

GİZEM KORAL

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İSTANBUL-2022



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**DENEYSEL OTOİMMÜN MYASTHENİA GRAVİS (DOMG)
MODELİNDE B LENFOSİT GENLERİNİN
HASTALIK GELİŞİMİNE ETKİSİ**

GİZEM KORAL

**DANIŞMAN
DOÇ. DR. VUSLAT YILMAZ**

**SİNİRBİLİM ANABİLİM DALI
SİNİRBİLİM YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

İSTANBUL 2022

İTHAF

Canım çekirdek aileme ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Tüm davranış ve tutumuyla bana ve birçok öğrenciye yol gösteren, bilimin gerçek yüzünü ve tüm keyfini yaşamamızı sağlayan sevgili danışmanım Doç. Dr. Vuslat YILMAZ’a teşekkür ederim. Danışmanlığı benim için çok büyük bir şanstı. Yenilikleri takibiyle, bilgi birikimiyle ve bilime duyduğu bariz heyecanla hangi koşulda olursa olsun tüm sorularımıza ışık tutmayı başaran Prof. Dr. Erdem TÜZÜN’e teşekkür ederim. Bölümümüzün şu an olduğu konumda olmasını sağlayan, değerli bölüm başkanımız Doç. Dr. Cem İsmail KÜÇÜKALİ’ye teşekkür ederim.

Her zaman yardımına koşan Dr. Araş. Gör. Canan ULUSOY’a teşekkür ederim, senden çok şey öğrendim; daha nicelerini de öğreneceğime eminim. Yardımını asla esirgemeyen Dr. Öğr. Gör. Ece ERDAĞ’a çok teşekkür ederim. Bundan yıllar sonra bile bağımızın zayıflamayacağına inandığım hem iş hem de özel hayatımın dev bir parçası haline gelen Elif ŞANLI’ya, mola vermenin güzelliğini bana öğreten canım ekürim Selen SOYLU ve Ece AKBAYIR’a çok teşekkür ederim. Zekası ve insanüstü dayanıklılığıyla hepimizin saygı duyduğu Zerrin KARAASLAN’a teşekkür ederim. Çok yönlülüğü, azmi ve heyecanı ile örnek bir araştırmacı olan Hande Yüceer’e ufku genişlettiği için teşekkür ederim. Çalışmayı bu kadar verimli ve keyifli hale getirdiğiniz için hepinize minnettarım. Lisans eğitimim süresinde yalnızca sayılı insanla bağ kurdum ama bugün bile kararımın doğruluğunu hissetmeye devam ediyorum. Profesyonelliği ve pratik çözümleriyle hayat kurtaran Hakan ŞAHİN’e çok teşekkür ederim, sensiz her şey çok daha zor olurdu. Üniversiteyi sevmemi sağlayan, diplomamın hissedarı Buse Nur ÇELİK ve biricik sunshine’ımız Melike Hande ŞEN’e teşekkür ederim. İstanbul’un benim için anlamı, ilk ev arkadaşım canım Işıl MERCİMEK’e teşekkür ederim, varlığı her şeyi daha keyifli hale getiriyor.

Her zaman en büyük destekçim olan aslan annem ve canım babama; hayatın çalışmaktan çok daha fazla olduğunu hatırlatan neşe kaynağım ve can simidim ablama sonsuz teşekkürler... Hayatı çekilir kılan miniğim Dobby ve Yamalı’ya teşekkür ederim. Melek kızım Kazandibi, seninle kısacık da olsa bir zamanı paylaşmak büyük bir keyifti. Nerede olursak olalım “evde” hissettiren, hakkında sayfalarca yazmak istediğim canım yol arkadaşım Fethi, varlığın için teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TYL-2021-37695

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	ii
BEYAN.....	iii
İTHAF	iv
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
TABLOLAR LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ	x
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ.....	xi
ÖZET	xii
ABSTRACT	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Düünden Bugüne Myasthenia Gravis	3
2.2. Myasthenia Gravis	4
2.2.1. Epidemiyoloji.....	5
2.2.2. Klinik Belirtiler	5
2.2.3. Tanı	6
2.2.4. Tedavi.....	7
2.3. MG’de Hastalık Altgrupları	8
2.3.1. Asetil Kolin Reseptörüne Karşı Otoantikorların Varlığı ile Gelişen Myasthenia Gravis (AChR-MG)	9
2.3.2. Kasa Spesifik Kinaza Karşı Otoantikorların Varlığı ile Gelişen Myasthenia Gravis (MuSK MG)	10
2.3.3. Düşük Yoğunluklu Lipoprotein Reseptörü ile İlişkili Protein 4 Karşı Otoantikorların Varlığı ile Gelişen myasthenia gravis (LRP4-MG).....	11
2.3.4. Seronegatif MG.....	11
2.4. Nöromusküler Bileşke ve Sinir İletimi.....	13
2.4.1. Agrin- LRP4 ve MuSK Yolağı	14
2.5. MuSK MG’nin Patofizyolojisi	15
2.5.1. MuSK’a Karşı Gelişen Otoantikorların Patolojik Mekanizması.....	17
2.5.2. Kompleman Sistemi.....	17

2.5.3. B Hücrelerin Rolü	18
2.6. Hastalık Mekanizmasını Anlamaya ve Tedaviye Yönelik Yaklaşımlar	19
2.7. MG’de Aday Genler: <i>FCRLB</i> ve <i>KCNS3</i>	20
2.7.1. Fc Reseptör Benzeri Yapı B (Fc receptor-like = <i>FCRLB</i>)	20
2.7.2. Potasyum Kapılı Kanal S Ailesi 3. Üyesi (Potassium voltage-gated channel subfamily S member 3 (Kv9.3) = <i>KCNS3</i>)	21
2.8. Deneysel Otoimmün Myasthenia Gravis Hayvan Modeli (DOMG)	22
2.9. Lentiviral Partiküller ile taşınan shRNA ile <i>in vivo</i> Gen Susturma	23
3. GEREÇ VE YÖNTEM	24
3.1. Deneysel Otoimmün Myasthenia Gravis Hayvan Modeli	24
3.1.1. DOMG Modelinin Oluşturulması	24
3.1.2. Klinik Skorlama ve Ölçümlerin Yapılması.....	24
3.1.3. shRNA ile DOMG Farelerinin Tedavisi (<i>in vivo</i> Gen Susturulması)	25
3.1.3.1. <i>In vivo</i> shRNA Optimum Uygulama Dozunun Belirlenmesi: Lenf Nodu Hücrelerinde <i>FCRLB</i> ve <i>KCNS3</i> Genlerinin shRNA İçeren Lentiviral Parçacıklarla Susturulması	25
3.1.3.2. Farelere shRNA Tedavi Uygulaması	26
3.1.4. Farelerin Sakrifiye Edilmesi ve Doku Örneklerin Saklanması	26
3.1.5. Lenf Nodu Hücrelerinin İzolasyonu.....	27
3.2. Serumda MuSK’a Spesifik Antikor Düzeyinin Belirlenmesi	27
3.3. RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi.....	28
3.4. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (GZ PZR)	29
3.5. Nöromusküler Bileşkenin İmmünfloresan İşaretleme ile Değerlendirilmesi.....	30
3.6. Akım Sitometrisi	31
3.7. İstatistiksel Analiz.....	32
4. BULGULAR.....	33
4.1. Ağırlık, Kas Gücü ve Klinik Skorların Değerlendirilmesi.....	33
4.2. DOMG Hayvan Modelinde shRNA ile Gen Susturma.....	35
4.3. Serumdaki MuSK’a Karşı IgG Miktarının Değişimi	37
4.4. Kastaki C3 ve IgG Birikimlerinin Kantitatif Belirlenmesi	38
4.5. Lenf Nodu Hücrelerinin İmmüfenotiplemesi.....	39
4.5.1. B ve T Hücrelerinin Dağılımı.....	39
4.5.2. B Hücresi İmmüfenotiplerinin Gruplar Arasındaki Dağılımı	40

4.5.3. T Hücresi Altıptilerinin çalışma grupları arasındaki dağılımı.....	44
5. TARTIŞMA	46
KAYNAKLAR	49
ETİK KURUL KARARI	55
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	56
ÖZGEÇMİŞ	57



TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1 Myasthenia graviste görülen hastalık alttıpleri.....	9
Tablo 2 Myasthenia gravis tedavisi için kullanılan ilaç ve uygulamalar.....	19
Tablo 3 : cDNA sentez reaksiyonu için bileşenler ve miktarları	28
Tablo 4: Gerçek zamanlı PZR reaksiyon koşulları.....	30
Tablo 5: Gerçek zamanlı-PZR'de kullanılan primer setleri	30
Tablo 6: Akım sitometresinde kullanılan floresan işaretli monoklonal antikorlar	31



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: Sinir-kas kavşağının (NMJ) ve asetilkolin reseptörlerinin (AChR'ler) kümelenme yolunun şematik gösterimi.	12
Şekil 2: MuSK Myasthenia gravisin patofizyolojisi	16
Şekil 3: <i>FCRL</i> 'lerin BCR sinyalleşmesi ve B-hücre fonksiyonunun üzerindeki düzenleyici etkileri.....	20
Şekil 4: STRING protein-protein etkileşimi atlasından elde edilen verilere göre <i>KCNS3</i> geninin etkileşimde olduğu protein kodlayıcı genler.....	21
Şekil 5: DOMG modeli oluşturulan fare gruplarında haftalık ağırlık değişim grafiği ...	33
Şekil 6: DOMG hastalık modeli geliştirilen fare gruplarında kas gücünün haftalık ölçüm grafiği.....	34
Şekil 7: Klinik skorların zaman içindeki değişim grafiği	35
Şekil 8: <i>FCRLB</i> ve <i>KCNS3</i> geninin dalak hücrelerinde ekspresyonu.....	36
Şekil 9: Farelerin serum örneklerindeki MuSK'a karşı gelişen IgG düzeyi.....	37
Şekil 10: Nöromusküler bileşkede oluşan C3 ve IgG birikimlerinin örnek görselleri....	38
Şekil 11: NMB'de IgG ve C3 birikimi	39
Şekil 12: CD19+ B ve CD3+ T hücrelerinin dağılımı	40
Şekil 13 : B hücre alttiplerinin dağılımı.....	41
Şekil 14: B1a hücrelerinin dağılımı	42
Şekil 15: ICOSL eksprese eden B hücrelerinin dağılımı	43
Şekil 16: PDL1 eksprese eden B hücre alttiplerinin dağılımı.....	44
Şekil 17: T hücre alttiplerinin dağılımı	45

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

- AChE:** Asetilkolinesteraz
AChR: Asetilkolin reseptörü
BTX: α - Bungarotoksin
CFA: Complete Freund's adjuvant
DMSO: Dimetil sülfoksit
DOMG: Deneyisel otoimmün myasthenia gravis
ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay
EOMG: Erken başlangıçlı myasthenia gravis
FBS: Fetal bovine serum
FCRLB: Fc reseptörü benzeri yapı B
FIPA: Floresan immünopresipitasyon
HLA: Human Leukocyte Antigen
IVIG: İntravenöz immunoglobulin
KCNS3: Potasyum kapılı kanal S ailesi 3
KO: Knock-out / nakavt
LOMG: Geç başlangıçlı myasthenia gravis
LRP4: low-density lipoprotein receptor-related protein 4
MAK: Membran atak kompleksi
MG: Myasthenia gravis
MuSK: Muscle specific kinase- Kasa özgü reseptör tirozin kinaz
NMB: Nöromüsküler bileske
OCT: Optimal cutting compound
PBS: Phosphate-buffered saline
PLEX: Plazma değişimi
RIPA: Radyoimmunopresipitasyon

ÖZET

Koral, G. (2022). Deneysel Otoimmün Myasthenia Gravis (DOMG) Modelinde B Lenfosit Genlerinin Hastalık Gelişimine Etkisi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Sinirbilim ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Myasthenia gravis, kas zayıflığına neden olan otoantikorlar ile karakterize, nadir bir otoimmün nörolojik hastalıktır. MG olgularının yaklaşık %85’inde hastalık postsinaptik nikotinik asetilkolin reseptörüne (AChR) karşı gelişen antikorlara bağlı olarak ortaya çıkarken, geriye kalan MG olgularının yaklaşık yarısında, kasa özgü reseptör tirozin kinaza (MuSK) karşı gelişen antikorlar saptanmaktadır.

Bu projede immün sistem ile ilişkisi nispeten daha iyi bilinen *FCRLB* ve daha az bilinen *KCNS3* geninin MG patogeneziyle bağlantısı ve hastalığın tedavisi için olası bir aday olup olamayacağı deneysel hayvan modeli oluşturularak araştırıldı.

Projemizde 8 haftalık, dişi Balb/c farelerinde MuSK antijeni kullanılarak deneysel otoimmün myasthenia gravis modeli (DOMG) oluşturuldu. Farelerin klinik durumları ve hastalık gelişimleri düzenli bir şekilde kontrol ve test edildi. *FCRLB* (*FCRL2*) ve *KCNS3* (Kv9.3) genlerinin lentiviral partikül taşıyıcılı shRNA kullanılarak susturulması hedeflendi. Sonrasında bu susturmanın, antikor yapımı, kasta kompleman depozitlerinin birikimi ve lenf nodu hücrelerinde immün sistem hücre profillerine etkisi değerlendirildi.

Sonuç olarak, *FCRLB* gen susturulmasının farelerin klinik durumlarında iyileşmeye neden olduğu *KCNS3*’ün ise farelerdeki kas güçsüzlüğü ile nöromusküler bileşkedeki IgG ve C3 birikimini arttırdığı tespit edildi. Ayrıca *FCRLB*’nin antikor yapan B hücreleri üzerinde baskılayıcı bir etki gösterebileceği gözlemlendi.

Anahtar Kelimeler: Miyastenia gravis, *FCRLB*, *KCNS3*, deneysel otoimmün miyastenia gravis, MuSK.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TYL-2021-37695

ABSTRACT

Koral, G (2022). The Effect of B Lymphocyte Genes on Disease Development in Experimental Autoimmune Myasthenia Gravis (EAMG). İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Neuroscience, Master of Science Thesis. İstanbul.

Myasthenia gravis is a rare autoimmune neurological disease characterized by autoantibodies causing muscle weakness. In approximately 85% of MG cases, the disease occurs due to antibodies against the postsynaptic nicotinic acetylcholine receptor (AChR), while antibodies against muscle-specific receptor tyrosine kinase (MuSK) are detected in approximately half of the remaining MG cases.

In this project, the association of *FCRLB*, which is relatively well known to be related to the immune system, and *KCNS3* gene, which is less known, with the pathogenesis of MG and whether it can be a possible candidate for the treatment of the disease was investigated by creating an experimental animal model.

In our project, experimental autoimmune model of myasthenia gravis (EAMG) was induced using MuSK antigen in 8 week old female Balb/c mice. The clinical status and disease development of the mice were regularly checked and tested. The *FCRLB* (*FCRL2*) and *KCNS3* (Kv9.3) genes were silenced using lentiviral particle carrier shRNA. Afterwards, the effects of this silencing on antibody production, accumulation of complement deposits in the muscle, and immune system cell profiles in the lymph node cells were evaluated.

As a result, it was determined that silencing the *FCRLB* gene caused an improvement in the clinical conditions of the mice, while *KCNS3* increased the accumulation of IgG and C3 at the neuromuscular junction with muscle weakness in mice. It was also observed that *FCRLB* could exert a suppressive effect on antibody-forming B cells.

Key Words: Myasthenia gravis, *FCRLB*, *KCNS3*, experimental autoimmune myasthenia gravis, MuSK.

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No. TYL-2021-37695

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Myasthenia gravis (MG), T hücrelerine bağımlı olarak oto-antikor aracılı gelişen bir otoimmün hastalıktır. MG, çoğunlukla nöromüsküler bileşkenin (Neuromuscular junction, NMB) postsinaptik membranındaki nikotinik asetilkolin reseptörlerine (AChR), daha az sıklıkla kasa özgü tirozin kinaza (muscle specific kinase, MuSK) ve diğer NMB proteinlerine karşı oluşan antikorlarla meydana gelir. MG, hem otoimmün bozukluklar için bir prototip hem de sinaptik işlevi anlamak için bir model haline gelmiştir⁽¹⁴⁾.

Asetilkoline bağlı myasthenia gravis daha yaygın görülmekle birlikte MuSK-MG, daha sık ve şiddetli miyastenik krizlerle birlikte seyreder. Solunum kaslarını da yoğun olarak etkilemesiyle hayati riski arttırmaktadır. Semptomları kontrol altına almak için uzun süreli, yüksek doz steroidler ve diğer immünosupresanlara ihtiyaç duyulur, diğer myasthenia gravis türlerinde uygulanan tedaviler MuSK-MG’de genellikle daha az etkilidir.

MuSK-MG hastalarının, hastalık aktivitesinin periferik bellek B hücre popülasyonu ile ilişkili olduğu bildirilmiştir ⁽⁹⁴⁾ . MuSK-MG’de sıklıkla kullanılan rituksimab ile elde edilen olumlu tedavi yanıtı, bu bellek B hücrelerinin etkin bir şekilde baskılanması ile ilişkilendirilmiştir ⁽⁹⁶⁾ . Maalesef standart tedavi yöntemleri (steroidler, plazma değişimi, vb.) B hücre popülasyonlarına etki ederken antikor yapımını değiştirmiyor oluşu ile hastalık seyrinde spesifik etki göstermediği şeklinde yorumlanabilir.

Deneyisel otoimmün myasthenia gravis hayvan modeli ise hastalığın immünpatolojisini anlamak için uygun bir altyapı oluşturmaktadır. “Knock out” fare modelleri ile yapılan çalışmalar MG için yeni tedavi modelleri planlamamızı sağlamaktadır. B hücre ilişkili genleri baskılayanın hastalığın tedavisinde nasıl etki yapacağını araştırmak da çalışmanın amacını oluşturmaktadır. Bu şekilde yeni ve daha etkin bir tedavi stratejisi geliştirmek mümkün olabilecektir.

Klinik deneylerde bir lentiviral uygulama sisteminin kullanılmasının önünde hala bazı engeller olsa da, lentivirüs taşıyıcılı shRNA ile gen susturma, yalnız myasthenia graviste değil birçok otoimmün hastalığın tedavisine ilişkin çalışmalarda

hedeflenebilecek bir tedavi veya hastalık mekanizmasını anlamaya yardımcı bir prosedür ortaya koyabilir. Bu sebeple, daha önce myasthenia gravis hastalığında araştırılmamış ancak multiple skleroz hastalarında anlamlı olarak farklı eksprese edildiği bulunan (differentially expressed genes) *FCRLB* ve *KCNS3* genlerinin MuSK-MG deneysel otoimmün hayvan modelinde nasıl bir etki yaratacağının moleküler ve immünolojik olarak incelenmesi amaçlanmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Düünden Bugüne Myasthenia Gravis

Retrospektif olarak incelendiğinde myasthenia gravisin (myo: kas, asthenia: zayıflık, gravis: şiddetli) ilk tanımlanması, **Thomas Willis** tarafından 1672’de yayınlanmış “*De Anima Brutorum*”da görülmektedir. Willis, yayınında bulunan klinik raporda, uzuvları ve dili üzerinde uzun süreli paraliz yaşamış kadın hastadan bahsetmektedir. Alıntı yapılması gerekirse raporda, “Bir süre boyunca rahat ve çabası konuşabilen hasta uzun süren diyalog sonrasında konuşma yetisini kaybetmekte ve ancak 1-2 saat sonra konuşabilir hale gelmiştir.” şeklinde tanımlanmıştır⁽¹⁾.

Yaklaşık iki yüzyıl sonra **Erb ve Goldflam**^(2,3), myasthenia gravisin klinik özelliklerini detaylı olarak açıklamışlardır. Bu yüzden, 1895’te Jolly tarafından şiddetli kas güçsüzlüğü anlamına gelen myasthenia gravis ismini alana kadar hastalık “Erb-Goldflam hastalığı” olarak anılmıştır.

1901 yılına gelindiğinde **Campbell ve Bramwell**⁽⁴⁾ 60, **Oppenheim**⁽⁵⁾ ise 58 hastanın klinik raporlarını inceledikleri derlemeler yazmışlardır. Bu, hastalığın tanınmasında oldukça faydalı olmuştur. 1921 yılında **Loewi**⁽⁶⁾ ve sonrasında **Dale**’in⁽⁷⁾ araştırmaları sayesinde ise nöromusküler sinir iletiminin, asetilkolin ile uyarıldığı açığa çıkmıştır. Asetilkolin reseptörü ve protein yapısı 1962’ye kadar gizemini korumuştur. 1962’de **Chang ve Lee**⁽⁸⁾, yılan toksini olan alfa bungarotoksinin nöromusküler bileşkeye spesifik olarak bağlanarak iletimi geri dönüşsüz bloke ettiğini kanıtlamıştır. Bu bilgi ışığında ise myasthenia gravis hastalarının kaslarında nöromusküler bileşkelerdeki asetilkolin reseptörü (AChR) sayısının sağlıklıları göre azaldığı bulunmuştur⁽⁹⁾.

Myasthenia gravis, antikor ilişkili olarak açıklanan ilk nörolojik hastalık olmuştur, bu nedenle immünologların ilgisini erken dönemlerden itibaren çekmeye başlamıştır. **Simpson**⁽¹⁰⁾, myasthenia gravisin nöromusküler bileşkeye (NMB) spesifik antikorların neden olduğu otoimmün bir hastalık olduğu hipotezini ilk defa ortaya atan kişidir. Kromatografi yöntemlerin gelişmesiyle birlikte AChR izolasyonu yapmayı başaran araştırmacı sayısı artmıştır⁽¹¹⁾.

Patrick ve Lindstrom⁽¹²⁾ tarafından ilk defa tavşanlar, pürifiye edilmiş AChR

ile immünize edilmiştir. İmmünize edilen tavşanlarda kas güçsüzlüğü görülmüş ve asetilkolinesteraz verilerek bu güçsüzlük tedavi edilmiştir. Deneysel otoimmün myasthenia gravis modelinin (DOMG) ilk uygulandığı bu çalışmayla başlamıştır. Sonrasında hasta serumları veya izole antikorların kullanılmasıyla farklı organizmalarda bu hastalık modeli indüklenmeye devam edilmiştir⁽¹³⁾.

