

DUYGU BAĞCIÇEK

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İSTANBUL-2022



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

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**ADENOSİN DEAMİNAZ 2 EKSİKLİĞİ HASTALIĞINDA
ADA2 MUTANT ALLELİN EKSPRESYON
DÜZEYLERİNİN HASTALIĞIN ŞİDDETİ ÜZERİNDEKİ
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

DUYGU BAĞÇİÇEK

**DANIŞMAN
PROF. DR. SEMA SIRMA EKMEKCİ**

**GENETİK ANABİLİM DALI
GENETİK PROGRAMI**

İSTANBUL-2022

İTHAF

Anneme ve Babama ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Beni yüksek lisans öğrencisi olarak kabul eden, tez projemin planlanması ve yürütülmesinde desteğini esirgemeyen, yüksek lisans eğitimim boyunca ve tez çalışmamda bana her zaman yardımcı olan, tüm sorularıma sabrı ve ilgisiyle cevap veren, bilgisiyle bana yol gösteren, tez çalışmalarımı gerçekleştirebilmem için sağladığı tüm imkânlar için değerli hocam ve tez danışmanım Prof. Dr. Sema Sırma Ekmekci'ye, bilgi ve tecrübesine saygı duyduğum değerli hocalarım Prof. Dr. Ahmet Gül ve Prof. Dr. Neslihan Abacı'ya çok teşekkür ederim.

Deneyimlerinden faydalandığım ve manevi desteklerini her zaman yanımda hissettiğim sevgili hocam Dr. Zeliha Emrence ve Msc. Burcu Salman Yaylaz'a

Tez çalışmam boyunca her an yanımda olan ve beni motive eden sevgili arkadaşım Damla Nur Şakar'a ve laboratuvarımızın değerli üyeleri; Büneyan Tüzün'e, Elif Nur Bozdağ'a, Doç. Dr. Ferda Paçal'a ve Dr. Aris Çakiris'e teşekkür ediyorum.

Birlikte her zaman eğlendiğim, tez çalışmamın her anında zaman, mekân fark etmeksizin bana hep destek olan sevgili arkadaşım Berk İleri'ye

Yüksek lisans eğitimime başladığımda yollarımızın kesiştiği, tanıştığımız ilk günden beri iyi ve kötü her anımda yanımda olan, uzak ya da yakın nerede olursam olayım desteğini her zaman hissettiğim ve bu süreçte bana en büyük desteği sağlayan canım dostum Şeyma Punar'a çok teşekkür ediyorum.

Yüksek lisans eğitimim boyunca ve tez çalışmamdaki tüm sıkıntılı süreçlerimde yanımda olan, stresli olduğum her an beni sabırla kucaklayan, hayatımı paylaştığım eşim Muhammet Bağçiçek'e

Tüm eğitim hayatım boyunca maddi manevi hiçbir desteğini esirgemeyen, her zaman başarılı olacağıma inanan ve bunun için her türlü imkânı sağlayan, hayatımın her anında yanımda olup beni bugünlere getiren, emeklerinin karşılığını asla veremeyeceğim canım annem Hacer Savaş ve canım babam Nevzat Savaş'a, hep destekçim olan ve iyi ki varsınız dediğim canım kardeşlerim Ebru Savaş ve Hasan Hüseyin Savaş'a çok teşekkür ediyorum.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 37571



İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.
BEYAN.....	HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.
İTHAF.....	İİ
TEŞEKKÜR.....	İİİ
İÇİNDEKİLER	V
TABLolar LİSTESİ.....	Vİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ	Vİİİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	İX
ÖZET	Xİ
ABSTRACT.....	Xİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Adenozin Deaminaz 2 Eksikliği (DADA2)	3
2.2. Klinik Bulgular	5
2.2.1. Vaskülit/Vaskülopati.....	5
2.2.2. İmmün Yetmezlik	6
2.2.3. Hematolojik Hastalıklar	7
2.3. Epidemiyoloji.....	7
2.4. Patofizyoloji.....	8
2.5. Genotip-Fenotip Korelasyonu.....	9
2.6. Tanı	10
2.7. Tedavi	11
2.8. Adenozin Deaminaz (ADA)	13
2.9. Adenozin (Ado)	15
2.10. ADA'nın Yapısı	17
2.11. ADA İzoenzimleri: ADA1 ve ADA2	18
2.12. Adenozin Deaminaz 2 (ADA2) Geni.....	20
2.13. ADA Aktivitesinin İnhibitörleri.....	20
2.13.1. EHNA-benzeri Bileşikler	21
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	23

3.1. Gereç	23
3.1.1. Kitler ve Kullanılan Kimyasallar	23
3.1.2. Kullanılan Cihazlar	24
3.2. Yöntem.....	25
3.2.1. Hasta Bilgileri	25
3.2.2. Periferik Kanda Mononükleer Hücre (PBMC) İzolasyonu.....	26
3.2.3. Monosit ve Lenfosit İzolasyonu.....	27
3.2.4. Total PBMC, Nötrofil, T ve B Lenfosit Hücre Eledeşi İçin Periferik Kanda Mononükleer Hücre (PBMC) İzolasyonu	28
3.2.5. Nötrofil İzolasyonu	28
3.2.6. T ve B Lenfosit İzolasyonu	29
3.2.7. Hücre Kültürü	31
3.2.8. LPS Uygulanması	32
3.2.9. Hücre Toplama.....	32
3.2.10. RNA İzolasyonu.....	33
3.2.11. cDNA Sentezi	34
3.2.12. Primer Tasarlanması	36
3.2.13. Gerçek Zamanlı Kantitatif PZR (qRT-PZR).....	37
3.2.14. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR).....	38
3.2.15. Jel Elektrophorezi	40
3.2.16. ADA2 Enzim Aktivite Tayini	40
4. BULGULAR.....	44
4.1. Jel Elektrophorezi Görüntüleri	44
4.2. qRT-PZR Analiz Sonuçları.....	47
4.3. ADA2 Enzim Aktivite Tayini Bulguları.....	51
5. TARTIŞMA	53
KAYNAKLAR	58
HAM VERİLER	69
FORMLAR	70
ETİK KURUL KARARI	71
PATENT HAKKI İZNİ	72
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	73
ÖZGEÇMİŞ	74

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 3-1: Dondurma (%20 FBS, %5 DMSO) Medyumu Hazırlanması.....	30
Tablo 3-2: RPMI (%10 FBS, %1 Antibiyotik) Medyumu Hazırlanması	30
Tablo 3-3: RPMI (%10 FBS, %1 Antibiyotik) Medyumu Hazırlanması	31
Tablo 3-4: 2X Master Mix Hazırlanması.....	35
Tablo 3-5: cDNA Sentezi Reaksiyon Koşulları.....	35
Tablo 3-6: qRT-PZR Primerleri.....	36
Tablo 3-7: PZR Primerleri	36
Tablo 3-8: TBP Primerleri	36
Tablo 3-9: qRT-PZR Karışımı (1 kuyu için)	37
Tablo 3-10: qRT-PZR Koşulları	38
Tablo 3-11: PZR Karışımı	39
Tablo 3-12: PZR Koşulları	39
Tablo 3-13: İnozin Standartı	42
Tablo 3-14: Reaksiyon Mix Hazırlanması.....	42
Tablo 3-15: Background Mix Hazırlanması	43

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Adenozin deaminaz 2 (DADA 2) eksikliğinin patofizyolojisi (45)	9
Şekil 2-2: Adenozin deaminaz (ADA) metabolizması (60).....	14
Şekil 2-3: Adenin nükleotidlerinin ve adenozinin hücre dışı metabolizmasında rol oynayan enzimler (83)	17
Şekil 2-4: Adenosin Deaminaz 2'nin (ADA2) üretimi ve fizyolojik rolü (97)	19
Şekil 3-1: Aile Ağacı	26
Şekil 4-1: II-1 ve II-2 numaralı hastaların LPS(+) ve LPS(-) lenfosit ve monosit hücrelerinde ADA2 jel görüntüsü.....	44
Şekil 4-2: II-1 numaralı hasta ve II-3 numaralı sağlıklı bireyin nötrofil hücrelerinde, LPS(+) ve LPS(-) PBMC hücrelerinde ADA2 jel görüntüsü	45
Şekil 4-3: II-1 numaralı hastanın T ve B lenfosit hücrelerinde ADA2 jel görüntüsü.....	46
Şekil 4-4: II-3 numaralı sağlıklı bireyin T ve B lenfosit hücrelerinde ADA2 jel görüntüsü	47
Şekil 4-5: II-1 ve II-2 numaralı hastaların lenfosit hücrelerinde qRT-PZR ile ADA2 gen ifadesi.....	48
Şekil 4-6: II-1 ve II-2 numaralı hastaların monosit hücrelerinde qRT-PZR ile ADA2 gen ifadesi.....	49
Şekil 4-7: II-1 numaralı hasta ve II-3 numaralı sağlıklı bireyin nötrofil hücrelerinde qRT-PZR ile ADA2 gen ifadesi.....	49
Şekil 4-8: II-1 numaralı hasta ve II-3 numaralı sağlıklı bireyin PBMC hücrelerinde qRT-PZR ile ADA2 gen ifadesi.....	50
Şekil 4-9: II-1 numaralı hasta ve II-3 numaralı sağlıklı bireyin T ve B lenfosit hücrelerinde qRT-PZR ile ADA2 gen ifadesi.....	51
Şekil 4-10: İnozin Standart Eğrisi.....	52

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

- ADA: Adenozin deaminaz
- ADA1: Adenozin deaminaz1
- ADA2: Adenozin deaminaz 2
- Ado: Adenozin
- AMP: Adenozin monofosfat
- ANCA: Anti-nötrofil stoplazmik antikor
- ATP: Adenozin trifosfat
- cAMP: siklik adenozin monofosfat
- CECR1: Kedigözü sendromu kromozom bölgesi, aday 1
- cGMP: siklik guanozin monofosfat
- CRP: C-reaktif protein
- CVID: Yaygın değişken immün yetmezlik
- DADA2: Adenozin deaminaz 2 eksikliği hastalığı
- dAdo: Deoksiadenozin
- dATP: 2'-deoksiadenozin-5'trifosfat
- DBA: Diadmond-Blackfan anemisi
- eADA: ekto-ADA
- EHNA: Eritro-9-(2-hidroksi-3-nonil)adenin
- ENT: Nükleozit taşıyıcıları
- GATA2: GATA-binding protein 2
- ĞİA: Geçici iskemik atak
- GWAS: Genom çapında ilişkilendirme çalışmaları
- HSCT: Hematopoetik kök hücre transplantasyonu
- IFN: İnterferon

Ig: İmmünoglobulin

IL: İnterlökin

Km: Michaelis konstantı

LOF: Loss-of-function

LPS: Lipopolisakkarit

MPO: Miyeloperoksidaz

mRNA: Mesajcı RNA

NGS: Yeni nesil dizileme

NK: Naturel killer cell

NKT: Naturel killer T cell

PAN: Poliarteritis nodosa

PRCA: Saf kırmızı hücre aplazisi

PZR: Polimeraz zincir reaksiyonu

qRT-PZR: Gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu

RNR: Ribonükleotidredüktaz

SCID: Ciddi kombine immğn yetmezlik

SLE: Sistemik lupus

TIM: Triozfosfat izomeraz

T-LGL: T hücreleri büyük granüler lenfosit

TNF: Tümör nekroz faktör

WES: Tüm ekzom dizileme

WGS: Tüm genom dizileme

ÖZET

Bağcıçek, D. (2022). Adenosin Deaminaz 2 Eksikliği Hastalığında ADA2 Mutant Allelin Ekspresyon Düzeylerinin Hastalığın Şiddeti Üzerindeki Etkisinin Araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

DADA2, ADA2 geninde fonksiyon kaybına neden olan mutasyonlardan kaynaklanan otozomal resesif bir hastalıktır. DADA2’de aynı kurucu mutasyon için hastalığın başlangıç yaşı, sıklığı ve semptomların şiddeti değişkenlik göstermektedir. Daha önce yaptığımız bir çalışmada ADA2 geninde ekzon 7’nin atlanmasına neden olan splice site mutasyonunu (c.973-2A>G) homozigot olarak taşıyan bireylerde kısa ADA2 ifade seviyelerinde farklılık saptandı. Bu tez çalışmasında hastaların farklı hücre tiplerinde mutant allelin ifade seviyeleri ve hastalığın şiddetinin değişkenliğinin nedenini araştırmak amaçlandı. Hastalardan elde edilen hücrelere Lipopolisakkarit (LPS) uygulanarak inflamasyon tetiklendi. qRT-PZR yöntemi ile mutant ve normal mRNA ifade seviyeleri analiz edildi ve ADA2 enzim aktivitesi ölçüldü. Hastaların plazmasında ADA2 enzim aktivitesinin azaldığı bulundu. Hücre kültüründe ise ADA2 enzim aktivitesi saptanamadı. Hücrelere LPS uygulanmasının ADA2 ifadesinde belirgin bir farka neden olmadığı tespit edildi. Hastalara ait lenfosit ve nötrofil hücrelerinde ekzon 7 atlanan mutant ADA2, monosit hücrelerinde ise yabancı tip ADA2 ekspresyonu görüldü. Heterozigot sağlıklı bireyin PBMC ve nötrofil hücrelerinde yabancı tip ADA2 ekspresyonu gözlemlendi. Bu sonuçlar, hastalığın şiddeti ve klinik fenotipin mutant ADA2’nin eksprese olduğu hücre tipine bağlı olarak değişkenlik gösterebileceğini düşündürmektedir. Bu çalışma farklı hücrelerin kullanılarak ADA2 gen ifadesi ve ADA2 enzim aktivitesinin araştırıldığı ilk çalışma olma özelliğine sahiptir.

Anahtar Kelimeler: DADA2, CECR1, ADA2, LPS, mRNA

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 37571

ABSTRACT

Bağcıçek, D. (2022). Investigation of the Effect of ADA2 Mutant Allele Expression Levels on Disease Severity in Adenosine Deaminase 2 Deficiency Disease. İstanbul University, Institute of Health Science, Genetics. Master Thesis. İstanbul.

DADA2 is autosomal recessive disease caused by loss-of-function mutations in the ADA2 gene. For the same constitutive mutation in DADA2, the age of onset, frequency and severity of symptoms of the disease vary. In a previous study, we found differences in short ADA2 expression levels in individuals homozygous carrying the splice site mutation (c.973-2A>G), which causes exon 7 skipping in the ADA2 gene. In this study, it was aimed to investigate the reason for variability of the mutant allele expression levels and severity of disease in different cell types of the patients. Inflammation was triggered by applying Lipopolysaccharide (LPS) to the cells obtained from patients. Mutant and normal mRNA expression levels were analyzed by qRT-PCR and ADA2 enzyme activity was measured. It was found that ADA2 enzyme activity was decreased in plasma of the patients. However, ADA2 enzyme activity was not detected in cell culture. It was determined that the LPS application to the cells did not cause significant difference in ADA2 expression. Exon 7 skipped mutant ADA2 expression was observed in lymphocytes and neutrophils of the patients, and wild type ADA2 expression was observed in monocyte. Expression of wild type ADA2 was observed in PBMC and neutrophils of heterozygous healthy person. These results suggest that the severity of the disease and the clinical phenotype may vary depending on the cell type in which mutant ADA2 is expressed. This study is the first functional study that ADA2 gene expression and ADA2 enzyme activity were investigated using different cells.

Key Words: DADA2, CECR1, ADA2, LPS, mRNA

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No. 37571

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Adenozin deaminaz 2 eksikliği (DADA2), sistemik inflamasyonla ilişkili monogenik vaskülitik sendromdur. DADA2'nin en yaygın belirtileri arasında, ateş, liveoid döküntü ve splenomegali ile birlikte erken başlangıçlı felçler ve poliarteritis nodosa (PAN) benzeri bulgular yer almaktadır. İlk tanımlanmasından bu yana klinik özelliklerinin önemli ölçüde genişlemesiyle birlikte immün yetmezlikler ve hematolojik belirtiler de hastalığın tanımına eklenmiştir. Hastalığın başlangıcı genellikle çocukluk çağında olup, % 24'ü bir yaşından, % 77'si ise 10 yaşından öncedir.

DADA2, Adenozin Deaminaz 2 (ADA2) genindeki fonksiyon kaybı (loss-of-function, LOF) mutasyonlardan kaynaklanan otozomal resesif olarak kalıtılan bir hastalıktır. ADA2, aktif miyeloid hücreler tarafından üretilen ve mononükleer hücrelerin büyüme ve gelişmesinde rol oynayan adenozin deaminaz protein ailesinden bir enzim kodlar. Tanımlanan ADA2 mutasyonları, inflamatuvar hücre düzenlemesinin bozulmasına yol açan azalmış enzimatik aktivite ile ilişkilendirilmiştir.

DADA2'de kesin olarak tanımlanmış tedavi stratejileri mevcut değildir, ancak eksojen ADA2 replasmanı ve TNF inhibitörleri gibi immünomodülatör kullanılmaktadır. Şiddetli immün yetmezlik veya primer hematolojik belirtileri olan hastalarda hematopoetik kök hücre transplantasyonunun (HSCT) başarılı olduğu gösterilmiştir.

DADA2 ile ilgili şimdiye kadar net bir genotip-fenotip korelasyonu belirlenememiştir. Aynı kurucu mutasyon için homozigot olan hastalarda hastalığın başlangıç yaşı, sıklığı ve semptomların şiddeti değişkenlik göstermektedir. Daha önce yaptığımız bir çalışmada DADA2 belirtileri gösteren Türk ve Hollandalı ailelerde ADA2 geninde ekzon 7'nin atlanmasına (exon skipping) neden olan splice-site mutasyonunu (c.973-2A>G) homozigot olarak taşıyan bireylerde kısa mRNA ekspresyon miktarlarının farklı olduğunu gösterdik. Bu mutasyonu taşıyan aile bireylerinde de hastalığın şiddeti farklılık göstermektedir.

Bu tez çalışmasında bu verilerden faydalanılarak mutant mRNA ekspresyonunun fenotip üzerine etkisi araştırılmıştır. Hastalara ait kan örneklerinden lenfosit, monosit, PBMC, nötrofil, T ve B lenfosit hücreleri saflaştırılmıştır. Hücreler Lipopolisakkarit (LPS) ile uyarılarak mutant ve normal mRNA ekspresyon seviyeleri qRT-PZR yöntemi ile incelenmiştir. Aynı zamanda ADA2 enzim aktivitesi ölçümü de yapılmıştır.

Bu çalışma ile mutant mRNA ekspresyon seviyesi ile hastalığın şiddeti arasındaki ilişkinin aydınlatılması hedeflenmektedir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Adenozin Deaminaz 2 Eksikliği (DADA2)

DADA2, ADA2 genindeki bialelik mutasyonların neden olduğu otozomal resesif olarak kalıtılan monogenik otoinflamatuvar bir hastalıktır (1,2). ADA2, endotel hücreleri için bir büyüme faktörüdür ve M2 makrofajların farklılaşmasında rol oynar. Bu enzimin eksikliği, vasküler bütünlüğün azalması, pro-inflamatuvar M1 makrofajların baskın olması ve tümör nekroz faktörün (TNF) aracılık ettiği perivasküler inflamasyon ile sonuçlanır. Bazı hastalarda inme atakları erken çocuklukta başlar ve beynin derin bölgelerini etkileyebilir.

DADA2’de yaygın olarak vaskülopati ve felç görülür (3–5). Hematolojik ve immünolojik bulguları arasında Diamond-Blackfan anemisi (DBA) benzeri fenotip (3,6,7), lenfopeni (8), nötropeni (5,7,9–13), pansitopeni (6,7,11), Coombs pozitif hemolitik anemi (6), otoimmün sitopeni (5,7,12,14,15), hemofagositik lenfositosis (14,16), hücrel immün yetmezlik (8) ve hipogamaglobulinemi (3,7,14,16) bulunur.

2014 yılında iki bağımsız grup (14,17), ADA2’de hastalıkla ilişkili mutasyonları olan 34 hastayı tanımlamıştır. Son yıllarda ise literatürde farklı kökenden 170’den fazla etkilenen birey rapor edilmiştir (18). ADA2’nin zararlı varyantlarının allel frekanslarına bakıldığında, DADA2’nin in-silico olarak tahmini prevalansı 4:100.000’den daha yüksek olabilir (18).

