOS 7/8	27,5 (25,4- 29,7)	27,0 (25,6- 31,4)	28,2 (26,1- 30,2)	0,88
BOS 9/10	-	26,9 (24,3- 27,9)	27,9 (27,9- 27,9)	1,00

Tablo 4.8. SMA alt tiplerine göre miR-378b değeri

MiR-378b	SMA I	SMA II	SMA III	P Değeri
BOS 1	13,0(11,2- 14,5)	14,6(13,0- 17,5)		0,12
BOS 2	12,4(11,7- 13,1)	13,9(13,7- 14,1)	13,8(13,8- 13,8)	0,22
BOS 3	14,3(12,5- 16,2)	15,1(15,1- 15,1)		0,65
BOS 4	12,9(11,9- 13,9)	12,7(12,7- 12,7)		1,00
BOS 5/6	13,9(12,6- 17,1)	13,4(10,2- 14,9)	13,3(13,1- 15,3)	0,69
BOS 7/8	12,5(11,7- 13,2)	13,9(11,8- 18,1)	14,0(13,9- 14,0)	0,35
BOS 9/10		14,7(11,8- 17,2)	14,3(14,3- 14,3)	1,00

5. TARTIŞMA

SMA, ilerleyici kas atrofisi ve güçsüzlüğü ile karakterize olan nöromusküler bir hastalık olup bebeklerde önde gelen ölüm nedenlerinden biridir(Darryl et al., 2019). Hastalığa SMN1 geninin ekson 7'deki mutasyonlar neden olmaktadır. SMN1 geni tarafından üretilen FL-SMN proteini motor nöronların işlevi için kritik öneme sahiptir(Albrechtsen et al., 2020). Paralog gen SMN2, ekson 7'deki C6T geçişi bakımından SMN1'den farklılık gösterir. SMN2-ekson 7'deki C6T geçişi, Alternatif Splicing işleminde bir hataya neden olarak ekson 7'nin atlanmasına ve kesilmiş, stabil ve işlevsel olmayan bir protein (SMN Δ 7) (%90)oluşmasına yol açmaktadır(Mercuri et al., 2022).Sonuç olarak SMN2, yeterli seviyede FL-SMN proteini oluşturamaz ve SMA'yı engelleyemez((Iftikhar et al., 2021; Q. Li, 2020) . ASO olan Nusinersen tüm SMA tipleri için uygulanabilen ilk tıbbi tedavidir ve FL-SMN protein oluşumunu arttırmak üzere tasarlanmıştır Günümüzde SMA gibi motor nöron hastalıkları için yeni tedavilerin geliştirilmesi göz önüne alındığında, hastalığın ilerlemesini ve terapötik yanıtı izlemek için non-invaziv ve klinik olmayan potansiyel biyobelirteçlerin tanımlanmasına olan ihtiyaç daha da artmıştır.MiRNA'lar, post-transkripsiyonel olarak gen ekspresyonunu düzenlenmesinde rol oynayan küçük endojen RNA'lardır. miRNA'ların anormal ekspresyon düzeyleri belirli bir dokuya verilen hasarı da yansıtmaktadır(Bonanno et al., 2020). Ayrıca miRNA'lar, non-invaziv yöntemlerle klinik olarak saptanabilir ve kolay erişilebilir olması nedeniyle biyobelirteçler olarak oldukça dikkat çekmiştir. Günümüzde bir çok hastalığın patogenezinde tanısız ve prognozu için miRNA'lar, potansiyel biyobelirteçler olarak kullanılmaktadır.

Nusinersen tedavisi alan SMA hastalarında biyobelirteçler olarak miRNA'ların incelendiği çok fazla çalışma yoktur. Ancak son zamanlardaki çalışmalar bu alandaki ilginin arttığını göstermektedir. Bu çalışmalardan biri Bonono ve ark.(2019) tarafından gerçekleştirilmiştir. Çalışmada, Nusinersen tedavisi alan 21infantil SMA hastasının serumunda, kas dokusunda ifade edilen 4 miRNA'nın(miR-133a, -133b, -206, -1) bir biyobelirteç olarak Nusinersen etkinliği ile ilgili bilgi verici potansiyeli ölçülmüştür. Çalışma sonucunda, tip II ve III hastalarında miR-133a, -133b, -206, -1, ekspresyon düzeylerinin Nusinersen tedavisi alan bu hastalarda başlangıç düzeyine göre azaldığı ve miR-133a düzeyinin tedaviye öngörülen motor fonksiyon yanıtı değiştirdiği gözlemlenmiştir(Bonanno et al., 2020). Magen ve ark (2022) çalışmalarını yine

Nusinersen'e yanıtı tahmin edebilecek invaziv olmayan biyobelirteçlerin belirlenmesi amacıyla, Nusinersen tedavisi alan 34 SMA tip II ve III hastalarında gerçekleştirmişlerdir. Çalışma sonunda, miR-206, miR-133-3p'ün düşük başlangıç seviyelerinin 6 aylık tedaviden sonra Nusinersen tedavisine klinik yanıtı öngördüğü gözlemlenmiştir(Magen et al., 2022). Benzer bir çalışma da Welby ve ark. (2022) tarafından yapılmış ve Nusinersen uygulamasını takiben nöron ve glial sağlığın bir göstergesi olarak SMA hastalarının BOS örneklerinde miRNA'ların potansiyeli değerlendirilmiştir. Çalışma sonucunda, SMA' ya spesifik ya da genel motor disfonksiyonu ile ilişkili down regüle edilen miRNA ekspresyonunun, Nusinersen ile tedavi edilen BOS örneklerinde artma eğiliminde olduğu gözlemlenmiştir. Bunun da SMA tip I ve II hastalarında motor fonksiyon iyileşmeleri ile korele olduğunu gözlemlenmiştir(Welby, Rehborg, Harmelink, & Ebert, 2022). Bu çalışmada, SMA hastalarının beyin omurilik sıvılarında miRNA ekspresyon profillerini araştırmak ve bu sayede hastalığın tedavisinde kullanılan Nusinersen etkinliğine dair bir bilgi/gösterge elde edilmesi amaçlandı. Çalışmamızda, Bonono ve ark (2019), Magen ve ark. (2022) ve Welby ve ark. (2022) tarafından gerçekleştirilen benzer yaklaşımlar model alınmıştır.

Nörodejeneratif hastalıklara yönelik yapılan çalışmalarda, miRNA'lar BOS örneklerinde tespit edilebilen en umut verici biyobelirteçler olduğu gözlemlenmiştir. Hücresel sağkalımdaki gelişmeleri izleyebilen ve motor fonksiyondaki iyileşme ile bağlantılı olan BOS, yüksek klinik değere sahip bir biyobelirteçtir. Bu bağlamda SMA'da, BOS örnekleri ve miRNA'lar üzerine literatürü incelediğimizde çalışmaların daha çok yeni olduğunu söyleyebiliriz. Çalışmamızda Nusinersen tedavisi alan SMA hastalarında, miRNA'ların BOS örneklerinde saptanabilmesi ve bu alanda çok az çalışma bulunması nedeniyle literatüre katkı sağlamak adına BOS örnekleri kullanıldı. Magen ve ark.(2022) ile Welby ve ark. (2022) çalışmalarında, Nusinersen tedavisi alan SMA hastalarında miRNA'ların potansiyel biyobelirteç etkinliğini ölçmek için hastaların BOS örneklerini kullanmışlardır(Magen et al., 2022; Welby et al., 2022). Bu yaklaşımlar bizim çalışmamızı destekler niteliktedir ve çalışmamızda BOS örneklerinin tercih edilmesi için olumlu etkiler sunmaktadır