Günümüzde hücre kültürü ve DOMG modelinin uluslararası kabul edilen güvenilir bir temel olması sayesinde çeşitli teknikler kullanılarak hastalığın nedenleri, etkilediği mekanizmalar ile tedavi ve ilaç araştırmaları sürmektedir.

2.2. Myasthenia Gravis

Myasthenia gravis (MG), kas güçsüzlüğü ile karakterize olan kronik otoimmün bir hastalıktır. Patolojik otoantikorlar postsinaptik nöromusküler bileşkede bulunan proteinlere bağlanırlar ve sinir iletimine engel olurlar. MG, hem otoimmün bozukluklar için bir prototip hem de sinaptik işlevi anlamak için bir model haline gelmiştir⁽¹⁴⁾. B hücresi aracılı bir hastalıktır. Çoğu hasta nikotinik asetilkolin reseptörüne (AChR) karşı gelişen otoantikora sahiptir. Ancak AChR otoantikorları bakımından negatif olan hastaların yaklaşık %15-20'si kasa spesifik tirozin kinaza (muscle specific kinase MuSK) karşı gelişen otoantikora sahiptir⁽¹⁵⁾. Farklı otoantikora sahip olan veya spesifik antikor bulunmamasına rağmen myasthenia gravis görülen hastalar da vardır. Bu alttiplerden ayrı bir başlıkta bahsedilecektir.

MG'ye otoimmün olma özelliğini sağlayan başlıca kriterler, hastaların büyük bir çoğunluğunda belirlenen hastalığa özgü antijen ve buna özgül olarak gelişen otoantikor varlığıdır. Hastalık kadınlarda erkeklerden daha sık görülmektedir (3:1 veya 4:1). Safleştirilmiş antijenik yapılar veya antijene özgü IgG tipi antikorlar, deney hayvanlarına enjekte edilerek MG'nin deneysel hayvan modeli oluşturulabilmektedir. Ayrıca otoantikorların transplasental geçişi de hastalık nedeni olabilmektedir. MG'nin organa özgü özellik taşıması ve patogeneğinde önemli bir organ olan timusun çıkarılmasından (timektomi), tedavide sıkça başvuru alan immünsüpresif ilaçlar ve plazmaferezden fayda sağlanması da otoimmünite kriterleri içinde yer alabilmektedir.

2.2.1. Epidemiyoloji

MG nadir bir hastalıktır. Bildirilen insidans ve prevalans oranlarındaki geniş çeşitlilik, son 70 yılda esas olarak Avrupa ve Amerika Birleşik Devletleri'nde gerçekleştirilen çeşitli epidemiyolojik çalışmalara dayanmaktadır. Bu artışlar, hastalığın daha iyi bilinmesine ve tanısıl antikor testi, epidemiyolojik metodoloji ve hastalığın tedavisinde daha yüksek sağkalım sağlayan gelişmelere bağlanmaktadır⁽¹⁶⁾. Prevalansın 100.000 nüfus başına 10 ila 20 vaka arasında olduğu; bu oranın iyileşen tedavi ve sağkalım nedeniyle zamanla artacağı tahmin edilmektedir.

MG insidansında bimodal bir yaş dağılımı vardır, 30 yaş civarında ve 50 yaş civarında zirve yapar ve daha sonra insidans sürekli bir artış olur⁽¹⁷⁻¹⁸⁾.

Otoimmün bozuklukların tipik özelliği olarak, myasthenia graviste de genç yaş grubunda, kadın hasta sıklığı daha yüksektir ve ileri yaş grubunda erkeklerde biraz daha fazla sayıda görülür⁽¹⁹⁾.

Juvenil MG, 1 yaşından önce başlayan hastalık olarak tanımlanır. 18 yaş ve tüm MG vakalarının kabaca %10'unu oluşturur.

Doğu Asya'da oküler hastalık sıklığı daha yaygın olarak bildirilmektedir⁽²⁰⁾. Hem yetişkinlerde hem de çocuklarda MG insidansı ve prevalansında nispeten eşit bir coğrafi dağılım vardır. Tüm etnik kökenler MG'den etkilense de, Afrika kökenli insanlarda, özellikle MuSK'a karşı antikor pozitifliği görece daha yüksektir⁽²¹⁻²²⁾. MuSK antikor pozitif hastalığı, ekvatora yakın coğrafi bölgelerde ise daha yaygın görünmektedir⁽²³⁾.

2.2.2. Klinik Belirtiler

MG'nin yaygın ancak spesifik olmayan bir özelliği, hastaların yaşadığı, yorgunluk olarak adlandırılan zayıflığın dalgalanan doğasıdır. Hastalar tipik olarak egzersizle veya gün geçtikçe semptomların kötüleştiğini bildirecek ve bu durum, işleyen AChR'lerin kaybı nedeniyle nöromusküler iletimin azaldığını gösterecektir.

Hastaların çoğunun semptomları (kabaca üçte ikisi), başlangıçta oküler semptomlarla gelen ptozis ve/veya pupilla anormallikleri olmayan diplopidir⁽²⁴⁾. Göz kaslarının zayıflığı genellikle asimetrik ve değişkendir. Kranial sinir III, IV veya VI lezyonları diplopi paternlerine yol açarken, MG'li hastalar sıklıkla yatay, dikey veya diyagonal diplopi kombinasyonu yaşamaktadır. Benzer şekilde, ptozis derecesi ve göz

tutulumu zamanla önemli ölçüde değişebilir. Sürekli yatay ve dikey bakış, Cogan kapak seçirmesi değerlendirmesi ve perde işareti değerlendirmesi dahil olmak üzere yorulabilir oküler zayıflığı doğrulamak için birden fazla yatak başı manevrası yapılabilir (25) .

Hastaların yaklaşık %75'inde, tipik olarak başvuruyu takip eden ilk 2 ila 3 yıl içinde genel güçsüzlük gelişir; anti-MuSK MG'de genel güçsüzlüğe yayılım daha hızlı olabilir (19,26,27) .

Hastalık jeneralize olduğunda bulbar, boyun ve proksimal ekstremiteler kas tutulumuna eğilim vardır (24,28,29) .

Hastalar, yemek yeme süresi arttıkça çene yorgunluğu nedeniyle çiğneme gücünü geliştirebilir. Benzer şekilde, yutma, yutak veya dil kaslarının zayıflığından dolayı etkilenebilir ve sıvılar için disfaji, katılardan daha sık görülür. Konuşma yorgunluğu klinikte bir hastadan 50 veya 100'e kadar yüksek sesle sayması istenerek değerlendirilebilir. Bifasiyal zayıflık, ifadesiz yüz ifadeleri, gülümsemede güçlük, ısıklık çalma ve göz kapaklarını tam olarak kapatamama ile sonuçlanabilir. Yüz ifadesi eksikliği hastalar için sosyal bir sıkıntı kaynağı olabilir. MG'de boyun fleksiyon zayıflığı baskındır (25). Nadiren boyun ekstansör güçsüzlüğüne bağlı baş düşmesi ile başvurulabilir; bu sunum daha çok MuSK MG'de görülür (26-28). MG hastalarının %40 kadarında solunum kas güçsüzlüğü ortaya çıkabilir ve bu da efor veya ortopne ile birlikte dispneye neden olabilir (24) .

MG'li hastaların yaklaşık %15 ila %20'si miyastenik kriz yaşar, miyastenik kriz MuSK MG'de daha yaygındır. Klinik iyileşme gerçekleşene kadar, invaziv olmayan pozitif basınçlı ventilasyon ile destek olunur (24-26-30) .

2.2.3. Tanı

AChR antikorlarının tespiti için serolojik testler, elektrofizyolojik inceleme ve asetilkolinesteraz (AChE) inhibitörlerine yanıtın değerlendirilmesi ile birlikte genellikle MG teşhisi için ilk adımdır (31). Aynı hastadan alınan seri numunelerin AChR antikor titre testi, ilerlemelerini izlemek ve hastalık yönetimine rehberlik etmek için önemlidir. Ek olarak, AChR antikor titresi, annenin titresi 100 nM'nin üzerinde olduğunda geçici neonatal MG'nin görülmesi olasıdır. 10 nM'nin altında olduğu zaman risk oluşturmadığı kabul edilmektedir (32) .

AChR antikör tespiti için şu anda en yaygın olarak kullanılan yöntem, radyoimmünopresipitasyon testidir (RIPA)⁽³³⁾. AChR için oldukça spesifik bir antagonist olan 125I- α -bungarotoksin ile insan AChR'sinin dolaylı olarak etiketlenmesine dayanır ⁽³⁴⁾ . AChR antikoru için uygulanan RIPA, çok yüksek özgüllüğü (yaklaşık %99) ve jeneralize MG durumunda yaklaşık %85 ve oküler MG'de yaklaşık %50 olan duyarlılığı nedeniyle uzun yıllardır MG tanısında altın standart olmuştur ⁽³⁴⁾.

Nadir durumlarda, diğer otoimmün bozuklukları olan veya MG'si olmayan timoma olan hastalarda AChR antikorları bulunabilir ⁽³⁵⁾. RIPA kantitatif sonuç verir ve hastaları izlemek için otoantikör titresi belirlenmesini sağlar. AChR antikorları için enzim bağlantılı immünosorbent testi (ELISA) da mevcuttur ancak standart RIPA kadar duyarlı değildir ⁽³⁶⁾. Rutin tanıda RIPA kadar ilgi görmemiştir. RIPA'ya radyoaktif olmayan bir başka umut verici alternatif, hedef antijenin floresan ile etiketlendiği bir floresan immünopresipitasyon testidir (FIPA). Bu yöntemin nispeten iyi bir duyarlılığa ve özgüllüğe sahip olduğu gösterilmiştir, ancak yine de RIPA kadar iyi değildir. Radyoaktivitenin tehlikelerini elimine etmiş olsa da özel ekipman ve uzmanlık gerektirir. Bu da rutin tanıyı zorlaştırır ⁽³⁷⁾.

Ayrıca ardışık sinir uyarım testleri ve tek lif elektromiyografi MG tanısında kullanılabilir. Timusun radyolojik incelemesi MG tanısı koyulduktan sonra timoma veya timik hiperplazi olup olmadığını araştırmak üzere yapılır. Mediasteninin bilgisayarlı tomografisi ile hemen tüm timomalar saptanabilir.

2.2.4. Tedavi

Tanı değerine ek olarak otoantikör özgüllüğünün belirlenmesi de hastalığın doğru tedavisi için çok önemlidir. İlk olarak, AChR ve MuSK serum otoantikörlerinin saptanması, MG için pratik olarak kesin bir teşhis sağlayarak uygun tedavinin başlanmasına olanak tanır. Ayrıca, antikör titresinin izlenmesi, hastalığın ilerlemesini ve tedaviye yanıtı takip etmede çok faydalı olur ⁽³⁸⁾ .

Terapötik yaklaşım MG alt grupları arasında farklılık gösterir. MuSK-MG hastaları daha şiddetli semptomlara ve genel güçsüzlüğe sahip olma eğilimindeyken bu hastalarda tedavinin kesilmesi sıklıkla semptomların kötüleşmesine yol açar⁽³⁹⁾. Ek olarak, MuSK-MG hastaları, MG için birinci basamak tedavi olarak yaygın olarak kullanılan bir AChE inhibitörü olan piridostigmin ile tedavi edildiğinde yan etkiler

gösterebilir ve bu hastalarda timektominin yararlılığını destekleyen çok az kanıt vardır⁽⁴⁰⁾. Öte yandan, genellikle plazma değişiminden (PLEX) büyük ölçüde yararlanırlar ve diğer MG alt gruplarına göre daha belirgin olarak rituksimab uygulamasına çok iyi yanıt verirler⁽⁴¹⁻⁴²⁾. Ayrıca titin veya RyR antikoru olan AChR antikoru pozitif hastalar daha şiddetli hastalığa sahip olma eğilimindeyken, erken başlangıçlı MG'de bunlar timoma göstergesidir⁽⁴³⁾.

Seronegatif MG, MuSK-MG ve LRP4-MG hastalarında genellikle AChR-MG'de görülen tipik timus patolojisinden yoksun olduklarından timektominin yararı şüphelidir⁽⁴⁴⁾.

Özellikle Japon hastalarda, Kv1.4 antikoru varlığı kardiyak fonksiyon bozukluğu ve ciddi komplikasyonlarla ilişkilendirilmiştir, bu buna göre izlenmelidir. Bu nedenle hastalara sadece klinik ve elektrofizyolojik muayene ile değil serolojik olarak da tanı konulabilmesi önemlidir. MG için en yaygın tedavi stratejileri şu anda AChE inhibitörleri, immünosupresif ajanların kullanımı, timektomi, intravenöz immünoglobulin (IVIG) ve plazmaferezdir^(45,46).

Bununla birlikte, bunlar büyük ölçüde spesifik değildir ve bu nedenle, özellikle yaşam boyu gerekli olan immünosupresif tedavi göz önüne alındığında, çeşitli yan etkiler eşlik edebilir. Yeni tedaviler, antijene özgü olmayı hedeflemelidir, yani bağışıklık sisteminin çoğunlukla MG'de iyi bilinen spesifik otoimmün bileşenlerini hedef almalıdır⁽³⁸⁾.

2.3. MG'de Hastalık Altgrupları

Hastalık 40 ya da 50 yaşından önce başlarsa erken başlangıçlı MG (EOMG) olarak sınıflanır. Erken ve geç başlangıç sınırı yakın zamana kadar 40 olarak kabul edilmişse de son zamanlarda daha çok 50 yaş kullanılmaktadır. Bu grupta sıklıkla timusta folikül hiperplazisi görünmektedir. Daha sıklıkla kadınlarda rastlanan bu alt tipte timusta hiperplazi olması ve hastaların timektomiye yanıt vermesi gibi özellikler sık bulunur ve EOMG en sık görülen alt tiptir (Tablo 1).

Hastalık 40 ya da 50 yaştan sonra başladığında geç başlangıçlı MG (LOMG) olarak gruplanabilir. LOMG'de kadın ve erkek dağılımı eşittir. Bu grupta timusun atrofisi daha sık görülür. Hastaların bir kısmında anti-riyanodine veya anti-titin (bir iskelet kası proteini) gibi başka otoantikorlar da bulunur.

Anti-AChR antikoru bulunmayan MG hastalarının bir grubunda MuSK'a karşı otoantikorlar bulunduğu gösterilmiştir. Anti-MuSK antikoru ile gelişen MG'de, timus genel olarak normal ya da hafif değişikliğe uğramış olarak değerlendirilmektedir. MuSK-MG, daha çok genç- orta yaşlarda ve kadınlarda görülür. Hastalığın klinik olarak AChR-MG'ye göre daha ağır şiddetli seyrettiği bildirilmektedir.

Hastaların küçük bir bölümünde (yaklaşık %10) hastalık oküler kaslarla sınırlı kalır. Oküler MG, jeneralize MG'ye göre hafif seyirli sayılır, fakat pitoz ve diplopi belirtilerinden dolayı günlük yaşamı etkiler. Oküler MG'nin sık görüldüğü gruplar prepubertal hastalar ve yaşlı erkeklerdir.

MG'de sıklıkla timusta patolojik değişikliklere rastlanmaktadır. Timoma timusun korteks, medulla veya her iki bölgesinden de köken alabilen, timik epitel hücrelerinin heterojen tümörleridir. Timustaki anomalilerden biri timik tümördür (timoma). Timomalı hastaların % 30'unda MG ortaya çıkarken, MG hastalarının % 10-15'inde timoma görülmektedir. Timomalı MG hastalarının hemen hepsinde anti-AChR pozitifdir.

Altıtip	Antikor	Farklı bir antikor daha bulunabilir mi ?	Yaş aralığı	Yüzdelik dağılım	Timus patolojisi
Erken başlangıçlı	Anti-AChR	Nadir	<50 yaş	15-25 %	Hiperplaji
Geç başlangıçlı	Anti-AChR	Genel	>50 yaş	35-45 %	Atrofi
Neonatal MG	Anti-AChR	Nadir	Bebeklik	5-30 % ihtimalle	Değişken
Timoma ile MG	Anti-AChR	Sık	Herhangi	10%	Lenfoepitelioma
MuSK-MG	Anti-MuSK	Nadir	Herhangi	1-10 %	Normal
LRP4	Anti-LRP4	Nadir	Herhangi	1-5 %	Normal
Seronegatif	Bulunmaz	Değişken	Herhangi	10-15 %	Değişken
Oküler	Değişken	Nadir	Herhangi	15%	Değişken

Tablo 1 Myasthenia graviste görülen hastalık alttıpleri

2.3.1. Asetil Kolin Reseptörüne Karşı Otoantikorların Varlığı ile Gelişen Myasthenia Gravis (AChR-MG)

Anti-AChR antikorumla sahip MG, erken başlangıçlı MG (50 yıldan önce başlayan semptom) ve geç başlangıçlı MG (50 yıl sonra başlangıçlı) olarak ikiye ayrılır. Her iki alt grupta da semptomlar geneldir. AChR-MG olmayan alt tiplerde, erken ve geç başlangıç arasındaki ayrımın prognostik veya tedavi için kanıtlanmış bir değeri yoktur (48).

AChR-MG'de erken başlangıçlı ve geç başlangıçlı hastalık tipleri, timik patoloji, HLA genotipi ve diğer genetik değişkenler, otoimmün komorbiditesi ve tedaviye yanıt açısından farklılık gösterir. Örneğin, timektominin erken başlangıçlı MG'de net klinik

faydaları vardır, ancak geç başlangıçlı MG'de faydaları daha tartışmalıdır ve muhtemelen yoktur. Ayrıca, immünosupresif ilaçlara verilen yanıtın yanı sıra yan etkilerin riskleri ve klinik önemi, erken başlangıçlı ve geç başlangıçlı formlar arasında farklılık gösterebilir⁽⁴⁹⁻⁵⁰⁻⁵¹⁻⁵²⁾.

MG başlangıcı çocuklukta ortaya çıkabilir. Çocukluk ve juvenil MG'nin klinik seyri, erişkinlerdeki erken başlangıçlı MG'ninkine benzerdir. Juvenil MG, Doğu Asya popülasyonlarında en yaygın olanıdır⁽⁵³⁾.

Neonatal myasthenia gravis, maternal antikorların transplasental geçişinin neden olduğu antikor aracılı bir hastalıktır. Myasthenia gravisli annelerin yaklaşık dörtte üçü anti-AChR antikorlarına sahiptir. MG'li annelerin çocuklarında, zamanın yaklaşık %5 ila %30'unda neonatal myasthenia gravis gelişir⁽⁵⁴⁾.

2.3.2. Kasa Spesifik Kinaza Karşı Otoantikorların Varlığı ile Gelişen Myasthenia Gravis (MuSK MG)

Kasa Spesifik Kinaz myasthenia gravis (MuSK-MG), genel kas güçsüzlüğüne yol açan nöromusküler iletimi bozan otoimmün bir hastalıktır. AChR-MG, daha yaygın bir myasthenia gravistir ancak, MuSK-MG, daha sık ve şiddetli miyastenik krizlerle birlikte esas olarak bulbar ve solunum kaslarını etkiler. Semptomları kontrol altına almak için uzun süreli, yüksek doz steroidler ve diğer immünosupresanlara ihtiyaç duyulur, tedaviler genellikle daha az etkilidir.

Fizyolojik koşullar altında MuSK, nöromusküler bileşkede (NMB) postsinaptik AChR kümelerinin gelişimi ve bakımı için temel olan bir fosforilasyon kaskadını düzenler. Motor sinir terminali tarafından sinaptik aralığa salgılanan Agrin, MuSK'u aktive eden düşük yoğunluklu lipoprotein reseptörü ile ilişkili protein 4'e (LRP4) bağlanır. MuSK-MG'de, monovalent MuSK'a spesifik IgG4 tipi otoantikorlar, MuSK-LRP4 etkileşimini bloke ederek MuSK aktivasyonunu önler ve AChR kümelerinin dağılmasına yol açar. Daha düşük seviyelerde MuSK IgG1, 2 ve 3 antikor alt sınıfları da mevcuttur ancak bunların hastalığın patogeneze katkılarını tartışmalıdır⁽⁴⁷⁾.

Anti-MuSK antikorlarının varlığı genellikle daha şiddetli ve yaygın kas zayıflığı ve bazen de kas atrofisi ile ilişkilidir⁽⁵⁵⁾. MG'li anti-MuSK-pozitif hastaların büyük çoğunluğu kadındır. MuSK-MG'de kas gücü diğer MG alt tiplerinde olduğundan daha az dalgalanır ve genellikle hastalığın erken evrelerinde bulbar ve yüz kasları da tutulur⁽⁵⁵⁻⁵⁶⁾. Uzun süreli zayıflığı AChR-MG'ye göre daha az yaygındır ve oküler kaslar

korunabilir. Daha da önemlisi, MuSK-MG hastalarında solunum güçlüğü diğer alt gruplara göre daha olasıdır⁽⁵⁵⁾. Klinik görünüm MuSK-MG şüphesine yol açabilir, ancak bu alt grup için spesifik, mutlak klinik kriterler yoktur.

2.3.3. Düşük Yoğunluklu Lipoprotein Reseptörü ile İlişkili Protein 4 Karşı Otoantikorların Varlığı ile Gelişen myasthenia gravis (LRP4-MG)

LRP4 antikorlarına sahip MG, diğer alt gruplara göre daha az karakterize edilir. Bu gruptaki hastalar, hem ilk sunumda hem de hastalık progresyonu boyunca daha hafif semptomlara sahip olma eğilimindedir⁽⁵⁷⁻⁵⁸⁾.