Zhou ve arkadaşları (14) birbiriyle ilgisi olmayan üç hastada aralıklı ateş, erken başlangıçlı laküner felç ve diğer nörovasküler belirtiler, liveoid döküntü, hepatosplenomegali ve sistemik vaskülopati sendromu gözlemlemiş ve hastalığın erken çocukluk döneminde ortaya çıkması nedeniyle genetik bir nedenden şüphelenmişlerdir. Yaptıkları çalışmada bu üç hastada ve etkilenmemiş ebeveynlerinde tüm ekzom dizileme yapmışlardır. Ardından benzer fenotipli üç hastada, ayrıca PAN’lı iki genç kardeşte ve küçük damar vaskülitli bir hastada aday gen dizileme yapmışlar ve hastalardan alınan numuneler üzerinde enzim deneyleri, immüno blotlama, immünohistokimyasal testler, akış sitometrisi ve sitokin profillemesi çalışmalarını gerçekleştirmişlerdir. Protein fonksiyonunu incelemek için ise zebra balıklarında morfolino aracılı knock-out’lar ve insan dermal endotel hücreleri ile kültürlenmiş U937 hücrelerinde kısa saç tokası RNA nakavtları kullanmışlardır. Çalışma sonucunda dokuz

hastanın hepsinde CECR1'de ADA2'yi kodlayan ve zararlı olduğunu düşündükleri resesif olarak kalıtsal mutasyonlar saptamışlardır. Bu mutasyonların sağlıklı kontrollerle kıyaslandığın ya nadir olarak bulunduğunu ya da hiç bulunmadığını tespit etmişlerdir. Altı hastanın sekiz CECR1 mutasyonu (A109D, Y453, G47A, R169Q, H112Q, M1T, I93T7, 28 kb delesyon) için bileşik heterozigot, PAN veya küçük damar vaskülit olan üç hastanın p.Gly47Arg (G47R) mutasyonu için homozigot olduğunu göstermişlerdir. Hastaların kanında ise ADA2 ve ADA2'ye özgü enzim aktivitesi düzeylerinde belirgin bir azalmanın olduğunu saptamışlardır. Tüm bu veriler ışığında CECR1'de fonksiyon kaybı mutasyonlarının, erken başlangıçlı tekrarlayan inmeden sistemik vaskülopatiye veya vaskülite kadar değişen bir dizi vasküler ve inflamatuvar fenotip ile ilişkili olduğunu bulmuşlardır. Navon ve arkadaşları (17) ise otozomal resesif kalıtımla uyumlu olan, sistemik ve kutanöz PAN vakaları bulunan Gürcü-Yahudi ya da Alman kökenli çok sayıda etkilenen ailede ekzom dizileme ve 3'ü Gürcü-Yahudi, 14'ü Türk kökenli ailede hedefli dizileme gerçekleştirmişlerdir. Hastalardan alınan serum örneklerinde mutasyonların enzimatik aktivite üzerindeki etkisini ve protein yapısını analizi etmişlerdir. Ayrıca memeli hücrelerinde ekspresyonu gerçekleştirmiş ve proteini saflaştırarak biyofiziksel analizlerini gerçekleştirmişlerdir. Sonuçlara bakıldığında tüm ailelerde vaskülite, ADA2'yi kodlayan gen CECR1'deki resesif mutasyonların neden olduğunu göstermişlerdir. Tüm Gürcü-Yahudi hastaların Gly47Arg mutasyonu için homozigot, Alman hastaların Arg169Gln ve Pro251Leu mutasyonları için bileşik (compound) heterozigot ve bir Türk hastanın Gly47Val ve Trp264Ser mutasyonları için bileşik heterozigot olduğu gösterilmiştir. Ayrıca hastalardan alınan serum örneklerinde ADA2 aktivitesinin azaldığını göstermişlerdir. Tüm bu sonuçlar ile ADA2'nin resesif fonksiyon kaybı mutasyonlarının oldukça değişken klinik ekspresyonla PAN vaskülopatisine neden olabildiğini bulmuşlardır.

DADA2 fenotipi tanımlanmasından bu yana sadece vaskülit değil aynı zamanda immün yetmezliği ve hematolojik bulguları da içerecek şekilde önemli ölçüde genişlemiştir. Oküler tutulum oldukça değişkendir ve görme kaybı ve internükleer oftalmopleji de dahil olmak üzere okülomotor palsi (19,20) gibi altta yatan serebrovasküler hastalığa sekonder birçok semptom vardır. Oküler tutulum şaşılık (3,16), konjonktivit (10), üveit, papillit (19) ve optik nevriti de içermektedir (16,21,22).

DADA2 ayrıca livedo retiküleristen makülopapüler döküntü, nodüller, purpura, eritema nodozum, Raynaud fenomeni, ülseratif lezyonlar ve dijital nekroza kadar değişen farklı olası cilt belirtileri ile ilişkili, ateş ve akut faz reaktanlarında yükselme ile birlikte kronik veya tekrarlayan sistemik inflamasyon ile de karakterizedir (14,17).

Çoğu DADA2 hastasında hem periferik hem de merkezi sinir sistemini etkileyen nörolojik tutulum tanımlanmıştır. Bazı hastalarda geçici iskemik atak (GİA) tanımlanmıştır (negatif serebral BT ve/veya MRG ile), diğerlerinde ise iskemik veya hemorajik inme gelişmiş, birkaç vakada ventriküler kanama da tespit edilmiştir. Tipik olarak, DADA2 ile ilişkili felçler, birkaç vakada klinik olarak sessiz epizodlardan kalıcı bir sakatlığa yol açan şiddetli olanlara kadar geniş klinik belirtiler gösterir (14,17,23,24). Nöropati, geçici bir mononöritten (kraniyal sinir geçici felci gibi) kalıcı bir polinöropatiye kadar değişir. Çoğu hastada; karın ağrısı, önemli kilo kaybı, kronik gastrit, hepatomegali, splenomegali, portal hipertansiyon, bağırsak perforasyonu veya darlığı gibi gastrointestinal belirtiler bulunur. Bu durumda nefrojenik hipertansiyon oldukça yaygın olmakla birlikte, az sayıda hastada fokal glomerüloskleroz ve renal amiloidoz da tanımlanmıştır (16). Bir hastada nekrotizan pnömoni (ölümcül) ile akciğer tutulumu bildirilmiştir (16). Kan testlerinde genellikle akut faz reaktanlarında yükselme, düşük hemoglobin düzeyleri ve nötrofilik lökositöz saptanmıştır (14,17). Ayrıca az sayıda hastada sitopeni (pansitopeni, lökopeni) saptanmıştır (5,14,24). Bazı hastalarda IgM'yi veya tüm Ig alt sınıflarını etkileyebilecek hipogamaglobulinemi mevcuttur (14,25).

Deri biyopsisi ile, çoğu durumda, poliarteritis nodosa ile aynı histopatolojik özelliklere sahip, küçük ve orta büyüklükte damarların granüloamatöz olmayan, nekrotizan vaskülit tanımlanmıştır (14,17,26).

2.2. Klinik Bulgular

2.2.1. Vaskülit/Vaskülopati

Küçük ve orta büyüklükteki arterlerin vaskülopatisi DADA2'nin başlıca klinik özelliğidir. Deri ve sinir sistemi en sık etkilenen yerler olmakla beraber dokular çeşitli derecelerde (gastrointestinal, karaciğer, böbrek, koroner) etkilenir. Hastaların %50'sinde artmış eritrosit sedimentasyon hızı (ESR) veya C-reaktif protein (CRP) ile ateş bildirilmiştir.

Kutanöz bulgular DADA2'nin en sık görülen özelliğidir ve hastaların >%75'inde görülür. Kutanöz PAN'lı hastaların deri biyopsisinde küçük veya orta büyüklükteki kas arterlerinin granüloamatöz olmayan, nekrotizan arteriiti saptanmıştır (14,17). Nodüler döküntü ve maküler eritem gibi diğer spesifik olmayan deri döküntüleri de tarif edilmiştir.

Vaskülit karaciğer, böbrek ve diğer organları da etkileyebilir. Birkaç vaka serisinde arteriyel hipertansiyon, renal damar arter anevrizması, renal arter darlığı, yoğun lenfositik infiltrasyonlu böbrek iltihabı ve glomerüler yara izi (scarring) bildirilmiştir (14,17,27). Nadir olarak bağırsak nekrozu, bağırsak perforasyonu, darlık veya mezenterik arter/çölyak arter anevrizması görülür (14,17,28,29). Karaciğer hastalığı DADA2'nin bir diğer önemli özelliğidir. Hastaların <%10'unda artmış transaminazlar, hepatosplenomegali ve portal hipertansiyon gözlenir (14,30).

2.2.2. İmmün Yetmezlik

DADA2 ile ilgili ilk çalışmalarda inflamatuvar fenotip baskındır. Zhou ve arkadaşları tarafından hastaların bir alt grubunda düşük immünoglobulin (Ig) M düzeyleri ile hipogammaglobulinemi bildirilmiştir (14). Ayrıca, periferik kandaki bellek (memory) B hücrelerinin sayısında azalma ve CD40L ve interlökin (IL)-21 ile stimülasyonu takiben B hücrelerinin ve immünoglobulin salgılayan hücrelerin terminal farklılaşmasında bir azalma olduğunu belirtmişlerdir. Schepp ve arkadaşları 10 yaşından önce yaygın değişken immün yetmezlik (CVID) ve immün yetmezlik başlangıcı ile başvuran hasta kohortlarında DADA2'li dokuz hasta tanımlamışlardır (25,31). DADA2'deki immün yetmezliğin patofizyolojisi belirsizdir. Bu durum için bir hipotez, inflamatuvar durumun B hücresi farklılaşmasını ve fonksiyonunu inhibe ettiği yönündedir.

Lenfoproliferasyon DADA2'nin bir diğer önemli özelliğidir. Tipik olarak, hastalar jeneralize lenfadenopati (>%10) ve splenomegali (en fazla 30%) ile başvururlar (5,6,31,32,7,10,12,14,19,21,23,24). Son zamanlarda, otoimmün lenfoproliferatif sendroma (ALPS) benzeyen bir fenotipi olan hastaların biallelik DADA2 ile ilişkili mutasyonları olduğu bildirilmiştir (5,32). Ayrıca, Trotta ve arkadaşları DADA2'li hastalarda T hücreli büyük granüler lenfosit (T-LGL) fenotipinin varlığı bildirilmiştir.

Hastaların %10'unda otoimmün özellikler ve pozitif otoantikörler, özellikle geçici pozitif lupus antikoagülanı mevcuttur. Bir hastada sistemik lupus (SLE) fenotipi tanımlanmıştır (25,31).

2.2.3. Hematolojik Hastalıklar

Bazı hastalarda sitopeni, hastalığın ilk belirtisi veya eşlik eden bir özelliğidir. Saf kırmızı hücre aplazisi (PRCA) başlangıçta üç hastada Hashem ve arkadaşları, Ben-Ami ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir (3,6). DADA2'deki şiddetli anemi tipi DBA'ya benzeyebilir. Bu aşamada, bu hematopoetik özelliklerin gerçek kemik iliği aplazisiyle veya otoimmünite ile ilişkili olup olmadığı açık değildir.

Ciddi nötropeni bir diğer önemli bulgudur ve hastaların %10'una kadar bildirilmiştir (5,7,9–12). GATA2 eksikliği nedeniyle MonoMac sendromunu düşündüren özelliklerle başvurmuş, daha sonra moleküler olarak DADA2 tanısı almış bir hasta bildirilmiştir (8). Kemik iliği biyopsilerinde retiküler fibrozis ve karakteristik lenfoid agregatlar saptanmıştır (6,9,12,14). Bu nedenle DADA2, yetişkinlerde ve inflamatuvar bir fenotip yokluğunda bile ayırıcı tanıda veya kemik iliği yetmezliğinde ve idiyopatik aplastik anemide de düşünülmelidir.

2.3. Epidemiyoloji

DADA2'li hastaların çoğunluğu missense mutasyonlar için bileşik heterozigottur. En sık görülen hastalık varyantları p.Gly47Arg (p.G47R), p.Gly47Ala (p.G47A), p.Arg169Gln (p.R169Q) ve p.Tyr453Cys'dir (p.Y453C) (14,17). Bu mutasyonlar farklı kökenlere sahip hastalarda bulunabilir, ancak bazıları kurucu popülasyonlarda daha yaygındır. Homozigot p.G47R mutasyonu Gürcü-Yahudi hastaların hepsinde ve erken başlangıçlı PAN'lı Türk hastaların çoğunda tanımlanmıştır (17). p.G47R mutasyonunun tahmini taşıyıcı sıklığı Gürcü-Yahudi popülasyonunda % 10, Türk popülasyonunda ise %0,2. Bu varyant Avrupa popülasyonunda bildirilmemiştir. p.R169Q varyantı Hollanda, Belçika ve Finlandiya popülasyonlarında kurucu mutasyon iken, p.Thr360Ala İtalyan hastalarda daha yaygındır (12,24,29). Taşıyıcı sıklığı Kuzey Avrupa popülasyonlarında yaklaşık 1:500, Afrika ve Latin popülasyonlarında daha düşüktür ve Asya popülasyonlarında ise yoktur. DADA2 hastaları birçok popülasyonda tanımlanmış olmasına rağmen, hastalık tanısı yetersiz kalmaktadır.

Artan genetik sıklığın bu alt kümelerinin sadece kurucu popülasyon etkilerini değil, aynı zamanda daha küçük popülasyonların göreceli izolasyonunu ve zararlı etkileri olan varyantların genişlemesine yol açabilecek popülasyon genişlemesini yansıttığı düşünülmektedir (27). Genel olarak, DADA2'li hastalar, Japonya, Singapur, Çin, Fas, Brezilya, Orta Doğu, Avrupa ve Kuzey Amerika dâhil olmak üzere küresel olarak tanımlanmıştır.

2.4. Patofizyoloji

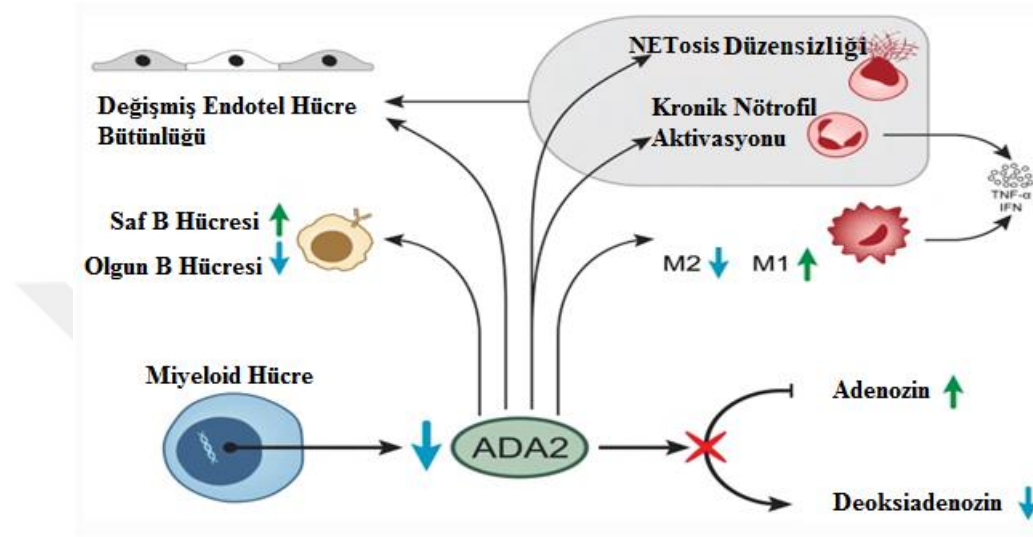
Nötrofillerin adenoazin reseptörleri vardır. İki DADA2 hastasında nötrofil türevli genlerin aşırı ekspresyonuna ve periferik kanda artmış interferonla (IFN) uyarılmış gen transkriptlerinin bulgularına dayanarak DADA2'nin vaskülopati bileşeninin arkasında nötrofil aktivitesinin kronik artışı olduğu düşünülmektedir. Nötrofil aktivasyonu, endotel hücre bütünlüğünün azalmasına neden olabilmektedir (28).

Adenoazin metabolizmasındaki değişiklikler DADA2'li hastalarda NETosis eğilimine neden olur (33). DADA2'li hastalarda NETosis eğilimi olan nötrofillerin bir alt kümesi olan düşük yoğunluklu granülositlerin de dolaşımında arttığı gösterilmiştir (33). NETosis ayrıca TNF- α 'nın makrofaj salınımını da artırır (33).

DADA2 hastalarında, miyeloid hücrelerin dengesini ve farklılaşmasını korumada ADA2'nin fizyolojik rolüne bağlı olarak pro-inflamatuar M1 makrofajlarının belirgin artışı söz konusudur (34). Monosit-makrofaj popülasyonunun bu polarizasyonunun pro-inflamatuar sitokinlerin salınmasına neden olduğu ve doku hasarına yol açtığı düşünülmektedir (14,35).

DADA2'li hastalarda birkaç anahtar pro-inflamatuar sitokin artışı tanımlanmıştır. Hem periferik hem de etkilenen dokularda artmış TNF- α görülmüştür (17,21). TNF- α sekresyonunun ağırlıklı olarak pro-inflamatuar makrofajlardan ve kronik olarak aktive nötrofillerden kaynaklandığı düşünülmektedir (14,28). Aplastik anemili hastalarda kemik iliği yetmezliğinde TNF- α 'nın rolü olabileceğinden, hastalığın hematolojik bulgularını açıklayan mekanizmanın artmış TNF- α seviyeleri olduğu düşünülmüştür (36). DADA2'li hastalarda ayrıca tip 1 IFN ile uyarılmış genlerin ifadelerinin arttığı gösterilmiştir (19,28,37–39). Tip 1 IFN tedaviden sonra azalır (37) ve DADA2 aktivitesi için bir biyobelirteç olarak yararlı olabilir. Ayrıca periferik kanda artan sitokinler arasında IL-6 (5,32,40,41), IL-8 (41) ve IL-10 (34,42) bulunmaktadır.

Birçok DADA2 hastasında NK, NKT ve CD16 pozitif monositlerde bir azalma olduğu gösterilmiştir (43). Bazı çalışmalar, bellek (memory) B hücrelerinin azaldığını göstermektedir. Buna karşılık saf B hücresi alt kümeleri artmış veya normal seviyelerde olabilir. (14,31,44). Bu da anormal B hücresi gelişimi ve farklılaşmasının da DADA2'nin patogenezinin bir parçası olduğunu düşündürmektedir (Şekil 2-1).



Şekil 2-1: Adenozin deaminaz 2 (DADA 2) eksikliğinin patofizyolojisi (45)

Adenozin deaminaz 2 (ADA2), enzim seviyesinde ve / veya enzim aktivite seviyesinde azalma olan miyeloid hücreler tarafından üretilir. Yetersiz ADA2 aktivitesi, adenozinin, deoksiadenozine deaminasyonunda ve hücre dışı adenozin birikiminde azalmaya yol açar. NETosis eğilimi, kronik nötrofil aktivasyonu ve M2 makrofaj alt tipinden pro-inflamatuar M1 alt tipine polarizasyon, TNF-α, IFN ve daha küçük kohortlarda interlekin (IL)-6, IL-8 ve IL-10 dahil olmak üzere inflammatuar sitokin üretiminin artmasına neden olur. NETosis eğilimi ve kronik nötrofil aktivasyonu da endotel hücre bütünlüğünün azalmasına katkıda bulunabilir. DADA 2'de, olgun B hücrelerinin azalmasıyla naif B hücrelerinin sayısında bir artış kaydedilmiştir.

2.5. Genotip-Fenotip Korelasyonu

DADA2 hastalarının yayınlanmış vaka örnekleri, nedensel mutasyonların protein fonksiyonu üzerindeki etkisi ve rezidüel enzimatik aktivite ile tam olarak açıklanamayan büyük bir fenotipik değişkenlik içermektedir. Aynı kurucu mutasyon için homozigot olan hastalar değişken başlangıç yaşı, sıklığı ve semptom ağırlığına sahip olabilir (24). Irak kökenli büyük bir ailede, homozigot mutasyonları olan dört yetişkin aile üyesi semptomsuz bulunmuştur (27). Bu durumda hastalığın ortaya çıkmasında ve ekspresivitesinde, diğer genetik ve epigenetik ve çevresel faktörlerin rol oynadığı söylenebilir.