Çalışmamızda, Nusinersen tedavisi alan SMA hastalarının BOS örneklerinde her Nusinersen uygulamasından önce ve sonrasındaki miR-155-5p, miR-222-5p ve miR-378b'nin ifade düzeyleri kıyaslandı. Çalışma sonucunda araştırılan miRNA'ların motor fonksiyon iyileşmeleri ile korele olması ve hastalığın tedavisinde kullanılan

Nusinersen'e yanıtı tahmin edebilecek invaziv olmayan biyobelirteçler olarak etkinlik göstermesi beklenmektedir.

qRT-PCR analiz ile miRNA'ların (miR-155-5p, miR-222-5p ve miR-378b'nin) analizi yapıldı ve analiz sonucunda miR-155-5p'nin ifade edilmediğini tespit ettik (Ct değeri tespit edilmedi). miR-155-5p bir RNA olduğu için gen ifade regülasyonunu, transkripsiyon ve RNA işlenmesi(post transkripsiyonel)aşamasına kadar irdeleyebiliriz. İlk aşamada, primer transkript olarak oluştuktan sonra olgunlaşma aşamasında (RNA işlenmesinde) RNA molekülleri yapısal değişikliklere uğrar ve bu aşamada bazı müdahaleler etkili olmuş olabilir. Yani bu müdahaleler, BOS'ta serumda olduğu gibi ya da SMA' da serum da olduğu gibi olmuyor olabilir. Bu bahsettiğimiz ifade regülasyonlarının, miR-155-5p'nin ifadesinde, SMA'ya spesifik olarak down regüle yönünde değişiklik gösterdiğini düşünmekteyiz.

Çalışmamızda, miR-222-5p düzeylerinde düşük başlangıç seviyesine göre Nusinersen tedavisiyle birlikte genel bir artış eğilimi gösterdiği gözlemlendi. Özellikle, baseline göre ilk doz Nusinersen uygulaması yapıldıktan sonra (BOS 1 ve BOS2 arasında) miR-222-5p düzeylerinde anlamlılığa yakın bir artış olduğu görüldü(p=0,068). Aynı zamanda alt tip değerlendirmesi yapıldığında miR-222-5p ifade düzeyinin tiplere göre farklılık göstermediği gözlemlendi. Verilerimiz, Nusinersen tedavisi alan SMA üzerine yapılan çalışmalarda literatürü destekler niteliktedir. Welby ve ark. tarafından gerçekleştirilen, SMA hastalarının BOS örneklerinde miRNA düzeylerinin Nusinersen tedavisiyle birlikte arttığının gözlemlendiği çalışma ile uyumludur(Welby et al., 2022). Aynı zamanda Captano ve ark., PMO25 ASO tedavisi aldıktan sonra hafif ve şiddetli SMA farelerinin omuriliklerinde miRNA'ların (örneğin miR-132) gelişmiş ekspresyonunu göstermiş ve miR-132'nin tedaviye yanıt verdiğini gözlemlemişlerdir. Çalışmamız, Captano ve ark. tarafından miR-132'nin hastalığın ilerlemesini ve terapötik yanıtı izleyebilmek adına potansiyel bir biyobelirteç olabileceğini gösterdikleri bu çalışma ile de uyumludur(Catapano et al., 2016).

Çalışmamızda yine benzer şekilde, miR-378b düzeylerinde de düşük başlangıç seviyesine göre Nusinersen tedavisiyle birlikte genel bir artış gösterdiği gözlemlendi. Özellikle, baseline göre 2 doz aldıktan sonra (BOS1 ve BOS3 arasında) miR-378b düzeylerinde anlamlılığa yakın bir artış olduğu görüldü(p=0,068). Aynı zamanda alt tip değerlendirmesi yapıldığında miR-378b ifade düzeyinin tiplere göre farklılık göstermediği gözlemlendi. Verilerimiz, Nusinersen tedavisi alan SMA üzerine

yapılan çalışmalarda literatürü destekler niteliktedir. Zaharieva ve ark. (2022) çalışmalarında Nusinersen tedavisi alan SMA tip II ve III hastalarının kan örneklerinde miR-378-3p'nin Nusinersen'e yanıtı tahmin etmede potansiyel biyobelirteç olarak etkinliğini araştırmışlardır. Çalışma sonucunda, miR-378-3p düzeylerinin başlangıç seviyelerine göre tedavi ile birlikte arttığı ve daha iyi motor fonksiyon ile ilişkilendirdiği bildirilmiştir. Zaharieva ve ark. (2022) tarafından gerçekleştirilen bu çalışma bizim çalışmamızla uyumludur(Zaharieva et al., 2022). Aynı zamanda çalışmamız yukarıda bahsedilen,Welby ve ark. ile Captano ve ark tarafından gerçekleştirilen, miRNA düzeylerinin Nusinersen tedavisiyle birlikte arttığının gözlemlendiği çalışmalar ile uyumludur(Welby et al., 2022).

Çalışmamızda, Nusinersen tedavisi alan SMA hastalarında tedavi ile birlikte motor fonksiyonlarında bir artış/iyileşme olması beklenmektedir. Çalışma verilerimizde beklendiği gibi olduğu Nusinersen tedavisi alan SMA hastalarında tedavi ile birlikte motor fonksiyonlarında bir artış olduğu gözlemlendi. Bu bulgumuz, Bonono ve ark.(2019), Magen ve ark. (2022), Webl ve ark. (2022) ve Zaharieva ve ark. (2022) tarafından gerçekleştirilen Nusinersen tedavisi alan SMA hastalarında motor fonksiyonlardaki iyileşme sonuçları ile uyumludur(Bonanno et al., 2020; Magen et al., 2022; Welby et al., 2022; Zaharieva et al., 2022).

Çalışmamızın bir diğer yaklaşımı ise, HFMSE skorları ile miR-222-5p ve miR-378b arasındaki korelasyonun değerlendirilmesi ve pozitif ya da negatif yönde bir korelasyonun bulunmasıydı.Analizlerimiz sonucunda, HFMSE skorları ile hastalardan toplanan BOS örneklerindeki miR-222-5p ve miR-378b ekspresyonları kıyaslanmış ancak herhangi bir korelasyon olmadığı gözlemlendi. Ancak ilk ve son durum karşılaştırmalarına baktığımızda, hem HFMSE'nin hem de miR-222-5p-miR-378b'nin zamanla (ilk duruma göre) artış gösterdiği görüldü. Ek olarak, HFMSE skor değişimleri ile miRNA ekspresyon düzeyleri arasındaki korelasyon değerlendirildi. miR-222-5p'nin BOS 4 ölçüm değeri ile HFMSE skor değişim puanı (HFMSE 5/6 - HFMSE1)arasında ve miR-222-5p'nin BOS5/6 ölçüm değeri ile HFMSE skor değişim puanı (HFMSE 7/8 -HFMSE 5/6)arasında negatif yönde orta düzeyde korelasyon olduğu gözlemlendi. Benzer şekilde, miR-378b'nin BOS 4 ölçüm değeri ile HFMSE skor değişim puanı (HFMSE 5/6 -HFMSE1)arasında ve miR-378b'nin BOS5/6 ölçüm değeri ile HFMSE skor değişim puanı (HFMSE 5/6 -HFMSE1)arasında negatif yönde orta düzeyde korelasyon olduğu ancak bunun istatistiksel olarak anlamlı olmadığı gözlemlendi. Çalışmamızdaki bu veriler değerlendirildiğinde genel anlamda

bahsettiğimiz benzer çalışmalarda olduğu gibi HFMSE ve miR-222-5p/miR-378b ifade düzeylerinde tedavi ile birlikte başlangıç düzeyine göre bir artış eğilimi ve HFMSE skor değişimleri ile miR-222-5p/miR-378b düzeyleri arasında negatif yönde orta düzeyde korelasyon olduğu gözlemlendi. Ancak bu veriler istatistiksel olarak anlamlı değildi. Bunun ana nedeninin hasta sayısının azlığı ve veri yetersizliğinin olduğunu düşünmekteyiz.