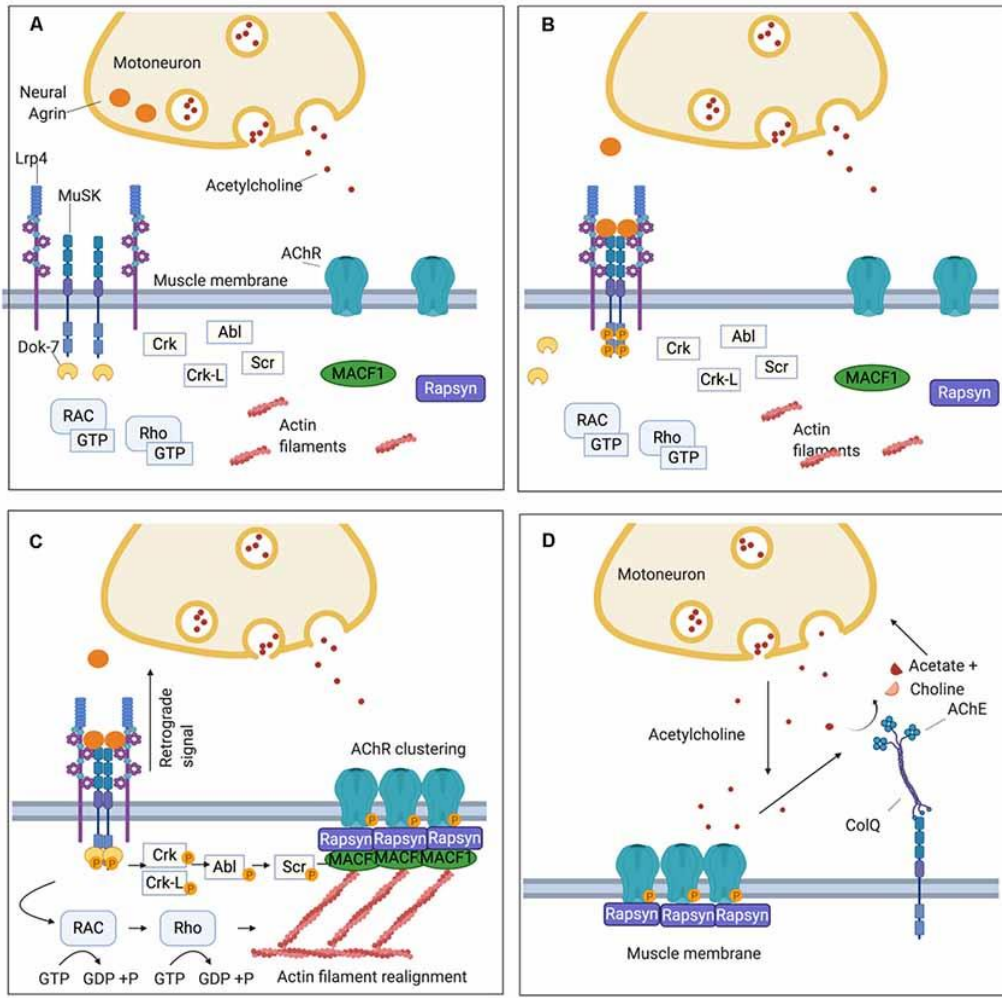
Bu hastalar çok nadiren solunum desteği gerektiren bir miyastenik kriz yaşarlar. Timoma bildirilmemiştir. Birkaç hastanın anti-AChR, anti-MuSK ve anti-LRP4 antikorlarının bir kombinasyonuna sahip olduğu bildirilmiştir; bu hastalar daha şiddetli MG'ye sahip olma eğilimindedir ve bazı görüşlere göre ilgili AChR antikor alt grubuna göre kategorize edilmelidir⁽⁵⁹⁾.

2.3.4. Seronegatif MG

MG hastası olan ancak anti-AChR, anti-MuSK veya anti-LRP4 antikorları için pozitif test sonucu olmayan hastalar, seronegatif MG'ye sahip olarak tanımlanır ve jeneralize (oküler olmayan) MG hastalarının yaklaşık %10'unu oluşturur⁽⁶⁰⁻⁶¹⁻⁶²⁻⁶³⁾. Tanı konulması kullanılan antikor testlerinin duyarlılığına bağlıdır.

Seronegatif MG grubu, afiniteleri veya konsantrasyonları tespit edilemeyecek kadar düşük antikorları olan hastaları, ilgili antijenlere karşı antikorları olan henüz tanımlanmamış ve test edilemeyen hastaları ve aracılık etmeyen miyastenik semptomları olan hastaları içerdiğinden heterojendir.

Bazı hastalarda tekrarlanan testler, artan antikor konsantrasyonu, epitop yayılması veya artan test duyarlılığı nedeniyle diğer alt gruplardan birine geçiş olabilmektedir. İlk değerlendirmeden 6-18 ay sonra seronegatif MG'de tekrarlanan testlerin yapılması önerilmektedir⁽⁴⁵⁾.



Şekil 1: Sinir-kas kavşağının (NMJ) ve asetilkolin reseptörlerinin (AChR'ler) kümelenme yolunun şematik gösterimi.

(A) Sinaptik sonrası kas membranında, düşük yoğunluklu lipoprotein reseptörü ile ilgili protein 4 (LRP4) ve Kas Spesifik Kinaz (MuSK) gevşek bir tetramer oluşturur ve bu aşamada AChR'ler sarkolemma boyunca dağılır. (B) Agrin, motor sinir terminali tarafından sinaptik aralığa salgılanır ve LRP4 ile etkileşime girerek LRP4-MuSK tetramerinde bir konformasyonel değişiklik meydana getirir. Bu, intrasitoplazmik alanındaki tirozin kalıntıların bir oto-fosforilasyon döngüsü yoluyla MuSK aktivasyonuna yol açar. (C) DOK7'nin alınması, MuSK fosforilasyonunu güçlendirir ve Crk, Ckr-l, Abl ve Scr dahil olmak üzere çeşitli ara proteinleri içeren aşağı yönde fosforilasyon şelalesini tetikler. Kümelenme yolu, AChR'nin alt birimlerinin fosforilasyonu ve AChR kümelerini alttaki aktin filamentlerine sabitleyen rapsin alımıyla sonuçlanır. LRP4, motor sinir terminalinde ACh veziküllerinin kümelenmesini artıran retrograd bir sinyal aracılığıyla presinaptik gelişime katılır. (D) Ekstrasellüler matriks (ECM) yoluyla MuSK ayrıca, AChR'ye bağlanmasından sonra asetilkolinin (ACh) hidrolizinden sorumlu asetilkolinesteraz enzimine (AChE) tetramerler halinde bağlanan ColQ ile de etkileşime girer. doi:10.3389/fnmol.2020.00159.

2.4. Nöromusküler Bileşke ve Sinir İletimi

Nöromusküler bileşkeler (NMB), omurilik motor nöronlarının sinir terminalleri ile nörotransmitter olarak asetilkolini kullanan iskelet kası lifleri arasında oluşan uyarıcı kimyasal sinapslardır. İskelet kaslarındaki kas lifleri, doğrudan omurilikteki alt motor nöronlardan monosinaptik girdi alır. Bu nedenle, omurilikten çıkan motor nöron aksonları, kas liflerini inerve etmek için uzun mesafeler katederler⁽⁶⁴⁾.

İskelet kaslarının çoğunda, bir kas lifinde bir NMB bulunur. Olgun bir NMB, bir motor sinir terminali tarafından inerve edilir; dolayısıyla kas lifi ile motor nöron arasında birebir ilişki vardır. Bununla birlikte, bir motor nöron, aksonunu hedef kas içinde dallara ayırarak çoklu kas liflerini inerve eder. Bir motor nöron tarafından inerve edilen bu kas lifleri grubuna motor ünite denir⁽⁶⁵⁾.

Motor sinir terminalleri, NMB'leri oluşturmak için sinaptik aralıkları doldurur. Motor sinir terminalleri ve kas lifleri, doğrudan temas etmez veya bir hücre yapışma kompleksi oluşturmaz. Motor sinir terminallerinin hücre zarları ve kas lifleri, yaklaşık 30 – 50 nm'lik sinaptik yarık adı verilen bir boşlukla ayrılır. Sinaptik yarıkta, asetilkolinesteraz, her sinaptik iletimi sonlandırmak için nörotransmitter asetilkolini hidrolize etmek için birikir. Sinaptik yarık, bazal laminayı oluşturan hücre dışı bir matriks ile doldurulur⁽⁶⁵⁻⁶⁶⁾.

Kas liflerinin hücre zarı olan sarkolemmanın ekstrasinaptik alanı, bazal membran olarak da adlandırılan bağ dokusu tabakasını oluşturan iç bazal lamina tabakası ve dış retiküler lamina tabakası ile çevrilidir. Bazal lamina kollajenler, fibronektinler, lamininler, nidojenler ve perlekandan oluşur⁽⁶⁵⁻⁶⁷⁾. Hücre dışı matriks proteinleri, sinaptik yarıkta iç içe geçmiş bir alan oluşturur. Bu proteinler, NMB'lerin sinaptik öncesi ve sonrası uzmanlaşmasının organizasyonu ve sürdürülmesi için işlevsel rollere sahiptir⁽⁶⁸⁾.

Sağlıklı bir NMB'nin sinir terminali, neredeyse tam bir örtüşme ile bir asetilkolin reseptör kümesi bölgesini kaplar. NMB'lerin sinaptik vezikülleri, asetilkolin içerir ve presinaptik zarın yakınında lokalize olur. Spesifik olarak, sinaptik veziküller presinaptik zarın aktif bölgelerinde birikir. Aktif bölgeler, sinaptik veziküllerin biriktiği ve nörotransmitter asetilkolinin ekzositotik salınımı için presinaptik membran ile kaynaştığı sinaptik vezikül salma bölgeleridir⁽⁶⁹⁻⁷⁰⁾.

Aksiyon potansiyelleri presinaptik terminallere ulaştığında, voltaj kapılı kalsiyum kanalları açılır ve aktif bölgelerde kalsiyum akışını indükler. Kalsiyum konsantrasyonundaki artış, SNARE proteinlerinin konformasyonel bir değişikliğine ve kenetlenmiş sinaptik veziküllerin presinaptik zar ile kaynaşmasına neden olur. Asetilkolin ekzositozla salınır, difüzyonla sinaptik yarık boyunca yayılır, postsinaptik zarda yoğunlaşan asetilkolin reseptörlerine bağlanır ve kas liflerinin kasılma için depolarizasyonuna neden olur ⁽⁷¹⁾.

2.4.1. Agrin- LRP4 ve MuSK Yolağı

NMB organizasyonunun moleküler mekanizmaları incelenmiştir, ve bu bilgiler myasthenia gravisin daha iyi anlaşılmasına katkıda bulunmuştur. Proteoglikan olan agrin, sinir terminallerinden salgılanır ve düşük yoğunluklu lipoprotein reseptörü ile ilişkili protein 4 (LRP4) ve MuSK'dan oluşan postsinaptik reseptörlere bağlanır ⁽⁷²⁻⁷³⁾.

Bu sinyalleşme sitozolik proteinler Dok-7 ve rapsin'i asetilkolin reseptörlerinin kümelenmesini sağlar ve postsinaptik hazırlıklar için indükler. Myasthenia graviste transmembran proteinler, asetilkolin reseptörleri ve MuSK, otoantikorların hedefi haline gelir ⁽⁷³⁻⁷⁴⁾.

MG'de çoğunlukla AChR'ye karşı gelişen otoantikorlar fonksiyonel AChR'lerin sayısının azalmasına, aksiyon potansiyeli kaybına ve nöromüsküler iletinin zayıflamasına sebep olmaktadır. Anti-AChR antikorları 3 mekanizma ile nöromüsküler iletiyi etkilemektedir. Birincisi, NMB'de kompleman bağlanması ve aktivasyonu ile meydana gelen lizistir. Bu AChR kaybına ve nöromüsküler iletinin zayıflamasına neden olmaktadır. Bu durumda normal postsinaptik membran katlanmasında bozulma ve voltaj kapılı Na⁺ kanalları sayısında azalma ve kas lifi aksiyon potansiyelinin eşik değerinde artma meydana gelmektedir. İkinci mekanizma antikorların AChR molekülüne çapraz bağlanmasıyla, endositoz meydana gelmekte AChR'nin internalizasyonu ve degradasyonu ortaya çıkar, antijenik modülasyon adını alır. Sonuncusunda ise AChR'nin ACh bağlama bölgesine doğrudan bağlanan antikorlar, fonksiyonel olarak reseptörün bloke olmasına sebep olmaktadır.

2.5. MuSK MG'nin Patofizyolojisi

MuSK, hücre dışı alana, transmembran sarmal alana ve tirozin kinaz aktivitesine sahip sitoplazmik alana sahip bir kas membran proteinidir. Hücre dışı alanı, üç immünoglobulin-benzeri bölge (Ig) ve sistein açısından zengin bir alan içerir. Bu alan Frizzled benzeri alan olarak da adlandırılır. MuSK antikorlarının çoğu, MuSK hücre dışı alanının Ig benzeri bölgelerine bağlanır⁽⁷⁵⁻⁷⁶⁾.

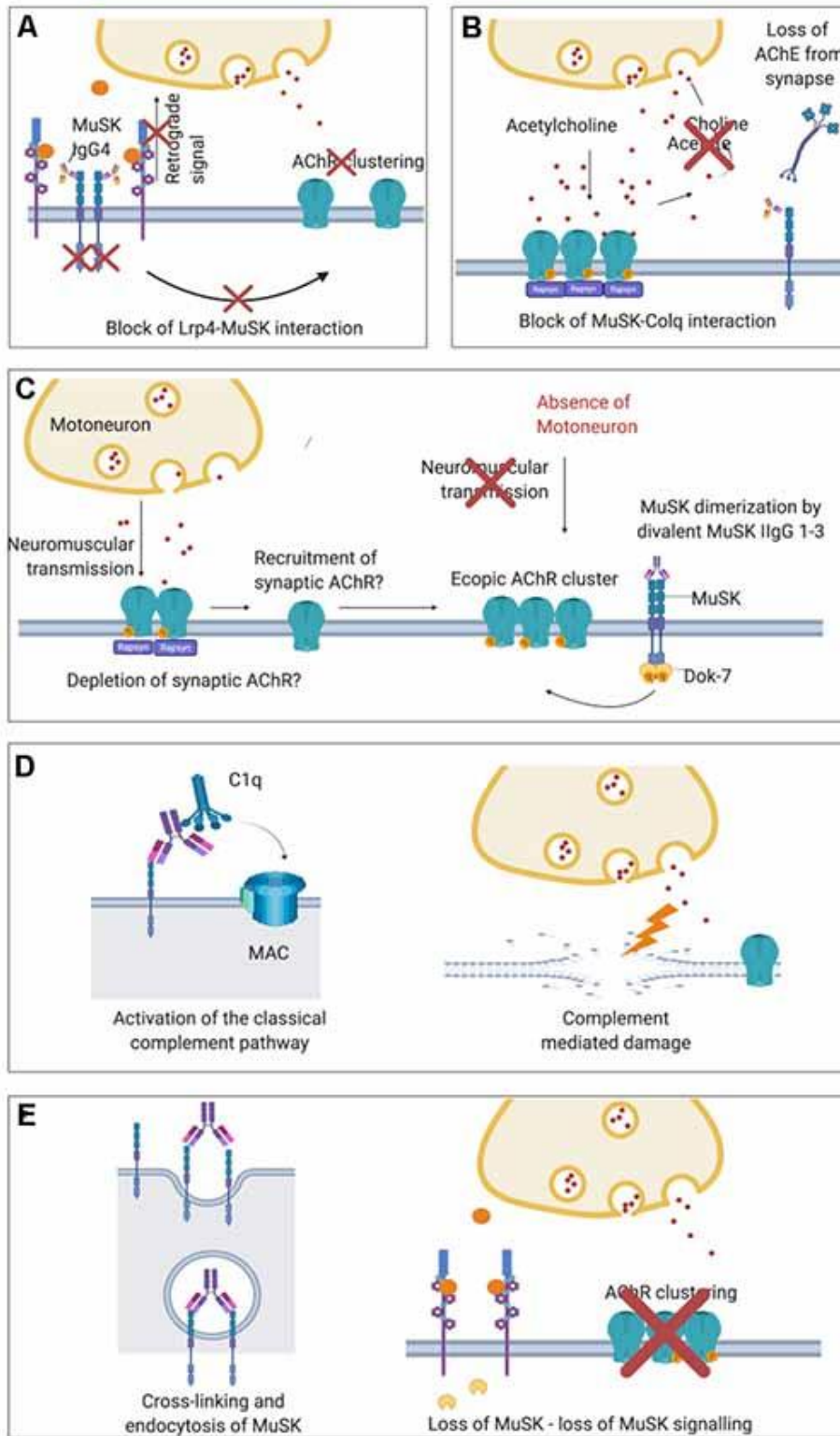
AChR antikorlarının aksine, MuSK antikorları komplemanı aktive etmeyen ve Fab kol değişimi nedeniyle fonksiyonel olarak önemli olan IgG4 alt sınıfına aittir⁽⁷⁷⁻⁷⁸⁾. Patojeniteleri, MuSK'nın ilk Ig benzeri alanına bağlanma yoluyla MuSK ve kollajen Q veya LRP4 arasındaki etkileşimlerin inhibisyonundan ve ardından hem agrin kaynaklı hem de agrinden bağımsız AChR kümelenmesinin azalmasından kaynaklanıyor gibi görünmektedir⁽⁷⁹⁻⁸⁰⁾.

Aşağıda görülecek Şekil 2.A görselinde, MuSK-MG'de, IgG4 alt sınıfının otoantikorları MuSK'nın ektodomainine bağlanır ve LRP4 ile etkileşimini önler ve aşağı yöndeki sinyalleri bloke eder. Fosforilasyon kaskadı bu nedenle engellenir ve AChR kümelerinin nihai dağılmasına neden olur. LRP4'ün aracılık ettiği retrograd sinyalleme kaybı, aksi takdirde AChR-MG'de karakteristik olan MuSK-MG hayvan modellerinde gözlenen ACh veziküllerinin presinaptik adaptif artışının olmamasını da açıklayabilir.

Şekil 2.B kısmında görüleceği üzere MuSK otoantikorları tarafından ColQ-MuSK bağlanması bloğunun, NMJ'de ECM'den AChE kaybına yol açabilecek patojenik bir mekanizma olduğu öne sürülmüştür.

Şekil 2.C' de ticari veya klonlanmış (monospesifik) MuSK antikorlarının iki değerlikli bağlanması, MuSK dimerizasyonuna ve aktivasyonuna neden olarak ektopik, ekstra sinaptik AChR kümelerine yol açtığı öne sürülmüştür. Bitişik motonöron terminallerinden yoksun olacakları için bunlar nöromusküler iletimde yer almazlar. Ektopik AChR kümelerinin oluşumu için, AChR sinapslardan da alınabilir ve böylece NMJ'yi AChR'den tüketir.

Şekil 2.D'de görüldüğü gibi *in vivo* MuSK antikorları (IgG1-3), C1q'yi toplayabilir ve klasik kompleman yolunu aktive ederek NMJ'de kompleman aracılı hasara neden olabilir. Şekil 2.E'de ise MuSK antikorları ayrıca MuSK'yı çapraz bağlayabilir böylece MuSK'u kas zarından etkili bir şekilde tüketebilir ve agrin-LRP4-MuSK-DOK7 sinyal iletiminin kaybına neden olabilir.



Şekil 2: MuSK Myasthenia gravisin patofizyolojisi

2.5.1. MuSK'a Karşı Gelişen Otoantikorların Patolojik Mekanizması

MuSK antikorlarının patojenitesinin en ilgi çekici yönlerinden biri, antikorların kendi doğasında bulunur. IgG1-3 antikorlarının aksine, IgG4'ler fonksiyonel olarak monovalenttir. Bunun nedeni, CH₃ omurgasındaki IgG1 ve IgG4 arasındaki tek amino asit farklılıklarının daha büyük stereomerik esnekliğe izin vermesidir. Sonuç olarak, zincir içi (intrachain) disülfid köprüleri, indirgeme koşulları altında oluşur. IgG4'ün iki yarım molekülünü arasında kovalent bağlantı olmadan bırakır⁽⁸¹⁾. CH₃ alanındaki diğer tek amino asit farklılıkları, ağır zincirler arasındaki kovalent olmayan etkileşimleri azaltır. Bu durum, her bir yarı antikorun IgG4 yarı antikor havuzundan rastgele seçilen diğer yarı antikorlarla değiş tokuş yaptığı Fab-kol değişim (Fab-arm exchange) fenomenine izin verir⁽⁸²⁾. Bu değişim başka bir antikorun ağır ve hafif zincirinin IgG4 izotipinde yer değiştirmesiyle IgG4'ün kimerik hale gelmesine sebep olmaktadır. Bu özelliklerle anti-MuSK antikoru varlığında NMB'de kompleman birikimi ve AChR kaybı meydana gelmez. Bu bulgular MG'nin bu iki alt tipinde farklı patolojik mekanizmalar ile hastalık oluşumuna işaret etmektedir.

Sonuç olarak, IgG4 MuSK antikorlarının tümü olmasa da çoğu, antijenleri için divalent değil, monovalenttir⁽⁸³⁾. IgG4'ün CH₂ alanındaki tekli amino asit farklılıkları, onu kompleman kaskadını aktive etmek için C1q'ya veya bağışıklık hücrelerini aktive etmek için FcγR'ye bağlanamaz hale getirir. Bunun yerine, IgG4 antikorları yalnızca bir proteinin işlevini bloke edebilir veya diğer proteinlerle etkileşimini engelleyebilir⁽⁸⁴⁾.

2.5.2. Kompleman Sistemi

Kompleman sistemi hem doğal hem de antikor aracılı bağışıklıkta önemli bir rol oynar. Mikroorganizmaları tanıyıp ortadan kaldırarak konağı enfeksiyona karşı savunmak için hareket eder ve antikor yanıtlarını artırarak doğuştan gelen ve adaptif bağışıklık arasında bir bağlantı oluşturur. Aynı zamanda bağışıklık komplekslerinin ve ölü veya modifiye edilmiş kendi hücrelerinin uzaklaştırılmasında da rol oynar⁽⁸⁵⁾.

Kompleman kaskadı, plazmada ve hücre yüzeylerinde bulunan 30'dan fazla protein içerir ve aktivasyonu sıralı ve dikkatli bir şekilde düzenlenir. Kaskadın başlamasını, amplifikasyon takip eder ve membran atak kompleksinin (MAC) oluşumu ile sonuçlanır⁽⁸⁵⁻⁸⁶⁾.

Üç farklı kompleman yolu vardır: klasik yol, lektin yolu ve alternatif yol ve her birinin bir C3-konvertaz oluşumuna yol açan farklı bir başlatma mekanizması vardır.

Başlatmayı takiben, C3 konvertaz C3'ü C3b'yi oluşturmak üzere böldükçe, kompleman kaskadı amplifiye edilir, bu daha sonra üretim yerine yakın başka yüzeye bağlı konvertaz kompleksleri oluşturur. Terminal kompleman aktivasyonu, C3b ve bir C3 konvertazın bir C5 konvertaz oluşturmak üzere birleşmesiyle başlar. C5 dönüştürücüler, C5'i C5b ve C5a'yı oluşturmak üzere parçalayarak MAC oluşturma sürecini başlatır. C5b daha sonra MAC'i oluşturmak için C6, C7, C8 ve C9'un birden çok kopyasıyla birleşir⁽⁸⁵⁾.