DADA2 hastalarının ebeveynleri tipik olarak etkilenmez, bu da normal enzimatik aktivitenin %50'sinin protein fonksiyonları için yeterli olduğu anlamına gelir. ADA2 mutasyonu için heterozigotluğun geç başlangıçlı inme, poligenik vaskülit ve diğer kardiyovasküler hastalıklara yatkın olup olmadığı araştırılmaya devam etmektedir. Genom çapında ilişkilendirme çalışmaları (GWAS) ile bu gen lokusundaki ortak varyantları vasküler bozukluklarla ilişkilendirme ile ilgili olumlu bir sonuç sağlanamamıştır (46,47).

Bununla birlikte, birkaç genotip-fenotip korelasyonu ileri sürülmüştür, ancak bu korelasyonlar yeni keşfedilen fenotipik bulgular, eksik penetrans, epigenetik düzenlenme, gen ekspresyonunu etkileyen çevresel faktörler ve iki farklı mutasyon için bileşik (compound) heterozigotluk ile karmaşık bir hal almıştır. Saf kırmızı hücre aplazi ve kemik iliği hastalığı olanlar, enzim ve/veya minimal rezidüel enzim aktivitesi, insersiyon/delesyon, nonsense veya missense mutasyonlar da dâhil olmak üzere tam işlev kaybına yol açan mutasyonlara sahipken, vaskülit-baskın fenotiplerde bir miktar rezidüel ADA2 enzimatik aktivitesi ve daha sık missense mutasyonları görülmüştür (48). Önerilen üç kategoriden biriyle ilişkili görünen bazı genotipler olsa da, Lee ve arkadaşları, DADA2'nin belirgin fenotipler yerine bir spektrumu temsil ettiğini öne sürmektedir.

2.6. Tanı

DADA2 tanısını doğrulamak için ADA2 aktivite düzeyi ve/veya genetik analiz kullanılmaktadır. Enzim aktivite testi düzeyi büyük ölçüde hasta plazmasının adenozinden üretilen inozin miktarına dayanır. Bazı çalışma grupları, plazmanın Guthrie filtre kartlarına uygulandığı kurutulmuş plazma spot yöntemini kullanmaktadır (25). Filtre kartları kurutulduktan sonra yüksek performanslı sıvı kromatografi ile enzim aktivitesi belirlenmektedir (14).

Genetik testler, ister gen hedefli ister kapsamlı genomik analizler olsun, tanıyı doğrulamaya yardımcı olabilir. Birçok çalışmada, ADA2 için hedeflenen gen dizilemesi ve/veya daha kapsamlı dizileme yapıldıktan sonra gen içindeki belirlenen mutasyonu doğrulamak için Sanger dizileme kullanılmaktadır (49). Diğer bazı çalışmalarda ise, tüm ekzom (WES) veya tüm genom dizileme (WGS) dâhil olmak üzere yeni nesil dizileme (NGS) kullanılmıştır (50). Kapsamlı genomik testler, tanıyı değiştirebilecek diğer genetik mutasyonların saptanmasına da olanak tanır. Rama ve arkadaşları,

DADA2 şüphesi yüksek olanlarda ileri genetik testler için bir tanı algoritması ileri sürdüler. İnflamasyon özellikleri (örneğin, ateş ve yüksek CRP), vaskülitin kutanöz veya nörolojik özellikleri ve erişkinlerde tekrarlayan veya kronik hastalık seyri olan hastalar, ADA2 geni hedefli Sanger dizilemesini önerdiler (19).

Şu anda, ADA2 tarama kararı büyük ölçüde hekimin takdirine dayanmaktadır. Bazıları erken başlangıçlı olanlarda (10 yaştan altında), PAN'lı diğer aile bireylerinde, bazı belirtilerde (cilt, nörolojik, serebral veya kanama) veya dirençli hastalığı olan hastalarda tarama yapılmasını önermiştir (51). 117 erişkin başlangıçlı PAN hastasının Kuzey Amerika kohort taraması, hastaların %3'ünden fazlasının ADA2 gen mutasyonları için homozigot veya bileşik heterozigot olduğunu göstermiştir (31). Yetişkin başlangıçlı PAN'da DADA2 prevalansı düşük olsa da, PAN, arteriyel inme, hematolojik bulgular veya immünolojik bulgular için ailesel yatkınlığı olanlarda göz önünde bulundurulabilir.

2.7. Tedavi

DADA2 yeni tanınan bir durumdur ve şimdiye kadar açıklanan hasta sayısı sınırlıdır; bu nedenle tedaviye yanıt halen tartışmalıdır.

Geçmişte, erken başlangıçlı PAN ve tekrarlayan inmeli hastalarda şiddetli sistemik inflamasyonu kontrol etmek için immünosupresif tedaviler kullanılmıştır. Tedavinin temel dayanağı olan steroidlerle başarı oranı değişkenlik göstermiştir (14,17). Bir makalede, Türk popülasyonunda yaygın olan Ailevi Akdeniz Ateşi ile ilişkili mutasyonun taşıyıcısı olan ve kolşisine iyi yanıt veren PAN'lı bir hasta bildirilmiştir (30). Tocilizumab ile Anti-IL-6 tedavisi, Castleman benzeri belirtileri olan bir DADA2 hastasında inflamasyonu kontrol etmede başarılı olmasına rağmen, tocilizumab ile tedavi edilen diğer DADA2 hastalarında tekrarlayan inme bildirilmiştir (52,53). Diğer vaka raporları, immün sistemi baskılayıcı ilaçlar sirolimus ve mycophe nolate mofetil ile kısmen başarılı tedaviler olmuştur.

Şu anda, tedavinin temeli anti TNF ajanlarından (etanersept, infliksimab, adalimumab) oluşmaktadır. Bildirilen tüm hastalarda biyolojik TNF inhibitörleri ile yapılan tedavi ateş ataklarını, vaskülopatiyi ve felçlerin önlenmesini kontrol etmede başarılı olmuştur. İnme görülen hastalar için standart bakımın aksine, hemorajik inme potansiyel bir komplikasyon olduğundan asetil salisilik asit ve diğer antikoagülanlarla tedavinin kesilmesi önerilir (14). Sitopeni (ITP veya nötropeni) kontrolünde rituksimab

kullanımı değişken başarı ile bildirilmiştir. Belgelenmiş hipogamaglobülinemi ve klinik immün yetmezliği olan hastalarda immünoglobulin replasmanı, antibiyotik ve antiviral tedavi rutin olarak kullanılmıştır (31,54).

ADA2 plazmada bulunduğundan, ADA2 aktivitesinin yerine taze donmuş plazma infüzyonları düşünölmüştür. Bununla birlikte, ADA2'nin yarı ömrü bu yaklaşımı daha az uygulanabilir kılmaktadır (55).

Daha kesin bir tedavi olarak, HSCT'nin DADA2'nin hem immünolojik hem hematolojik hem de vasküler fenotipini kontrol altına aldığı bildirilmiştir.

Potansiyel olarak yıkıcı komplikasyonları önlemek için erken tedavi önemlidir. Spesifik hematolojik ve immünolojik fenotiplerin vaskülitik fenotipleri olanlarla aynı tedavilere yanıt vermeyebileceği yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (48). Vaskülitik-baskın fenotipi olan hastalar için TNF- α inhibisyonunun oldukça etkili olduğu gösterilmiştir (35,51,56). Anti-TNF- α tedavisinin inmeye karşı güçlü koruyucu etkileri vardır (56,57). TNF- α inhibitörlerinin ADA2 enzim aktivite düzeyleri üzerinde belirgin bir etkisi yoktur (56). Özellikle vaskülit ve merkezi sinir sistemi bulguları olanlarda tedavinin kesilmesiyle nüks riski nedeniyle TNF- α inhibitörlerinin uzun süreli ve muhtemelen ömür boyu kullanılması önerilmiştir (56).

İmmün yetmezlik ve sitopeni kaynaklı fenotipleri olan hastalar TNF- α inhibisyonuna daha az duyarlı olma eğilimindedir. Bu hastalar HSCT için aday olabilirler. HSCT için bildirilen komplikasyonlar arasında akut/kronik graft-versus-host hastalığı, viral reaktivasyon, HSCT sonrası ciddi enfeksiyonlar, HSCT sonrası otoimmün fenomenler ve epifiz bezi kanaması gösterilebilir (5,7,8,34). Peritransplant döneminde DADA2'de artmış inflamasyon potansiyeli engraftasyonu ve transplantasyonun genel başarısını etkileyebilir (5). Bu artan inflamatuvar durum, nakil öncesi ve sonrası dönemlerde serebrovasküler hastalık (cerebrovascular accident, CVA) riskini de artırabilir (5).

Aylık taze dondurulmuş plazma infüzyonları ADA2 seviyelerinin yerini alır, ancak uzun süreli etkinlik için uygun değildir (52,56,57). Anti-trombosit tedavisi Kawasaki hastalığında başarılı bir şekilde kullanılsa da, bu tedavilerin hemorajik enfarktüsleri kötüleştirmesi veya DADA2'li hastalarda iskemik enfarktüslerin hemorajik dönüşümüne yol açma potansiyeli vardır.

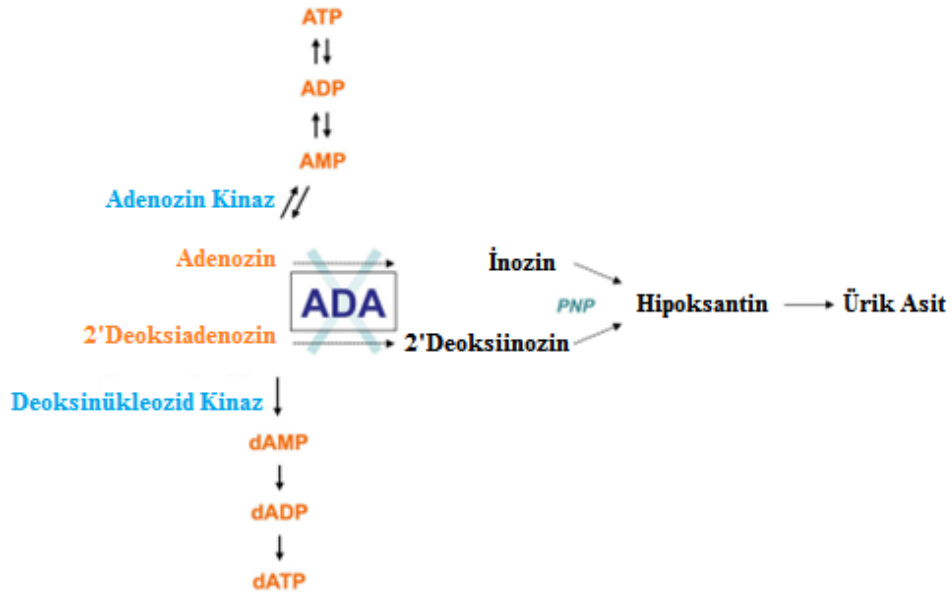
Otolog gen tedavisi için viral vektörlerin kullanılmasıyla hasta kök hücreleri genetik olarak düzenlenerek DADA2 için çekici bir terapötik seçenek sağlamaktadır. Zoccolillo ve ark. yaptıkları bir çalışmada DADA2'de bu yaklaşımı araştırdı ve lentiviral (LV) aracılı ADA2 gen transferinin hasta hematopoietik kök progenitör hücrelerinde (HSPC) ADA2 enzimatik aktivitesini geri kazanabileceğini ve makrofaj inflamatuvar aktivasyonunu düzeltebileceğini gösterdi (58).

Özellikle geniş hastalık yelpazesi ve hastalık şiddeti göz önüne alındığında, hastaların ne zaman tedavi edileceğine dair bir kılavuz yoktur. Sağlıklı heterozigotlar, genellikle indeks vakaların sağlıklı aile üyeleri ve genetik olarak kanıtlanmış asemptomatik DADA2 hastaları, herhangi bir DADA2 semptomunun gelişimini izlemek için güvenli olabilir. Bu hastalar için, hastalığın erken başlangıcında bir TNF- α inhibitörü başlatmak, yıkıcı komplikasyonları önleyebilir.

2.8. Adenozin Deaminaz (ADA)

ADA tüm hücre tiplerinde mevcut olmasına rağmen, enzim aktivitesi dokular arasında önemli ölçüde farklılık gösterir. İnsanlarda en yüksek miktarlar lenfoid dokularda (Özellikle T-lenfositler olmak üzere lenfositlerdeki düzeyi eritrositlerden 10 kat daha yüksektir), timusta, beyinde ve gastrointestinal sistemde bulunur. 1956 yılında Max Wintrob; lenfosit ve fonksiyonlarını anlattığı yazısında lenfositlerin lenf nodüllerinde stratejik pozisyonda olduklarını, adenozinaz enziminden zengin olmaları nedeni ile lenfositlerin toksik ürünlerin yıkımının gerçekleştiği önemli yerler olduğunu ileri sürmüştür (59). Böylece yaklaşık 36 yıl önce ADA eksikliği ile immün fonksiyon arasındaki ilgiye işaret edilmiştir (59).

ADA, adenozinin (Ado) inozine ve 2'-deoksiadenozinin (2'-dAdo) 2'-deoksiinozine geri dönüşümsüz deaminasyonunu katalize eden pürin metabolizmasının bir enzimidir.



Şekil 2-2: Adenozin deaminaz (ADA) metabolizması (60)

Adenozinin çoğu, ATP'nin ve RNA'nın parçalanmasından oluşur veya her yerde eksprese edilen nükleozit taşıyıcıları tarafından eksojen olarak alınır. Adenozinden farklı olarak, 2'-deoksiadenozin, DNA degradasyonu ile oluşturulur ve ağırlıklı olarak ADA tarafından katabolize edilir. İnozin nükleozitinin fazla yıkımı, ya geri dönüşsüz olarak ürik asidi ya da diğer mononükleozitlere geri kurtarılabilen hipoksantini meydana getirir.

ADA'nın çeşitli metabolik rolleri de vardır ve ciddi kombine immün yetmezlik hastalığında (SCID) bu enzimin genetik eksikliği gösterilmiştir (61). ADA aktivitesinin olmaması nedeniyle, 2'-deoksiadenozin ortamda birikir ve DNA sentezinde önemli bir enzim olan ribonükleotid redüktazı (RNR) inhibe eden 2'-deoksi-adenozin-5'-trifosfata (dATP) dönüştürülür (62). ADA için ikinci substrat olan adenozin konsantrasyonu, Michaelis kostantı (K_m) değeri $\sim 1 \mu M$ olan adenozin kinaz ile hücre içinde düşük seviyede tutulur (63). Bununla birlikte, iltihaplanma veya hipoksi durumunda, düşük enerji yükü koşulları altında hücre içi ATP'den adenozin üretilir. ATP degradasyonundan kaynaklanan AMP, yüksek K_m ADA ($25-100 \mu M$) nedeniyle hızlı bir şekilde inozine deamine edilmeyen adenozine dönüştürülür (64). Bu durum, dengeleyici nükleozit taşıyıcıları (ENT'ler) yoluyla hücreden kuvvetli bir şekilde dışarı atılan geçici adenozin birikimine neden olur (65).

2.9. Adenozin (Ado)

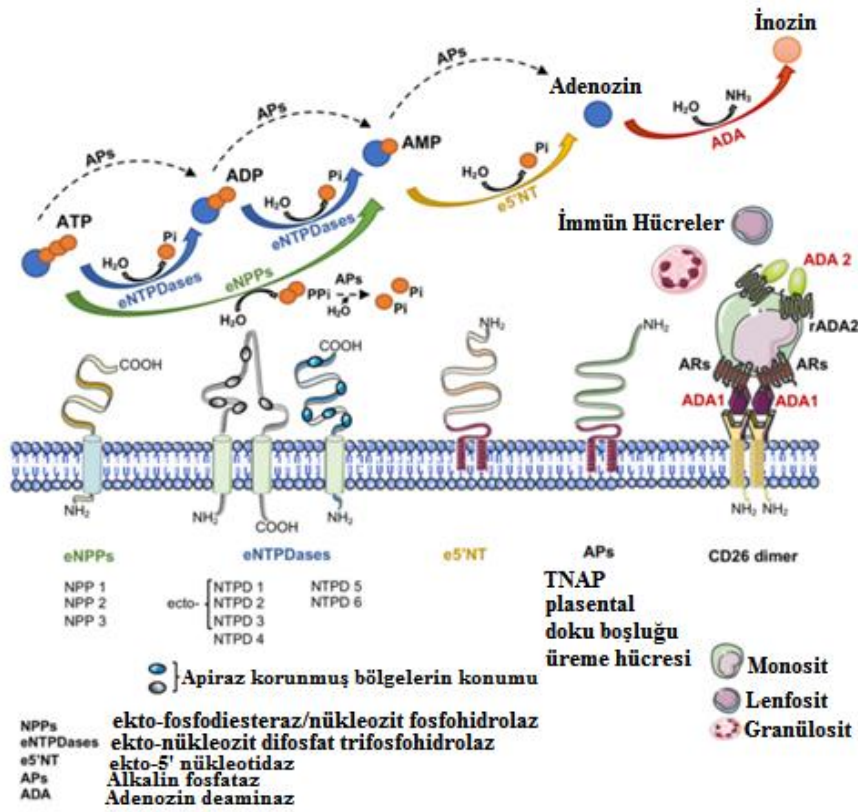
Hücre dışı Hücre dışı adenozinin önemli kaynağı, adenin nükleotitlerinin hücre yüzeyi ekto-nükleotidazları tarafından hidrolizidir (66). Nükleotidler, litik ve litik olmayan mekanizmalar yoluyla hücresel strese yanıt olarak hücre dışı bölmeye salınır (67). Bu nedenle, nükleotid indirgeyici ekto-enzimler ve transmembran adenozin taşıması ile birlikte ekto-ADA (eADA), hücre dışı adenozin konsantrasyonunun düzenlenmesinde önemli bir rol oynar.

Adenozin, anahtar düzenleyici ve sitoprotektif mekanizmalara sahip ve her yerde bulunan bir moleküldür. Adenozinin etkisine, birçok farklı hücre tipinde bulunan dört G-proteinine bağlı adenozin reseptörleri (ARs) (A1, A2A, A2B ve A3) aracılık eder (43). Reseptör aktivasyonu, hücre içi siklik AMP'de bir azalmayı (A1 ve A3) veya artışı (A2A ve A2B) tetikler ve bu da hücresel aktivasyonda bir değişiklik meydana getirir (68). Adenozinin hücresel aktivite ve lokal inflamasyon üzerindeki değişen etkisi, lokal adenozin konsantrasyonu, hücresel reseptör ekspresyon derecesi, reseptör tipi ve reseptör afinitesi arasındaki etkileşimle belirleniyor gibi görünmektedir ve bunların çoğu çevresel faktörlerden etkilenebilir (43). Adenozin yolunu manipüle eden ilaçlar inflamatuvar hastalıklarda etkili olabilir (69).