Çalışmamızın kısıtlı yanlarını ele aldığımızda ilk olarak en önemli odak noktamız HFMSE ile miRNA'lar(miR-222-5p ve miR-378b) arasındaki korelasyonu araştırmaktı. Verilerimiz, benzer çalışmalarda olduğu gibi tedavi ile birlikte hem HFMSE'nin hem de miR-222-5p-miR-378b'nin tedavi ile birlikte başlangıç düzeyine göre bir artış eğilimi gösterdiğini gözlemlendi. Ancak bu istatistiksel olarak anlamlı değildi. Bunun yanı sıra HFMSE skor değişimleri ile miR-222-5p-miR-378b ifade düzeyleri negatif yönde korelasyon gösterdiği gözlemlendi ancak istatistiksel olarak anlamlı değildi. Bunun da ana nedeni çalışmamızdaki en büyük kısıtlılığımız olan hasta sayımızın düşük olması ve veri yetersizliği olmuştur. Korelasyonu anlamlandırmak ve sonuçlarımızı doğrulayabilmek için daha büyük hasta kohortlarına ihtiyacımız bulunmaktadır. Hasta sayısının ve verilerinin daha çok olduğu geniş kapsamlı bir çalışma gerçekleştirilmesi durumunda, miR-222-5p ve miR-378b ile HFMSE arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon gözlemleneceğini düşünmekteyiz. Çalışmamız miRNA'ların Nusinersen tedavisi alan SMA hastalarında, hastalığın daha iyi anlaşılması, ilerlemesi ve terapötik yanıtı izlenmesi için non-invaziv ve klinik olmayan biyobelirteçler olarak etkinliğinin değerlendirilmesi üzerine yapılacak olan çalışmalara fikir olacaktır.

6. SONUÇ

Çalışmadan elde edilen sonuçlar aşağıda sıralanmıştır

- İn siliko çalışmalar ile kasta ifade edilen ve SMN2-ekson 7 ile yüksek bağlantı gösterebilen 3 tane miRNA(miR-155-5p, -222-5p, -378b) tespit ettik.
- Çalışmaya 20 hasta dahil edilmiş olup, hastaların 11(%55,0) erkek ve 9 (%45,0) olduğu tespit edildi. Bu hastaların yaş ortalaması $53,5 \pm 57,3$ ay, yaş ortancası ise 34,5 (3-200) aydı. Hastaların 7'sini (%35,0) SMA tip I, 10'unu (%50,0) SMA tip II ve 3'ünü (%15'i) SMA tip III oluşturmaktadır.
- Spermann korelasyon analizinde, miR-222-5p ve SMN2 kopya sayısı ile hem Baseline (BOS1) (ve tüm BOS'larda) hem de HFMSE ölçümleri arasında doğrusal ilişki olmadığı bulundu ($p>0,05$)
- Spearman korelasyon analizinde, BOS 2 ölçümünde ki miR-378b düzeyi ile SMN2 kopya sayısı arasında istatistiksel olarak anlamlılığa yakın yüksek bir korelasyon olduğu bulundu($r:0,86$; $p=0,058$). Diğer ölçümlerde ise korelasyon bulunmadı ($p>0,05$).
- Çalışmamızda, Nusinersen uygulaması alan SMA hastalarında, Nusinersen'in motor fonksiyonlara olası katkısını değerlendirmek için HFMSE kullanıldı. Wilcoxon Signed Ranks Test ile uygulanan her HFMSE skorları kıyaslanarak istatistiksel analiz yapıldı. Test sonucuna göre;
 - HFMSE-1(ortanca değer=13,0) ve HFMSE-5/6 (ortanca değer=29,0). arasında istatistiksel olarak anlamlılığa yakın bir fark gösterdiği bulundu ($p=0,068$)
 - HFMSE-1 (ortanca değer=13,0) ve HFMSE-7/8 (ortanca değer=28,0) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p>0,05$).
 - HFMSE-1 (ortanca değer=13,0) ve HFMSE-9/10 (ortanca değer=29,0) veri yetersizliğinden dolayı ölçülemedi.
 - HFMSE-5/6 (ortanca değer=29,0) ve HFMSE7/8 (ortanca değer=28,0) arasında istatistiksel olarak net bir korelasyon olduğu bulundu ($p=0,007$).
 - HFMSE-5/6 (ortanca değer=29,0) ve HFMSE-9/10 (ortanca değer=29,0) istatistiksel olarak arasında anlamlı fark bulunmadı ($p>0,05$)
 - HFMSE-7/8 (ortanca değer=28,0) ve HFMSE-9/10 (ortanca değer=29,0) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı.

- *miR-222-5p ifade değişimi*: BOS1’de (25,4 (22,1-28,3)) ve BOS2’de (28,0 (24,5-32,3)) arasında bir artışın olduğu ve bunun istatistiksel olarak anlamlılığa yakın olduğu bulundu ($p=0,068$). Diğer tüm BOS grupları da karşılaştırıldı, ancak istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı bulundu. Tüm gruplarda ayrı ayrı miR-222-5p’nin ifade değişiminin gösterimine şekil 5’de yer verildi.
- *MiR-378b ifade değişimi*; BOS 1 (13,0 (4-30)) ve BOS 3(14,7 (12,5-16,2)) arasında istatistiksel olarak anlamlılığa yakın fark bulundu ($p=0,068$). Diğer tüm BOS grupları da karşılaştırıldı, ancak istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı bulundu.
- HFMSE ve miRNA Korelasyonu : HFMSE skor değişimleri ile BOS taki miRNA ekspresyon düzeyleri arasındaki korelayon değerlendirildi.
 - Hastaların klinik değerlendirmedeki HFMSE skorları ile hastalardan toplanan BOS örneklerindeki miR-222-5p-miR-378b ekspresyonları kıyaslanmış ancak herhangi bir korelasyon bulunmamıştır. Ancak ilk ve son durum karşılaştırmalarına baktığımızda, hem HFMSE’nin hem de miR-222-5p-miR-378b’nin zamanla (ilk duruma göre) artış gösterdiği bulunmuştur.
 - HFMSE ve miR-222-5p’nin BOS 4 lm değeri ile HFMSE skor değişim puanı (HFMSE 5/6 -HFMSE1)arasında negatif yönde orta düzeyde korelasyon vardı, ancak istatistiksel anlamlı değildi ($r=-0,40;p=0,30$)
 - HFMSE ve miR-222-5p; miR-222-5p’nin BOS5/6 lm değeri ile HFMSE skor değişim puanı (HFMSE 7/8 -HFMSE 5/6)arasında negatif yönde orta düzeyde korelasyon vardı, ancak istatistiksel anlamlı değildi ($r=-0,31;p=0,18$)
 - HFMSE ve miR-378b5p’nin BOS 4 lm değeri ile HFMSE skor değişim puanı (HFMSE 5/6 -HFMSE1)arasında negatif yönde orta düzeyde korelasyon vardı, ancak istatistiksel anlamlı değildi ($r=-0,38;p=0,061$)
 - HFMSE vemiR-378b5p’nin BOS5/6 lm değeri ile HFMSE skor değişim puanı (HFMSE 5/6 -HFMSE1)arasında negatif yönde orta düzeyde korelasyon vardı, ancak istatistiksel anlamlı değildi ($r=-0,24;p=0,050$)