MAC'ler, hücre zarlarına giren, gözenek oluşumuna ve nihayetinde çekirdeksiz hücrelerin hücre lizisine ve çekirdekli hücrelere zarar veren lipofilik protein kompleksleridir⁽⁸⁷⁾.

2.5.3. B Hücrelerin Rolü

B hücre deplesyon tedavisi MuSK MG'de etkili olmaktadır, ancak AChR MG'de daha az etkili görünmektedir⁽⁸⁸⁻⁸⁹⁾. Bu gözlem, otoantikorlara yol açan altta yatan B hücre popülasyonlarında farklılıklar olabileceğini düşündürmektedir.

Kendine karşı bir bağışıklık tepkisinin gelişmesinden kaçınmak için, iki ayrı tolerans mekanizması, gelişimleri sırasında B hücrelerini seçer⁽⁹⁰⁾. Birincisi, erken olgunlaşmamış ve olgunlaşmamış B hücresi gelişim aşamaları arasında kemik iliğinde merkezi bir tolerans kontrol noktasıdır. Bu, kendi kendine tepkimeye giren antikorları ifade eden büyük bir B hücresi popülasyonunu ortadan kaldırır⁽⁹¹⁾. İkinci kontrol noktası, olgun naif B hücre bölmesine girmeden önce kendi kendine tepki veren yeni göçmen (emigrant/transitional) B hücrelerini eler. Bu tolerans mekanizmalarının bütünlüğündeki eksiklikler otoimmün hastalıklarda görülebilir⁽⁹²⁻⁹³⁾.

MuSK-MG hastaları derin B hücre patolojisi sergiler ve MG hastalarının hastalık aktivitesi bellek B hücrelerinin yeniden popülasyonu ile ilişkilidir⁽⁹⁴⁾.

CD27+ bellek B hücreleri, otoimmün ve inflamatuvar bozuklukların patogeneğinde yer almıştır⁽⁹⁵⁾. Ayrıca MG hastalarında MuSK-MG'de sıklıkla kullanılan rituksimab ile elde edilen olumlu tedavi yanıtı ve sürekli klinik iyileşme, CD27+ bellek B hücrelerinin etkin bir şekilde baskılanması ile ilişkilendirilmiştir^(96,97).

2.6. Hastalık Mekanizmasını Anlamaya ve Tedaviye Yönelik Yaklaşımlar

Genel anlamda, myasthenia gravis, hastaların önemli bir bölümünde tam ve stabil bir remisyonun sağlanabildiği, tedavi edilebilir birkaç nörolojik bozukluktan biri olarak kabul edilir. Bununla birlikte, MuSK-MG, semptomların ağırlığı ve genellikle tedaviye zayıf yanıt vermesi nedeniyle tedaviyi zorlaştırır.

MG tedavisi her hasta için kişiselleştirilmelidir. Doğru MG alt gruplandırması, tedaviyi seçerken ilk adımdır. Otoantikör paterni, başlangıç yaşı, timus patolojisi ve kas zayıflığının derecesi, bu tür alt gruplama için esastır. Tedavi semptomatik ve immünosupresif ilaçları, destekleyici önlemleri ve bazen timektomi içerir. Tedaviyi gerçek semptomlara uyarlamak ve yeni alevlenmeleri önlemek için özel takip gereklidir ⁽⁴⁵⁾. MG’de mevcut tedaviler Tablo 2’de özetlenmiştir.

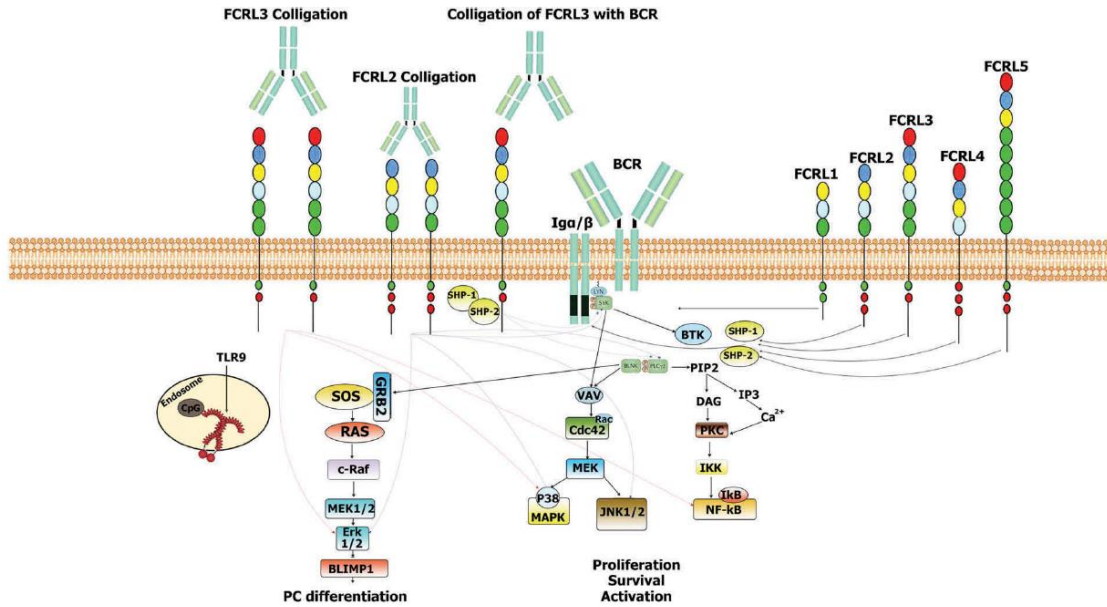
Tablo 2 Myasthenia gravis tedavisi için kullanılan ilaç ve uygulamalar

	Treatment	Mechanism	Negative Aspects
Symptomatic treatments	Pridogstigmine	Acetylcholinesterase inhibitor	Not beneficial for MuSK-MG
	Neostigmine	Acetylcholinesterase inhibitor	Shorter half-life
	Ambenonium chloride	Acetylcholinesterase inhibitor	Less effective
	3-4 diaminopyridine	K ⁺ channel blocker/increasing the presynaptic release of ACh vesicles	Needs more controlled clinical trials
Immunosuppressants	Prednisone	Broad action on the immune system	Long-term steroid usage-adverse effects
	Prednisolone	Broad action on the immune system	Long-term steroid usage-adverse effects
	Azathioprine	Steroid-sparing agent	Takes 6–15 months for an optimal effect
	Rituximab	CD20 ⁺ B cell depleting	Risk of precipitating other autoimmune disorders
	Mycophenolate mofetil	Steroid-sparing agents	Carries a teratogenic risk
Cytotoxic immunosuppressants	Methotrexate	Single immunosuppressive agents	High risk of adverse effects
	Cyclosporine	Single immunosuppressive agents	Adverse effects- only beneficial in AchR-MG
Immunoactive treatments	IVIG	Intravenous immunoglobulin infusion	Less efficacy in MuSK-MG
	Plasma exchange (PLEX)	Takes autoantibodies out of system	Time consuming and repetitive
	Salbutamol	β -adrenergic agonists	Needs more randomized clinical trials
	Ephedrine	β -adrenergic agonists	Needs more randomized clinical trials
Invasive approach	Thymectomy	Removal of thymus (whole or partial)	Effective only on AchR-MG

2.7. MG'de Aday Genler: *FCRLB* ve *KCNS3*

2.7.1. Fc Reseptör Benzeri Yapı B (Fc receptor-like = *FCRLB*)

FCRLB, Fc reseptör ailesine aittir. Fc reseptörleri, immünoglobulin (Ig) sabit bölgelerine bağlanma yetenekleri aracılığıyla fagositoz, antikora bağımlı hücre sitotoksitesi, ani aşırı duyarlılık ve immünoglobulinlerin transsitozunda yer alır (Şekil 3).



Şekil 3 FCRL'lerin BCR sinyalleşmesi ve B-hücre fonksiyonunun üzerindeki düzenleyici etkileri

Fc reseptör benzeri yapı ailesinin 5 üyesi vardır. Bunlar arasında hedef genimiz olan *FCRLB* de vardır. *FCRLB* sinyali, BCR sinyalini çoğunlukla MAPK yolu aracılığıyla modüle eder. *FCRLB* ve BCR'nin birlikte bağlanması, SHP-1'in *FCRLB*'nin ITIM'lerinde tirozin kalıntılarına alınması yoluyla BCR sinyalinin inhibisyonuna yol açar ve BCR ile tetiklenen kalsiyum mobilizasyonunu ve çoklu downstream sinyal yollarının fosforilasyonunu inhibe eder. (Syk, p38, JNK, ERK ve MAPK'ler.).

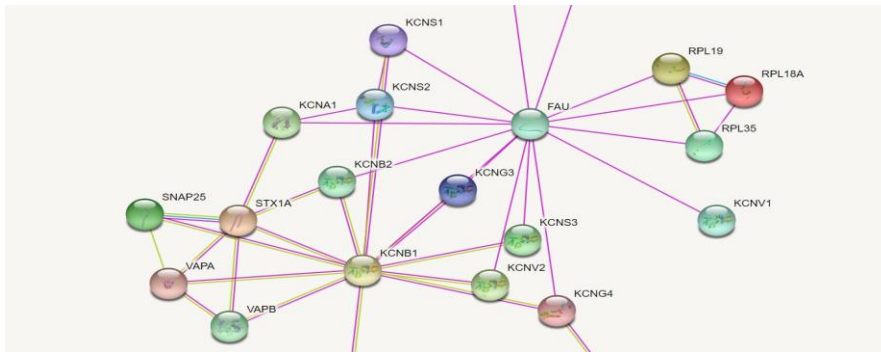
FcY reseptörü III (FcYR) nakavt (KO) farelerin, EAMG indüksiyonuna dirençli olduğu önceki çalışmalarda bulunmuştur. Bu da dolaşımdaki immün kompleksin EAMG indüksiyonunu sadece klasik kompleman yolunu aktive ederek değil, aynı zamanda FcYR'ler aracılığıyla immün hücre aktivitelerini de değiştirerek etkilediğini düşündürür. FcYRIII'ün inflamasyonu teşvik etmedeki kritik rolü nedeniyle, FcYRIII KO fareleri, çeşitli otoimmün bozukluklara dirençlidir. Yine daha önce yapılan çalışmaya göre; FcYRIII KO fareleri ayrıca wild type farelere kıyasla önemli ölçüde

daha düşük klinik insidans değerlerine ve dinamometre ile ölçülen daha yüksek ortalama kavrama kuvvetlerine sahipti⁽⁹⁸⁾.

FCRLB ise Fc reseptörüne benzer B hücre proteinidir. Benign multiple skleroz hastalığında yapılmış bir çalışmada, B hücreleriyle ilişkili farklı miktarda eksprese edilen *FCRLB* geni mikroarray ile tanımlanmıştır⁽⁹⁹⁾. Neonatal Fc reseptörü ise, IgG moleküllerinin yarı ömrünün uzatılmasında merkezi bir rol oynar. FcRn'nin birincil işlevi, hücreler içinde IgG'nin geri dönüşümü ve transsitoz yoluyla lizozomal bozulmadan IgG ve albüminin kurtarılmasıdır. Bu reseptörün antagonizmi, toplam IgG ve patojenik otoantikor düzeylerinin azalmasıyla sonuçlanan IgG katabolizmasına neden olur⁽¹⁰⁰⁾. Bu yüzden bir tedavi yaklaşımı olarak ilgi çekici görülmektedir.

2.7.2. Potasyum Kapılı Kanal S Ailesi 3. Üyesi (Potassium voltage-gated channel subfamily S member 3 (Kv9.3) = *KCNS3*)

Voltaj kapılı potasyum kanalları, iyon kanallarının en büyük ve en çeşitli sınıfını oluşturur ve hem uyarılabilir hem de uyarılabilir olmayan hücrelerde bulunur. Ana işlevleri, dinlenme zar potansiyelini düzenlemek ve aksiyon potansiyellerinin şeklini ve sıklığını kontrol etmekle ilişkilidir. Alfa alt birimleri 2 tiptir: kendi başlarına işlevsel olanlar ve elektriksel olarak sessiz olan ancak belirli işlevsel alfa alt birimlerinin aktivitesini modüle edebilenler. Bu gen tarafından kodlanan protein kendi başına işlevsel değildir ancak potasyum voltaj kapılı kanal proteinlerinin diğer üyeleri heteromultimerler oluşturabilir. İlgili yolları arasında enerji metabolizmasının entegrasyonu ve potasyum kanalları bulunmaktadır. Hipoksik durumlarda düz kaslardaki eksitasyon değerlerini daha negatife kaydırıldığı bilinmektedir⁽¹⁰¹⁾.



Şekil 4 STRING protein-protein etkileşimi atlasından elde edilen verilere göre *KCNS3* geninin etkileşimde olduğu protein kodlayıcı genler

İnsan protein atlası ve protein-protein etkileşimi analizlerinden elde edilen verilerde görüldüğü gibi *KCNS3*, *KCNB1* ile voltaj kapılı heteromer potasyum kanalı oluşturur. En çok bulunduğu doku çizgili kaslardır. Özellikle nöronlar ve kas hücrelerinde homeostatik elektriksel uyarımda ve ekzositozla ilişkilendirilmiştir. Protein haritalaması yapıldığında ise naif ve hafıza B hücrelerinde bulunduğu, RNA ekspresyonu incelendiğinde ise, en yakın etkileşiminin Immunoglobulin Kappa ve Lambda ile olduğu görülmektedir. Henüz *KCNS3* üzerinde fonksiyonel bir deneysel araştırma yapılmasa da *KCNS3* geninin susturulmasının MG patolojisinin anlaşılmasına yardımcı olacak farklı bir araştırma alanı olduğu öngörülmektedir.

2.8. Deneysel Otoimmün Myasthenia Gravis Hayvan Modeli (DOMG)

Otoimmün bozuklukların hayvan modelleri iki ana kategoriye ayrılabilir: 1) Hayvanlarda kendiliğinden bir otoimmün hastalık geliştirdiği spontan modeller, 2) Otoimmün hastalığın yapay olarak taklit edildiği indüklenmiş modeller.

Myasthenia gravis (MG) üzerinde yapılan çalışmalar, hem aktif hem de pasif immünizasyon ile indüklenebilen bir hastalık modeli olduğunu göstermiştir. Antikor aracılı hastalıklar konusundaki anlayışımızı şekillendirmeye yardımcı olmuştur ⁽¹⁰⁵⁾.

Pasif transfer, otoantikor aracılı hastalıkların akut etkilerini değerlendirmenin en iyi yoludur ve MG'de hastaların türetilmiş antikorlarını incelemek için yaygın olarak kullanılmıştır, hastalığın altında yatan immünolojik faktörleri daha geniş bir şekilde araştırmak için özellikle yararlı olmuştur. Sınırlamaları ise insan ve kemirgen bağışıklık sistemlerinin işlevi ve farklı fare türleri arasındaki olası farklılıklardır. Örneğin, C57B1/6 fareleri, AChR ile aktif immünizasyona çok duyarlıyken, AKR/J fareleri dirençlidir ⁽¹⁰⁶⁾. Bu yüzden DOMG hayvan modeli oluştururken kullanılacak hayvanın türünü, seçilecek immünizasyon yöntemini ve içeriğini doğru olarak seçmek, hastalığı yansıtan bir model oluşturma konusunda çok önemlidir. Ayrıca, hedef antijenin bir bütün protein olarak kullanılması sıklıkla yüksek antikor titrelerine neden olur, ancak protein farklı bir türden izole edilmiş ise, antikorların tümü mutlaka fare antijeni ile çapraz reaksiyona girmez veya hastalığa neden olan epitopların üretilmesine neden olmaz. Bu nedenle, aktif bağışıklama modelleri her zaman insan patolojisi ile ilgili değildir, ancak uygun bir klinik ve fizyolojik fenotip üretmede başarılı olduklarında,

deneysel tedavileri test etmek için uygun olan uzun vadeli bir hastalık modeli sağlar (107).

2.9. Lentiviral Partiküller ile taşınan shRNA ile *in vivo* Gen Susturma

shRNA taşıyan lentivirüs, klinik öncesi çalışmalarda gen manipülasyonu için yaygın olarak kullanılmıştır. Gen transferi için güçlü bir araçtır ve bu hücrelerin gen manipülasyonunun diğer teknikler kullanılarak elde edilmesinin genellikle zor olduğu düşünüldüğünde, otoimmün hastalıkların ilk terapötik hedefi olan bağışıklık hücrelerini ve hematopoietik kök hücrelerini verimli bir şekilde iletme yeteneğinde umut vaat etmektedir (102).

Lentivirüs, insan immün yetmezlik virüsünden modifiye edilmiş viral bir vektördür. Gen transferi için güçlü bir araçtır ve gelecekte otoimmün hastalıkların ilk terapötik hedefi olan bağışıklık hücrelerini ve hematopoietik kök hücrelerini verimli bir şekilde iletme yeteneği nedeniyle umut vaat etmektedir (103).

Kollajen kaynaklı artrit modelinde lentiviral dağıtım sistemi ile birlikte spesifik shRNA kullanarak terapötik hedeflerin ekspresyonunun sistemik ve lokal yıkımını başarıyla gerçekleştirilmiştir. Sonucunda artrit şiddetinde bir azalma görülmüştür, üstelik bu lentiviral partiküllerin tek intravenöz enjeksiyonu ile sağlanmıştır (104).

Klinik deneylerde bir lentiviral uygulama sisteminin kullanılmasının önünde hala bazı engeller olsa da, bu sistem myasthenia gravis tedavisine ilişkin çalışmalarda da hedeflenebilecek bir tedavi veya hastalık mekanizmasını anlamaya yardımcı bir prosedür ortaya koyabilir. Bu sebeple çalışmamızda DOMG MuSK modelinde *FCRLB* ve *KCNS3* genlerini shRNA teknolojisi kullanarak susturmayı ve klinik iyileşme sağlayıp sağlamayacağını test etmeyi hedefledik.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deneysel Otoimmün Myasthenia Gravis Hayvan Modeli

3.1.1. DOMG Modelinin Oluşturulması

Deneysel otoimmün myasthenia gravis hayvan modeli aktif immünizasyon ile yapıldı. İmmünizasyon için kullanılacak MuSK antijeni Oxford Üniversitesi'nden Prof. Dr. Angela Vincent'tan temin edildi. İzole ekstraselüler MuSK molekülünün (stok-0,88 mg/ml) saflığı, immünizasyon öncesi jel elektroforezi ile kontrol edildi ve fare başına 45 ug/μl konsantrasyonda PBS ve Complete Freund's Adjuvant (CFA-100 μg) (Mycobacterium Tuberculosis H37Ra Dessicated, BD, 231141) (Adjuvant Incomplete Freund, BD, 263910) ile 1:1 oranında homojenize edilerek hazırlandı. İmmünizasyon işlemi öncesi anestezi olarak 1:5 oranında PBS ile sulandırılmış propofol intraperitoneal olarak fare başına 50 mg/kg kullanıldı. Fare başına toplam 200 μl hacimde olacak şekilde, ilk immünizasyonda omuzlar ve arka pati içlerine; ikinci immünizasyonda ise omuzlara ve kalçalara subkutan olarak enjekte edildi. Modelin oluşması için 28 gün aralıkla iki enjeksiyon gerçekleştirildi. Kontrol grubu olarak ise sadece CFA ile enjeksiyonu yapılan fareler kullanıldı.

DOMG modeli oluşturulması için 8-10 haftalık, dişi Balb/C fareler tercih edildi. Deneyimizde 22 adet fare kullanıldı. Farelerde hastalık modelinin oluşturulması, bakımları ve gözlemleri İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Laboratuvar Hayvanları Anabilim Dalı'nda gerçekleştirildi. Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimince desteklendi (TYL-2021-37695) ve İstanbul Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun (HADYEK) 2020/29 no'lu kararıyla onaylandı.

3.1.2. Klinik Skorlama ve Ölçümlerin Yapılması

Myasthenia gravisteki gözlemlenen semptomlar egzersiz ve yorgunluk sonrası artış göstermektedir. Bu yüzden fareler 40 defa kafes üzerinde sürüklenerek egzersiz yaptırılmakta ve ardından gözlenmektedir. Gözlemlerde farenin tüy temizliği, sosyallığı ve hareketliliği, ağırlık değişimi ve kas gücü göz önüne alınır ve uygun olan skor verilir.

Klinik skor 0 olduğunda fareler hareketli bir şekilde çevreyi incelemeye devam eder. **Skor 1** olduğunda egzersiz sonrası sırtta kambur oluşumu gözlemlenir. Ancak

sonrasında hareketli hale geri döner ve sosyaldır. Genellikle tüylerinde bakımsızlık görülmez. **Skor 2'**ye ulaştığında egzersiz öncesi de kambur görünür haldedir. Egzersiz sonrası kamburu daha dramatik bir hal alır. Özbakımda ve hareketlilikte azalma görülür. **Skor 3'**te egzersiz öncesi ve sonrası dramatik bir kambur gözlemlenir. Hareket, sosyallik ve kas gücü düşer ve ağırlığında 2-3 günde 1-2 gram düşüş görülebilir. Suya ve pellet mamaya ulaşması zorlaştığından dehidrate olur ve zayıf görünür. Dehidrate oluşu derisinin çekildiğinde hızla eski halinin almamasından ve dışkısından anlaşılabilir. Acı içinde olup olmadığı gözlerini kısması ve büzülmüş vücut duruşuyla da karakterizedir. Acı çeken ve ağırlığının %20'sinden fazlasını kaybetmiş olan fare sakrifiye edilir. **Skor 4** farenin kafeste ölü halde bulunmasıdır. Bu durumda fare kafesten ivedilikle uzaklaştırılmalı ve kafes değişimi, yapılmalıdır. İkinci immünizasyondan yaklaşık 10 gün sonra semptomlar hızla ilerlemeye başladığından fareler hergün kontrol edildi. Klinik skorlama ve ölçümler ise ilk 28 gün haftada bir, sonrasında haftada 2 kere yapıldı.