Adenozin çok sayıda fizyolojik etkisinin yanı sıra, kardiyovasküler sistem homeostazında da önemli bir role sahiptir (70). Kalbin ve damar sisteminin tüm kurucu hücrelerinde çoğunlukla adaptif ve akut tepkilere aracılık etmek için AR ailesinin üyelerini kullanır. Bu şekilde, dört AR alt tipi miyokardiyal kasılmayı, kalp hızı ve iletimini, adrenerjik kontrolü, kardiyak ve vasküler büyümeyi, inflamatuvar-vasküler hücre etkileşimlerini ve hücresel stres direncini, yaralanmayı ve ölümü düzenler (71). AR'nin tüm alt tiplerinde üç hücre içi ve hücre dışı alanı birbirine bağlayan yedi transmembran alan bulunmaktadır. Hücre dışı düzeyde, amino (N-terminal) spesifik glikosilasyon bölgeleri bulunurken, hücre içi tarafta, karboksi ucu (C-terminal), reseptör desensitizasyonu için önemli olan fosforilasyon ve palmitoilasyon bölgelerini içerir (72). Her AR, benzersiz hücre ve doku dağılımına, ikincil sinyal transdüktörlerine, adenozin afinitesine ve fizyolojik etkilere sahiptir. Tüm AR alt tipleri kardiyovasküler sistemdeki endotelde, vasküler düz kas hücrelerinde, kardiyomiyositlerde, kapak hücrelerinde bulunur (71,73,74). A1R ve A3R, ağırlıklı olarak, adenilat siklaz tarafından cAMP üretimini engelleyen G α i/o ailesine ait heterotrimerik G proteinlerini

aktive eder, A2AR ve A2BR ise, ağırlıklı olarak cAMP üretimini uyaran G α s ailesi üyelerini aktive eder (75). A1, A2A ve A3 reseptörleri, adenosin için yüksek afiniteye sahipken A2B, nispeten daha düşük afinite gösterir. Birçok çalışma hücre dışı adenosin seviyelerinin, iskemi, hipoksi ve inflamasyon gibi stresli koşullara maruz kalan dokularda düşük afiniteli reseptörleri aktive eden mikromolar konsantrasyonlara yükseldiğini göstermektedir (76). Adenozine ek olarak, kafein, teofilin ve bunların türevleri gibi doğal bitki alkaloidleri dahil olmak üzere mikromolar afiniteleri olan adenosin reseptörlerini seçici olmayan bir şekilde aktive edebildiği gösterilmiştir (77). Yapılan bir çalışmada, mikromolar konsantrasyonlarda inozinin, A1R, A2AR ve A3R yoluyla immünomodülatör ve anti-inflamatuar özellikler sergilediği gösterilmiştir (78,79). Herman-de-Sousa ve arkadaşları (80) adenosinin, A2AR yoluyla insan deri altı fibroblastları tarafından normal kollajen üretimini desteklediğini, inozinin A3R yoluyla, bağ dokusu düzensizliğini önlemek için terapötik bir hedef olarak ADA inhibisyonunu sağlayarak dermal yeniden şekillenmeyi uyardığını göstermişlerdir. Mikromolar konsantrasyonlarda inozin, adenosin için yüksek afiniteye sahip reseptörleri uyarır; bu durum, artan eADA aktivitesi için telafi edici bir anti-inflamatuar mekanizma olabilir. Ayrıca artan eADA ekspresyonu ve dolayısıyla eADA'nın AR ile güçlendirilmiş ilişkisi, agonist afinitesini ve etkinliğini allosterik olarak düzenleyebilir (81).

Enzimatik işlevinin dışında, eADA, ADA bağlayıcı proteinleri membranında eksprese eden hücreler arasındaki etkileşimlerde önemli bir enzimatik rol oynar. Bazı çalışmalarda iki hücreyi içeren dipeptidil peptidaz IV (CD26)-ADA-A2AR trimerik komplekslerinin oluştuğu gösterilmiştir (82). eADA'nın aktivitesi ile uyarıcı ve hücreden hücreye bağlantı eylemleri, endotel aktivasyonu ve disfonksiyonu, inflamasyon, miyokardiyal iskemi-reperfüzyon hasarı veya pıhtılaşma bozuklukları gibi kardiyovasküler hastalıklarla bağlantılı patolojik durumları etkileyen proliferasyon ve farklılaşma ile ilgili birçok hücresel süreci düzenler. Bu patolojiler ADA'nın aşırı ekspresyonu ile ilişkili olduğundan, aktivitesinin inhibisyonu ve ayrıca yüzey proteinlerine bağlanması, kardiyovasküler hastalıklarda terapötik potansiyel taşır.



Şekil 2-3: Adenin nükleotidlerinin ve adenosinin hücre dışı metabolizmasında rol oynayan enzimler (83)

2.10. ADA'nın Yapısı

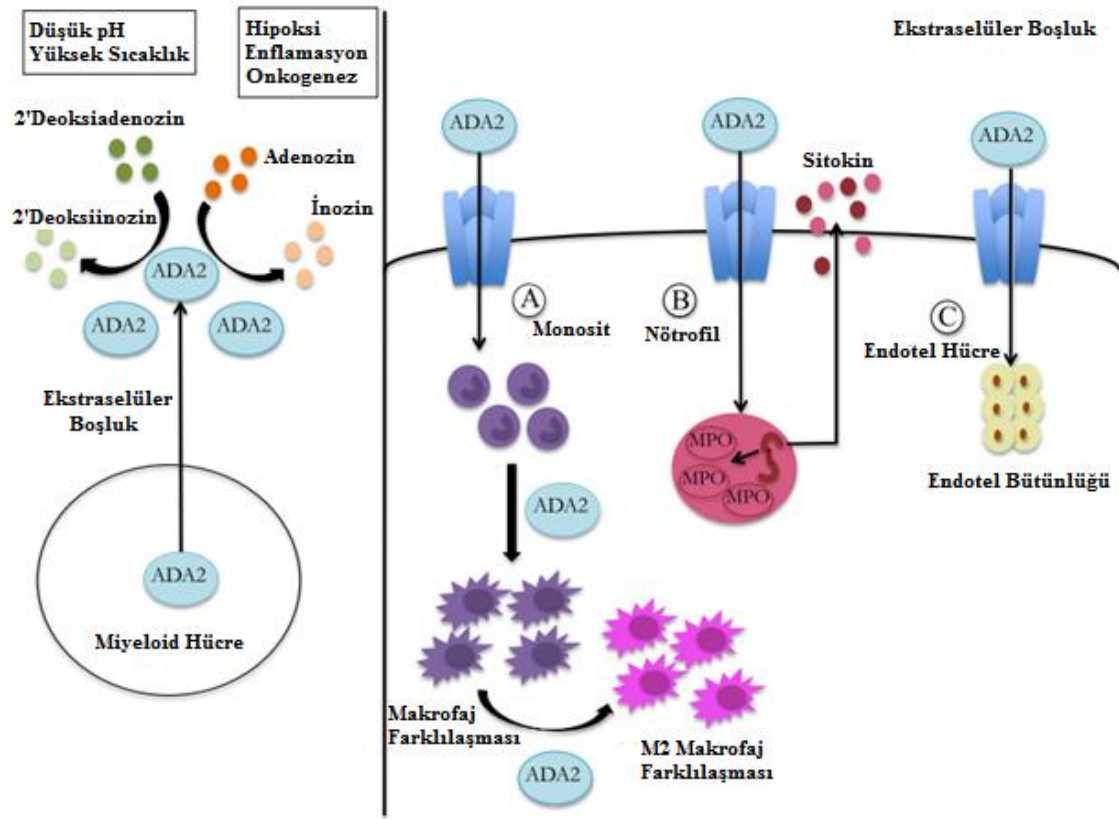
ADA'nın üç boyutlu yapısı hesaplamalı (84), kristalografik (85) ve mutajenik analizler (86) ile gösterilmiştir.

ADA, merkezi sekiz paralel β zincirini çevreleyen sekiz periferik α sarmalından oluşan triozfosfat izomeraz (TIM)-varil (barrel) veya $(\beta/\alpha)_8$ -varil yapısı olarak kabul edilir. TIM-varil yapısal iskelesi doğada her yerde bulunur ve birçok farklı enzim ailesinde görülür. ADA dahil olmak üzere birçok TIM-varil proteini, aktif bölgelerinde metal iyonları içerir (87). Aslında ADA'nın aktif bölgesinde bir Zn^{+2} iyonu vardır. Zn^{+2} iyonu biyolojik işlevinde ve düzenlenmesinde anahtar role sahiptir ve aynı zamanda protein stabilizasyonu için de gereklidir (88). ADA geninin ürünü 363 amino asitten oluşur. ADA, bakterilerden memelilere ve insana evrimsel olarak korunmuştur. İnsan ve sıgır ADA'sı yaklaşık olarak %88 amino asit dizi benzerliği gösterir (89). Bununla birlikte, çeşitli türler arasında yüksek derecede amino asit dizisi korumasına rağmen, insan ADA enzimi, murin ve bakteri homologlarından daha uzun bir karboksi terminal bölgeye sahiptir (83).

2.11. ADA İzoenzimleri: ADA1 ve ADA2

ADA'nın insanlarda iki izoformu vardır, adenosin deaminaz 1 (ADA1) ve ADA2. İnsanlardaki başlıca adenosin deaminaz, hemen hemen tüm hücrelerde bulunan ve yüksek seviyelerde sitotoksik olduğu için hücre içi boşluktaki adenosin seviyelerini azaltmak için işlev gören 40 kDa'lık bir monomer olan ADA1'dir (90). ADA1 genindeki fonksiyon kaybı mutasyonları, T ve B hücrelerinin apoptozunun artmasına neden olarak tekrarlayan enfeksiyonlara neden olur (91).

ADA2 geni tarafından kodlanan ADA2, fizyolojik durumda sadece düşük seviyelerde bulunur ve stres dönemlerinde artar (90). ADA2, hücre dışı boşluğa salgılanan 57 kDa'lık bir homodimerdir. Sinyal dizisi, dimerizasyon alanı, varsayılan reseptör bağlama (PTB) alanı ve katalitik alan olmak üzere 4 alan içermektedir. ADA2 monomerlerinin dimerizasyonu, tam enzimatik aktivite için gereklidir ve dimer, hücre yüzeyi glikozaminoglikanları (GAG) ile etkileşime girerek stabilize olur (14). PTB alanı, ADA2'nin spesifik reseptörlere bağlanmasından sorumludur, katalitik alan ise enzimin katalitik işlevi için önemlidir (14). ADA2 ağırlıklı olarak makrofajlara ve dendritik hücrelere T hücresine bağımlı farklılaşan monositler tarafından eksprese edilir (92). ADA2'nin hücre yüzeyi bağlanması ve immünolojik sinapsın oluşumu yoluyla CD4⁺ T hücrelerini ve monositleri aktive eder. Bu yönüyle sitokin benzeri büyüme faktörü özelliklerine sahip olduğu görülmektedir (92). Makrofaj proliferasyonunu uyaran ve T hücresine bağımlı olarak monositlerin makrofajlara farklılaşmasını indükleyen ADA2'nin otokrin tipi büyüme faktörü özelliklerine sahip olduğu düşünülmektedir (92). ADA2, hücre yüzeyi proteoglikanları yoluyla farklı hücre tiplerine ve adenosin reseptörleri yoluyla spesifik olarak T hücrelerine bağlanabilir (92). Yapısal olarak, ADA1 ve ADA2 benzer katalitik alanlar içerir ancak ADA2, hücre dışı alanda protein dimerizasyonuna ve hücre yüzeyi bağlanmasına sağlayan ek alanlara sahiptir (93). Protein dimerizasyon alanı, kurbağa (94) ve sinek embriyolarının (95) gelişiminde kritik olduğu gösterilen bir adenosin deaminaz büyüme faktörleri ailesi ile yapısal olarak homologdur (96). ADA2'nin endotel hücresi ve hematopoetik hücre gelişiminde rolü olduğu öne sürülmüştür, ancak bu enzim insan endotel hücrelerinde mevcut değildir (14,90,93). Bu durumun, ADA2'li hastalarda vaskülitik fenotipe yatkınlığın sebebi olarak endotel hücre instabilitesinin altında yatan neden olduğu düşünülmektedir (14,17). ADA2'nin ayrıca pro-inflamatuar (M1) ve anti-inflamatuar (M2) monositler arasındaki dengede rol oynadığı görülmektedir (Şekil 2-4).



Şekil 2-4: Adenosin Deaminaz 2'nin (ADA2) üretimi ve fizyolojik rolü (97)

ADA2, miyeloid seri hücreleri tarafından üretilir ve salgılanır. Hücre dışı alanda, özellikle düşük pH veya yüksek sıcaklıkta enzimatik aktivite gösterir. Monositlerde (a) ADA2, bir otokrin aktiviteye sahip büyüme faktörü olarak işlev görür: monositlerin çoğalmasını indükler ve M2 anti-inflamatuvar makrofajların farklılaşmasını sağlar. Nötrofillerde (b) ADA2, miyeloperoksidaz (MPO) ve bazı proinflamatuvar proteinlerin ekspresyonunu indükleyerek proinflamatuvar sitokinlerin salgılanmasına yol açar. ADA2'nin endotel hücreleri için büyüme faktörü olarak rol oynadığı düşünülmektedir (c).

ADA1 ve ADA2, kinetik ve immünokimyasal özelliklerde birbirlerinden farklılık gösterir. Ado için ADA2'nin K_m 'si 1,48 mM'dir ve ADA1'in K_m 'sinden ($< 0,1$ mM) yaklaşık 15 kat daha yüksektir. Andreasyan ve arkadaşları hem ADA1 hem de ADA2'nin aktif merkezde Zn^{+2} iyonları ile karakterize olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca asidik tarafta ADA2'nin pH profili ve pKa değerleri 4,1 ve 4,5, bazik tarafta 7,8 olarak belirlenmiştir. Gözlenen asidik taraflı pKa değerleri, pKa 3,9 ile Asp ve 4,3 ile Glu'nun ADA2 tarafından katalize edilen adenosin deaminasyonuna katıldığını göstermektedir (98).

2.12. Adenozin Deaminaz 2 (ADA2) Geni

ADA2 geni, daha önce kedigözü sendromu ile ilişkili bulunduğu CECR1 (Kedi Göz Sendromu Kromozom Bölgesi, Aday 1) geni olarak adlandırılmıştır.

ADA2 2005 yılında saflaştırıldı ve 22q11.1 kromozomunda bulunan ADA2 geni (CECR1) tarafından kodlandığı belirlendi (90,99). O zamandan beri missense, nonsense, splice site, çerçeve kayması mutasyonları, delesyonlar ve kopya numarası varyasyonları gibi çeşitli mutasyon türleri bildirilmiştir (46,100,101). 2014 ve 2020 yılları arasında, en az 67 bilinen patojenik mutasyon tespit edilmiş ve birçoğu sınıflandırılmamıştır. Ayrıca önemi bilinmeyen veya potansiyel olarak iyi huylu olan bilinen toplam 98 varyantı vardır (45). Mutasyonlar etnik kökene göre farklı bir prevalansa sahiptir (5,13,52,102,14,16,17,23–26,28). G47R mutasyonu, Gürcü-Yahudi ve Türk kökenli tüm hastalarda homozigot olarak tespit edilmiştir. R169Q mutasyonu, Avrupa Kafkas popülasyonunda daha sık tespit edilen mutasyondur (5,14,17,24,25).

Riazi ve arkadaşları (103) ekzon yakalama (exon trapping) ve genomik dizi analizi ile CECR1'i tanımlamışlardır. Bunun için bir akciğer hücre soyundan tam uzunluktaki cDNA'yı, 5-prime RACE ile klonlayarak 511 amino asit içeren bir protein elde etmişlerdir. Elde edilen bu protein böcek ve yumuşakça büyüme faktörlerine dizi benzerliği gösterdiğini saptamışlardır. Bu proteinin amino ucu (N-terminal), bir salgı sinyal peptidi ve karboksi ucu (C-terminal) bölgesinin yarısı, adenozin deaminaz ile önemli benzerlik göstermiştir. Northern blot analizi farklı şekilde ifade edilen 1,0-, 3,5- ve 4,4-kb transkriptlerin olduğunu göstermiştir. Proteinin en yüksek ekspresyonu yetişkin kalp, akciğer, lenfoblastlar, dalak ve plasentanın yanı sıra fetal akciğer, karaciğer ve böbrekte görülmüştür. Erişkin pankreas, iskelet kası ve karaciğerde ekspresyon daha zayıf ve erişkin ve fetal beyinde azdır. 35 günlük bir insan embriyosunun in-situ hibridizasyonu ile kalbin çıkış yolunda ve atriyumunda, VII/VIII kraniyal sinir gangliyonunda, notokordda ve plasentada CECR1 mRNA gösterilmiştir.

2.13. ADA Aktivitesinin İnhibitörleri

Birkaç ADA inhibitörü grubu vardır ve bunlardan bazıları şu anda klinik uygulamada kullanılmaktadır, ancak yine de bazı yan etkileri mevcuttur. Bu nedenle sitotoksik etkileri olmayan yeni ADA inhibitörleri yoğun bir şekilde araştırılmaktadır.

ADA inhibitörleri geçiş durumu inhibitörleri, temel durum bileşikleri ve nükleozit olmayan inhibitörler olarak sınıflandırılır (104). Geçiş durumu inhibitörlerinin yapısı, ADA tarafından katalize edilen deaminasyon işlemi sırasında oluşan tetrahedral ara maddenin yapısını taklit eder. Temel hal bileşikleri, endojen substrat olan adenezine benzer. Nükleozit olmayan inhibitörler ise yakın zamanda eklenmiştir ve özellikle Terasaka ve Fujisawa Pharmaceutical Company'deki ortak çalışanlar tarafından tasarlanan ve geliştirilen bir dizi imidazol-4 karboksamidi içerir (105). Ayrıca, flavonoidler gibi ilaçlar veya bitki fenolikleri dahil olmak üzere birçok başka bileşik, ADA aktivitesini güçlü bir şekilde inhibe eder.

2.13.1. EHNA-benzeri Bileşikler

Eritro-9-(2-hidroksi-3-nonil)adenin (EHNA), adeninin N9 konumunda kiral hidroksinonil zincirine bağlanmasıyla oluşturulur. Bu, yarı sıkı bir ADA inhibitörüdür ve ilk aşamada klasik yarışmalı inhibisyonu temsil ederken, daha sonra enzim ve inhibitörün sıralı yeniden düzenlenmesi ile sıkı bir ADA-inhibitör kompleksi oluşur (106). *Eritro* diastereomer *treo* olandan daha aktiftir ve EHNA'nın K_i değeri deney koşullarına bağlı olarak 1,6–7,0 nM arasında değişmektedir (107).

Lipofilik hidroksinonil zincirinin modifikasyonları optimize edilmiş ve sadece birkaç iyi sonuçlar vermiştir. Zincir C9'a kadar uzatılabilir ve ftalimido gibi bir klor atomunun veya lipofilik grubun zincire eklenmesi ile 2,7 nM (9'-kloro-EHNA) ve 0,95 nM (9'-ftalimido-EHNA) K_i değerleri elde edilmiştir (83). Yan zincirin çeşitli konumlarında bir fenil halkasının eklenmesi, yalnızca fenil halkası adenin sistemine en az iki karbon atomu ile köprülendiğinde, korunan inhibitör aktivitesi göstermiştir (108).

EHNA'nın kimyasal yapısının basitleştirilmesi, eritro-1-(2-hidroksi-3-nonil)imidazol türevlerini oluşturdu. EHNA'nın piridin veya pirimidin halkasının açılması, ADA için etkili inhibitör aktivitesi gösteren bileşikler meydana getirmiştir. Bunların arasında en güçlüsü, $K_i=0,035$ uM olan C4 (eritro-9-(2-hidroksi-3-nonil)imidazol-4 karboksamid) amido grubuna sahip bileşik olmuştur, eritro-1-(2-hidroksi-3-nonil)imidazolün kendisi ise 0,90 uM K_i değeri göstermiştir (109,110). Bu inhibitörlerin yapısına ek basitleştirmeler getirmek için, bir dizi *eritro* ve *threo*-9-(2-hidroksi-3-nonil)azol sentezlendi ve eritro 9-(2-hidroksi 3-nonil)1,2,4-triazol, 0,3 uM K_i değeri ile en güçlü etkiyi gösterdi (111).

EHNA'nın ADA izoenzimlerini ayırt etmek için en iyi bileşik olduğu düşünülmektedir. Birçok deneysel çalışmada, bu molekül sadece ADA1 aktivitesini inhibe ederken, ADA2, EHNA ve türevlerinin inhibisyonuna karşı dirençli olduğu gösterildi (112). ADA1 ve ADA2 aktif merkezlerinin yapısı arasındaki benzerlikler gösterilmiş olsa da, ADA2'de hidrofobik bölgenin olmaması EHNA bağlanmasını önleyebileceği düşünülmektedir (98).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Kitler ve Kullanılan Kimyasallar

6X DNA Loading Dye (Thermo Fisher)

Adenosin Deaminaz Aktivite Assay Kit (Colorimetric) (Sigma)

Agaroz (Sigma)

cDNA Sentez Kiti (Thermo Fisher, High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with Rnase Inhibitor)

DNA Marker (Thermo Fisher)

dNTP (Thermo Fisher)

EHNA hydrochloride (Sigma)

Etidyum Bromür (Thermo Fisher)

Fetal Sığır Serum (Fetal Bovine Serum, FBS) (Capricorn Sci.)

Lenfosit Ayırma Medyumu (1.077g/ml) (Capricorn Sci.)