- Alt Tip Değerlendirmesi:
 - SMA tip I yaş ortancası 21 (10-55) ay iken, SMA tip II yaş ortancası 109.5 (31-215) ay ve SMA tip III yaş ortancası 154 (100-178) ay olduğu bulundu. SMA tiplerine göre yaş ortancaları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardı ($p=0,003$) ve SMA tip I yaş ortancası diğer iki gruptan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha düşük olduğu bulundu.
 - SMA alt tiplerine göre HFMSE 5/6 ölçümlerine göre SMA tip I ve II arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($P=0,019$). SMA tip I ve III arasında fark vardı Tip I ve III arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu. HFMSE 7/8 ölçümlerine göre SMA tip II. ve III arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu (**$P=0,009$**). Dolayısıyla farkı oluşturan grup SMA tip II'nin olduğu sonucuna varıldı.
 - SMA alt tiplerine göre miR-222-5p ve miR-378b ölçümlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı.

KAYNAKLAR

- 691, C. O. N. (2017). Summary: Carrier Screening for Genetic Conditions. *Obstet. Gynecol*, 129, 597-599.
- Abiusi, E., Infante, P., Cagnoli, C., Severini, L. L., Pane, M., Coratti, G., . . . Novelli, A. (2021). SMA-miRs (miR-181a-5p, -324-5p, and -451a) are overexpressed in spinal muscular atrophy skeletal muscle and serum samples. *Elife*, 10, e68054.
- Albrechtsen, S. S., Born, A. P., & Boesen, M. S. (2020). Nusinersen treatment of spinal muscular atrophy-a systematic review. *Danish medical journal*, 67(9), A02200100-A02200100.
- Anatoliagenetworks. *Gen tanımlamalarıyla ilgili cevaplar*. ErişimTarihi:20.12.2022 (<https://www.anatoliagenetworks.com/tr/destek/sik-sorulan-sorular>).
- Bhaskaran, M., & Mohan, M. (2014). MicroRNAs: history, biogenesis, and their evolving role in animal development and disease. *Veterinary pathology*, 51(4), 759-774.
- Bio-Rad Laboratuvarları A.Ş. 2022. ErişimTarihi:20.12.2022 (<https://www.bio-rad.com/featured/en/sybr-green-for-qpcr.html>)
- Bonanno, S., Marcuzzo, S., Malacarne, C., Giagnorio, E., Masson, R., Zanin, R., . . . Venerando, A. (2020). Circulating myomiRs as potential biomarkers to monitor response to nusinersen in pediatric SMA patients. *Biomedicines*, 8(2), 21.
- BORA, E. (2007). Spinal muskuler atrofi olgularında Survival Motor Neuron Gen 1 (SMN1) delesyon sıklığı. *Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 21(2), 71-74.
- Brakemeier, S., Stolte, B., Thimm, A., Kizina, K., Totzeck, A., Munoz-Rosales, J., . . . Hagenacker, T. (2021). Assessment of bulbar function in adult patients with 5q-SMA Type 2 and 3 under treatment with nusinersen. *Brain Sciences*, 11(9), 1244.
- Burr, P., & Reddivari, A. (2021). Spinal Muscle Atrophy StatPearls. *Treasure Island (FL)*.
- Butchbach, M. E. (2016). Copy number variations in the survival motor neuron genes: implications for spinal muscular atrophy and other neurodegenerative diseases. *Frontiers in molecular biosciences*, 3, 7.
- Cardinali, B., Cappella, M., Provenzano, C., Garcia-Manteiga, J. M., Lazarevic, D., Cittaro, D., . . . Falcone, G. (2016). MicroRNA-222 regulates muscle alternative splicing through Rbm24 during differentiation of skeletal muscle cells. *Cell death & disease*, 7(2), e2086-e2086.
- Cardinali, B., Castellani, L., Fasanaro, P., Basso, A., Alema, S., Martelli, F., & Falcone, G. (2009). MicroRNA-221 and microRNA-222 modulate differentiation and maturation of skeletal muscle cells. *PloS one*, 4(10), e7607.
- Carré, A., & Empey, C. (2016). Review of spinal muscular atrophy (SMA) for prenatal and pediatric genetic counselors. *Journal of genetic counseling*, 25(1), 32-43.
- Catapano, F., Zaharieva, I., Scoto, M., Marrosu, E., Morgan, J., Muntoni, F., & Zhou, H. (2016). Altered levels of microRNA-9, -206, and -132 in spinal muscular atrophy and their response to antisense oligonucleotide therapy. *Molecular Therapy-Nucleic Acids*, 5, e331.
- Chaytow, H., Huang, Y.-T., Gillingwater, T. H., & Faller, K. M. (2018). The role of survival motor neuron protein (SMN) in protein homeostasis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 75(21), 3877-3894.
- Chen, M., Wang, F., Xia, H., & Yao, S. (2021). MicroRNA-155: regulation of immune cells in sepsis. *Mediators of Inflammation*, 2021.
- Chen, T.-H. (2020a). Circulating microRNAs as potential biomarkers and therapeutic targets in spinal muscular atrophy. *Therapeutic Advances in Neurological Disorders*, 13, 1756286420979954.