Ağırlık ölçümü hastalığın ilerleyişini gözlemede önemli bir veri sağlar. Farelerin metabolizma hızlarından dolayı vücut ağırlıkları çok değişkendir. Sağlıklı bir veri elde etmek için deneylerde hep aynı tartının kullanılması önemlidir. Projemizde hep aynı saatte ve aynı tartıyla ölçüm yapılmıştır.

Kas gücünün ölçümü için Imada DST-50N cihazı (Muromachi- MK380Si) kullanıldı. Fareler klinik skorlama için yapıldığı gibi egzersize tabi tutuldu. Sonrasında fare zaman kaybedilmeden dinamometrenin ızgarasına yerleştirildi ve kuyruğundan çok kuvvetli olmayacak şekilde çekildi. Farenin tüm patilerinin ızgaraya tutunmuş, sabit bir pozisyonda olmasına dikkat edildi. Her ölçümde eşit güç uygulamak ve yapan araştırmacının değişmemesi önemlidir. Çalışmamızda her fare için 7 defa ölçüm yapıldı. Maksimum ve minimum değerler elenip kalan 5 ölçümde elde edilen değerlerin ortalaması alındı. Böylece güvenilir bir sonuç elde edilmesi hedeflendi.

3.1.3. shRNA ile DOMG Farelerinin Tedavisi (*in vivo* Gen Susturulması)

3.1.3.1. *In vivo* shRNA Optimum Uygulama Dozunun Belirlenmesi: Lenf Nodu Hücrelerinde *FCRLB* ve *KCNS3* Genlerinin shRNA İçeren Lentiviral Parçacıklarla Susturulması

Bu denemeler, daha önceki projelerde kullanılan immünize olmamış donmuş fare lenf nodu hücrelerinde yapıldı. *FCRLB* ve *KCNS3* genlerinin susturulması için

SantaCruz Biotechnology firmasından lentiviral parçacıklarla taşınan shRNA (sc-145153-V, sc-60914-V, sc-108060) satın alındı. 500.000 hücre için 100.000 IFU, 50.000 IFU ve 25.000 IFU shRNA konsantrasyonları kullanıldı. Transdüksiyon medyumunu protokole uygun şekilde hazırlandı. 24 saat ekim medyumunda içinde inkübe edilen hücrelerin medyumunu transdüksiyon medyumuna ile değiştirildi ve shRNA'lar kuyulara eklendi. 24 saatlik inkübasyon sonrası medyum, tam medyum (complete medium) ile değiştirildi. Tam medyum RPMI içerisinde %1 FBS ve %1 Penisilin-streptomisin içerecek şekilde hazırlandı. 48 saatlik bir inkübasyondan daha sonra tekrar medyum değişimi yapıldı ve transfekte olmayan hücrelerin ayrıştırılması için kuyu başına 10 µg Puromisin dihidroklorid (sc-108071) eklendi. 7. gün hücreler kuyulardan toplandı. Tripan mavisi ile canlılıkları tespit edildi. En yüksek canlı hücre sayısının olduğu 100.000 IFU uygulamasının optimum doz olduğuna karar verildi.

3.1.3.2. Farelere shRNA Tedavi Uygulaması

Deneysel otoimmün myasthenia gravis hayvan modelinde kullanılan MuSK molekülünün *in vivo* yıkıma uğraması ve MusK-reaktif lenfositlerin de yaşamlarının 28 gün içinde büyük oranda sonlanması sebebiyle immünizasyonlar 28 gün aralıkla yapılmalıdır. İkinci immünizasyondan 3 saat sonra *FCRLB* ve *KCNS3* genleri için shRNA uygulaması intraperitoneal şekilde yapıldı. *In vivo*'da kullanılacak shRNA-lentivirüs partiküllerinin miktarı, yapılan *in vitro* deneyler ve genlerin hedef dokulardaki ekspresyon seviyeleri göz önüne alınarak seçildi. *In vitro* denemelerde 100.000 IFU kullanılan doz, farelere 100 µl hacimde serum fizyolojik içinde çözülerek 1 defa enjekte edildi. Bu tekniğin shRNA lentiviral partikülleriyle daha önce uygulanmamış olması nedeniyle fareler gözetim altında tutuldu ancak bir yan etki gözlenmedi.

3.1.4. Farelerin Sakrifiye Edilmesi ve Doku Örneklerin Saklanması

İkinci immünizasyondan 28 gün sonra fareler sakrifiye edildi. Sakrifiye edilen farelerden kardiyak kan, kas, dalak ve lenf nodu toplandı.

Kardiyak kan alınabilmesi için sevofloran ile anestezi uygulandı. Abdomen açıldı ve kalpten kan alındı. Alınan kan örnekleri RNA izolasyonu için EDTA'lı tüpe ve serumu ayrılmak üzere kuru tüpe aktarıldı.

Dalak ve lenf nodları %10 FBS içeren RPMI (Gibco, 11875093) içerisine alındı ve hücreler izole edilinceye kadar 4°C'de bekletildi. Lenf nodu hücreleri *in vitro*

çalışmalarda kullanılmak üzere izole edildi. Dalak ise lamaların pürüzlü yüzeyi kullanılarak mekanik olarak parçalandı. Parçalama esnasında %10 FBS içeren RPMI kullanıldı. PBS ile yıkama yapıldı ve tripan ile sayılarak %20 DMSO içeren FBS içerisinde donduruldu.

Kas örnekleri nöromüsküler bileşkenin immünfloresan işaretleme ve ileride uygulanacak olan western blot tekniğı için saklandı. Kaslar ve dil örneğı; cryotüplere alındı ve -20°C ye soğutulmuş izopentan içerisinde sıvı azota batırıldı. Donan kas örnekleri -80°C derin dondurucuda saklandı. İmmünfloresan boyama için kullanılacak kas örnekleri OCT (Optimal cutting temperature compound) içerisine gömüldü ve izopentan içerisinde sıvı azot kullanılarak donduruldu. Cryostat ile yapılacak kesim işlemine kadar -80°C derin dondurucuda saklandı.

3.1.5. Lenf Nodu Hücrelerinin İzolasyonu

Sakrifikasyon öncesi her fare için yaklaşık 5 ml %10 FBS-RPMI içeren tüpler hazırlandı. Farelerden lenf nodları toplanarak petri üzerinde, 40µm cell strainer içinde dokular ezilerek hücreler mekanik olarak izole edildi. Yaklaşık 10 ml hacimde toplanan hücreler 1800 rpm 4°C de santrifüj edildi. Üst sıvı atıldı ve yıkama için pellet 1 ml PBS ile çözüldü. 1800 rpm 4°C de santrifüj edildi. Pellet 1 ml FBS ile çözüldü ve canlılık boyası olan tripan mavisi ile hücreler sayıldı. Hücre sayısına göre cryotüp başına maksimum 15 milyon hücre/ml olacak şekilde %20 DMSO-FBS (Dimethyl sulfoxide - Fetal Bovine Serum) içinde donduruldu. İmmünfenotipleme ve RNA izolasyonu yapılmıncaya kadar sıvı azotta saklandı.

3.2. Serumda MuSK'a Spesifik Antikor Düzeyinin Belirlenmesi

Farelerin serumlarındaki MuSK'a spesifik IgG'sinin miktarı homemade ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) tekniğı kullanıldı. Sakrifiye edilen farelerin kanları alındı ve serumları ayrıldı. Etkili bir kaplama olması için Maxisorp plak tercih edildi. Kuyu başına, 0,5 µg MuSK antijeni 100 µl hacimde karbonat bikarbonat tamponu içinde hazırlandı ve plak kuyularına dağıtıldı ve 4 °C de geceboyu bekletildi. Ertesi gün %0,5 Tween 20 içeren PBS (yıkama solüsyonu) ile yıkama yapıldı. Spesifik olmayan bağlanmaların engellenmesi amacıyla plak, %5 FBS içeren PBS (Phosphate-buffered saline) (bloklama solüsyonu) ile 90 dakika 4 °C de inkübe edildi. Kullanılacak serumların MuSK-IgG miktarının yüksek olduğu optimizasyon çalışmalarında görüldüğü için serumlar 1/50.000 oranında dilüe edildi. Serum dilüsyonu için bloklama

solüsyonu kullanıldı. Bloklama sonrası yıkama yapılmadan serum örnekleri eklendi ve 37 °C de 90 dakika inkübe edildi. Yıkama solüsyonu ile 3 defa yıkandı. HRP işaretli fare IgG'sine karşı tasarlanmış sekonder antikor (ab97023), bloklama solüsyonu içerisinde 1/5000 oranında dilüe edildi ve 100 µl hacminde kuyulara konularak 37 °C de 90 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası yıkama solüsyonu ile 3 defa yıkandı. Kuyu başına 100 µl TMB eklenerek renk değişimi gözlemlendi. 2 molar H₂SO₂ kullanılarak renk değişimi uygun bir anda durduruldu. 450 OD'de spektrofotometrik olarak ölçüldü. Bütün örnekler duplike ve aynı plakta tek seferde çalışıldı. Standart örnek dilüsyonu olmaması nedeniyle optik densite değerleri kullanılarak karşılaştırma yapıldı. Örnek konulmayan negatif kontrol kuyularında (blank) renk değişimi görülmedi.

3.3. RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi

Çalışma gruplarında shRNA tedavisinin validasyonu için *FCRLB* ve *KCNS3* genlerinin ekspresyon düzeylerini belirlemek üzere donmuş dalak hücrelerinde RNA izolasyonu yapıldı (QIAGEN, RNeasy Mini Kit, Cat no:74106). İzole edilip -80°C de saklanan dalak hücreleri 37°C ye ısıtılmış su banyosunda çözdürüldü ve %10 FBS içeren RPMI'a alınarak yıkama yapıldı, DMSO hücrelerden uzaklaştırılmış oldu. Hücrelerden, kit protokolüne uygun şekilde RNA izolasyonu yapıldı. Elde edilen RNA'ların kalitesinin ölçümü Thermofisher Nanodrop kullanılarak ölçüldü ve cDNA sentezi yapılınca kadar -80°C'de saklandı.

cDNA sentezi Applied Biosystem'in High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit'I kullanılarak yapıldı (4368814) (Tablo 3). Örnek sayısına göre, kit protokolünde belirtilen; 10X RT Buffer, 25X dNTP mix, 10X RT Random Primers, MultiScribe Reverse Transcriptase ve nükleaz içermeyen su kullanılarak karışım (master mix) hazırlandı. Konsantrasyonları gözetilerek RNA eklendi ve son hacim nükleaz içermeyen su ile 20 µl ye tamamlandı. 25°Cde 10 dakika, 37°C de 2 saat, 65°C'de 5 dakika tutulacak şekilde tasarlanan sentez planıyla BioRad Thermal cycler cihazıyla cDNA'lar sentezlendi.

Tablo 3 : cDNA sentez reaksiyonu için bileşenler ve miktarları

	Miktar (µl)
10x RT Buffer	2

25x dNTP Mix (100 mM)	0.8
10x RT Random Primer	2
M _{ulti} Scribe Reverse Transkriptaz	1
Nucleaz olmayan H ₂ O	4,2
Total Reaksiyon Hacmi	10 µl

3.4. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (GZ PZR)

Referans gen için farelerde yüksek ekspresyonu kanıtlanan *RPLP0* geni kullanıldı. Referans gen primeri Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Sağlık Meslek Yüksek Okulu, Dr. Öğr. Üyesi Beyza Servet Göncü'den temin edilmiştir. *FCRLB* ve *KCNS3* için kullanılan primer ise Ensemble kullanılarak tasarlandı. Transkripsiyon tablosundan kodlanan sekanslar incelendi. Primer3 kullanılarak gen dizisi içerisinde, guanin/sitozin oranı %55'e yakın, erime sıcaklıkları (T_m) genler arasında uyumlu olacak şekilde forward ve reverse primerler bulundu. Bulunan primerler NCBI'a bağlı olan PrimerBlast ile aratıldı. Dizinin spesifik olarak bağlanma oranının düşük olup olmadığı kontrol edildi. Varyant görülmeyen primerler seçilerek üretilmesi için sipariş verildi. Primerlerin doğru annealing ısısı için gradiyent yapıldı ve jel elektroforezi ile oluşan bantlar kontrol edildi. Jel elektroforezinde görülen doğru sıcaklık, GZ PZR'de kullanıldı.

GZ-PZR işlemi CFX96 Touch Real-Time PCR cihazında (Bio-Rad Laboratories), LightCycler® 480 SYBR Green I Master kiti (Roche) kullanılarak üretici firmanın talimatları doğrultusunda gerçekleştirildi (Tablo 4). Tüm genler için örnekler çift çalışıldı. Kullanılan primerlerin dizileri Tablo 5'de yer almaktadır. Her kuyucuğa, toplam hacmi 10 µl olacak şekilde, 2x Sybr Green I floresan boyası/enziminden 5 µl, 1000 ng (2 µl) cDNA ve her gen için dizayn edilmiş primerlerin forward ve reverse örneklerinden 800-1000 nM (0,5 µl) oluşan karışım hazırlandı. Örnekler PZR cihazına yerleştirilerek Tablo 4'te belirtilen aşamalara tabi tutuldu. Oluşan amplifikasyon eğrileri ve erime tepe noktaları (melting peak) değerlendirildi.

Tablo 4: Gerçek zamanlı PZR reaksiyon koşulları

Aşama	Sıcaklık (°C)	Süre (dk:sn)	Siklus
Denatürasyon	95	10:00	1
Amplifikasyon	95	00:15	35
	60	00:15	
	72	00:20	
Erime Eğrisi analizi	95	00:10	1
	65	00:05	1
	97	-	1
Soğutma	4	∞	1

Tablo 5: Gerçek zamanlı-PZR'de kullanılan primer setleri

Genler	Forward primer (5'-'3)	Reverse primer (5'-'3)
FCRL2	AGGAGCTCGAATCGTACTGG	TCGGGATGGAAGTGACTGAC
KCNS3	TGTAGGGCTTCGGTCTCTTG	GATGCTGGTGAGACTGGACT
RPLP0	TGAGATTCGGGATATGCTGTTGG	CGGGTCCTAGACCAGTGTCT

3.5. Nöromusküler Bileşkenin İmmüno Floresan İşaretleme ile Değerlendirilmesi

Dondurulan kas dokularından, -24°C de, 7 µm kalınlıkta, cryostatda seri kesit alındı. Alınan kesitler -20°C de soğutulmuş aseton içerisinde fikse edildi. PBS ve %0,4 TritonX içeren PBS (PBS-T) ile yıkandı. Fiksasyondan etkilenebilen moleküllerin formasyonunun düzelmesi için permeabilizasyon basamağı uygulandı, böylece daha doğru bağlanmalar hedeflendi. Permeabilizasyon için 10 dakika süreyle %1 FBS içeren PBS ve 10 dakika PBS-T ile muamele edildi. Spesifik olmayan bağlanmaların önüne geçilmek için %10 FBS içeren PBS-T ile 30 dk bloklama yapıldı. Boyama için Dylight 488 işaretli C3 (NB200-540G Novus) ve FITC işaretli IgG (ab96871 Abcam) ve asetilkolin reseptörlerini işaretleyen a-bungarotoxin (BTX T1175 Invitrogen) antikorları kullanıldı. Seçilen antikorlar %1 FBS içeren PBS-T ile dilüe edildi ve karanlıkta, oda sıcaklığında 2,5 saat inkübe edildi. %1 FBS içeren PBS-T ile yıkandı ve DAPI (D1306 Invitrogen) ile kapatılıp floresan mikroskopunda incelenmesine kadar karanlık ve nemli ortamda 4 °C de saklandı.

Her kesitteki BTX pozitif nöromusküler bileşke işaretlenmeleri Olympus BX61 floresan mikroskopunda sayıldı ve 20x ile çekilen görüntüler vsi. formatında saklandı. Analizleri için OlyVia programında BTX ve C3 veya IgG pozitif nöromusküler bileşkeler sayıldı. Seri kesitlerdeki toplam BTX işaretli bileşkelerinin, çift pozitiflikle oranı yüzdelik veri olarak analizde kullanıldı.

3.6. Akım Sitometrisi

Akım sitometrisi için dondurulan lenf nodu hücreleri kullanıldı. Dondurulmuş hücreler su banyosunda çözündürüldü. %10 FBS-RPMI içerisine alınarak 1500 rpm 4°C de 8 dakika santrifüj yapıldı Hücreler boyama için 3 ayrı fenotipleme tüpüne ayrıldı. Toplam hacim 100 ul'den az olacak şekilde floresan işaretli anti-fare antikorları eklendi ve 30 dakika, oda sıcaklığında, karanlıkta inkübe edildi. İnkübasyon sonrası PBS ile 1 ml içerisinde 2200 rpm'de 10 dakika santrifüj edilen hücrelerin üstsıvısı atıldı ve hücreler PBS içerisinde çözülerek akım sitometrisi değerlendirmesi için BD FACSAria II (Flow Cytometry Cell Sorter Becton Dickinson) ve Novocyte (ACEA Biosciences) cihazları kullanıldı. Analizler FlowJo ve NovoExpress yazılımları kullanılarak yapıldı.

Tablo 6: Akım sitometresinde kullanılan floresan işaretli monoklonal antikorlar

Yüzey Belirteci	Floresan İşaret	Marka	Katalog No
CD27	FITC	Biolegend	124207
CD25	PE	Biolegend	101904
CD3	PerCP/Cy5.5	Biolegend	100217
CD8a	APC	Biolegend	100712
CD4	APC/Cy7	Biolegend	100414
CD27	FITC	Biolegend	124207
CD138	PE	Biolegend	142504
CD1d	PerCP/Cy5.5	Biolegend	123514
CD24	PE/Cy7	Biolegend	101822
CD19	APC	Biolegend	152410

CD38	APC/Cy7	Biolegend	102728
CD5	AlexaFluor700	Biolegend	100636
PDL1	PE-Cy5	Biolegend	124343
CXCR5	FITC	Biolegend	145520
ICOSL	PE	Biolegend	107405
CD21	APC/Cy7	Biolegend	123417

3.7. İstatistiksel Analiz

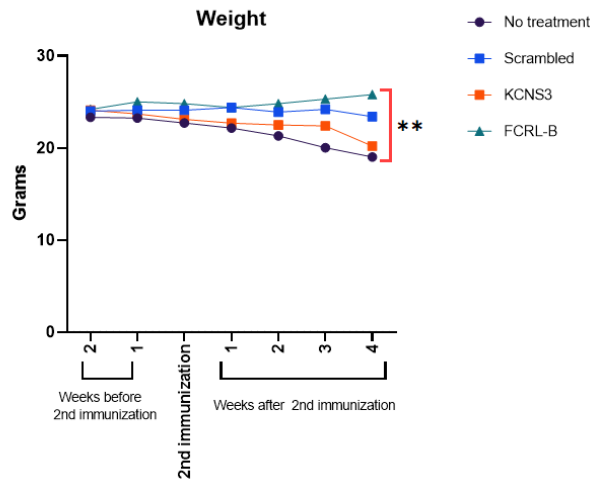
Hayvan modeli sonucunda elde edilen klinik ve moleküler sonuçların gruplar arası karşılaştırılmasında parametrik veriler için ANOVA testi kullanıldı. Altgruplar arasındaki ikili karşılaştırmalar ise Student t-testi ile yapıldı. Periferik kan hücrelerinin alttiplerinin belirlenmesinde ve analizinde FlowJo ve Cell Quest (BD) analiz programları ile kullanıldı. Akım sitometrisi sonuçlarında da ikiden fazla grup bulunan durumlarda ANOVA kullanıldı. İkili karşılaştırmalar için de Kruskal-Wallis ile karşılaştırma yapıldı. Elde edilen verilerde standart sapmayla beraber ortalama değer ve aralık ile verildi. İstatistiksel anlamlılık, p değerinin 0,05'ten az olması durumunda anlamlı kabul edildi. İstatistiksel analiz ve grafikler için GraphPad Prism 9.4.0 programı kullanıldı.

4. BULGULAR

4.1. Ağırlık, Kas Gücü ve Klinik Skorların Değerlendirilmesi

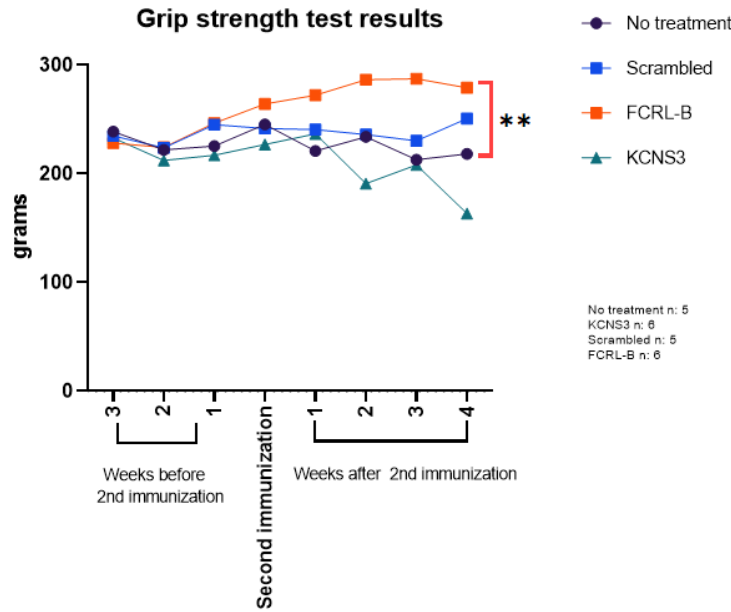
İndüklenen MuSK-MG hayvan modelinde, ağırlık, kas gücü ve klinik skorlar ikinci immünizasyona kadar haftada bir, sonrasında haftada iki kere olmak üzere gerçekleştirildi. Bu ölçümlerde standardizasyon önemli olduğu için ölçümler hep aynı kişi tarafından, aynı saatte yapıldı. shRNA uygulanacak kafesler rastgele seçildi ve farelerin hangi shRNA'nın uygulandığı, kafes üzerindeki bilgilerin arasına eklenmedi. Bununla tarafsız ölçüm ve gözlemlerin yapılması hedeflendi. Elde edilen sonuçlarda genel olarak shRNA uygulanmayan MuSK-MG grubu (no treatment) ile MuSK immünizasyonunun yanında protein kodlamayan rasgele shRNA parçaları içeren enjeksiyonu alan scrambled grupları arasında fark bulunmadı.