Lipopolisakkarit (LPS) (Sigma-Aldrich®)

MgCl₂ (Thermo Fisher)

Monosit İzolasyon Kiti (Pan Monocyte Isolation Kit, Miltenyi Biotec.)

PBS 1X (w/o calcium and magnesium) (Wisent Multicell)

Penisilin-Streptomisin (Pen-Strep, 10,000 U/mL) (Wisent Multicell)

Primerler (Sentebiolab)

Proteaz İnhibitör tablet EDTA-free (Roche)

RNA İzolasyon Kiti (Thermo Fisher, PureLink™ RNA Mini Kit)

RPMI 1640 (with Stable Glutamine) (Capricorn Sci.)

RPMI 1640 Medium Gibco (Thermo Fisher)

SYBR Green I Master (Bioline-SensiFAST™ SYBR No-ROX Kit)

Taq DNA Polimeraz (Thermo Fisher)

Taq DNA Polimeraz PZR Buffer 10X (Thermo Fisher)

3.1.2. Kullanılan Cihazlar

Buz Makinası (Cornelius)

Buzdolabı +4 °C/-20 °C (Beko)

Buzdolabı -80 °C (Thermo Scientific)

CCD Kameralı Jel Görüntüleme Sistemi (UVP)

Distile Su Cihazı (Milipore)

Elektroforez Tankı (Biorad)

Güç Kaynağı (EC Apparatus Corporation)

Hassas Terazı (KERN Emb 200-2)

İnkübatör (Thermo Electron Corporation)

Laminar Akışlı Steril Kabin (Nuanre)

Mikroskop (Olympus)

Multiskan Spectrum (Thermo Electron Corporation)

Nanodrop 2000 Spektrofotometre (Thermo Scientific)

Nanodrop 2000 Spektrofotometre (Thermo Scientific)

Pipet Seti (Gilson)

Real Time PZR Cihazı (Light Cycler 480-II, Roche)

Santrifüj (Hettich)

Sıvı Azot Tankı (StateBourne)

Su Banyosu (Mettler)

Thermal Cycler (Techne)

Vi-Cell®XR Hücre Sayım Cihazı (Beckman Coulter)

Vorteks (Stuart)

3.2. Yöntem

Bu çalışmada ADA2 geninde daha önce yaptığımız bir araştırmada bulmuş olduğumuz c.973-2A>G mutasyonuna homozigot veya heterozigot olarak sahip bireylerden alınan kan örnekleri ile yoğunluk santrifügasyon (Ficoll-Paque) yöntemi kullanılarak periferik kan mononükleer hücreleri (PBMC) elde edildi. *Pan Monosit İzolasyon Kit (Thermo Fissher)* kullanılarak monosit ve lenfosit hücreleri ve *FACSCalibur Akan Hücre Ölçer (Becton Dickinson)* kullanılarak T ve B lenfosit hücreleri izole edildi. PBMC kısmı ayrıştırılmış hücrelerden nötrofil hücreleri izole edildi. Monosit, lenfosit ve PBMC hücreleri medyuma alındı ve hücre sayıları belirlendi. Sayılan hücreler 6 kuyulu hücre kültür kaplarında kültüre edildi ve hücrelere LPS uygulandı. LPS uygulamasından sonra inkübasyon süresi PBMC için 0., 3., 6., ve 12. saatler, monosit hücreleri için 0. ve 6. saatler, lenfosit hücreleri için ise 0., 2. ve 6. saatler olarak belirlendi. İnkübasyon sonrası hücreler RNA izolasyonu ve enzim aktivitesi ölçmek için ayrı tüplere toplandı. Tüm hücrelerden RNA izolasyonu ve cDNA sentezi yapıldıktan sonra polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ve Gerçek Zamanlı Kantitatif PZR (qRT-PZR) gerçekleştirildi. Daha sonra PZR ürünleri jel elektroforezi ile yürütüldü ve UV ışık altında jel görüntüsü alındı. Enzim aktivitesi için toplanan hücrelere ise *Adenosin Deaminaz Aktivite Assay Kit (Sigma)* protokolü uygulandı ve üç farklı zaman aralığında spektrofotometre ile enzim aktivitesi ölçüldü.

3.2.1. Hasta Bilgileri

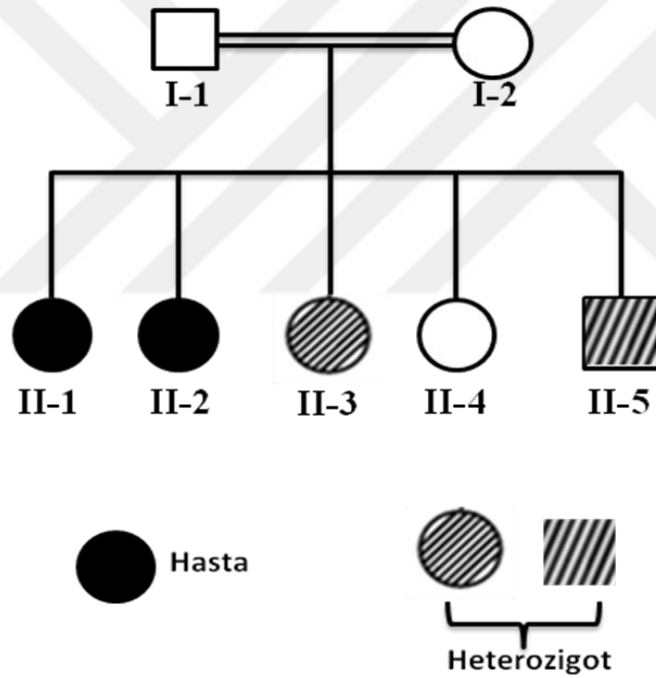
Bu çalışma için gerekli hasta örnekleri İstanbul Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Romatoloji Bilim Dalı tarafından sağlanmıştır. Çalışmada gerekli olan etik kurul onayı İstanbul Tıp Fakültesi Etik Kurulundan (Tarih: 21/08/2020, Dosya No: 2020/1052) alınmıştır. Hastalara bilgilendirilmiş onam formu imzalatılarak 10 ml kan örneği alınmıştır.

Hasta II-1, üç yaşında sol okulomotor sinir felci nedeniyle ağırlı bacaklar ve akut başlangıçlı üst göz kapağı pitozu bulguları başlamış, 13 yaşında tekrarlayan genital ülserler, eklem ağrıları ve ateş gelişmiştir. Behçet hastalığı (BH) şüphesiyle kolşisin tedavisine başlanmış ve tedaviye yanıt vermiştir. 21 yaşında, kısa süreli kortikosteroidlere yanıt veren eritema-nodozum ve vertigo atakları yaşamaya başlamıştır. 23 yaşında, ateşi ve nörolojik belirtileri kontrol altına almak ve

kortikosteroid ihtiyacını azaltmak için aylık 150 mg canakinumab ve azatioprin verilmiştir. DADA2 teşhisi konduktan sonra tedavisi adalimumab ile devam etmektedir.

Kız kardeşi (II-2) 10 yaşında eritema nodozum ve 12 yaşında tekrarlayan oral aftöz ülserler ile başvurmuş ve bunun için olası BH tanısı konulmuştur. Kolşisin ile tedavi edilmiş ve 23 yaşında oral ülser ve artraljinin ilerlemesi ve gövdesinde folikülit ve ellerinde liveoid döküntü açısından değerlendirilmiştir. DADA2 tanısı konularak anti-TNF tedavisi devam etmektedir.

Bu çalışmada Şekil 3-1'de görülen aile bireylerinden söz konusu mutasyon için 2 homozigot hastadan (II-1 ve II-2) ve bir heterozigot sağlıklı bireyden (II-3) periferik kan örnekleri kullanılmıştır. Şekil 3-1'de aile ağacında bulunan diğer tüm bireyler ise söz konusu mutasyon için heterozigot ve sağlıklıdır.



Şekil 3-1: Aile Ağacı

3.2.2. Periferik Kanda Mononükleer Hücre (PBMC) İzolasyonu

II-1 ve II-2 numaralı hastalardan onam formu eşliğinde 10 mL periferik kan örneği alındı ve aynı gün periferik kan mononükleer hücrelerinin (PBMC) izolasyonu için yoğunluk santrifüjasyon (Ficoll-Paque) yöntemi kullanıldı.

Bu yöntemde aşağıdaki protokol kullanıldı.

1. Lenfosit ayırma medyumu oda sıcaklığına getirildi ve bir falkon içerisine 15 mL alındı.
2. Medyum eklenen falkon 45°C'lik bir açılı tutularak üzerine total kan (10 mL) pastör pipeti ile faz oluşturacak şekilde damla damla eklendi.
3. Oda sıcaklığında 2100 rpm'de 25 dakika boyunca santrifüj edildi.
4. Santrifüj sonra faz oluşumu gözlemlendi.
5. Faz oluşumundan sonra PBMC, dikkatlice çekildi ve başka bir falkona alındı.
6. Serum kısmı da ayrı bir ependorf tüpüne alındı ve kullanılabilecek kadar -80°C'de saklandı.
7. Ayrı bir falkona alınan PBMC üzerine 5 mL PBS eklendi ve 1500 rpm'de santrifüj edildi ve santrifüj sonrası süpernatant atıldı.
8. Falkonun dibinde kalan pellet ise tamamen PBMC içermektedir.

3.2.3. Monosit ve Lenfosit İzolasyonu

Bu çalışmada II-1 ve II-2 numaralı hastalardan PBMC elde edildikten sonra monosit ve lenfosit hücrelerinin izolasyonu için ticari olarak temin ettiğimiz *Pan Monosit İzolasyon Kit (Miltenyi Biotec.)* kullanıldı.

Kit protokolü aşağıdaki gibi uygulandı.

1. PBMC içeren pellet falkona hafifçe vurularak iyice çözündürüldü.
2. Çözündürülen PBMC üzerine 2 mL *MACS Seperasyon Buffer* eklendi.
3. Hücre sayma tüplerine 10 µL *MACS Seperasyon Buffer* eklenmiş hücre ve 990 µL *MACS Seperasyon Buffer* eklenerek 1mL'e tamamladı ve *Vi-Cell®XR Hücre Sayım Cihazı (Beckman Coulter)* kullanılarak total PBMC sayımı yapıldı.
4. Kit protokolünde 10^7 hücre başına verilen solüsyon ve tampon miktarları, sayılan total PBMC miktarına göre değiştirildi.
5. Hücre sayımı için ayrılan hücrelerden sonra kalan hücreler 300xg'de 10 dakika boyunca santrifüj edildi ve santrifüj sonrası süpernatant iyice uzaklaştırıldı.
6. Pellet üzerine 100 µL *MACS Seperasyon Buffer* eklendi ve çözüldü.

7. 25 μ L *Biotin-Antibody Coctail* eklendi ve iyice karıştırıldıktan sonra buzdolabında (+4'de) 5 dakika boyunca inkübe edildi.

8. 75 μ L *MACS Seperasyon Buffer* eklendi.

9. 50 μ L *Antibiotin Microbeads* eklendi ve iyice karıştırıldıktan sonra buzdolabında (+4'de) 5 dakika boyunca inkübe edildi.

10. Manyetik seperasyon adımı için total hacim *MACS Seperasyon Buffer* ile 500 μ L'ye tamamlandı ve manyetik seperasyon adımına geçildi.

11. Manyetik Seperasyon kolonu manyetik alana yerleştirildi ve 500 μ L *MACS Seperasyon Buffer* ile yıkama yapıldı.

12. Yıkama sonrası total hacmi *MACS Seperasyon Buffer* ile 500 μ L'ye tamamlanan hücreler kolona eklendi.

13. 3 kere daha 500 μ L *MACS Seperasyon Buffer* ile yıkama yapıldı ve bu aşama ile ~2 mL monosit elde edilmiş oldu.

14. Lenfosit eldesi için kolon manyetik tüp taşıyıcı çıkarıldı ve toplama falkonuna alındı.

15. 1 mL *MACS Seperasyon Buffer* eklendi ve piston yardımıyla manyetik tüp taşıyıcıya takılmış olan lenfositler (~1 mL) toplanmış oldu.

3.2.4. Total PBMC, Nötrofil, T ve B Lenfosit Hücre Eledesi İçin Periferik Kanda Mononüklear Hücre (PBMC) İzolasyonu

II-1 numaralı hasta ve II-3 numaralı sağlıklı bireyden onam formu eşliğinde 10 mL periferik kan örneği alındı ve aynı gün periferik kan mononüklear hücrelerinin (PBMC) izolasyonu için yoğunluk santrifügasyon (Ficoll-Paque) yöntemi yukarıda bahsedildiği gibi uygulandı.

3.2.5. Nötrofil İzolasyonu

II-1 numaralı hasta ve II-3 numaralı sağlıklı bireyden Ficoll-Paque yöntemi ile PBMC ayrıldıktan sonra nötrofillerin izolasyonu için aşağıdaki protokol kullanıldı. Nötrofil izolasyonu için tüm işlemler oda sıcaklığında gerçekleştirildi.

1. PBMC ayrı bir falkona alındıktan sonra falkonda kalan medyum uzaklaştırıldı.

2. Falcon içerisinde kalan hücre kısmı 2 mL PBS ile yıkandı.
3. Oda sıcaklığında 1500 rpm’de 10 dakika boyunca santrifüj edildi.
4. Santrifüj sonrası süpernatant atıldı.
5. Pellet üzerine 10 mL RBL eklendi. RBL ekledikten sonra falkon tüp 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
6. Ardından 1500 rpm 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra üst sıvı atıldı ve pellet kısmı elle tüpe vurularak çözündürüldü.
7. 5 ml RBL eklenerek oda sıcaklığında tekrar 5 dakika inkübe edildi. Ardından 1500 rpm 10 dakika santrifüj edildi.
8. Daha sonra pellet üzerine RNA izolasyonu için 400 µL RLT eklenerek pellet çözündürüldü.
9. Deney çalışmasına kadar -20°C’de saklandı.

3.2.6. T ve B Lenfosit İzolasyonu

II-1 numaralı hasta ve II-3 numaralı sağlıklı bireyin PBMC hücreleri *Vi-Cell®XR Hücre Sayım Cihazı (Beckman Coulter)* kullanılarak sayıldı.

Hasta II-1’in PBMC sayısı 25×10^6 ve sağlıklı II-3’ün PBMC sayısı 42×10^6 olarak hesaplandı II-1 numaralı hastanın PBMC hücrelerinden lenfosit izolasyonu için $12,5 \times 10^6$ hücre ve II-3 numaralı sağlıklı bireyin PBMC hücrelerinden lenfosit izolasyonu için 30×10^6 hücre ayrıldı. Her iki bireyin kalan hücreleri ise LPS deneylerinde kullanıldı.

T ve B lenfosit izolasyonu için önce total lenfosit izolasyonu gerçekleştirildi. Bu aşamada total lenfosit izolasyonu için ticari olarak temin ettiğimiz *Pan Monosit İzolasyon Kit (Miltenyi Biotec.)* kullanıldı. Kit protokolü yukarıda bahsedildiği gibi uygulandı.

Elde edilen total lenfosit hücreleri *Vi-Cell®XR Hücre Sayım Cihazı (Beckman Coulter)* kullanılarak sayıldı.

II-1 numaralı hastanın total lenfosit hücresi $7,1 \times 10^6$ ve II-3 numaralı sağlıklı bireyin total lenfosit hücre sayısı 21×10^6 olarak hesaplandı.

Total lenfosit hücrelerine, 1 mL’de 1×10^6 hücre olacak şekilde Tablo 3-1’de içeriği verilen dondurma medyumundan eklendi ve her biri 1 mL olacak şekilde cryo tüplerine dağıtıldı. Tüm hücreler deney aşamasında kullanılabilecek kadar sıvı azota kaldırıldı.

Tablo 3-1: Dondurma (%20 FBS, %5 DMSO) Medyum Hazırlanması

Bileşen	Miktar (mL)
RPMI 1640, with Stable Glutamine	375
FBS	100
DMSO	25

T ve B lenfosit izolasyonu için hücreler sıvı azottan alındı ve 37 °C’lik su banyosunda eritilerek Tablo 3-2’de içeriği belirtilen RPMI medyumundan 5 mL eklendi. 1500 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Pellet 1 mL PBS ile çözüldü ve tekrar 1500 rpm’de 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Süpernatant atıldıktan sonra pellete 1 mL PBS eklendi ve *FACSCalibur Akan Hücre Ölçer (Becton Dickinson)* cihazı kullanılarak T ve B lenfosit hücrelerinin ayrımı gerçekleştirildi.

Tablo 3-2: RPMI (%10 FBS, %1 Antibiyotik) Medyum Hazırlanması

Bileşen	Miktar (mL)
RPMI 1640, with Stable Glutamine	445
FBS	50
Penisilin-Streptomisin	5

II-1 numaralı hasta ve II-3 numaralı sağlıklı bireyin T ve B lenfosit hücreleri *Vi-Cell®XR Hücre Sayım Cihazı (Beckman Coulter)* kullanılarak sayıldı. II-1 numaralı hastanın T lenfosit hücresi 6×10^3 , B lenfosit hücresi 14×10^3 , II-3 numaralı sağlıklı bireyin T lenfosit hücresi 5×10^3 , B lenfosit hücresi 12×10^3 olarak hesaplandı.

3.2.7. Hücre Kültürü

1. *Pan Monosit İzolasyon Kit (Miltenyi Biotec.)* ile izole edilen monosit ve lenfositler 6 kuyulu hücre kültür kaplarında total hacimleri 5 mL olacak şekilde Tablo 3-3'de içeriği verilen medyum içerisine alındı.

Tablo 3-3: RPMI (%10 FBS, %1 Antibiyotik) Medyumu Hazırlanması

Bileşen	Miktar (mL)
RPMI 1640 Medium Gibco	445
FBS	50
Penisilin-Streptomisin	5

2. Hücreler medyuma alındıktan sonra *Vi-Cell®XR Hücre Sayım Cihazı (Beckman Coulter)* kullanılarak sayıldı.

3. II-1 numaralı hasta için lenfosit sayısı $11,5 \times 10^6$, monosit sayısı $5,5 \times 10^6$ olarak hesaplandı. II-2 numaralı hasta için lenfosit sayısı 18×10^6 monosit sayısı 6×10^6 olarak hesaplandı.

4. Lenfositler kuyu başına 2×10^6 , monositler ise kuyu başına $1,2 \times 10^6$ hücre olacak şekilde 6 kuyulu hücre kültür kaplarına alındı ve lenfositlerin total hacmi medyum ile 3 mL'e, monositlerin ise total hacmi medyum ile 2 mL'e tamamlandı.

5. Her iki bireyinde monosit hücreleri 0. ve 6. saat için, lenfosit hücreleri de 0., 2. ve 6. saatler için LPS uygulanan ve LPS uygulanmayan kontrol hücreleri olmak üzere 2'şer kuyu olarak çalışıldı.

6. II-1 numaralı hastanın kalan $12,5 \times 10^6$ PBMC hücresi ve II-3 numaralı sağlıklı bireyi kalan 12×10^6 PBMC hücresi 0., 3. 6. ve 12. saatler için LPS uygulanan ve LPS uygulanmayan kontrol hücreleri olmak üzere 2'şer kuyu şeklinde çalışıldı.

7. PBMC'ler kuyu başına $1,8 \times 10^6$ hücre olacak şekilde 6 kuyulu hücre kültür kaplarına alındı ve total hacim 1 mL olacak şekilde Tablo'da gösterilen medyum ile 1 mL'e tamamlandı.

3.2.8. LPS Uygulanması

Medyuma alınan lenfosit ve monosit hücreleri 100 ng/mL ile uyarıldı. Monosit hücreleri 0 ve 6 saat ve lenfosit hücreleri 0, 2 ve 6 saat %5 CO₂ etüvde inkübe edildi.

Medyuma alınan PBMC'ler 1 µg/mL LPS ile uyarıldı. PBMC'ler 0, 3, 6 ve 12 saat %5 CO₂ etüvde inkübe edildi.

3.2.9. Hücre Toplama

Bu aşamada II-1 ve II-2 numaralı hastaların“0. saat” lenfosit ve monosit hücreleri aşağıdaki adımlar takip edilerek toplandı.

1. LPS uygulanmasından önce ilgili kuyulara hücreler dağıtıldıktan sonra 2×10^4 hücre RNA izolasyonu için, 1×10^6 hücre ADA2 enzim aktivitesinin belirenmesi için ayrı ependorf tüplerine alındı ve 4000 rpm’de 5 dakika boyunca santrifüj edildi.