- Chen, T.-H. (2020b). New and developing therapies in spinal muscular atrophy: from genotype to phenotype to treatment and where do we stand? *International journal of molecular sciences*, 21(9), 3297.
- Chen, T.-H., & Chen, J.-A. (2019). Multifaceted roles of microRNAs: From motor neuron generation in embryos to degeneration in spinal muscular atrophy. *Elife*, 8, e50848.
- Chiriboga, C. A. (2017). Nusinersen for the treatment of spinal muscular atrophy. *Expert review of neurotherapeutics*, 17(10), 955-962.
- Chiriboga, C. A., Swoboda, K. J., Darras, B. T., Iannaccone, S. T., Montes, J., Darryl, C., . . . Bishop, K. M. (2016). Results from a phase 1 study of nusinersen (ISIS-SMNRx) in children with spinal muscular atrophy. *Neurology*, 86(10), 890-897.
- Chong, L. C., Gandhi, G., Lee, J. M., Yeo, W. W. Y., & Choi, S.-B. (2021). Drug discovery of spinal muscular atrophy (SMA) from the computational perspective: a comprehensive review. *International journal of molecular sciences*, 22(16), 8962.
- Chung, H. K., Rao, J. N., & Wang, J.-Y. (2021). Regulation of Gut Barrier Function by RNA-Binding Proteins and Noncoding RNAs.
- Claborn, M. K., Stevens, D. L., Walker, C. K., & Gildon, B. L. (2019). Nusinersen: a treatment for spinal muscular atrophy. *Annals of Pharmacotherapy*, 53(1), 61-69.
- Coovert, D. D., Le, T. T., McAndrew, P. E., Strasswimmer, J., Crawford, T. O., Mendell, J. R., . . . Burghes, A. H. (1997). The survival motor neuron protein in spinal muscular atrophy. *Human molecular genetics*, 6(8), 1205-1214.
- D'Amico, A., Mercuri, E., Tiziano, F. D., & Bertini, E. (2011). Spinal muscular atrophy. *Orphanet journal of rare diseases*, 6(1), 1-10.
- Dangouloff, T., & Servais, L. (2019). Clinical evidence supporting early treatment of patients with spinal muscular atrophy: current perspectives. *Therapeutics and clinical risk management*, 15, 1153.
- Darras, B. T., Markowitz, J. A., Monani, U. R., & Darryl, C. (2015). Spinal muscular atrophies. *Neuromuscular disorders of infancy, childhood, and adolescence*, 117-145.
- Darryl, C., Bertini, E., Swoboda, K. J., Hwu, W.-L., Crawford, T. O., Finkel, R. S., . . . Ryan, M. M. (2019). Nusinersen initiated in infants during the presymptomatic stage of spinal muscular atrophy: Interim efficacy and safety results from the Phase 2 NURTURE study. *Neuromuscular Disorders*, 29(11), 842-856.
- De Paola, E., Verdile, V., & Paronetto, M. P. (2019). Dysregulation of microRNA metabolism in motor neuron diseases: novel biomarkers and potential therapeutics. *Non-coding RNA research*, 4(1), 15-22.
- Di Leva, G., Garofalo, M., & Croce, C. M. (2014). MicroRNAs in cancer. *Annual review of pathology*, 9, 287.
- Fan, L., & Simard, L. R. (2002). Survival motor neuron (SMN) protein: role in neurite outgrowth and neuromuscular maturation during neuronal differentiation and development. *Human molecular genetics*, 11(14), 1605-1614.
- Faravelli, I., Nizzardo, M., Comi, G. P., & Corti, S. (2015). Spinal muscular atrophy—recent therapeutic advances for an old challenge. *Nature Reviews Neurology*, 11(6), 351-359.
- Finkel, R. S., Chiriboga, C. A., Vajsaar, J., Day, J. W., Montes, J., De Vivo, D. C., . . . Schneider, E. (2016). Treatment of infantile-onset spinal muscular atrophy with nusinersen: a phase 2, open-label, dose-escalation study. *The Lancet*, 388(10063), 3017-3026.
- Finkel, R. S., Mercuri, E., Darras, B. T., Connolly, A. M., Kuntz, N. L., Kirschner, J., . . . Tiziano, E. (2017). Nusinersen versus sham control in infantile-onset spinal muscular atrophy. *N Engl J Med*, 377, 1723-1732.
- Finnegan, E. F., & Pasquinelli, A. E. (2013). MicroRNA biogenesis: regulating the regulators. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 48(1), 51-68.
- Fridrichova, I., & Zmetakova, I. (2019). MicroRNAs contribute to breast cancer invasiveness. *Cells*, 8(11), 1361.

- Gagan, J., Dey, B. K., Layer, R., Yan, Z., & Dutta, A. (2011). MicroRNA-378 targets the myogenic repressor MyoR during myoblast differentiation. *Journal of Biological Chemistry*, 286(22), 19431-19438.
- Gandhi, G., Abdullah, S., Foad, A. I., & Yeo, W. W. Y. (2021). The potential role of miRNA therapies in spinal muscle atrophy. *Journal of the neurological sciences*, 427, 117485.
- Gavrilov, K., & Saltzman, W. M. (2012). Therapeutic siRNA: principles, challenges, and strategies. *The Yale journal of biology and medicine*, 85(2), 187.
- Gidaro, T., & Servais, L. (2019). Nusinersen treatment of spinal muscular atrophy: current knowledge and existing gaps. *Developmental Medicine & Child Neurology*, 61(1), 19-24.
- Goodkey, K., Aslesh, T., Maruyama, R., & Yokota, T. (2018). Nusinersen in the treatment of spinal muscular atrophy. *Exon Skipping and Inclusion Therapies*, 69-76.
- Gunel, T. (2007). Quantitative analysis of gene expression real-time pcr: scientific letter. *Turkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 27(5), 763-767.
- Hahn, A., Günther, R., Ludolph, A., Schwartz, O., Trollmann, R., Weydt, P., . . . Hagenacker, T. (2022). Short-term safety results from compassionate use of risdiplam in patients with spinal muscular atrophy in Germany. *Orphanet journal of rare diseases*, 17(1), 1-10.
- Hammond, S. M. (2015). An overview of microRNAs. *Advanced drug delivery reviews*, 87, 3-14.
- He, J., Zhang, Q.-J., Lin, Q.-F., Chen, Y.-F., Lin, X.-Z., Lin, M.-T., . . . Chen, W.-J. (2013). Molecular analysis of SMN1, SMN2, NAIP, GTF2H2, and H4F5 genes in 157 Chinese patients with spinal muscular atrophy. *Gene*, 518(2), 325-329.
- Iftikhar, M., Frey, J., Shohan, M. J., Malek, S., & Mousa, S. A. (2021). Current and emerging therapies for Duchenne muscular dystrophy and spinal muscular atrophy. *Pharmacology & Therapeutics*, 220, 107719.
- Jung, H. J., Lee, K.-P., Kwon, K.-S., & Suh, Y. (2019). MicroRNAs in skeletal muscle aging: current issues and perspectives. *The Journals of Gerontology: Series A*, 74(7), 1008-1014.
- Kakazu, J., Walker, N. L., Babin, K. C., Trettin, K. A., Lee, C., Sutker, P. B., . . . Kaye, A. D. (2021). Risdiplam for the use of spinal muscular atrophy. *Orthopedic Reviews*, 13(2).
- Kang, L., Han, C., Yang, G., Li, H., Li, T., Yang, S., . . . Zhu, D. (2020). miR-378 and its host gene Ppargc1 β exhibit independent expression in mouse skeletal muscle. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 52(8), 883-890.
- Karasu, N., Acer, H., Akalin, H., Demir, M., Sahin, I. O., Gokce, N., . . . Cuce, I. (2022). Molecular Analysis of SMN2, NAIP and GTF2H2 Gene Deletions and Relation with Clinical Subtypes of Spinal Muscular Atrophy.
- Keinath, M. C., Prior, D. E., & Prior, T. W. (2021). Spinal muscular atrophy: mutations, testing, and clinical relevance. *The Application of Clinical Genetics*, 14, 11.
- Kolb, S. J., & Kissel, J. T. (2015). Spinal muscular atrophy. *Neurologic clinics*, 33(4), 831-846.
- Kye, M. J., & Goncalves, I. d. C. G. (2014). The role of miRNA in motor neuron disease. *Frontiers in cellular neuroscience*, 8, 15.
- Lee, Y. S., & Dutta, A. (2009). MicroRNAs in cancer. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 4, 199-227.
- Li, Q. (2020). Nusinersen as a therapeutic agent for spinal muscular atrophy. *Yonsei medical journal*, 61(4), 273-283.
- Li, Y., Jiang, J., Liu, W., Wang, H., Zhao, L., Liu, S., . . . Wu, Y. (2018). microRNA-378 promotes autophagy and inhibits apoptosis in skeletal muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(46), E10849-E10858.
- Lin, S., & Gregory, R. I. (2015). MicroRNA biogenesis pathways in cancer. *Nature reviews cancer*, 15(6), 321-333.