Farelerin ağırlık ölçümlerinin grup içi ortalamaları alındı ve zaman içinde değişimleri karşılaştırıldı. Tüm verilerde sakrifikasyon öncesi sonuçlarda gruplar arası farkın arttığı gözlemlendi. Ağırlık verilerinde son ölçümde *FCRLB* geninin susturulduğu grupta ağırlık ortalaması $25,8 \pm 1,7$ gr idi. *KCNS3* geninin susturulduğu grupta ortalama $20,2 \pm 2,3$, scrambled grubunda $23,4 \pm 1,1$ ve shRNA uygulanmayan MuSK-MG no treatment grubunda $19,1 \pm 1,7$ gr olarak ölçüldü. Ağırlık ölçümlerinin zaman içindeki değişimi Şekil 5'te gösterilmiştir. Son ölçümdeki *FCRLB* ve no treatment arasındaki fark anlamlı bulunmuştur ($p=0,004$). *KCNS3* ve *FCRLB* grupları arasında da anlamlı fark oluşmuştur ($p=0,0025$).



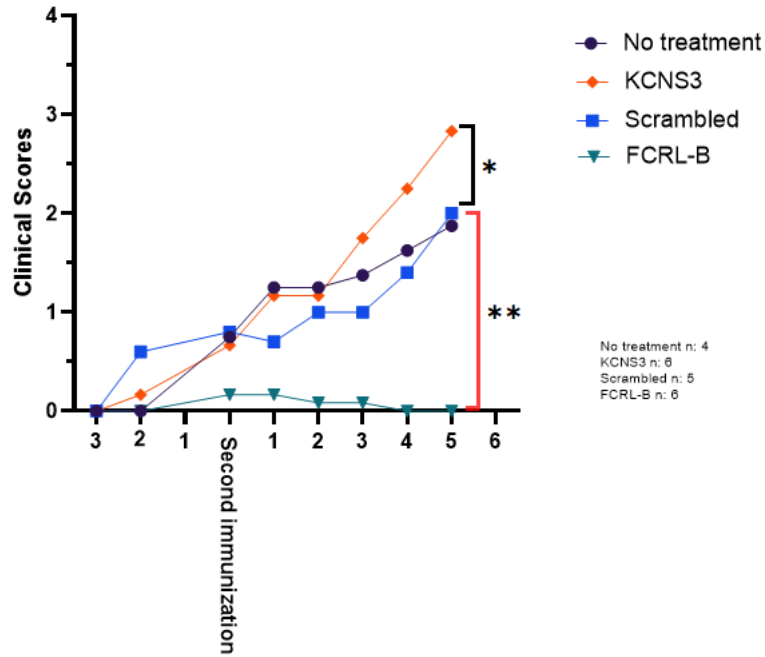
Şekil 5: DOMG modeli oluşturulan fare gruplarında haftalık ağırlık değişim grafiği

Kas gücü verilerinde, son ölçümde *FCRLB* geninin susturulduğu grupta ortalama kas gücü $278,9 \pm 18$ gr, *KCNS3* geninin susturulduğu grupta ortalama $163,4 \pm 41,8$, sadece lentivirüs verilen scrambled grubunda $250,6 \pm 36,2$ ve shRNA uygulanmayan MuSK-MG no treatment grubunda $218,2 \pm 38,6$ olarak ölçüldü. Kas gücü (grip strenght) ölçümlerinin zaman içindeki değişimi Şekil 6'da gösterilmiştir. Son ölçümdeki *FCRLB* ve no treatment grupları arasındaki fark anlamlı bulunmuştur ($p=0,0036$).



Şekil 6: DOMG hastalık modeli geliştirilen fare gruplarında kas gücünün haftalık ölçüm grafiği

Hastalık modeli gelişiminde en önemli gösterge olan klinik skor grafiği ise aşağıdaki Şekil 7’de gösterilmektedir. Son ölçümdeki *FCRLB* ve *KCNS3* ile scrambled grupları arasındaki fark anlamlı bulunmuştur ($p=0,005$, $p=0,03$).



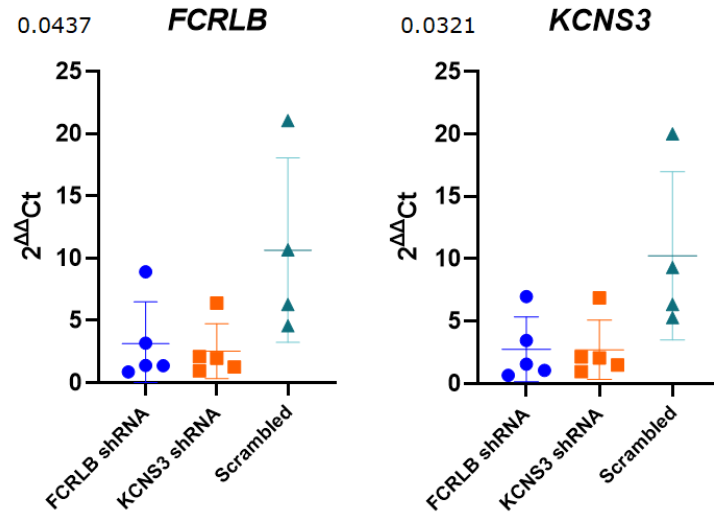
Şekil 7: Klinik skorların zaman içindeki değişim grafiği

4.2. DOMG Hayvan Modelinde shRNA ile Gen Susturma

DOMG modelinde genellikle farelerin hastalık belirtisi göstermeye başlaması, ikinci immünizasyonun 10-14 gün sonrasına denk gelmektedir. Bu yüzden lentiviral taşıyıcılı shRNA’ların ikinci immünizasyondan sonra uygulanmasına karar verildi. Myasthenia gravis modelinde siRNA ile gen susturma⁽¹⁰⁸⁾ daha önce uygulanmış olmasına rağmen, shRNA ile *in vivo* gen susturulması daha önce denenmemiştir. Bu yüzden uygun dozun belirlenmesi için hücre kültüründe, kontrol (CFA ile immünize) farelerinden elde edilen lenf nodu hücrelerinde deneme yapıldı. Kullanılan en yüksek doz olan 100.000 IFU’nun hücrelerde efektif bir transfeksiyona ulaşmayı başardığı ve hücre morfolojisine zarar vermediği gözlemlenerek doğrulandı.

In vivo uygulamada ise, shRNA’nın intraperitoneal olarak verilmesine karar verildi. Bu, etkiyi azaltabilecek bir seçim olsa da yan etkiyle karşılaşma ihtimalinin minimize edilmesi hedeflendi. Dalaklardan izole edilen hücrelerde hedef genlerin

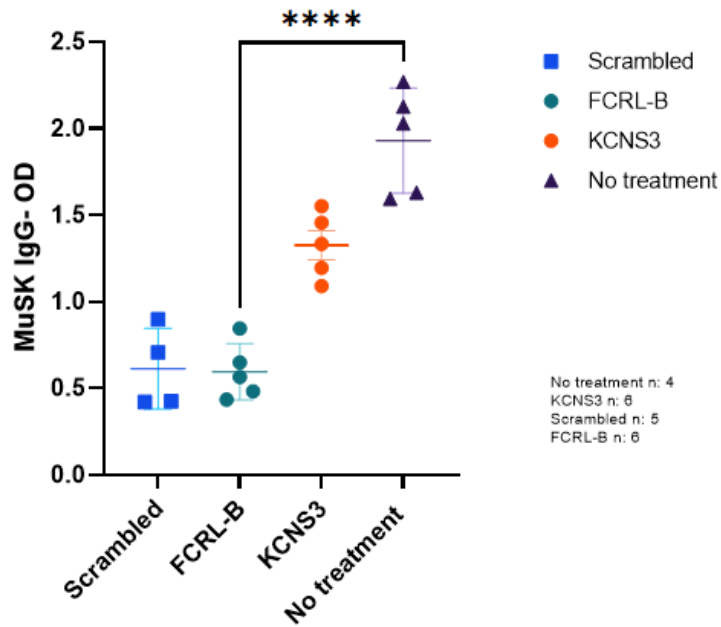
ekspresyon miktarları gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ile ölçüldü ve karşılaştırıldı. Referans gen olarak *RPLP0* geni kullanıldı ve sonuçlar shRNA uygulaması yapılmamış MuSK-MG (no-treatment) fareler ile normalize edildi. Gruplar arasında one-way ANOVA testi uygulandığında *FCRLB* ($p=0,0437$) ve *KCNS3* ($p=0,0321$) genlerinin ekspresyonlarının, spesifik hedefe yönelik shRNA kullanılan hücrelerde, scrambled shRNA uygulanan hücrelere kıyasla anlamlı derecede baskılandığı bulundu. Şekil 8 ve şekil 9’da seçilen genlerin, aralarında fark olmamasına rağmen ekspresyonlarının scrambleda göre baskılandığı ve böylece etkili bir tedavi uygulamasının etkin olarak yapılabildiğini gösterilmektedir. Lentiviral taşıyıcılı shRNA uygulanan iki gende de etkileşimli olarak baskılanma görülmesi, genlerin bağlantıları olabileceğini düşündürmektedir.



Şekil 8: FCRLB ve KCNS3 geninin dalak hücrelerinde ekspresyonu

4.3. Serumdaki MuSK'a Karşı IgG Miktarının Değişimi

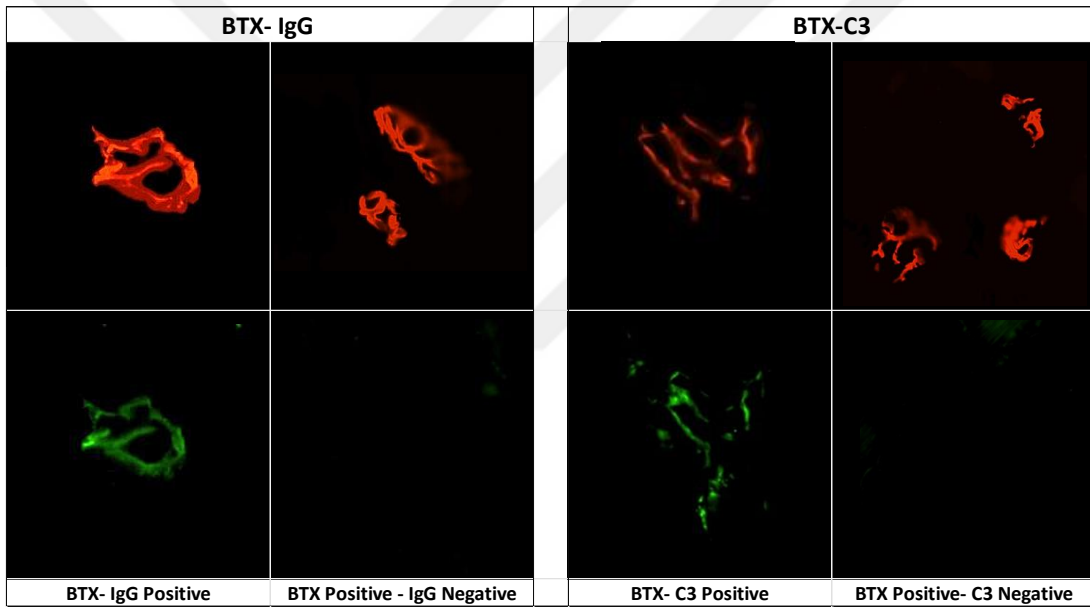
MG hayvan modelindeki serumda bulunan MuSK'a karşı IgG miktarı klinik durumla doğrudan korelasyon göstermese de paralel olduğu görülmektedir. Ne kadar fazla IgG bulunursa farenin klinik skoru o kadar yüksek değildir. Çünkü hastalık şiddetinde tek etkili olan etken oluşan otoantikorlar değildir. Ayrıca farklı deney hayvanlarında patojenik (nöromusküler iletiyi bozma etkisi olan) olan antikor gruplarının toplam antikor popülasyonu içindeki oranları farklıdır. Bununla birlikte gruplar arasında, immün sistemin immünizasyona verdiği cevabın şiddetinin incelenmesinde önemli bir belirteçtir. Sakrifikasyonda alınan kan örneklerinden serum ayrılmış ve homemade ELISA yöntemiyle immünizasyonda verilen MuSK antijenine karşı oluşan IgG'lerin miktarı ölçülmüştür. Her farenin ölçülen MuSK-IgG miktarı Şekil 10'da gösterilmektedir. *FCRLB* ve no treatment grupları arasındaki farklılık anlamlı iken ($p<0,0001$), *FCRLB* ve scrambled grupları arasındaki fark anlamlı bulunmamıştır. Bulunmuştur. Hem no treatment ($p= 0,0053$) hem de scrambled ($p=0,0014$) ile *KCNS3* grubu arasında anlamlı fark görülmüştür.



Şekil 9: Farelerin serum örneklerindeki MuSK'a karşı gelişen IgG düzeyi

4.4. Kastaki C3 ve IgG Birikimlerinin Kantitatif Belirlenmesi

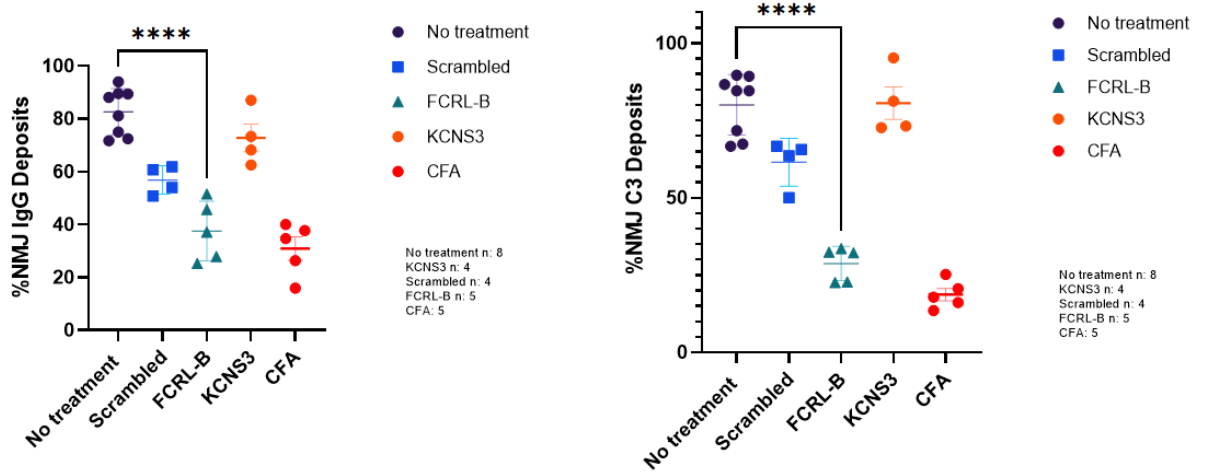
Deney gruplarındaki kas örnekleri uygun şekilde dondurulup cryostat ile kesildi ve floresan işaretli antikorlarla boyandı. A-bungarotoxin (BTX) ile nöromusküler bileşke işaretlendi (kırmızı), nöromusküler bileşkenin işaretlendiği alanlarda kompleman 3 (C3) ve IgG birikiminin varlığı incelendi (yeşil). Her dokudan 3 seri kesit alındı ve boyandı. Floresan mikroskopunda tüm alanlardaki nöromusküler bileşkeler sayıldı ve görüntüleri alındı. Şekil 11’de demonstratif pozitif ve negatif görüntüler derlenmiştir.



Şekil 10: Nöromusküler bileşkede oluşan C3 ve IgG birikimlerinin örnek görselleri

BTX ile işaretlenmiş alanların, IgG ve C3 antikorları ile çift pozitiflik gösterme yüzdeleri kör olarak sayıldı ve hesaplandı. Şekil 12 ve 13’te bu yüzdelerin gruplar arası karşılaştırılması ifade edilmiştir. Scrambled grubuna göre *FCRLB* ile tedavi edilen farelerde IgG ve C3 birikimlerinin anlamlı olarak azaldığı bulunmuştur ($p < 0,0148$, $p = 0,0007$). *KCNS3* shRNA ile tedavi edilen grupta ise IgG ve C3 birikimlerinin scrambled grubuna göre anlamlı ($p = 0,0477$, $p = 0,0291$) yüksek saptanmıştır. Scrambled grubunda no treatment grubuna göre yüksek anlamlılıkta fark görülmesi beklenen bir sonuç değildir, ve DOMG’li farelere rasgele shRNA sekansları (scrambled)

uygulanmasının henüz bilinmeyen bir mekanizma ile kas gücü şiddetini azaltıcı etkisi olduğunu göstermektedir. Bunun yanında shRNA taşıyan lentivirüslerin verildiği *FCRLB* ve *KCNS3* gruplarıyla da scrambled grubu arasında anlamlı fark oluşması gen susturmanın DOMG şiddetini değiştiren bir etki oluşturmayı başardığının göstergesidir.



Şekil 11: NMB'de IgG ve C3 birikimi

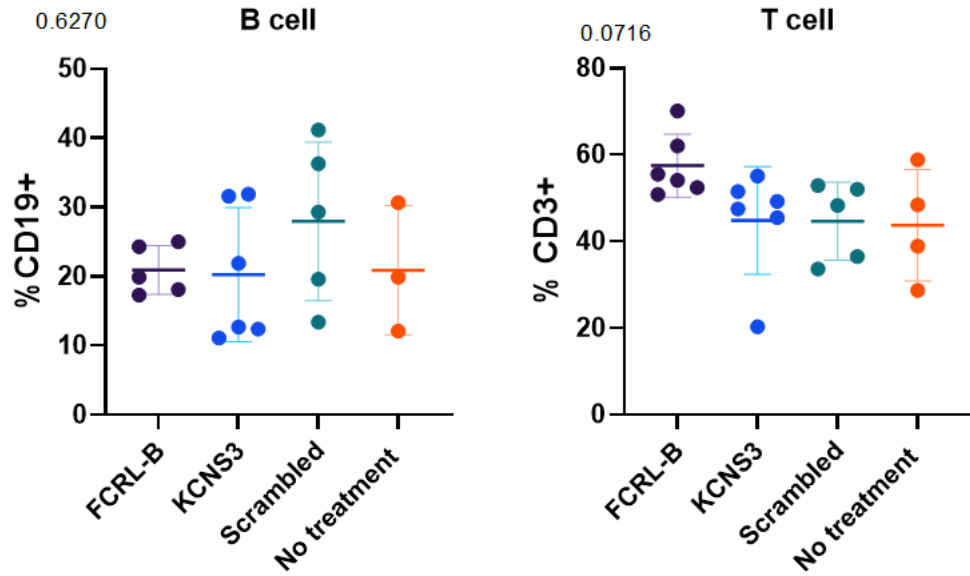
4.5. Lenf Nodu Hücrelerinin İmmünotiplemesi

Lentiviral taşıyıcılı shRNA ile hedef genlerimizin susturulmasının MuSK-MG hastalığı üzerindeki klinik ve moleküler etkileri incelendi. MuSK ile immünize DOMG farelerinde uygulama sonrasındaki immünolojik değişimleri incelemek için farelerin lenf nodlarından izole edilen hücrelerde floresan bağlı monoklonal antikorlar ile işaretleme yapıldı ve akım sitometrisi yöntemi kullanıldı. Bunun için 3 ayrı panel tasarlandı. İlk panelin hedefi T hücreleri ve alttiplerini, ikinci panel B hücre ve alttiplerini hedefleyen bir analiz oluşturmaktı. Üçüncü paneldeki hedefimiz ise otoimmün hastalıklarla ilişkilendirilen lenfoid organlardaki etkin B hücre profillerini belirlemektir.

4.5.1. B ve T Hücrelerinin Dağılımı

MG'de T lenfosit yanıtına bağımlı ve B hücreleri üzerinden ilerleyen bir immünpatoloji olduğu bilinmektedir. Lentiviral partikül içeren shRNA'ların

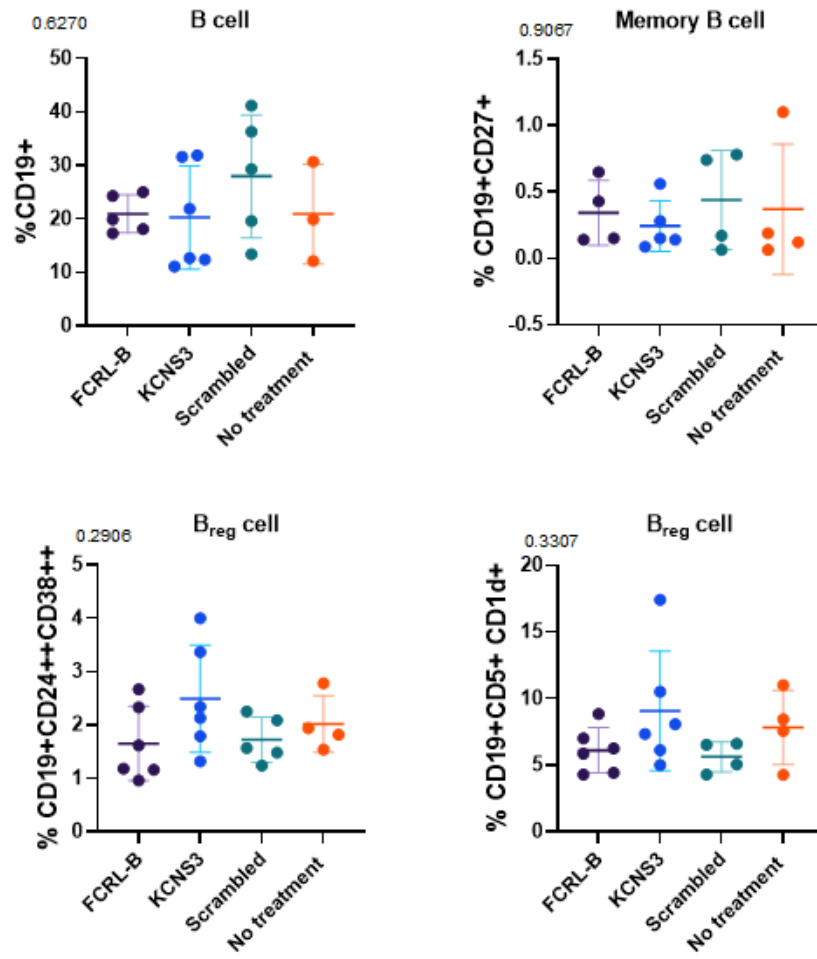
kullanılması, bir immün yanıt oluşturma ihtimalini doğurmuştur. Ancak Şekil 14'te görülebileceği gibi lentiviral partikül uygulanmayan no treatment grubuyla diğer gruplar arasında anlamlı bir fark oluşmamıştır (ANOVA $p=0,627$). $CD3^+$ T hücrelerinin oranları ise Şekil 15'te görülmektedir. Klinik skorlarda iyileşmenin görüldüğü *FCRLB* geninin susturulduğu grupta diğer gruplara göre daha fazla $CD3^+$ T hücre yüzdesi görülmektedir. Gruplar arası farklar one-way ANOVA ile analiz edilmiştir ve farkın anlamlılığa yakın olduğu bulunmuştur ($p=0,0716$).