2. Santrifüj sonrası süpernatantlar ayrı bir ependorf tüplerinde toplandı.

3. Süpernatantları uzaklaştırılmış pelletlerin üzerine 50 µL PBS eklendi.

4. 4000 rpm’de 5 dakika boyunca santrifüj edildi ve santrifüj sonrası süpernatant atıldı.

5. Hücre içi enzim aktivitesinin belirlenmesinde kullanıcak pellet üzerine 0,5 µL 50X Proteaz İnhibitör eklendi.

6. RNA izolasyonu için kullanılacak pellet üzerine 250 µL RLT eklendi ve pellet iyice pipetlenerek çözdürüldü.

II-1 ve II-2 numaralı hastaların hem LPS uygulanmış hem de LPS uygulanmamış lenfosit ve monosit hücreleri “2. ve 6. saat”lerde, ayrı tüplerde toplandı. Her bir saatte LPS uygulanmış ve LPS uygulanmamış hücreleri için aşağıdaki adımlar takip edildi.

1. İlgili saatler için her iki bireyin LPS uygulanmış ve LPS uygulanmamış hücrelerden 2×10^4 hücre RNA izolasyonu için, 1×10^6 hücre ADA2 enzim aktivitesinin belirenmesi için ayrı ependorf tüplerine alındı.

2. 4000 rpm’de 5 dakika boyunca santrifüj edildi ve santrifüj sonrası süpernatantlar ilgili saat için ayrı ependorf tüplerinde toplandı.

3. Süpernatantları uzaklaştırılmış pelletlerin üzerine 50 µL PBS eklendi.

4. 4000 rpm’de 5 dakika boyunca sentrifüj edildi ve santrifüj sonrası süpernatant atıldı.

5. Hücre içi enzim aktivitesinin belirlenmesinde kullanıcak pelletler üzerine 0,5 µL 50X Proteaz İnhibitör eklendi.

6. RNA izolasyonu için kullanılacak pelletler üzerine 250 µL RLT eklendi ve pellet iyice pipetlenerek çözündürüldü.

7. Tüm saatlerde toplanan örnekler deney çalışmasına kadar -80°C’de saklandı.

II-1 numaralı hasta ve II-3 numaralı sağlıklı bireyin “0. saat” PBMC hücreleri aşağıdaki adımlar takip edilerek toplandı.

1. LPS uygulamasından önce kuyulara dağıtıldıktan sonra kalan hücreler ayrı bir eppendorf tüpüne alındı.

2. Hücrelerin üzerine 300 µL RLT eklendi ve pipetlenerek iyice karıştırıldı.

II-1 numaralı hasta ve II-3 numaralı sağlıklı bireyin hem LPS uygulanmış hem de LPS uygulanmamış PBMC hücreleri “3., 6. ve 12. saat”lerde, ayrı tüplerde toplandı. Her bir saatte LPS uygulanmış ve LPS uygulanmamış hücreleri için aşağıdaki adımlar takip edildi.

1. İlgili saatler için her iki bireyin LPS uygulanmış ve LPS uygulanmamış hücreleri 4000 rpm’de 5 dakika boyunca sentrifüj edildi ve santrifüj sonrası süpernatantlar ilgili saat için ayrı eppendorf tüplerinde toplandı.

3. Süpernatantları uzaklaştırılmış pelletlerin üzerine 50 µL PBS eklendi.

4. 4000 rpm’de 5 dakika boyunca sentrifüj edildi ve santrifüj sonrası süpernatant atıldı.

5. Pellet üzerine 300 µL RLT eklendi ve iyice pipetlenerek çözündürüldü.

7. Tüm saatlerde toplanan örnekler deney çalışmasına kadar -80°C’de saklandı.

3.2.10. RNA İzolasyonu

II-1 ve II-2 numaralı hastalardan ve II-3 numaralı sağlıklı bireyden elde edilen tüm hücrelerden *PureLink™ RNA Mini Kit* kullanılarak RNA izolasyonu gerçekleştirildi.

RNA izolasyonu için kit protokolü aşağıdaki gibi uygulandı.

1. 250 μ L RLT içinde bulunan her örnek buz üzerinde çözdürüldükten sonra üzerlerine kit içeriğinde bulunan RNase-free su ile hazırlanmış %70'lik etanolden 1:1 oranında (250 μ L) eklendi ve iyice pipetaj yapıldıktan sonra tüm örnek kit içeriğinde mevcut olan spin kolonlara aktarıldı.

2. Oda sıcaklığında 12.000xg'de 15 saniye boyunca santrifüj edildi ve alt kısım atılarak kolonlar kit içeriğinde mevcut olan yeni tüplere takıldı.

3. Kolonların üzerine 700 μ L *Wash Buffer I* eklendi ve oda sıcaklığında 12.000xg'de 15 saniye boyunca santrifüj edildikten sonra alt kısımları döküldü ve tüpler kolonlara geri takıldı.

4. Kolonların üzerine 500 μ L *Wash Buffer II* eklendi ve oda sıcaklığında 12.000xg'de 15 saniye boyunca santrifüj edildikten sonra alt kısımları döküldü ve tüpler kolona geri takıldı.

5. 4. Adım tekrar edildi.

6. Kolonlar 12.000xg'de 2 dakika boyunca boş şekilde santrifüj edildi ve alt kısımları atılarak kit içeriğinde mevcut olan kapaklı tüplere takıldı.

7. 30 μ L RNase-free su kolondaki filtrenin tam üzerine gelecek şekilde eklendi ve 1 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi.

8. Kolonlar $\geq 12.000xg$ 'de 2 dakika boyunca santrifüj edildi ve tüpler artık izole edilen RNA'yı içerdiği için kolonlar atıldı.

9. Elde edilen RNA örneklerine *Nanodrop 2000 Spektrofotometre (Thermo Fisher)* ile 260 nm'de OD ölçüm yapıldı.

10. OD ölçüm yapılan RNA örnekleri deney çalışmasına kadar -80°C 'de saklandı.

3.2.11. cDNA Sentezi

Bu çalışmada elde ettiğimiz tüm RNA örneklerinden cDNA sentezi ticari olarak temin ettiğimiz *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher)* ile gerçekleştirildi.

Kit protokolü, OD ölçüm yapılan RNA miktarına bağlı olarak cDNA sentezi gerçekleştirilecek tüm hücrelerden elde edilen her bir örnekten 500 ng alındı.

Kit protokolü aşağıdaki gibi uygulandı.

1. Önce cDNA sentez reaksiyonu için gerekli master mix Tablo 3-4’de verildiği gibi hazırlandı.

Tablo 3-4: 2X Master Mix Hazırlanması

Bileşen	Miktar (mL)
RPMI 1640 Medium Gibco	445
FBS	50
Penisilin-Streptomisin	5

2. Hazırlanan 2X Master Mix buz üzerine alındı.

3. Her bir örnek için 0,2 mL’lik santrifüj tüpüne 2X Master Mix’ten 6,8 µL dağıtıldı ve buza alındı.

4. Mix üzerine 13,2 µL RNA örnekleri eklendi ve karışması için iyice pipetaj yapıldı.

5. Hava kabarcıklarının giderilmesi için tüpler kısa santrifüj edildi.

6. Tüpler *thermal cycler* (Techne) cihazına yerleştirildi ve Tablo 3-5’de ki program uygulandı.

Tablo 3-5: cDNA Sentezi Reaksiyon Koşulları

	1. Adım	2. Adım	3. Adım	4. Adım
Sıcaklık (°C)	25	37	85	4
Zaman (dk)	10	120	5	∞

7. cDNA örnekleri deney çalışmasına kadar - 20°C’de saklandı.

3.2.12. Primer Tasarlanması

ADA2 geninin kantitatif gerçek zamanlı PZR (qRT-PZR) için kullanılacak primerler ADA2 cDNA dizisi üzerinden *NCBI primer designing tool* kullanılarak Forward ve Reverse yönlü olarak tasarlandı. Yabani tip (wild type ADA2) primerler ekzon 6, 7 ve 8'i çerecek şekilde, ekzon 7 atlanan mutant ADA2 için ekzon 6 ve 8'in birleşme bölgesine spesifik primerler kullanıldı.

PZR için kullanılacak primerler ADA2 cDNA dizisi 6. ve 8. ekzonlarına spesifik olacak şekilde *NCBI primer designing tool* kullanılarak tasarlandı.

Primerler tasarlanırken T_m değeri, GC %'si, kendi üzerine katlanma skoru dikkate alındı. Tasarlanan primer dizileri Tablo 3-6, Tablo 3-7 ve Tablo 3-8'de gösterilmiştir.

Tablo 3-6: qRT-PZR Primerleri

Gen Bölgesi	Primer Dizisi
ADA2 Wild Type Forward	5' TTTGACCTGGTGGGGCATGA 3'
ADA2 Wild Type Reverse	5' GGAGTAAGTCCTGACTGCGG 3'
ADA2 Skip Forward	5' GGGTTTGACCTGACTGGCA 3'
ADA2 Skip Reverse	5' AGTAAGTCCTGACTGCGGGG 3'

Tablo 3-7: PZR Primerleri

Gen Bölgesi	Primer Dizisi
ADA2 Wild Type cDNA Forward	5' CAAAGATGTGGCTGTCATCG 3'
ADA2 Wild Type cDNA Reverse	5' GTTCAGCATCAGAGCATCCA 3'

Tablo 3-8: TBP Primerleri

Gen Bölgesi	Primer Dizisi
TBP Forward	5' ACTTGACCTAAAGACCATTGCAC 3'
TBP Reverse	5' CTTGAAGTCCAAGAACTTAGCTGG 3'

3.2.13. Gerçek Zamanlı Kantitatif PZR (qRT-PZR)

II-1 ve II-2 numaralı hastalardan elde edilen lenfosit ve monosit hücrelerine ait cDNA örneklerinden, II-1 numaralı hasta ve II-3 numaralı sağlıklı bireyden elde edilen PBMC, nötrofil, T ve B lenfosit hücrelerine ait cDNA örneklerinden qRT-PZR yöntemi ile ADA2 wild type ve ekzon 7 atlanan mutant ADA2 için tasarlanmış primerler kullanılarak ADA2 geninin ifade düzeyleri belirlendi.

Bu çalışmada *Light Cycler 480-II (Roche)* cihazı ve *SensiFast SYBR No-ROX Kit (Bioline)* kullanıldı. TBP, ADA2 wild type ve ekzon 7 atlanan mutant ADA2'ye özgü primerler kullanıldı. Standartlar, cDNA'ların beş farklı 1:10 dilüsyonları hazırlanarak oluşturuldu. Çalışmaya dahil edilen tüm örnekler 2 kopya olarak çalışıldı.

Çalışma basamakları aşağıdaki gibidir.

1. TBP, ADA2 wild type ve ekzon 7 atlanan ADA2 için ayrı ayrı Tablo 3-9'da verilen karışım hazırlandı.

Tablo 3-9: qRT-PZR Karışımı (1 kuyu için)

Bileşen	Miktar (µL)
2X SYBR Green	5
Forward Primer (10 pmol/µL)	0,7
Reverse Primer (10 pmol/µL)	0,7
H ₂ O	1,6
cDNA	2
Final Hacim	10

2. Bu karışımlar 96 kuyulu qRT-PZR plate'inde önceden belirlenmiş kuyulara 8 µL dağıtıldı. Standartlar için TBP karışımı kullanıldı.

3. Dağıtılan karışımın üzerine 2 µL cDNA ve her biri 1:10 seri dilüsyon yapılmış standartlar eklendi ve iyice pipetlendi.

4. qRT-PZR koşulları Tablo 3-10'da verildiği gibi gerçekleştirildi.

Tablo 3-10: qRT-PZR Koşulları

Basamak	Sıcaklık	Zaman	Döngü Sayısı
Ön Denatürasyon	95°C	5 dakika	1
Amplifikasyon	95°C	10 saniye	45
	62°C	20 saniye	
	72°C	10 saniye	
Melting Curve	95°C	5 saniye	1
	65°C	1 dakika	
	97°C	-	
Soğutma	4°C	30 saniye	1

3.2.14. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

II-1 ve II-2 numaraları II-1 ve II-2 numaralı hastalardan elde edilen lenfosit ve monosit hücrelerine ait örneklerden, II-1 numaralı hasta ve II-3 numaralı sağlıklı bireyden elde edilen PBMC, nötrofil, T ve B lenfosit hücrelerine ait örneklerden ADA2 gen bölgesi PZR yöntemi ile ADA2 wild type cDNA'sı için tasarlanmış primerler kullanılarak çoğaltıldı.

Bu aşamada aşağıdaki basamaklar uygulandı.

1. PZR karışımı Tablo 3-11'de verildiği gibi hazırlandı.

Tablo 3-11: PZR Karışımı

Malzeme	Miktar (µL)
10X Taq DNA Polimeraz Buffer	2,5
25 mM MgCl ₂	2
2,5 mM dNTP	2
Forward Primer (10 pmol/µL)	1
Reverse Primer (10 pmol/µL)	1
Taq DNA Polimeraz (5 U/µL)	0,15
H ₂ O	14.85
cDNA	1,5
Final Hacim	25

2. Hazırlanan karışım 0,2 mL'lik PZR tüplerine 23,5 µL dağıtıldı ve buza alındı.

3. Karışım üzerine 1,5 µL cDNA örnekleri eklendi ve iyice pipetlendi.

4. Hava kabarcıklarının giderilmesi için kısa santrifüj edildi.

5. Thermal cycler (*Techne*) cihazına yerleştirildi ve Tablo 3-12'de verilen programda çalışıldı.

Tablo 3-12: PZR Koşulları

Basamak	Sıcaklık	Zaman	Döngü
Ön Denatürasyon	95°C	2 dakika	1
Denatürasyon	94°C	30 saniye	
Amplifikasyon	57°C	30 saniye	39

Uzama	72°C	30 saniye	
	72°C	5 dakika	
Soğuma	4°C	∞	-

3.2.15. Jel Elektroforezi

PZR ürünleri jel elektroforezi ile yürütüldü. Bunun için aşağıdaki adımlar takip edildi.

1. %2'lik jel için 50 ml 1X TAE'nin içine 1 gram agaroz tartılarak eklendi.
2. Karışım mikrodalgada kaynatıldı.
3. Kaynayan karışıma 2,5 µL Etidyum Bromür (EtBr) eklendi ve kasete döküldü.
4. Jel donduktan sonra kaset tanka alındı ve 1X TAE kuyuların üzerini kapatacak şekilde eklendi.
5. Örnekler 6X DNA Loading Dye ile karıştırılarak yüklendi.
6. Örneklerin yanına 100 bp marker yüklendi.
7. Örnekler 80 V'da yürütüldü ve marker band büyüklükleri ayrılacak kadar açıldıktan sonra, transilluminatör cihazında UV ışık altında jel görüntüsü alındı.

3.2.16. ADA2 Enzim Aktivite Tayini

Bu çalışmada ADA2 enzim aktivitesini ölçmek için ticari olarak temin ettiğimiz *Adenosin Deaminaz Aktivite Assay Kit (Colorimetric) (Sigma)* kullanıldı. Kit protokolü II-1 ve II-2 numaraları hastaların monosit ve lenfosit hücrelerine ait pellet ve süpernatant olarak saklanan örnekler ve Ficoll-Paque aşamasında saklanan serum örnekleri ile aşağıdaki gibi uygulandı. Ayrıca ADA1'e bağlanan ancak ADA2'ye bağlanmayan bir inhibitör olan Eritrosit-9-(2-hidroksi-3-nonyl) adenin (EHNA) kit protokolüne eklendi.

1. İlk kullanımdan önce tüm küçük tüpler kısa santrifüj edildi.
2. 1X ADA Assay Buffer hazırlamak için 9 hacim suya 1 hacim 10X Assay Buffer olacak şekilde 50 mL'lik falkona 5 mL 10X ADA Assay Buffer, 45 mL H₂O ve 1 mL 50X Proteaz İnhibitör Kokteyli eklendi.
3. ADA Converter ve ADA Developer'a 210 µL 1X ADA Assay Buffer eklendi ve pipetleyerek iyice karıştırıldı.
4. ADA Positive Control 25 µL 1X ADA Assay Buffer ile sulandırıldı ve pipetleyerek iyice karıştırıldıktan sonra kısa santrifüj edildi.
5. Ayrı bir tüpe 10 µL 10mM inozin standart ve 90 µL 1X ADA Assay Buffer eklenerek 1 mM inozin standartı elde edildi.
6. Çalışılacak örneklerin süpernatantları ve pelletleri -80'den buz üzerinde çözündürüldü.
7. Pelletlerin her biri için 2'şer tane 1,5'luk ependorf yazıldı ve buz üzerine alındı.
8. Pelletlerin üzerine 200 µL Proteaz İnhibitör Kokteyli içeren 1X ADA Assay Buffer eklendi ve hücreleri bozmak için birkaç kez pipetlendi.
9. Hücre homojenatı soğuk ependorfa aktarıldı ve +4'de döner bir çalkalayıcıda 15 dakika boyunca çalkalandı.
10. Daha sonra +4'de 16.000xg'de 10 dakika boyunca santrifüj edildi.
11. Süpernatant önceden soğutulmuş yeni bir ependorfa aktarıldı ve buza alındı.
12. Örnekler önceden belirlenmiş kuyulara 20 µL dağıtıldı ve kalan lizat saklandı.
13. Süpernatant ve serum örneklerine hiçbir ön işlem uygulamadan direkt olarak önceden belirlenmiş kuyulara 20 µL eklendi.
14. Daha sonra her örneğin üzerine 30 µL 1X ADA Assay Buffer eklenerek total hacim 50 µL'ye tamamlandı.
15. Önceden belirlenmiş kuyulara 2 µL ADA Positive Control eklendi ve kuyuların total hacmini 1X ADA Assay Buffer ile 50 µL'ye tamamlandı.
16. Her örnek ve positive kontrol kuyularına 1 µL 100 µM EHNA eklendi.

17. Reagent Background Control (RBC) için önceden belirlenmiş kuyulara 50 μ L 1X ADA Assay Buffer eklendi.

18. İnozin standartları önceden belirlenmiş kuyulara dağıtırken Tablo 3-13 kullanıldı.

Tablo 3-13: İnozin Standartı

Kuyu	1 mM İnozin Standart	1X ADA Assay Buffer	İnozin (nmol/well)
1	0 ul	50 ul	0
2	2 ul	48 ul	2
3	4 ul	46 ul	4
4	6 ul	44 ul	6
5	8 ul	42 ul	8
6	10 ul	40 ul	10

19. Her bir örnek (S), Reagent Background Control (RBC) ve Pozitif kontrol kuyularına eklemek için 15 mL'lik falkonda Tablo 3-14'de verilen Reaksiyon karışımı hazırlandı ve önceden belirlenmiş kuyulara 50 μ L dağıtıldı.

Tablo 3-14: Reaksiyon Mix Hazırlanması

Reagent	Reaksiyon Mix
1X ADA Assay Buffer	41 ul
ADA Converter	2 ul
ADA Developer	2 ul
ADA Substrate	5 ul

20. Her Standart kuyusuna eklemek için 1,5'lik ependorfta Tablo 3-15'de verilen Background Mix hazırlandı ve 50 µL dağıtıldı.

Tablo 3-15: Background Mix Hazırlanması

Reagent	Background Mix
1X ADA Assay Buffer	46 ul
ADA Converter	2 ul
ADA Developer	2 ul
ADA Substrate	-

21. Plate 37°C'de 5 dk inkübe edildi.

22. 293 nm'de (A293) 37°C'de kinetik modda absorbansı ölçüldü. Bu aşamada 3 okuma alındı.