- Lu, T. X., & Rothenberg, M. E. (2018). MicroRNA. *Journal of allergy and clinical immunology*, 141(4), 1202-1207.
- Lunn, M. R., & Wang, C. H. (2008). Spinal muscular atrophy. *The Lancet*, 371(9630), 2120-2133.
- Magen, I., Aharoni, S., Yacovzada, N. S., Tokatly Latzer, I., Alves, C. R., Sagi, L., . . . Bruckheimer, E. (2022). Muscle microRNAs in the cerebrospinal fluid predict clinical response to nusinersen therapy in type II and type III spinal muscular atrophy patients. *European journal of neurology*.
- Magri, F., Vanoli, F., & Corti, S. (2018). mi RNA in spinal muscular atrophy pathogenesis and therapy. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 22(2), 755-767.
- Main, M., Kairon, H., Mercuri, E., & Muntoni, F. (2003). The Hammersmith functional motor scale for children with spinal muscular atrophy: a scale to test ability and monitor progress in children with limited ambulation. *European Journal of Paediatric Neurology*, 7(4), 155-159.
- Menduti, G., Rasà, D. M., Stanga, S., & Boido, M. (2020). Drug screening and drug repositioning as promising therapeutic approaches for spinal muscular atrophy treatment. *Frontiers in Pharmacology*, 1696.
- Mercuri, E. (2021). Spinal muscular atrophy: from rags to riches. *Neuromuscular Disorders*, 31(10), 998-1003.
- Mercuri, E., Darras, B. T., Chiriboga, C. A., Day, J. W., Campbell, C., Connolly, A. M., . . . Saito, K. (2018). Nusinersen versus sham control in later-onset spinal muscular atrophy. *New England Journal of Medicine*, 378(7), 625-635.
- Mercuri, E., Pera, M. C., Scoto, M., Finkel, R., & Muntoni, F. (2020). Spinal muscular atrophy—insights and challenges in the treatment era. *Nature Reviews Neurology*, 16(12), 706-715.
- Mercuri, E., Sumner, C. J., Muntoni, F., Darras, B. T., & Finkel, R. S. (2022). Spinal muscular atrophy. *Nature Reviews Disease Primers*, 8(1), 1-16.
- Messina, S., & Sframeli, M. (2020). New treatments in spinal muscular atrophy: positive results and new challenges. *Journal of clinical medicine*, 9(7), 2222.
- Meyer, S. U., Sass, S., Mueller, N. S., Krebs, S., Bauersachs, S., Kaiser, S., . . . Theis, F. J. (2015). Integrative analysis of microRNA and mRNA data reveals an orchestrated function of microRNAs in skeletal myocyte differentiation in response to TNF- α or IGF1. *PloS one*, 10(8), e0135284.
- Monani, U. R. (2005). Spinal muscular atrophy: a deficiency in a ubiquitous protein; a motor neuron-specific disease. *Neuron*, 48(6), 885-895.
- Mori, M. A., Ludwig, R. G., Garcia-Martin, R., Brandão, B. B., & Kahn, C. R. (2019). Extracellular miRNAs: from biomarkers to mediators of physiology and disease. *Cell metabolism*, 30(4), 656-673.
- Neil, E. E., & Bisaccia, E. K. (2019). Nusinersen: A novel antisense oligonucleotide for the treatment of spinal muscular atrophy. *The Journal of Pediatric Pharmacology and Therapeutics*, 24(3), 194-203.
- (nfku.com,2019). spinal-muskuler-atrofi-sma-nedir-belirtileri-tipleri-tedavisi. Erişim:23.02.2023
<https://www.nkfku.com/spinal-muskuler-atrofi-sma-nedir-belirtileri-tipleri-tedavisi/>
- O'carroll, D., & Schaefer, A. (2013). General principals of miRNA biogenesis and regulation in the brain. *Neuropsychopharmacology*, 38(1), 39-54.
- O'Hagen, J. M., Glanzman, A. M., McDermott, M. P., Ryan, P. A., Flickinger, J., Quigley, J., . . . Martens, W. B. (2007). An expanded version of the Hammersmith Functional Motor Scale for SMA II and III patients. *Neuromuscular Disorders*, 17(9-10), 693-697.
- Oskoui, M., & Kaufmann, P. (2008). Spinal muscular atrophy. *Neurotherapeutics*, 5(4), 499-506.

- Paul, G. R., Gushue, C., Kotha, K., & Shell, R. (2021). The respiratory impact of novel therapies for spinal muscular atrophy. *Pediatric pulmonology*, 56(4), 721-728.
- Pera, M. C., Coratti, G., Bovis, F., Pane, M., Pasternak, A., Montes, J., . . . Messina, S. (2021). Nusinersen in pediatric and adult patients with type III spinal muscular atrophy. *Annals of clinical and translational neurology*, 8(8), 1622-1634.
- Pera, M. C., Coratti, G., Forcina, N., Mazzone, E. S., Scoto, M., Montes, J., . . . Sframeli, M. (2017). Content validity and clinical meaningfulness of the HFMSE in spinal muscular atrophy. *BMC neurology*, 17(1), 1-10.
- Pierzchlewicz, K., Kępa, I., Podogrodzki, J., & Kotulska, K. (2021). Spinal muscular atrophy: the use of functional motor scales in the era of disease-modifying treatment. *Child neurology open*, 8, 2329048X211008725.
- Pino, M. G., Rich, K. A., & Kolb, S. J. (2021). Update on Biomarkers in Spinal Muscular Atrophy. *Biomarker Insights*, 16, 11772719211035643.
- Podkalicka, P., Mucha, O., Bronisz-Budzyńska, I., Kozakowska, M., Pietraszek-Gremplewicz, K., Cetnarowska, A., . . . Kulecka, M. (2020). Lack of miR-378 attenuates muscular dystrophy in mdx mice. *JCI insight*, 5(11).
- Prior, T. W., Leach, M. E., & Finanger, E. (2020). Spinal muscular atrophy.
- Ramos, D. M., d'Ydewalle, C., Gabbeta, V., Dakka, A., Klein, S. K., Norris, D. A., . . . Prior, T. W. (2019). Age-dependent SMN expression in disease-relevant tissue and implications for SMA treatment. *The Journal of clinical investigation*, 129(11), 4817-4831.
- Ramsey, D., Scoto, M., Mayhew, A., Main, M., Mazzone, E. S., Montes, J., . . . Glanzman, A. M. (2017). Revised Hammersmith Scale for spinal muscular atrophy: A SMA specific clinical outcome assessment tool. *PLoS one*, 12(2), e0172346.
- Reed, U. C., & Zanolini, E. (2018). Therapeutic advances in 5q-linked spinal muscular atrophy. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, 76, 265-272.
- Ross, L. F., & Kwon, J. M. (2019). Spinal muscular atrophy: past, present, and future. *Neoreviews*, 20(8), e437-e451.
- Russman, B. S. (2007). Spinal muscular atrophy: clinical classification and disease heterogeneity. *Journal of child neurology*, 22(8), 946-951.
- Schoch, K. M., & Miller, T. M. (2017). Antisense oligonucleotides: translation from mouse models to human neurodegenerative diseases. *Neuron*, 94(6), 1056-1070.
- Schorling, D. C., Pechmann, A., & Kirschner, J. (2020). Advances in treatment of spinal muscular atrophy—new phenotypes, new challenges, new implications for care. *Journal of neuromuscular diseases*, 7(1), 1-13.
- Scoto, M., Finkel, R., Mercuri, E., & Muntoni, F. (2017). Therapeutic approaches for spinal muscular atrophy (SMA). *Gene therapy*, 24(9), 514-519.
- Sendtner, M. (2010). Therapy development in spinal muscular atrophy. *Nature neuroscience*, 13(7), 795-799.
- Seok, H. Y., Tatsuguchi, M., Callis, T. E., He, A., Pu, W. T., & Wang, D.-Z. (2011). miR-155 inhibits expression of the MEF2A protein to repress skeletal muscle differentiation. *Journal of Biological Chemistry*, 286(41), 35339-35346.
- Shababi, M., Lorson, C. L., & Rudnik-Schöneborn, S. S. (2014). Spinal muscular atrophy: a motor neuron disorder or a multi-organ disease? *Journal of anatomy*, 224(1), 15-28.
- Singh, R. N., Howell, M. D., Ottesen, E. W., & Singh, N. N. (2017). Diverse role of survival motor neuron protein. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1860(3), 299-315.
- Singh, R. N., Ottesen, E. W., & Singh, N. N. (2020). The first orally deliverable small molecule for the treatment of spinal muscular atrophy. *Neuroscience insights*, 15, 2633105520973985.
- Sumner, C. J. (2006). Therapeutics development for spinal muscular atrophy. *NeuroRx*, 3(2), 235-245.