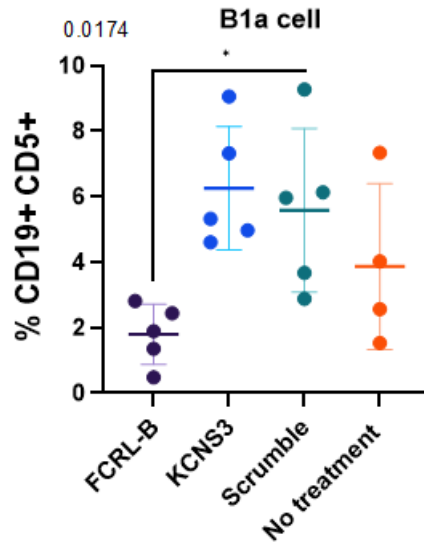
Şekil 12: CD19+ B ve CD3+ T hücrelerinin dağılımı

4.5.2. B Hücresi İmmünofenotiplerinin Gruplar Arasındaki Dağılımı

B hücre oranları arasında fark yoktur ve $CD19^+CD27^+$ bellek B hücrelerinde ($p=0,9067$) ve *KCNS3* grubundaki farelerin B regülatör hücrelerinde ($CD19^+CD24^{++}CD38^{++}$ ve $CD19^+CD5^+CD1d^+$) fark gözlenmemiştir.



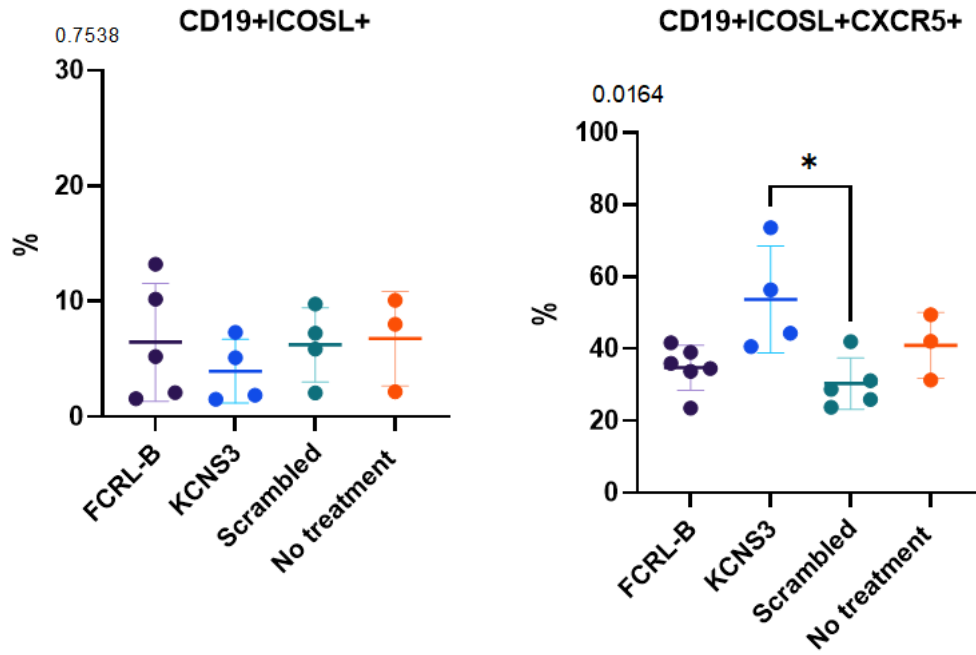
Şekil 13 : B hücre alttiplerinin dağılımı



Şekil 14: B1a hücrelerinin dağılımı

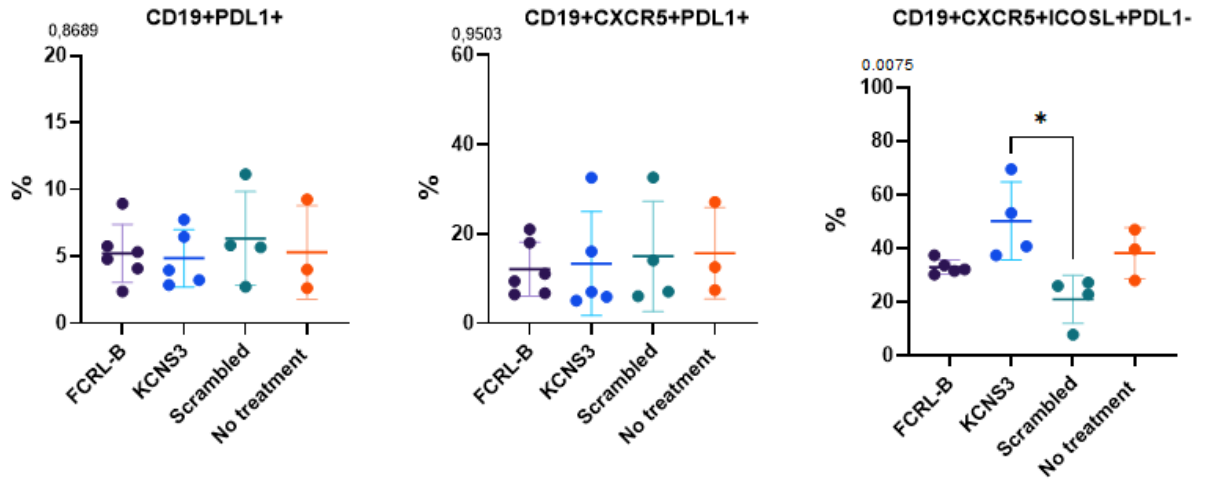
B1a hücre altgrubu, antikor üretimine katkıda bulunan bir B lenfosit alt türüdür. Enfeksiyon ve aşılama durumlarında aktifleşir. Yardımcı T hücreler aktif olmadan da B1a hücreleri aktifleşip antikor üretimini sağlayabilir ve IgM altipi antikorları IgG'den daha çok üretirler. Otoimmün hastalıklarda dalakta birikimleri görülür. Deney gruplarımız arasında myasthenia gravis semptomlarının en az görüldüğü *FCRLB* geni susturulmuş olan grubumuzda B1a hücre popülasyonunun, scrambled grubuna göre anlamlı olarak azaldığı bulunmuştur ($p=0,0241$).

CD19⁺ICOSL⁺ hücreler CXCR5 pozitifliğine göre ikiye ayrılmaktadır. CXCR5⁺ hücreler germinal merkezde T hücreler ile etkileşime giren yüksek afiniteli ve uzun ömürlü antikorlar üreten, etkin bir B hücre alttipidir. Bu hücre altgurubunda, gruplar arası farklılıklar ANOVA ile karşılaştırıldığında anlamlı bulunmuştur ($p= 0,0164$). *KCNS3* susturulan grupta bu hücrelerin, scramble grubuna göre anlamlı olarak yüksek olduğu görülmektedir ($p=0,043$). Ancak *FCRLB* ile gözlenen farklılık anlamlılığa ulaşmamıştır.



Şekil 15: ICOSL eksprese eden B hücrelerinin dağılımı

PDL1 ekspresyonu yapan B hücrelerinin T hücre yanıtlarını baskıladığı bilinmektedir. CD19⁺ICOSL⁺CXCR5⁺ hücrelerde PDL1 ekspresyonu incelendiğinde PDL1 eksprese etmeyen hücrelerin KCNS3 grubunda scrambled grubuna göre anlamlı artmış olması (ANOVA p=0,0075 , p=0,0190) bu grupta klinik kötüleşme ve serumdaki antikor miktarı ile de ilişkili olduğu düşünülmüştür. Hastalık patogenezinde baskılama yönünde aktivite olmadığı şeklinde yorumlanmıştır.

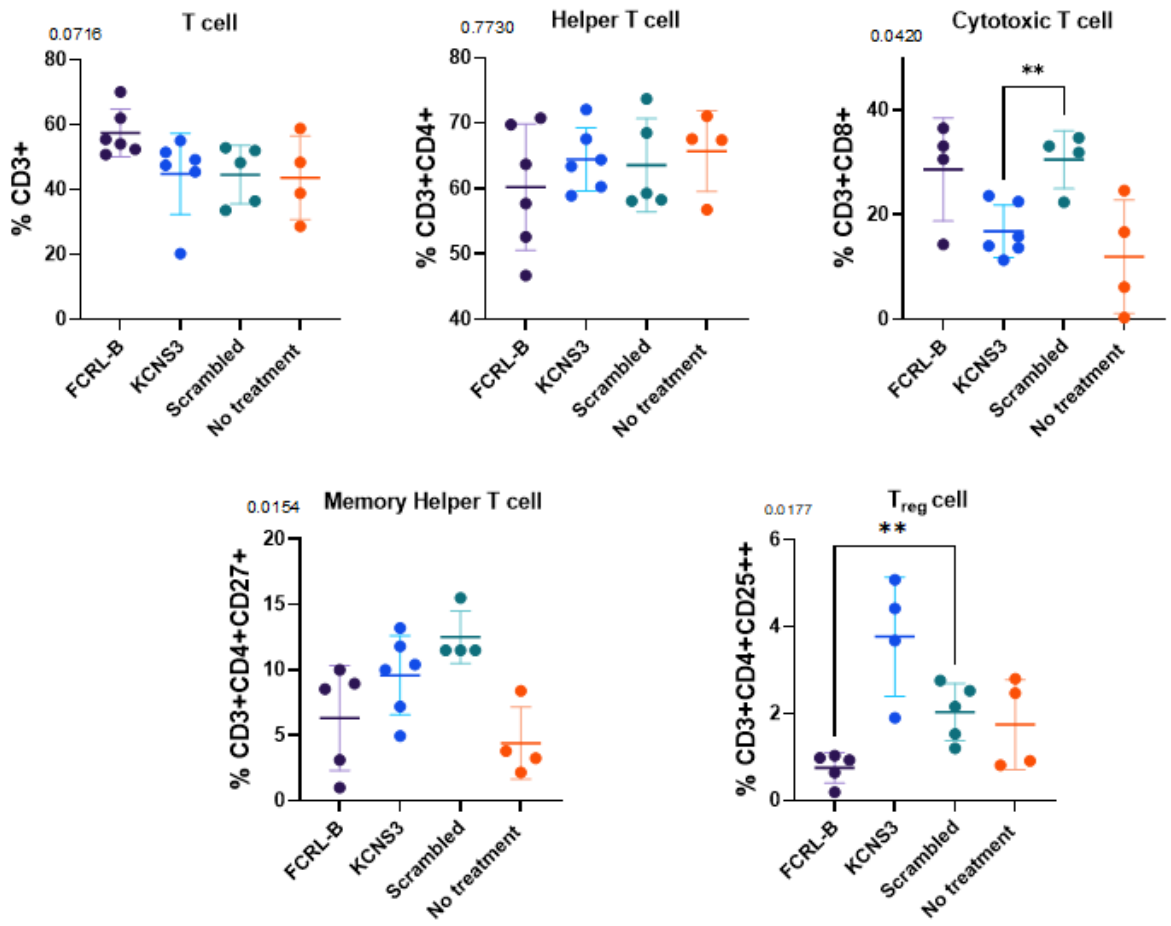


Şekil 16: PDL1 eksprese eden B hücre alttiplerinin dağılımı

4.5.3. T Hücresi Alttiplerinin çalışma grupları arasındaki dağılımı

Total T hücre popülasyonu oranları incelendiğinde *FCRLB* susturulan grupta diğer gruplara göre daha yüksek bir oran görülmektedir. Yardımcı T hücrelerinin gruplar arasında bir farkı olmasa da bellek yardımcı T hücrelerinde shRNA ve lentivirüs uygulaması yapılan grupların oranlarında tedavi almamış farelere göre artış olduğu görülmektedir ($p=0,0154$). Sitotoksik T hücrelerinde *KCNS3* grubunda scrambled grubuna göre anlamlı bir azalma görülmektedir. No treatment grubunda da bu

hücrelerin yüzdesinin en az olduğunu görmek, hastalık patolojisiyle bağlantısı olabileceğini düşündürmektedir. *FCRLB* grubu, T hücre popülasyonlarının genellikle diğer grupların ortalamasına uyum sağlasa da regülatör T hücrelerinin yüzdesinde diğer gruplara göre anlamlı olarak azalma olduğu belirlenmiştir ($p=0,0083$).



Şekil 17: T hücre alttiplerinin dağılımı

5. TARTIŞMA

Araştırmamızdaki hedef, otoimmün hastalıklarda farklı miktarlarda eksprese edildiği bilinen *FCRLB* ve *KCNS3* genlerinin myasthenia gravis fare modelindeki etkisinin belirlenmesi ve fonksiyonunun aydınlatılmasıdır.

KCNS3'ün, Kv9.3 adıyla ve yalnızca potasyum kanal proteini olarak bilinen fonksiyonunun incelendiği en güncel araştırmalar 2000'lerin başında yapılmıştır. Gen ekspresyon analizleri ve protein-protein etkileşim haritaları sayesinde, üzerine araştırma yapılmamış genler hakkında da tahminlerde bulunmamızı sağlayan veriler gündeme gelmiştir. *KCNS3*'ün *KCNB1* ile heteromer bir kanal oluşturduğu bu analizler sayesinde bulunmuştur. Voltaj kapılı potasyum kanalları, yavaş etkili ve kontrollü kanallardır. Aksiyon potansiyelinin oluşmasında ve nörotransmitterlerin salınmasında görev alırlar. Bu kanalları oluşturan proteinlerin üretilmesini sağlayan bir genin susturulması, potasyum kanallarının oluşma oranını azaltmış olur. Bu durum, denge içinde çalışan voltaj kapılı kalsiyum, sodyum ve potasyum kanalları arasındaki dengenin bozulmasına sebep olabilir. Postsinaptik nöronların sinir uçlarındaki iyon dengesi pozitif kayar ve aksiyon potansiyeline ulaşması zorlaşır. Buna bağlı olarak da nöromusküler bileşkedeki uyarımın sıklığının azalması beklenebilir. *KCNS3*'ün susturulması sonrasında shRNA verilmemiş MuSK immünize fare (no treatment) grubuna göre klinik skorunun daha yüksek ve kas gücünün daha düşük olmasını açıklayabileceği düşünülebilir. Ancak bu akıllara klinik olarak daha hasta görünen farelerin serumlarındaki MuSK'a karşı oluşan IgG antikorlarının miktarının neden no treatment grubuna göre daha düşük olduğu sorusunu akla getirmektedir. Bunun olası bir açıklaması, *KCNS3* shRNA uygulanan farelerde patojenik özelliği olan antikor sayısının daha yüksek olması olabilir. Çalışmamızdaki farklı tedavi gruplarına ait farelerin serum antikorları ile yapılacak mekanistik çalışmalarla bu savın doğrulanması gerekmektedir.

DOMG hayvan modelinin oluşturulması aşamasında her fareye eşit miktarda MuSK antijeni, immün sistemlerini tetikleyecek CFA ile homojenize edilip verilir. MuSK antijeninin vücutta yıkılması ve MusK-reaktif lenfositlerin yaşam sürelerinin dolması birkaç hafta içinde tamamlandığı için immünizasyonlar 28 günde bir tekrarlanır. Farelerin hastalığa verdiği immün yanıt, hastalıklarının şiddetini belirler. Serumda ölçülen MuSK-IgG miktarı klinik skorla doğrudan korele değildir ancak verilen antijene

karşı oluşturduğu IgG miktarının düşüklüğü daha az immün yanıt verdiğini ve otoimmünitenin yıkıcı etkilerini azalttığını düşündürmektedir. *KCNS3*'ün protein-protein etkileşim haritasında immünglobulin Kappa ve Lambda ile en yakın etkileşimi gösterdiği bulunmuştur. Bu bulgu, *KCNS3* geni susturulmuş farelerde kas zaafının artmasına rağmen serumlarındaki MuSK-IgG miktarının tedavisiz farelere oranla düşük seyretmesi bulgusunu açıklamakta bir ipucu verebilir.

Literatürde, Fc reseptör benzeri gen ailesi ile ilgili yayın bulmak çok zor değildir. *FCRLB* ise bu gen ailesinde olmasına rağmen yakın zamanlarda ilgi odağı olmaya başlamıştır. *FCRLB* geni tarafından kodlanan *FCRLB*, başta mature B hücreleri olmak üzere dalak, tonsil ve germinal merkez oluşumlarında yoğunlukla salgılanır. Bu B hücre bağlantısı da, B hücre ilişkili otoimmün hastalıklar üzerinde etkili bir gen ve molekül olabileceğini düşündürmektedir. Yaptığımız çalışmada *FCRLB* baskılanması ile tedaviye yönelik olumlu bir sonuç doğurduğunu söyleyebiliriz. *KCNS3*'ün aksine *FCRLB* geni susturulmuş ve MuSK ile immünize edilmiş farelerde myasthenia gravis hastalık modeli gelişiminin kısmen engellenmiş olduğu gözlenmiştir. Özellikle shRNA enjeksiyonunu takip eden iki haftada (hastalığın ağırlaşması beklenirken) farelerde güç ve kilo artışı kantitatif olarak ölçüldü, hiperaktiviteyi düşündüren hareket artışları ise deney notları arasına kaydedildi. Deney sonuna kadar klinik skorlar 1'in altında kalmayı sürdürdü. Sakrifikasyon sonra toplanan serum örneklerindeki MuSK-IgG seviyeleri gruplar arasındaki en düşük ortalamaya sahipti. Bu açıdan bakıldığında *FCRLB*'nin myasthenia gravis hastalığının tedavisi için uygun bir hedef olabileceği varsayılabilir.

İmmünfenotipleme sonuçları göz önüne alındığında ise, $CD19^+$ B hücrelerinin genel popülasyonunda gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığı görülmektedir. $CD19^+CD5^+$ B1a hücrelerinin oranlarının diğer gruplarda birbirine yakınken *FCRLB* grubunda daha az olduğu belirlendi. Buna karşın *FCRLB* grubunda $CD3^+$ T hücrelerinin yüzdesi diğer gruplara göre daha yüksek görünmektedir. $CD3^+CD4^+$ yardımcı T hücreleri gruplar arasında farklı değilken $CD3^+CD4^+CD27^+$ hafıza yardımcı T hücrelerinin yüzdesi, *FCRLB* grubunda *KCNS3* grubundan daha azdır. $CD3^+CD4^+CD25^{++}$ regülatör T hücrelerinde ise durum tam tersidir. Yalnızca *KCNS3* grubunda görülen bir artış söz konusudur. $CD3^+CD8^+$ sitotoksik T hücrelerinin yüzdesi scramble ve *KCNS3* grubunda *FCRLB* grubuna göre azalmıştır.

Çalışmamızın sınırlılıkları olmakla beraber, MG hastalığı penceresinde bu iki gene karşı yeni bir bakış açısı oluşturmuştur. En önemli sınırlama gruplardaki örnek-fare sayısının az olması ve sadece CFA ile immünize edilen ve hastalık geliştirmeyen grubun bu çalışmada yer almamış olmasıdır. Ayrıca yalnızca deney sonunda toplanmış olan periferik kan örnekleri, shRNA uygulamasının etkisini göstermek için yetersiz kalmıştır. Deney süresi içerisinde birkaç kere kuyruk kanı alınarak serum antikor düzeyleri, immünofenotipleme yapılarak gen susturmanın immün hücreler üzerindeki etkileri ve sitokin ekspresyon düzeylerinin ile GZ-PZR ile değerlendirmesi hastalığın klinik seyrini anlamak için önemli olacaktır. Kas örneklerinde western blot yöntemi ile MuSK ve AChR proteinlerinin ekspresyonunun gösterilmesi hem DOMG'nin validasyonu hem de shRNA uygulamasının nöromüsküler bileşke üzerinden etki edip etmediğini anlamakta yardımcı olabilir. Ayrıca kasta *KCNS3* gen ekspresyonunun veya proteininin belirlenmesi kas zaafiyetlerini içeren diğer otoimmün hastalıklar için de yeni bir hedef tedavi stratejisi uygulamasının önünü açabilecektir.

KAYNAKLAR

1. Willis T., De Anima Brutorum, 404-407, Oxonii Theatro Sheldoniano, Oxford, 1672.
2. Erb, W. Zur casuistik der bulbären lähmungen. Arch. Psychiatr. Nervenkr. 9, 336–350 (1879).
3. Goldflam, S. Ueber einen scheinbar heilbaren bulbär paralytischen Symptomencomplex mit Betheiligung der Extremitäten. Dtsch. Z. Nervenheilkd 4, 312–352 (1893).
4. Campbell, H. & Bramwell, E. myasthenia gravis. Brain 23, 277–336 (1900).
5. Oppenheim, H. Die myasthenische Paralyse (Bulbarparalyse ohne anatomischen Befund) (JHH Karger, Berlin, 1901).
6. Loewi, O. Über humorale Übertragbarkeit der Herznervenwirkung. Pflügers Arch. ges Physiol. 189, 239–242 (1921).
7. Dale, H. H., Feldburg, W. & Vogt, M. Release of acetylcholine at voluntary motor nerve endings. J. Physiol. 86, 353–380 (1936).
8. Chang, C. & Lee, C. Isolation of neurotoxins from the venom of Bungarus multicinctus and their modes of neuromuscular blocking action. Arch. Pharmacodyn. Ther. 144, 241–257 (1962).
9. Fambrough, D. M., Drachman, D. B. & Satyamurti, S. Neuromuscular junction in myasthenia gravis: decreased acetylcholine receptors. Science 182, 293–295 (1973).
10. Simpson, J. A. myasthenia gravis, a new hypothesis. Scott. Med. J. 5, 419–436 (1960).
11. Beeson, D. et al. Primary structure of the human muscle acetylcholine receptor. cDNA cloning of the γ and ϵ subunits. Eur. J. Biochem. 215, 229–238 (1993).
12. Patrick, J. & Lindstrom, J. Autoimmune response to acetylcholine receptor. Science 180, 871–872 (1973).
13. Vincent, A. (2002). Unravelling the pathogenesis of myasthenia gravis. Nature Reviews Immunology, 2(10), 797–804. <https://doi.org/10.1038/nri916>.
14. Keesey JC. Clinical evaluation and management of myasthenia gravis. Muscle and Nerve. 2004;29(4):484–505.
15. Takata K, Stathopoulos P, Cao M, et al. Characterization of pathogenic monoclonal autoantibodies derived from muscle-specific kinase myasthenia gravis patients. JCI Insight. 2019;4(12):e127167. Published 2019 Jun 20. doi:10.1172/jci.insight.127167.
16. Hehir MK, Silvestri NJ. Generalized myasthenia gravis: Classification, Clinical Presentation, Natural History, and Epidemiology. Neurol Clin. 2018;36(2):253-260. doi:10.1016/j.ncl.2018.01.002
17. Heldal AT, Owe JF, Gilhus NE, et al. Seropositive myasthenia gravis: a nationwide epidemiologic study. Neurology 2009;73:150–1.
18. Andersen JB, Engeland A, Owe JF, et al. myasthenia gravis requiring pyridostigmine treatment in a national population cohort. Eur J Neurol 2010;17:1445–50.
19. Grob D, Brunner N, Namba T, et al. Lifetime course of myasthenia gravis. Muscle Nerve 2008;37:141–9.
20. Yu YL, Hawkins BR, Ip MS, et al. myasthenia gravis in Hong Kong Chinese. 1. epidemiology and adult disease. Acta Neurol Scand 1992;86:113–9.
21. Phillips LH 2nd, Torner JC, Anderson MS, et al. The epidemiology of myasthenia gravis in central and western Virginia. Neurology 1992;42:1888–93.