-Birinci okuma 2 dakikada bir 15 ölçüm olacak şekilde 30 dakika

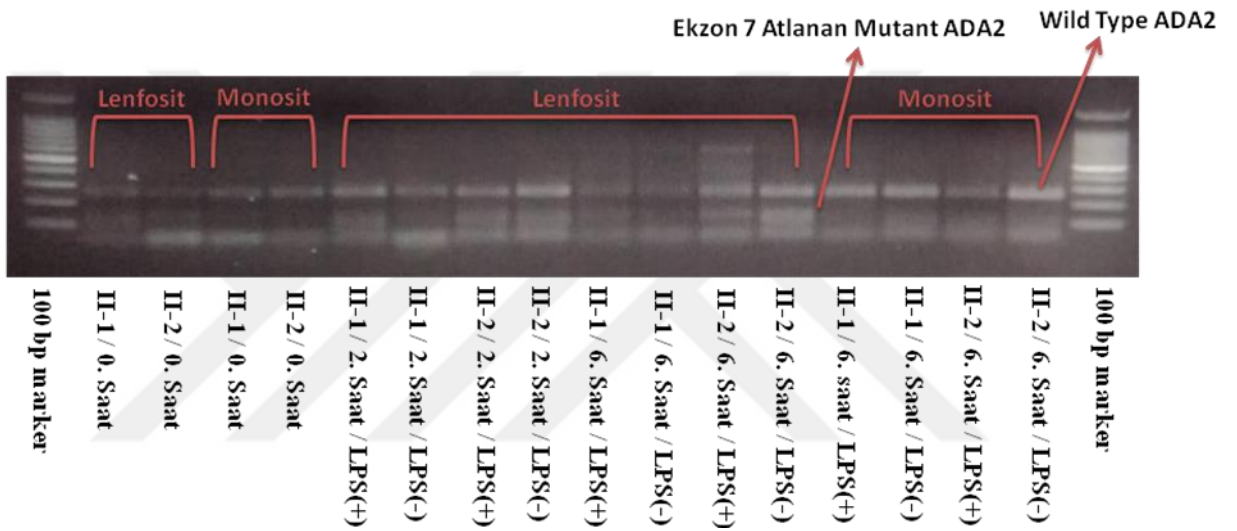
-İkinci okuma 10 dakikada bir 6 ölçüm olacak şekilde 1 saat

-Üçüncü okuma 10 dakikada bir 4 ölçüm olacak şekilde 40 dakika

4. BULGULAR

4.1. Jel Elektroforezi Görüntüleri

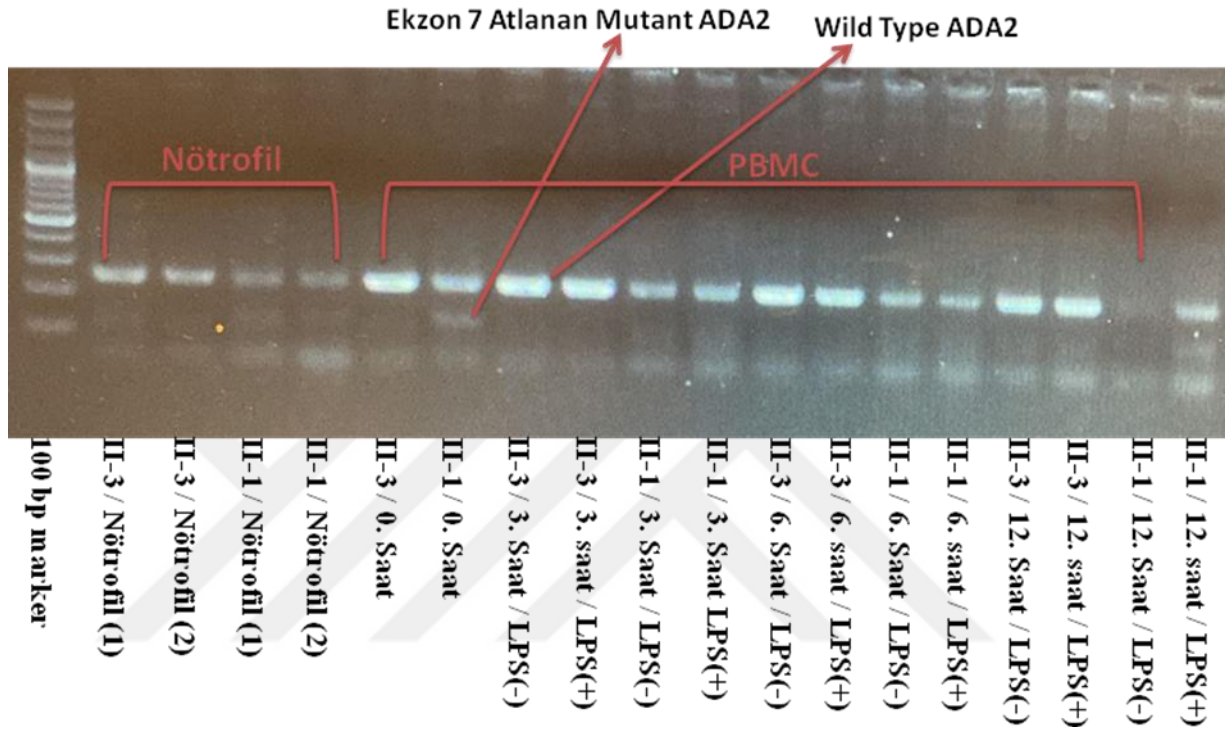
II-1 ve II-2 numaralı hastaların monosit ve lenfosit hücrelerinde ADA2 gen bölgesi, PZR yöntemi ile çoğaltılarak, jel elektroforezi ile görüntülendi. Lenfosit hücreleri 2 ve 6 saat boyunca, monosit hücreleri ise hücre sayısı az olduğu için 6 saat boyunca LPS ile muamele edildi. 100 ng/mL LPS uygulanmış hücreler “LPS(+)”, LPS uygulanmayan kontrol hücreleri ise “LPS(-)” olarak gösterildi (Şekil 4-1).



Şekil 4-1: II-1 ve II-2 numaralı hastaların LPS(+) ve LPS(-) lenfosit ve monosit hücrelerinde ADA2 jel görüntüsü

Hem II-1 hem de II-2 numaralı hastanın 0. saat lenfosit hücrelerinde ADA2'nin ekzon 7 atlanan mutant ADA2'nin eksprese olduğu görüldü. Her iki hastanın 0. saat monosit hücrelerinde ise ekzon 7 atlanan mutant ADA2 hemen hemen hiç görülmedi. Her iki hastanın LPS(+) veya LPS(-) lenfosit hücrelerinde 0, 2 ve 6. saatlerde ekzon 7 atlanan mutant ADA2'nin eksprese olduğu ve LPS uygulamasının ekzon 7 atlanan mutant ADA2'nin ekspresyonu üzerinde anlamlı bir değişime neden olmadığı saptandı. Her iki hastanın LPS(+) veya LPS(-) monosit hücrelerinde 0, ve 6. saatlerde ekzon 7 atlanan mutant ADA2'nin eksprese olmadığı ve LPS uygulaması ekzon 7 atlanan mutant ADA2'nin ekspresyonunu arttırmadı.

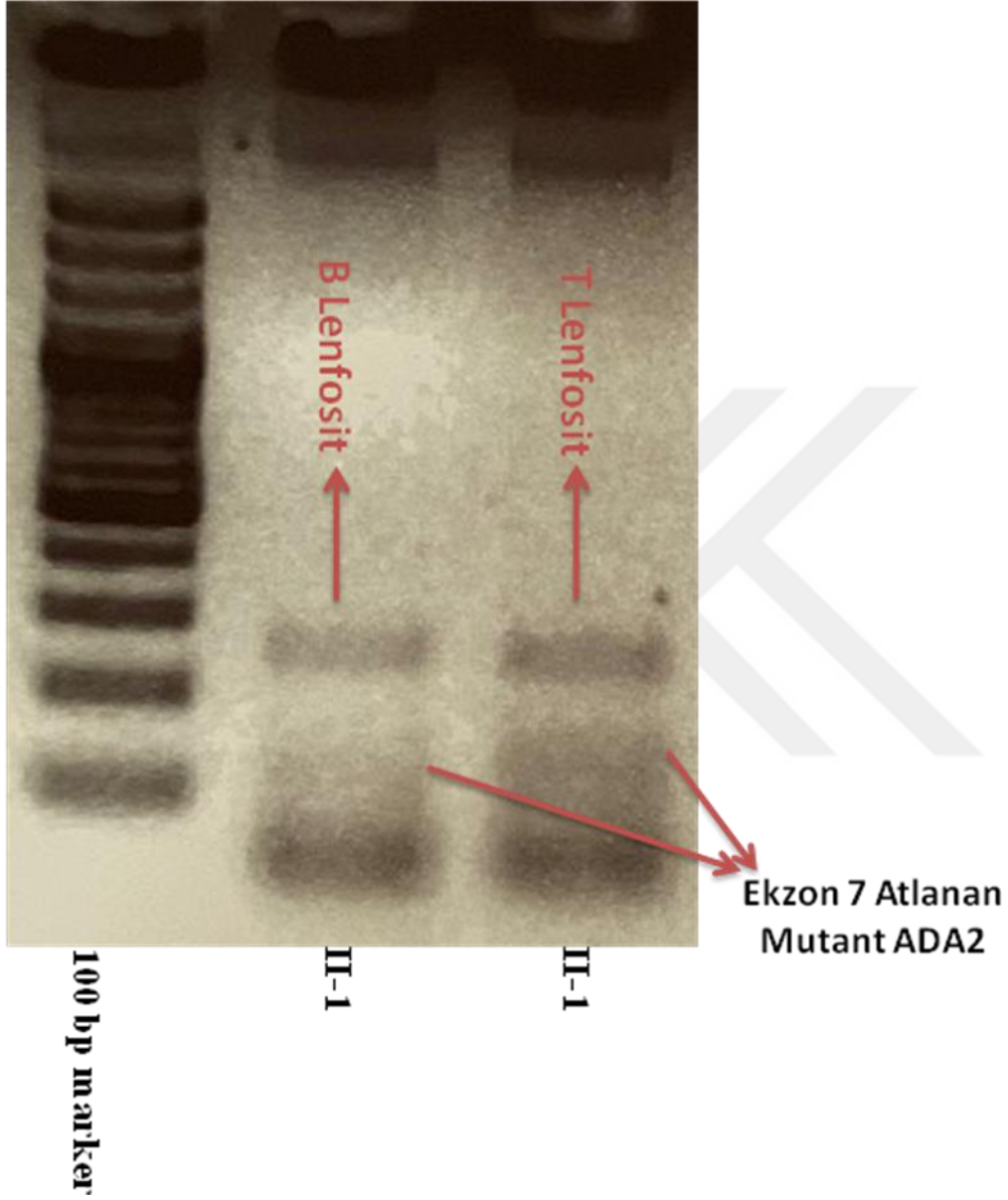
II-1 numaralı hasta ve II-3 numaralı sağlıklı bireyin nötrofil ve PBMC hücrelerinde ADA2 gen bölgesi PZR yöntemi ile çoğaltılarak, agaroz jel elektroforezi ile yürütüldü. PBMC hücreleri 3, 6 ve 12 saat boyunca LPS ile muamele edildi. 1 µg/mL LPS uygulanmış PBMC hücreleri “LPS(+)”, LPS uygulanmayan kontrol hücreleri ise “LPS(-)” olarak gösterildi (Şekil 4-2).



Şekil 4-2: II-1 numaralı hasta ve II-3 numaralı sağlıklı bireyin nötrofil hücrelerinde, LPS(+) ve LPS(-) PBMC hücrelerinde ADA2 jel görüntüsü

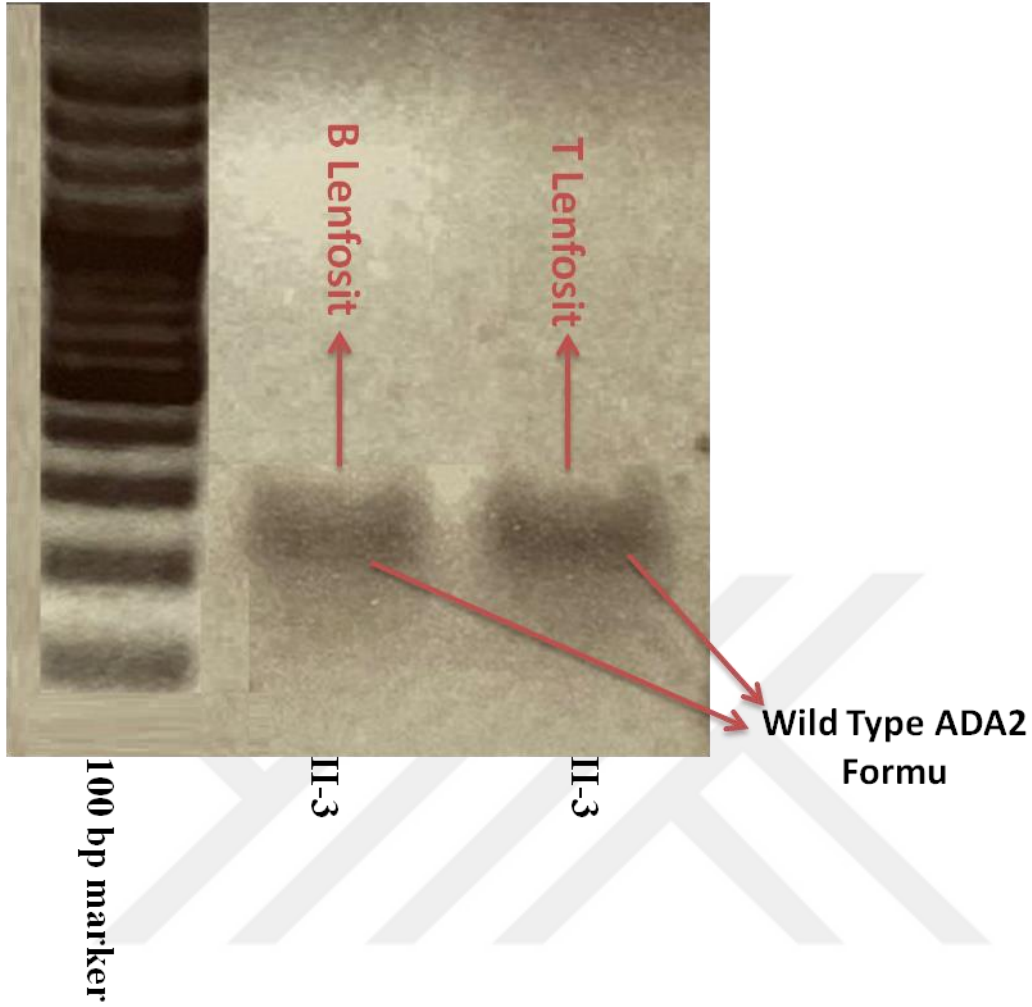
II-1 numaralı hastanın nötrofillerinde ekzon 7 atlanan mutant ADA2 eksprese olurken, II-3 numaralı sağlıklı bireyde çok düşük düzeyde görüldü. II-1 numaralı hastanın PBMC hücrelerinde ekzon 7 atlanan mutant ADA2'nin eksprese olduğu görüldü ve LPS uygulması ADA2 gen ekspresyonunu değiştirmede. II-3 numaralı sağlıklı bireyde ise ekzon 7 atlanan mutant ADA2'nin ekspresyonu görülmeyi ve LPS uygulması ADA2 gen ekspresyonunu arttırmadı.

II-1 numaralı hasta ve II-3 numaralı sağlıklı bireyin T ve B lenfosit hücrelerinde ait ADA2 gen bölgesi PZR yöntemi ile çoğaltıldı ve jel elektroforezi ile yürütüldü (Şekil 4-3, Şekil 4-4).



Şekil 4-3: II-1 numaralı hastanın T ve B lenfosit hücrelerinde ADA2 jel görüntüsü

II-1 numaralı hastanın hem T hem de B lenfosit örneklerinde ekzon 7 atlanan mutant ADA2 formunun ekspresyonu gözlemlendi.



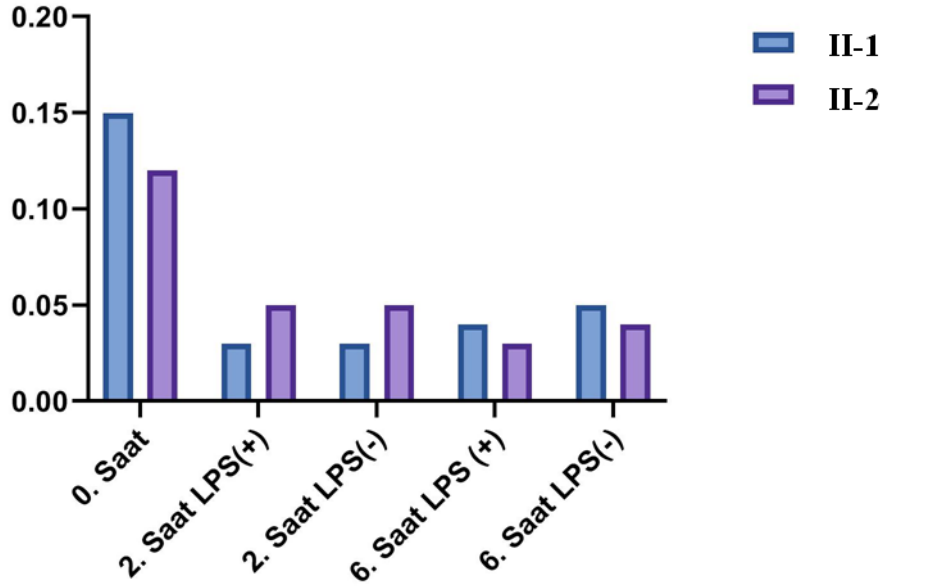
Şekil 4-4: II-3 numaralı sağlıklı bireyin T ve B lenfosit hücrelerinde ADA2 jel görüntüsü

II-3 numaralı sağlıklı bireyin hem T hem de B lenfositlerinde sadece yabanıl tip (wild type) ADA2 formu ekspresyonu tespit edildi. Ekzon 7 atlanan mutant ADA2, II-3 numaralı sağlıklı bireyde görülmedi.

4.2. qRT-PZR Analiz Sonuçları

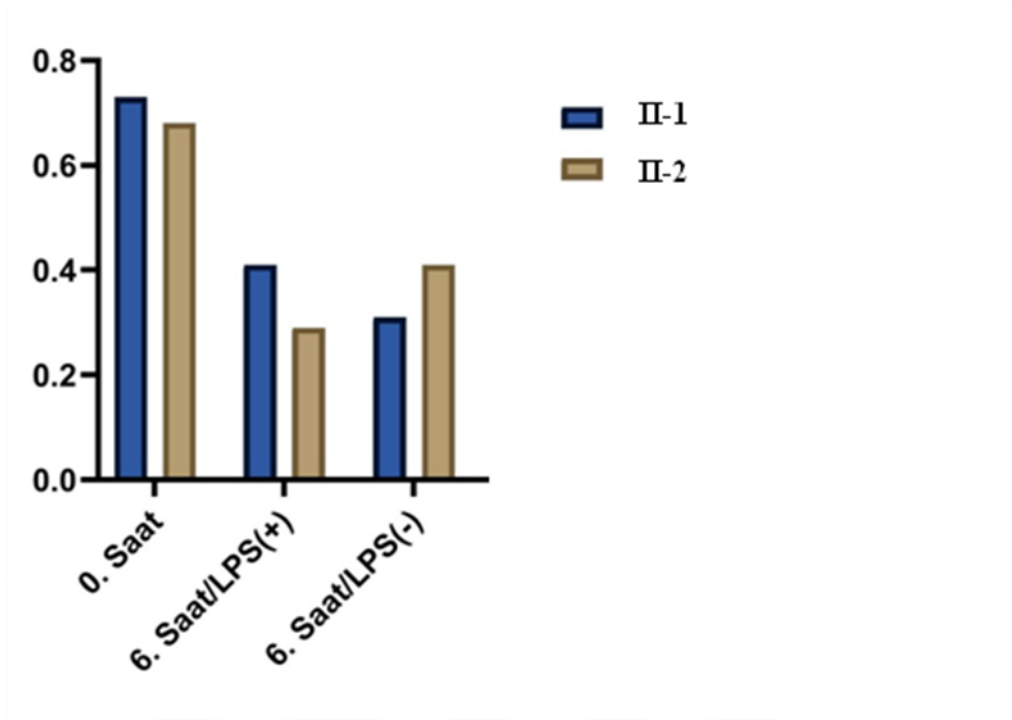
Hastalara ait cDNA örneklerinden ADA2 yabanıl tip (wild type) ve ekzon 7 atlanan mutant ADA2 için tasarlanmış primerlerle qRT-PZR yapıldı. Ekzon 7 atlanan mutant ADA2'ye spesifik primerlerle yabanıl tip ADA2'nin de amplifiye olduğu görüldü. Ekzon 6 ve 8'in birleşme yerine tasarlanan primerin 3' ucu ekzon 6'ya bağlandıktan sonra 5' tarafı farklılık gösterse bile o bölgeyi amplifiye edebilmektedir. Bundan dolayı total ADA2 ekspresyonu qRT-PCR ile analiz edildi. Yabanıl tip ADA2'nin ekzon 7 atlanan mutant ADA2'ye oranı klasik PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntülerine göre değerlendirildi.

qRT-PZR analizleri sonucunda II-1 ve II-2 numaralı hastaların lenfosit hücrelerinde 0. saate göre diğer zaman dilimlerinde ADA2 gen ifadesinin azaldığı ve LPS uygulanmasının ADA2 gen ifadesinde belirgin bir farka neden olmadığı bulundu (Şekil 4-5).