- Tai, W., & Gao, X. (2017). Functional peptides for siRNA delivery. *Advanced drug delivery reviews*, 110, 157-168.
- Talbot, K., & Tizzano, E. (2017). The clinical landscape for SMA in a new therapeutic era. *Gene therapy*, 24(9), 529-533.
- Tisdale, S., & Pellizzoni, L. (2015). Disease mechanisms and therapeutic approaches in spinal muscular atrophy. *Journal of Neuroscience*, 35(23), 8691-8700.
- Verhaart, I. E., Robertson, A., Wilson, I. J., Aartsma-Rus, A., Cameron, S., Jones, C. C., . . . Lochmüller, H. (2017). Prevalence, incidence and carrier frequency of 5q-linked spinal muscular atrophy—a literature review. *Orphanet journal of rare diseases*, 12(1), 1-15.
- Wang, D., Sang, Y., Sun, T., Kong, P., Zhang, L., Dai, Y., . . . Liu, W. (2021). Emerging roles and mechanisms of microRNA-222-3p in human cancer. *International Journal of Oncology*, 58(5), 1-12.
- Wang, X.-l., Zhang, T., Wang, J., Zhang, D.-b., Zhao, F., Lin, X.-w., . . . Pang, X.-n. (2015). MiR-378b promotes differentiation of keratinocytes through NKX3. 1. *PloS one*, 10(8), e0136049.
- Welby, E., Rehborg, R. J., Harmelink, M., & Ebert, A. D. (2022). Assessment of cerebral spinal fluid biomarkers and microRNA-mediated disease mechanisms in spinal muscular atrophy patient samples. *Human molecular genetics*, 31(11), 1830-1843.
- Whitehead, K. A., Langer, R., & Anderson, D. G. (2009). Knocking down barriers: advances in siRNA delivery. *Nature reviews Drug discovery*, 8(2), 129-138.
- Wirth, B. (2000). An update of the mutation spectrum of the survival motor neuron gene (SMN1) in autosomal recessive spinal muscular atrophy (SMA). *Human mutation*, 15(3), 228-237.
- Wirth, B. (2021). Spinal muscular atrophy: in the challenge lies a solution. *Trends in Neurosciences*, 44(4), 306-322.
- Wirth, B., Mendoza-Ferreira, N., & Torres-Benito, L. (2017). Spinal muscular atrophy disease modifiers. In *Spinal muscular atrophy* (pp. 191-210): Elsevier.
- Wong, M. L., & Medrano, J. F. (2005). Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques*, 39(1), 75-85.
- Zaharieva, I. T., Scoto, M., Aragon-Gawinska, K., Ridout, D., Doreste, B., Servais, L., . . . Zhou, H. (2022). Response of plasma microRNAs to nusinersen treatment in patients with SMA. *Annals of clinical and translational neurology*.
- Zhang, J., Chen, Z., Chen, H., Deng, Y., Li, S., & Jin, L. (2022). Recent Advances in the Roles of MicroRNA and MicroRNA-Based Diagnosis in Neurodegenerative Diseases. *Biosensors*, 12(12), 1074.
- Zhao, J., Liu, Z., & Chang, Z. (2021). Osteogenic differentiation and calcification of human aortic smooth muscle cells is induced by the RCN2/STAT3/miR-155-5p feedback loop. *Vascular Pharmacology*, 136, 106821.

EKLER

ETİK KURUL ONAYI



T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Sayı: B.30.2.ODM.0.20.08/199

24.03.2022

Sayın Doç. Dr. Sercan ERGÜN

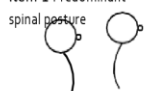
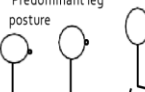
Etik Kurulumuza sunmuş olduğunuz Nusinersen tedavisi almakta olan pediatrik Spinal Musküler Atrofi (SMA) hastalarının izleminde potansiyel biyobelirteçler olarak miR-155-5p, miR-222-5p ve miR-378b'nin araştırılması başlıklı OMÜ KAEK 2022/140 Karar nolu Genetik çalışma nitelikli araştırma projeniz amaç, gerekçe, yaklaşım ve yöntemle ilgili açıklamaları, Klinik Araştırmalar Etik kurulu yönergesine göre 23.03.2022 tarihli Etik Kurulumuzda incelenmiş etik açıdan uygun bulunmuştur. Ancak araştırma bütçesinin maddi desteği henüz sağlanamadığından projeye bütçe desteği sağlanıp, tarafımıza bildirilmesinden sonra başlanmasına oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinize arz/rica ederim.