22. Oh SJ, Morgan MB, Lu L, et al. Racial differences in myasthenia gravis in Alabama. *Muscle Nerve* 2009;39:328–32.
23. Deymeer F, Gungor-Tuncer O, Yilmaz V, et al. Clinical comparison of anti-MuSK vs anti-AChR-positive and seronegative myasthenia gravis. *Neurology* 2007;68: 609–11.
24. Grob D, Arsura EL, Brunner NG, et al. The course of myasthenia gravis and therapies affecting outcome. *Ann New York Acad Sci* 1987;505:472–99.
25. Juel VC, Massey JM. myasthenia gravis. *Orphanet J Rare Dis* 2007;2:44.
26. Pasnoor M, Wolfe GI, Nations S, et al. Clinical findings in MuSK-antibody positive myasthenia gravis: a U.S. experience. *Muscle Nerve* 2010;41:370–4.
27. Guptill JT, Sanders DB, Evoli A. Anti-MuSK antibody myasthenia gravis: clinical findings and response to treatment in two large cohorts. *Muscle Nerve* 2011;44:36–40.
28. Gwathmey KG, Burns TM. myasthenia gravis. *Semin Neurol* 2015;35:327–39.
29. Gilhus NE. myasthenia gravis. *N Engl J Med* 2016;375:2570–81.
30. Jani-Acsadi A, Lisak RP. Myasthenic crisis: guidelines for prevention and treatment. *J Neurol Sci* 2007;261:127–33.
31. Rodgaard A, Nielsen FC, Djurup R, Somnier F, Gammeltoft S. Acetylcholine receptor antibody in myasthenia gravis: predominance of IgG subclasses 1 and 3. *Clin Exp Immunol.* (1987) 67:82–8.
32. Eymard B, Vernet-der Garabedian B, Berrih-Aknin S, Pannier C, Bach JF, Morel E. Anti-acetylcholine receptor antibodies in neonatal myasthenia gravis: heterogeneity and pathogenic significance. *J Autoimmun.* (1991) 4:185–95. doi: 10.1016/0896-8411(91)900177.
33. Lindstrom J. An assay for antibodies to human acetylcholine receptor in serum from patients with myasthenia gravis. *Clin Immunol Immunopathol.* (1977) 7:36–43. doi: 10.1016/0090-1229(77)90027-7.
34. Benatar M. A systematic review of diagnostic studies in myasthenia gravis. *Neuromuscul Disord.* (2006) 16:459–67. doi: 10.1016/j.nmd.2006.05.006.
35. Meriggioli MN, Sanders DB. Muscle autoantibodies in myasthenia gravis: beyond diagnosis? *Expert Rev Clin Immunol.* (2012) 8:427–38. doi: 10.1586/eci.12.34.
36. Oger J, Frykman H. An update on laboratory diagnosis in myasthenia gravis. *Clin Chim Acta.* (2015) 449:43–8. doi: 10.1016/j.cca.2015.07.030.
37. Yang L, Maxwell S, Leite MI, Waters P, Clover L, Fan X, et al. Non-radioactive serological diagnosis of myasthenia gravis and clinical features of patients from Tianjin, China. *J Neurol Sci.* (2011) 301:71–6. doi: 10.1016/j.jns.2010.10.023.
38. Lazaridis K, Tzartos SJ. Autoantibody Specificities in myasthenia gravis; Implications for Improved Diagnostics and Therapeutics. *Front Immunol.* 2020;11:212. Published 2020 Feb 14. doi:10.3389/fimmu.2020.00212.
39. Evoli A, Tonali PA, Padua L, Monaco ML, Scuderi F, Batocchi AP, et al. Clinical correlates with anti-MuSK antibodies in generalized seronegative myasthenia gravis. *Brain.* (2003) 126(Pt 10):2304–11. doi: 10.1093/brain/awg223.
40. Evoli A, Bianchi MR, Riso R, Minicuci GM, Batocchi AP, Servidei S, et al. Response to therapy in myasthenia gravis with anti-MuSK antibodies. *Ann N Y Acad Sci.* (2008) 1132:76–83. doi: 10.1196/annals.1405.012.
41. Silvestri NJ, Wolfe GI. Treatment-refractory myasthenia gravis. *J Clin Neuromuscul Dis.* (2014) 15:167–78. doi: 10.1097/CND.0000000000000034.

42. Iorio R, Damato V, Alboini PE, Evoli A. Efficacy and safety of rituximab for myasthenia gravis: a systematic review and meta-analysis. *J Neurol.* (2015) 262:1115–9. doi: 10.1007/s00415-014-7532-3.
43. Szczudlik P, Szyluk B, Lipowska M, Ryniewicz B, Kubiszewska J, Dutkiewicz M, et al. Antititin antibody in early- and late-onset myasthenia gravis. *Acta Neurol Scand.* (2014) 130:229–33. doi: 10.1111/ane.12271.
44. Leite MI, Strobel P, Jones M, Micklem K, Moritz R, Gold R, et al. Fewer thymic changes in MuSK antibody-positive than in MuSK antibody-negative MG. *Ann Neurol.* (2005) 57:444–8. doi: 10.1002/ana.20386.
45. Gilhus NE, Skeie GO, Romi F, Lazaridis K, Zisimopoulou P, Tzartos S. myasthenia gravis - autoantibody characteristics and their implications for therapy. *Nat Rev Neurol.* (2016) 12:259–68. doi: 10.1038/nrneurol.2016.44.
46. Barnett C, Tabasinejad R, Bril V. Current pharmacotherapeutic options for myasthenia gravis. *Expert Opin Pharmacother.* (2019) 20:2295–303. doi: 10.1080/14656566.2019.1682548.
47. Cao M, Koneczny I, Vincent A. myasthenia gravis With Antibodies Against Muscle Specific Kinase: An Update on Clinical Features, Pathophysiology and Treatment. *Front Mol Neurosci.* 2020;13:159. Published 2020 Sep 2. doi:10.3389/fnmol.2020.00159.
48. Gilhus NE, Skeie GO, Romi F, Lazaridis K, Zisimopoulou P, Tzartos S. myasthenia gravis - autoantibody characteristics and their implications for therapy. *Nat Rev Neurol.* 2016;12(5):259–268. doi:10.1038/nrneurol.2016.44.
49. Querol L, Illa I. Myasthenia and the neuromuscular junction. *Curr. Opin. Neurol.* 26, 459–465 (2013).
50. Gilhus, N. E. & Verschuuren, J. J. myasthenia gravis: subgroup classification and therapeutic strategies. *Lancet Neurol.* 14, 1023–1036 (2015).
51. Skeie, G. O. et al. Guidelines for treatment of autoimmune neuromuscular transmission disorders. *Eur. J. Neurol.* 17, 893–902 (2010).
52. Gronseth, G. H. & Barohn, R. J. Thymectomy for autoimmune myasthenia gravis (an evidence-based review). *Neurology* 55, 7–15 (2000).
53. VanderPluym, J. et al. Clinical characteristics of pediatric myasthenia: a surveillance study. *Pediatrics* 132, e939–944 (2013).
54. Bardhan M, Dogra H, Samanta D. Neonatal myasthenia gravis. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; February 4, 2022.
55. Guptill, J. T., Sanders, D. B. & Evoli, A. Anti-MuSK antibody myasthenia gravis; clinical findings and response to treatment in two large cohorts. *Muscle Nerve* 44, 36–40 (2011).
56. Chang, T. et al. Clinical and serological study of myasthenia gravis using both radioimmunoprecipitation and cell-based assays in a South Asian population. *J. Neurol. Sci.* 343, 82–87 (2014).
57. Higuchi, O. et al. Autoantibodies to low-density lipoprotein receptor-related protein 4 in myasthenia gravis. *Ann. Neurol.* 69, 418–422 (2011).
58. Zisimopoulou, P. et al. A comprehensive analysis of the epidemiology and clinical characteristics of anti-LRP4 in myasthenia gravis. *J. Autoimmun.* 52, 139–145 (2014).
59. Tsonis, A. I. et al. MuSK autoantibodies in myasthenia gravis detected by cell-based assay: a multinational study. *J. Neuroimmunol.* 284, 10–17 (2015).
60. Gilhus, N. E. Myasthenia and neuromuscular junction. *Curr. Opin. Neurol.* 25, 523–529 (2012).

61. Querol, L. & Illa, I. Myasthenia and the neuromuscular junction. *Curr. Opin. Neurol.* 26, 459–465 (2013).
62. Verschuuren, J. J.G. M. et al. Pathophysiology of myasthenia gravis with antibodies to the acetylcholine receptor, muscle-specific kinase, and low-density lipoprotein receptor-related protein 4. *Autoimmune Rev.* 12, 918–923 (2013).
63. Gilhus, N. E. & Verschuuren, J. J. myasthenia gravis: subgroup classification and therapeutic strategies. *Lancet Neurol.* 14, 1023–1036 (2015).
64. Nishimune H, Shigemoto K. Practical Anatomy of the Neuromuscular Junction in Health and Disease. *Neurol Clin.* 2018;36(2):231-240. doi:10.1016/j.ncl.2018.01.009.
65. Patton BL. Basal lamina and the organization of neuromuscular synapses. *Journal of Neurocytology.* 2003; 32(5):883–903.
66. Sanes JR. The basement membrane/basal lamina of skeletal muscle. *J Biol Chem.* 2003; 278(15): 12601–12604.
67. Timpl R, Brown JC. Supramolecular assembly of basement membranes. *Bioessays.* 1996; 18(2):123–132.
68. Rogers RS, Nishimune H. The role of laminins in the organization and function of neuromuscular junctions. *Matrix Biol.* 2016.
69. Couteaux R, Pecot-Dechavassine M. Synaptic vesicles and pouches at the level of active zones of the neuromuscular junction. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D.* 1970; 271(25):2346–2349.
70. Tsuji S. Rene Couteaux (1909–1999) and the morphological identification of synapses. *Biol Cell.* 2006; 98(8):503–509.
71. Lazaridis K, Tzartos SJ. Autoantibody Specificities in myasthenia gravis; Implications for Improved Diagnostics and Therapeutics. *Front Immunol.* 2020;11:212. Published 2020 Feb 14. doi:10.3389/fimmu.2020.00212.
72. DeChiara TM, Bowen DC, Valenzuela DM, et al. The Receptor Tyrosine Kinase MuSK Is Required for Neuromuscular Junction Formation In Vivo. *Cell.* 1996; 85(4):501–512.
73. Yumoto N, Kim N, Burden SJ. Lrp4 is a retrograde signal for presynaptic differentiation at neuromuscular synapses. *Nature.* 2012; 489(7416):438–442.
74. Apel ED, Roberds SL, Campbell KP, Merlie JP. Rapsyn may function as a link between the acetylcholine receptor and the agrin-binding dystrophin-associated glycoprotein complex. *Neuron.* 1995; 15(1):115–126.
75. Hoch W, McConville J, Helms S, Newsom-Davis J, Melms A, Vincent A. Auto-antibodies to the receptor tyrosine kinase MuSK in patients with myasthenia gravis without acetylcholine receptor antibodies. *Nat Med.* (2001) 7:365–8. doi: 10.1038/85520.
76. Skriapa L, Zisimopoulou P, Trakas N, Grapsa E, Tzartos SJ. Expression of extracellular domains of muscle specific kinase (MuSK) and use as immunoadsorbents for the development of an antigen-specific therapy. *J Neuroimmunol.* (2014) 276:150–8. doi: 10.1016/j.jneuroim.2014.09.013.
77. Gomez AM, Van Den Broeck J, Vrolix K, Janssen SP, Lemmens MA, Van Der Esch E, et al. Antibody effector mechanisms in myasthenia gravis-pathogenesis at the neuromuscular junction. *Autoimmunity.* (2010) 43:353–70. doi: 10.3109/08916930903555943.
78. Koneczny I, Stevens JA, De Rosa A, Huda S, Huijbers MG, Saxena A, et al. IgG4 autoantibodies against muscle-specific kinase undergo Fab-arm exchange in myasthenia gravis patients. *J Autoimmun.* (2017) 77:104–15. doi: 10.1016/j.jaut.2016.11.005.

79. Kawakami Y, Ito M, Hirayama M, Sahashi K, Ohkawara B, Masuda A, et al. Anti-MuSK autoantibodies block binding of collagen Q to MuSK. *Neurology*. (2011) 77:1819–26. doi: 10.1212/WNL.0b013e318237f660.
80. Koneczny I, Cossins J, Waters P, Beeson D, Vincent A. MuSK myasthenia gravis IgG4 disrupts the interaction of LRP4 with MuSK but both IgG4 and IgG1–3 can disperse preformed agrin-independent AChR clusters. *PLoS ONE*. (2013) 8:e80695. doi: 10.1371/journal.pone.0080695.
81. van der Neut Kolfschoten, M., Schuurman, J., Losen, M., Bleeker, W. K., Martinez-Martinez, P., Vermeulen, E., et al. (2007). Anti-inflammatory activity of human IgG4 antibodies by dynamic Fab arm exchange. *Science* 317, 1554–1557. doi: 10.1126/science.1144603.
82. Vidarsson, G., Dekkers, G., and Rispens, T. (2014). IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Front. Immunol.* 5:520. doi: 10.3389/fimmu.2014.00520.
83. Koneczny, I., Stevens, J. A., De Rosa, A., Huda, S., Huijbers, M. G., Saxena, A., et al. (2017). IgG4 autoantibodies against muscle-specific kinase undergo Fab-arm exchange in myasthenia gravis patients. *J. Autoimmun.* 77, 104–115. doi: 10.1016/j.jaut.2016.11.005.
84. Koneczny, I. (2018). A new classification system for IgG4 autoantibodies. *Front. Immunol.* 9:97. doi: 10.3389/fimmu.2018.00097.
85. Zipfel, P.F. & C. Skerka. 2009. Complement regulators and inhibitory proteins. *Nat. Rev. Immunol.* 9:729–740.
86. Tüzün, E., & Christadoss, P. (2013). Complement associated pathogenic mechanisms in myasthenia gravis. *Autoimmunity Reviews*, 12(9), 904–911. doi:10.1016/j.autrev.2013.03.003
87. Morgan, B.P. 2016. The membrane attack complex as an inflammatory trigger. *Immunobiology* 221:747–751.
88. Diaz-Manera J, Martinez-Hernandez E, Querol L, et al. Long-lasting treatment effect of rituximab in MuSK myasthenia. *Neurology* 2012;78:189–193.
89. Nowak RJ, Dicapua DB, Zebardast N, et al. Response of patients with refractory myasthenia gravis to rituximab: a retrospective study. *Ther Adv Neurol Disord* 2011;4:259–266.
90. Meffre E, Wardemann H. B-cell tolerance checkpoints in health and autoimmunity. *Curr Opin Immunol* 2008;20:632–638.
91. Wardemann H, Yurasov S, Schaefer A, et al. Predominant autoantibody production by early human B cell precursors. *Science* 2003;301:1374–1377.
92. Samuels J, Ng YS, Coupillaud C, et al. Impaired early B cell tolerance in patients with rheumatoid arthritis. *J Exp Med* 2005;201:1659–1667.
93. Kinnunen T, Chamberlain N, Morbach H, et al. Specific peripheral B cell tolerance defects in patients with multiple sclerosis. *J Clin Invest* 2013;123:2737–2741.
94. Guptill JT, Yi JS, Sanders DB, Guidon AC, Juel VC, Massey JM, Howard JF Jr, Scuderi F, Bartoccioni E, Evoli A, et al. 2015. Characterization of B cells in muscle-specific kinase antibody myasthenia gravis. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm.* 2:e77.
95. Si R, Zhao P, Yu Z, Qu Z, Sun W, Li T, Jiang Y. 2020. Increased non-switched memory B cells are associated with plasmablasts, serum IL-6 levels and renal functional impairments in IgAN patients. *Immunol Invest.* 49:178–90.

96. Yilmaz V, Ulusoy C, Hajtovic S, et al. Effects of Teriflunomide on B Cell Subsets in MuSK-Induced Experimental Autoimmune myasthenia gravis and Multiple Sclerosis. *Immunol Invest.* 2021;50(6):671-684. doi:10.1080/08820139.2020.1785491.
97. Yilmaz V, Oflazer P, Aysal F, Durmus H, Poulas K, Yentur SP, Gulsen-Parman Y, Tzartos S, Marx A, Tuzun E, et al. 2015. Differential cytokine changes in patients with myasthenia gravis with antibodies against AChR and MuSK. *PLoS One.* 10:e0123546.
98. Tüzün E, Saini SS, Yang H, Alagappan D, Higgs S, Christadoss P. Genetic evidence for the involvement of Fcγ receptor III in experimental autoimmune myasthenia gravis pathogenesis. *J Neuroimmunol.* 2006;174(1-2):157-167. doi:10.1016/j.jneuroim.2006.01.015.
99. Turkoglu R, Yilmaz V, Ozdemir O, et al. Peripheral blood B cell subset ratios and expression levels of B cell-associated genes are altered in benign multiple sclerosis. *Mult Scler Relat Disord.* 2021;52:103019. doi:10.1016/j.msard.2021.103019.
100. Gable KL, Guptill JT. Antagonism of the Neonatal Fc Receptor as an Emerging Treatment for myasthenia gravis. *Front Immunol.* 2020;10:3052. Published 2020 Jan 10. doi:10.3389/fimmu.2019.03052.
101. Kerschensteiner D, Stocker M. Heteromeric assembly of Kv2.1 with Kv9.3: effect on the state dependence of inactivation. *Biophys J.* 1999;77(1):248-257. doi:10.1016/S0006-3495(99)76886-4.
102. Liu S. Lentiviral-Mediated Systemic RNA Interference In Vivo. *Methods Mol Biol.* 2018;1868:137-144. doi:10.1007/978-1-4939-8802-0_14.
103. Kotterman MA, Chalberg TW, Schaffer DV(2015) Viral vectors for gene therapy: translational and clinical outlook. *Annu Rev Biomed Eng* 17:63–89.
104. Eneljung T, Tengvall S, Jirholt P, Henningsson L, Holmdahl R, Gustafsson K et al (2013) Antigen-specific gene therapy after immunisation reduces the severity of collagen-induced arthritis. *Clin Dev Immunol* 2013:345092.
105. Giannoccaro MP, Wright SK, Vincent A. In vivo Mechanisms of Antibody-Mediated Neurological Disorders: Animal Models and Potential Implications. *Front Neurol.* 2020;10:1394. Published 2020 Feb 5. doi:10.3389/fneur.2019.01394.
106. Berman PW, Patrick J. Linkage between the frequency of muscular weakness and loci that regulate immune responsiveness in murine experimental myasthenia gravis. *J Exp Med.* (1980) 152:507–20. doi: 10.1084/jem.152.3.507.
107. Kusner LL, Losen M, Vincent A, Lindstrom J, Tzartos S, Lazaridis K, et al. Guidelines for pre-clinical assessment of the acetylcholine receptor-specific passive transfer myasthenia gravis model-Recommendations for methods and experimental designs. *Exp Neurol.* (2015) 270:3–10. doi: 10.1016/j.expneurol.2015.02.025.
108. Huda R, Tüzün E, Christadoss P. Complement C2 siRNA mediated therapy of myasthenia gravis in mice. *J Autoimmun.* 2013;42:94-104. doi:10.1016/j.jaut.2013.01.003.

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

DENEYSEL OTOİMMÜN MYASTHENİA GRAVİS (DOMG) MODELİNDE B LENFOSİT GENLERİNİN HASTALIK GELİŞİMİNE ETKİSİ

ORJİNALLIK RAPORU

% 2	% 2	% 1	% 0
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 1
2	"Neuroimmune Diseases", Springer Science and Business Media LLC, 2019 Yayın	<% 1
3	www.frontiersin.org İnternet Kaynağı	<% 1
4	repositorio-aberto.up.pt İnternet Kaynağı	<% 1
5	"Poster Özetleri / Poster Abstracts", Turkish Journal of Biochemistry, 2015 Yayın	<% 1
6	docplayer.biz.tr İnternet Kaynağı	<% 1
7	koreascience.or.kr İnternet Kaynağı	<% 1
8	Submitted to University of Colorado, Denver Öğrenci Ödevi	<% 1

2. Tamam, Y., Gunes, B., Akbayir, E., Kizilay, T., Karaaslan, Z., Koral, G., ... & Turkoglu, R. (2021). CSF levels of HoxB3 and YKL-40 may predict conversion from clinically isolated syndrome to relapsing remitting multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, 48, 102697.
3. Gencer, M., Koral, G., Sanli, E., Cirak, S., Akbayir, E., Yuceer, H., ... & Turkoglu, R. (2021). Cerebrospinal fluid level of phosphorylated neurofilament heavy chain is higher in converting clinically isolated syndrome and correlates with CAMP response element-binding protein concentration. *Neurological Sciences and Neurophysiology*, 38(4), 256.