Prof.Dr.Ramis ÇOLAK
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanı

HFMS SKORU

Hammersmith Functional Motor Scale for SMA (HFMS)							
Name		DOB					
Date of assessment		Time taken to complete					
Date of spinal surgery		Evaluator					
Please circle highest current level of independent mobility							LBC = Limited by contracture
None	Rolls	Bottom shuffles	creeps/crawls	Walks with crutches/frame/rollator	Walks with KAFO's / AFO's	Independent walking	
Comment.....							
Test	Instruction	2	1	0	L B C	S =	Comments
S = score							
1 Plinth /chair sitting Can be over edge of plinth or on plinth / floor. Record best you see	Can you sit on the plinth /chair without using your hands for support for a count of 3?(Back unsupported /feet +/- support)	Able to sit using no hand support for a count of 3 or more	Needs one hand support to maintain balance for a count of 3	Needs two hand support to maintain balance Unable to sit			Item 1 Predominant spinal posture  Predominant leg posture  Circle predominant spinal posture and leg position
2 Long sitting Legs straight = knees maybe flexed, knee caps pointing upwards, ankles <10cm apart	Can you sit on the floor/plinth without using your hands for support and with your legs straight for a count of 3?	Able to sit on floor/plinth with legs straight without hand support for a count of 3	Able to sit on floor/plinth with legs straight propping with one hand support for a count of 3	Able to long sit using two hands for a count of 3 Or unable to sit with straight legs			
3 One hand to head in sitting Hand touch head above level of ears	Can you get one hand to your head without bending your neck	Able to bring one hand to head. Head and trunk remain stable	Can only bring hand to head by flexing head	Unable to bring hand to head even using head and trunk movement			R / L
4 Two hands to head in sitting Hands touch head above level of ear	Can you lift both hands up at the same time, to your head, without bending your neck?	Able to place both hands on head arms free from side. Head and trunk remain stable	Able to place hands on head but only using head flexion or side tilt or crawling hands up or one at a time	Unable to place both hands on head			
5 Supine to side-lying	Can you roll onto your side in both directions? Try not to use your hands	Able to ½ roll from supine both ways	Can ½ roll only one way R / L	Unable to half roll either way			Shoulders perpendicular to floor. Trunk and hips in line with body
6 Rolls prone to supine over R	Can you roll from your tummy to your back in both directions?	Turns to supine with free arms to the right	Turns to supine using arms to push/ pull with	Unable to turn into supine			
7 Rolls prone to supine over L		Turns into supine with free arms to the left	Turns to supine using arms to push/ pull with	Unable to turn into supine			
8 Rolls supine to prone over R		Turns to prone with free arms to the right	Turns to prone by pulling/ pushing on arms	Unable to turn into prone			
9 Rolls supine to prone over L		Turns to prone with free arms to the left	Turns to prone by pulling/ pushing on arms	Unable to turn into prone			
10 Sitting to lying	Can you lie down in a controlled way from sitting?	Able to lie down in a controlled fashion through side lying or using clothes	Able to lie down by flopping forwards and rolling sideways	Unable or falls over			
11 Props on forearms	Can you prop yourself on your forearms and hold for a count of 3?	Able to achieve prop on elbows with head up for a count of 3	Holds position when placed for a count of 3	Unable			
12 Lifts head from prone	Can you lift your head up keeping your arms by your side for a count of 3?	Able to lift head up in prone arms by side for a count of 3	Lift head with arms in a forward position for a count of 3	Unable			
13 Prop on extended arms	Can you prop yourself up with straight arms for a count of 3?	Able to prop on extended arms, head up for a count of 3	Can prop on extended arms if placed for a count of 3	Unable			
14 Lying to sitting	Can you get from lying to sitting without rolling to your tummy?	Able by using side lying	Turns into prone or towards floor	Unable			
15 Four-point kneeling	Can you get onto your hands and knees with your head up and hold for a count of 3?	Achieves four-point kneeling – head up for a count of 3	Holds position when placed for a count of 3	Unable			

Test	Instruction	2	1	0	L B C	S =	Comments
16 Crawling	Can you crawl forwards?	Able to crawl forwards – moves all four points twice or more	Moves all four points only once	Unable			S = score
17 Lifts head from supine	Can you lift your head to look at your toes your arms folded for a count of 3	In supine, head must be lifted in mid-line. Chin moves towards chest. Held for a count of 3	Head is lifted but through side flexion or with no neck flexion Held for a count of 3	Unable			
18 Supported standing	Can you stand using one hand for support for a count of 3?	Can stand using one hand support for a count of 3	Able to stand with minimal trunk support (not hip) for a count of 3	Can stand with hand support but needs knee/hip support in addition for a count of 3 Or unable			
19 Stand unsupported	Can you stand without holding onto anything for a count of 3?	Can stand independently for the more than a count of 3	Stands independently for a count of 3	Stands only momentarily (less than a count of 3) Or unable			
20 Stepping	Can you walk without using any help or aids? Show me	Able to take more than 4 steps unaided	Able to take 2 – 4 steps unaided	Unable			
SCORE		No of 2's =	No of 1's =	No of 0's =	TOTAL = /40		

Comments	
----------	--

Expanded Hammersmith Functional Motor Scale for SMA (HFMSE)							
Test	Instruction	2	1	0	L B C	S =	Comments S = score
21 Right hip flexion in supine	<i>Can you bring your right knee to your chest?</i>	Full hip flexion achieved	Initiates right hip and knee flexion (more than 10% of available range of motion)	Unable			
22 Left hip flexion in supine	<i>Can you bring your left knee to your chest?</i>	Full hip flexion achieved	Initiates left hip and knee flexion (more than 10% of available range of motion)	Unable			
23 High kneeling to right half kneel	<i>Can you bring your left leg up so that your foot is flat on the ground without using your arms and hold for a count of 10?</i>	Arms used for transition, maintains arms free in half kneel for a count of 10	Maintains half kneel with arm support for a count of 10	Unable			
24 High kneeling to left half kneel	<i>Can you bring your right leg up so that your foot is flat on the ground without using your arms and hold for a count of 10?</i>	Arms used for transition, maintains arms free in half kneel for a count of 10	Maintains half kneel with arm support for a count of 10	Unable			
25 High kneeling to stand leading with left leg	<i>Can you stand up from this position starting with your left leg without using your hands? May need demonstration</i>	Able with arms free	Able to shift weight off both knees (with or without arm support)	Unable			
26 High kneeling to stand leading with right leg	<i>Can you stand up from this position starting with your right leg without using your hands? May need demonstration</i>	Able with arms free	Able to shift weight off both knees (with or without arm support)	Unable			
27 Stand to sit	<i>Can you sit on the floor, in a controlled way? Try not to use your arms.</i>	Able to sit down with arms free and no collapse	Sits on floor but uses arms or crashes	Unable			
28 Squat	<i>Can you squat? Pretend you are going to sit in a very low seat.</i>	Squats with arms free (at least 90° of hip and knee flexion)	Initiates squat (more than 10%), uses arm support	Unable to initiate			
29 Jump 12" forward	<i>Can you jump as far as you can, with both feet, from this line all of the way to the other line?</i>	Jumps at least 12", both feet simultaneously	Jumps between 2-11", both feet simultaneously	Unable to initiate jump with both feet simultaneously			
30 Ascends stairs with rail	<i>Can you walk up the steps? You can use one railing</i>	Ascends 4 stairs with railing, alternating feet	Ascends 2-4 stairs, one rail, any pattern	Unable to ascend 2 stairs one rail			
31 Descends stairs with rail	<i>Can you walk down the steps? You can use one railing</i>	Descends four stairs, with railing, alternating feet	Descends 2-4 stairs, one rail, any pattern	Unable to descend 2 stairs with one rail			

32 Ascends stairs without rail	<i>Can you walk up the steps? This time try not to use the railing</i>	Ascends four stairs, arms free, alternating feet	Ascends 2-4 stairs, arms free, any pattern	Unable to ascend 2 stairs arms free			
33 Descends stairs without rail	<i>Can you walk down the steps? This time try not to use the railing</i>	Descends four stairs, arms free, alternating feet	Descends 2-4 stairs, arms free, any pattern	Unable to descend 2 stairs arms free			
SCORE		No of 2's =	No of 1's =	No of 0's =			TOTAL = /66



ÖZ GEÇMİŞ

Samsun 100. Yıl Lisesi’ni bitirdikten sonra Tokat Gaziosman Paşa Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümünden 2018 tarihinde mezun oldum. 2021 yılında OMÜ LEE Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans programına başladım ve hala devam etmekteyim. Orta düzeyde İngilizce bilmekteyim. Deney hayvanları kullanım sertifikasına sahibim.

Temel ilgi alanlarım: epigenetik, nöromusküler hastalıklar ve mikroRNA’lardır.

İletişim Bilgileri

ORCID ID : 0000-0003-1119-3568

Yayınlar:

1. Kayaoğlu S, Ergün S. Investigation of miR-155-5p, miR-222-5p and miR-378b as potential biomarkers in the follow-up of pediatric Spinal Muscular Atrophy (SMA) patients receiving Nusinersen therapy. 5. International Congress on Medical Sciences and Multidisciplinary Approaches. 8-9.10.2022, Online (Oral Presentation-Full Text).