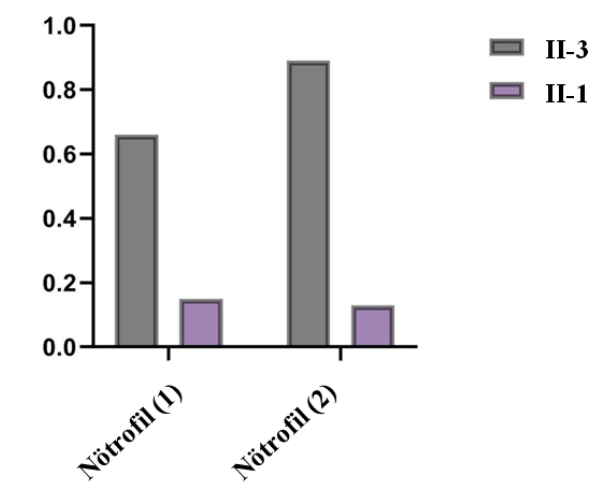
Şekil 4-5: II-1 ve II-2 numaralı hastaların lenfosit hücrelerinde qRT-PZR ile ADA2 gen ifadesi

Yapılan analizler sonucunda II-1 ve II-2 numaralı hastaların monosit hücrelerinde 0. saate göre diğer zaman dilimlerinde ADA2 gen ifadesinin azaldığı, LPS(+) ve LPS(-) örnekler arasında belirgin bir fark olmadığı bulundu (Şekil 4-6).



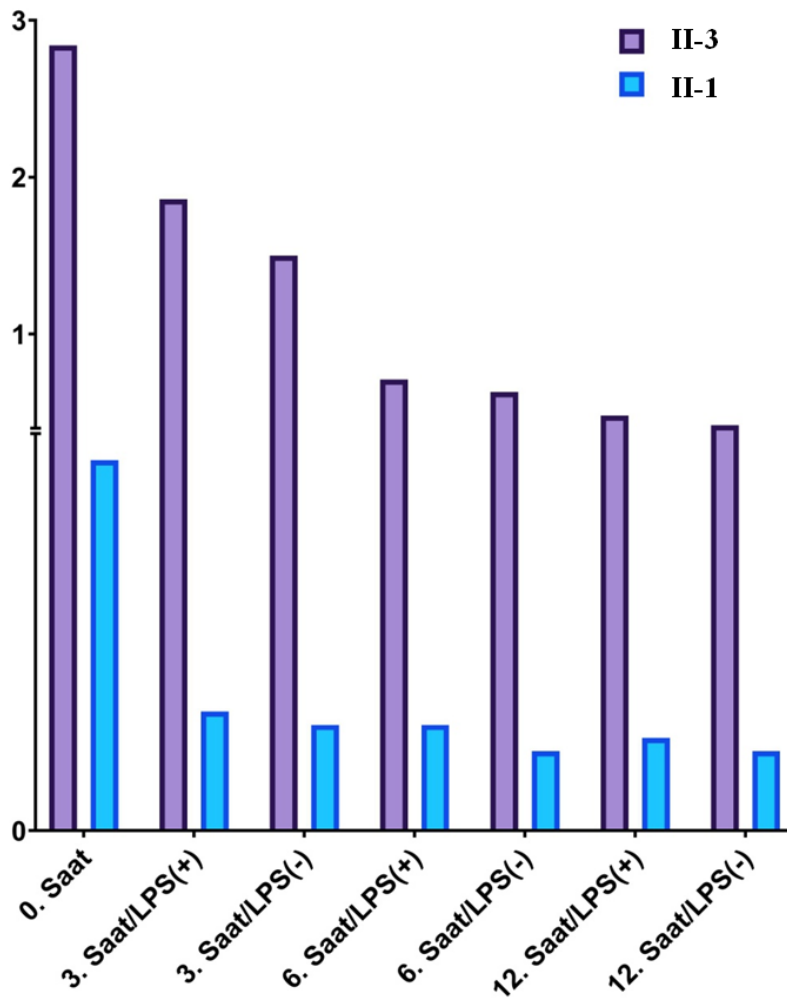
Şekil 4-6: II-1 ve II-2 numaralı hastaların monosit hücrelerinde qRT-PZR ile ADA2 gen ifadesi

Yapılan analizler sonucunda II-1 numaralı hastanın nötrofil hücrelerinde ADA2 gen ifadesinin II-3 numaralı sağlıklı bireye göre daha düşük olduğu bulundu (Şekil 4-7).



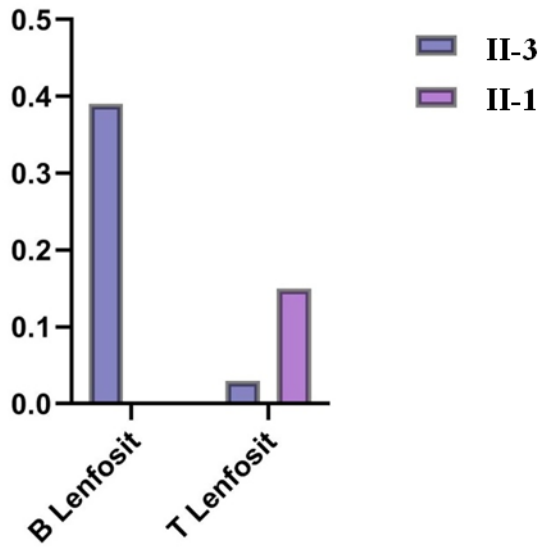
Şekil 4-7: II-1 numaralı hasta ve II-3 numaralı sağlıklı bireyin nötrofil hücrelerinde qRT-PZR ile ADA2 gen ifadesi

Yapılan analizler sonucunda II-3 numaralı sağlıklı bireyin PBMC hücrelerinde 3., 6. ve 12. saatlerde 0. saate göre hem LPS(+) hem de LPS(-) örneklerde ADA2 gen ifadesinin azaldığı görüldü. Aynı şekilde II-1 numaralı hastanın PBMC hücrelerinde 3., 6. ve 12. saatlerde 0. saate göre hem LPS(+) hem de LPS(-) örneklerde ADA2 gen ifadesinin azaldığı ve LPS(+) ve LPS(-) örnekler arasında belirgin bir fark olmadığı bulundu. II-3 numaralı sağlıklı bireyin, II-1 numaralı hastaya göre 0., 3., 6. ve 12. saatlerde tüm gruplarda ADA2 gen ifadesinin daha yüksek olduğu gösterildi (Şekil 4-8).



Şekil 4-8: II-1 numaralı hasta ve II-3 numaralı sağlıklı bireyin PBMC hücrelerinde qRT-PZR ile ADA2 gen ifadesi

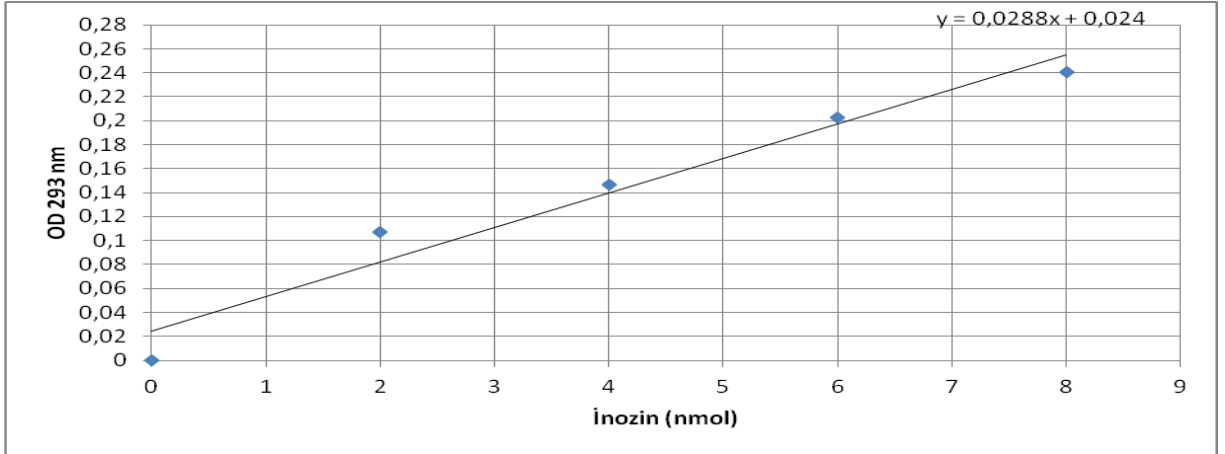
Yapılan analizler sonucunda II-1 numaralı hastanın B lenfosit hücrelerinde hücre varlığına rağmen ADA2 gen ifadesi olmadığı tespit edildi. II-1 numaralı hastanın T lenfosit hücrelerinde ADA2 gen ifadesinin, II-3 numaralı sağlıklı bireyin T lenfosit hücrelerine göre daha yüksek olduğu bulundu. II-3 numaralı sağlıklı bireyin B lenfosit hücrelerinde ise T lenfosit hücrelerine göre daha yüksek ADA2 gen ifadesi tespit edildi (Şekil 4-9).



Şekil 4-9: II-1 numaralı hasta ve II-3 numaralı sağlıklı bireyin T ve B lenfosit hücrelerinde qRT-PZR ile ADA2 gen ifadesi

4.3. ADA2 Enzim Aktivite Tayini Bulguları

Kit protokolüne uygun olarak yapılan üç farklı ölçümünden elde edilen veriler ile İnozin Standart Eğrisi çizildi (Şekil 4-10).



Şekil 4-10: İnozin Standart Eğrisi

Kit protokolüne göre deltaT değeri belirlendi.

$$\text{deltaT} = (T_2 - T_1)$$

$$\text{deltaT} = (22 - 18)$$

$$\text{deltaT} = 4$$

Seçilen zaman aralığında ki deltaOD hesaplandı.

$$\text{deltaOD} = (A_{S2} - A_{BG2}) - (A_{S1} - A_{BG1})$$

$$\text{deltaOD}_{II-1} = (2,17 - 0,08) - (2,15 - 0,08)$$

$$\text{deltaOD}_{II-1} = 0,02$$

$$\text{deltaOD}_{II-2} = (3,79 - 0,08) - (3,26 - 0,08)$$

$$\text{deltaOD}_{II-2} = 0,5$$

Daha sonra seçilen iki farklı zaman aralığında gerçekleşen reaksiyon süresi boyunca örnek tarafından üretilen B değerini (nmol inozin miktarı) elde etmek için deltaOD Standart Eğri ile karşılaştırıldı.

$$B_{II-1} = 0,66$$

$$B_{II-1} = 16,6$$

Son olarak elde edilen değerler ile ADA Aktivitesi hesaplandı.

$$\text{ADA Aktivitesi} = [B / (\text{deltaT}) \times \mu\text{g protein}] \times \text{DF (Dilüsyon Faktörü)}$$

$$\text{ADA Aktivitesi}_{II-1} = 1,5$$

$$\text{ADA Aktivitesi}_{II-2} = 37,5$$

5. TARTIŞMA

Adenozin deaminaz tip 2 eksikliği (DADA2), adenozin deaminaz 2 (ADA2) geninde fonksiyon kaybı mutasyonlarının neden olduğu otozomal resesif bir hastalıktır. ADA2 geni, esas olarak monositler ve makrofajlar tarafından salgılanan hücre dışı bir enzim olan ADA2'yi kodlar. ADA2, adenosin deaminazın (ADA) iki izoformundan (ADA1 ve ADA2) biridir. ADA2, adenozini inozine dönüştüren deaminaz reaksiyonunu katalize etmektedir ancak fizyolojik işlevi hala tam olarak aydınlatılamamıştır.

ADA2 aynı zamanda bağışıklıkta rol oynayan, makrofaj farklılaşmasını ve endotel bütünlüğünü düzenleyen önemli bir büyüme faktörüdür. DADA2'de M1 pro-inflamatuar makrofajlarının arttığı ve aşırı apoptoz nedeniyle ise anti-inflamatuar M2 makrofajlarının azaldığı gösterilmiştir.

ADA2'deki bialelik mutasyonlar ve periferik kanda düşük ADA2 enzimatik aktivitesi seviyeleri DADA2'nin teşhisini oluşturur. Mutasyonlar arasında missense varyantlar en yaygın olanıdır, ancak nonsense mutasyonlar, insersiyon/delesyon ve splice-site mutasyonları tanımlanmıştır.

DADA2'nin klinik özellikleri arasında livedo racemosa, laküner ve hemorajik inme, vaskülit periferik nöropati, sistemik vaskülit, kas-iskelet sistemi komplikasyonları ve sistemik inflamasyon sayılabilir. Çok düşük veya hiç ADA2 enzimatik aktivitesi olmayan hastalarda da ciddi ilik yetmezliği ve/veya immün yetmezlik görülür. Bu nedenle, DADA2 daha önce ilişkili olmadığı düşünülen çeşitli semptomları birleştirebilir.

DADA2'li hastaların yayınlanmış vaka serileri, nedensel mutasyonların protein fonksiyonu ve rezidüel enzimatik aktivite üzerindeki etkisi ile tam olarak açıklanamayan büyük bir fenotipik değişkenlik ortaya koymuştur. Aynı kurucu mutasyon için homozigot olan hastalarda hastalığın başlangıç yaşı, sıklığı ve semptomların şiddeti değişkenlik göstermektedir. Aynı mutasyonu taşıyan kardeşlerde fenotipik değişkenlik olduğu bildirilmiştir. Tüm bu veriler ile DADA2'de ADA2 enziminin eksikliğinin hastalığın patofizyolojisini nasıl etkilediği tam olarak aydınlatılamamıştır.

Daha önce yaptığımız bir çalışmada birbiriyle ilişkisiz Türk ve Hollandalı ailelerde ADA2 geninde ekzon 7'nin atlanmasına (exon skipping) neden olan splice site mutasyonu (c.973-2A>G) tanımlandı (113). Ailelerde mutasyonu taşıyan bireylerde mutant allelden ifade olan mRNA miktarları ve hastalığın şiddeti farklılık göstermektedir. Mutant allelin bireyler arasındaki ekspresyon farklılığını ve hastalığın klinik tablosundaki değişkenliği anlamak amacıyla hasta ve sağlıklı bireylerden alınan kan örneklerinden elde edilen farklı hücre tiplerinde ADA2 geni ifadesi ve enzim aktivitesi açısından incelendi.

Çalışmamızda qRT-PZR yöntemi ile ADA2 gen ifade seviyelerindeki değişimler incelendi. II-1 ve II-2 numaralı hastaların lenfosit ve monosit hücrelerinde ADA2 gen ifadesinin 0. saat ile kıyaslandığında diğer zaman dilimlerinde azaldığı ve LPS uygulanmasının ADA2 aktivitesinde belirgin bir farka neden olmadığı bulundu. Bunun nedeninin in vivo ortam ile hücre kültürünün aynı olmaması ve hücre kültür medyumunda ADA2 gen ifadesini arttıracak faktörlerin bulunmaması olabileceğini düşünmekteyiz. Caorsi ve ark. (21) adenoazin ile uyarılmış monosit hücrelerinden inozin ve adenoazin konsantrasyonları ile ADA2 enzim aktivitesini ölçmüş ve birçok hastada hastalığın şiddeti ile ilişkili olarak düşük enzim aktivitesi olduğunu göstermişlerdir. Heterozigotların ise normal kontroller ile kıyaslandığında daha düşük enzim aktivitesine sahip olduğunu bildirmişlerdir.

II-1 numaralı hastanın nötrofil hücrelerindeki ADA2 gen ifadesinin II-3 numaralı sağlıklı birey ile kıyaslandığında azaldığı bulundu. Bunun nedeni olarak sağlıklı bireyin normal allele sahip olması ile ADA2'nin az da olsa ifadesini sağlayabildiğini ancak hasta bireyin mutant allel için homozigot olması sebebiyle eksik ADA2 seviyelerini telafi edemediğini düşünmekteyiz.

PBMC hücrelerinde II-3 numaralı sağlıklı bireyin ADA2 gen ifadesinin 0. saat ile kıyaslandığında 3, 6 ve 12. saat dilimlerinde azaldığı, II-1 numaralı hastanın 0. saat ile kıyaslandığında 3, 6 ve 12. saat dilimlerinde hem LPS(-) hem de LPS(+) grupta ADA2 gen ifadesinin azaldığı, LPS(+) ve LPS(-) örnekler arasında ise belirgin bir fark olmadığı bulundu. II-1 numaralı hasta, II-3 numaralı sağlıklı birey ile kıyaslandığında ise tüm zaman dilimlerinde ve tüm gruplarda ADA2 gen ifadesinin azaldığı bulundu. Bu sonuçlar hücrelerin in vitro ortama alındıklarında ADA2 gen ifadesinin azaldığını göstermektedir. Aynı zamanda hücrelerde in vitro olarak LPS ile inflamasyonun

tetiklenmesi ADA2 aktivitesinde artışa neden olmamaktadır. LPS dışında inflamasyonu tetikleyen diğer ajanlar kullanılarak ADA2 ekspresyonu üzerinde bir etkisi olup olmayacağı araştırılmalıdır. Aynı zamanda hasta hücrelerinde farklı adenosin konsantrasyonlarında yabancı-tip ADA2 veya ekzon 7 atlanan mutant ADA2 gen ifadesi üzerinde etkisi araştırılabilir.

II-1 numaralı hastanın T lenfosit hücrelerinde ADA2 gen ifadesi, II-3 numaralı sağlıklı bireyin T lenfosit hücrelerine göre daha fazladır. II-1 numaralı hastanın B lenfosit hücrelerinde anlamlı bir ADA2 gen ifadesi bulunmamıştır. II-3 numaralı sağlıklı bireyin B lenfosit hücrelerinde ADA2 gen ifadesi, T lenfosit hücrelerine göre daha fazladır. Bu sonuçlar hastaların B lenfositlerinde ADA2 gen ifadesinin büyük oranda azaldığını göstermiştir. Ayrıca hastaya ait B hücrelerinde ADA2 gen ifadesinin olmaması bu hastada görülen ağır sitopeni bulgusuyla ilişkili olabilir. Zhou ve ark. (14) çalışmalarında artmış B hücresi ölümü ve azalmış B hücresi farklılaşması olduğunu göstermişlerdir. B hücrelerinin ölümü ve farklılaşmalarının bozulması ADA2 gen ifadesinin kaybına bağlı olabilir. NIH tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada ADA2 mutasyonlarının T lenfosit sayısını ve aktivitesini etkilemediği gösterildi ancak yeni yapılan bir çalışma ile DADA2'li bir hastada regülatör T hücrelerinin arttığı (14), CD8⁺ ve CD4⁺ bellek (memory) T hücrelerinin azaldığı bildirildi (5). ADA2 eksikliği olan CD4⁺ ve CD8⁺ bellek (memory) T hücreleri, zayıf proliferasyon, terminal farklılaşma ve tükenme/yaşlanma ile ilişkilendirilen işlevsiz bir fenotip sergiler (114). DADA2'li hastalarda CD4⁺ ve CD8⁺ T hücrelerinin ve B hücrelerinin bozulmuş farklılaşması ile karmaşık bir immünofenotip tanımlanmıştır (115). Farklı bir çalışmada in vitro uyarılmış B hücrelerinin işlevsel olmayan ADA2 proteini salgıladığı, CD4⁺ ve CD8⁺ T hücrelerinin azalmış aktivite sergilediği gösterildi (116). ADA2 eksikliği olan (memory) bellek CD8⁺ T hücrelerinde in vitro olarak azalmış hücre sağkalımı ve granzim üretimi olduğu bildirilmiştir (115). DADA2 hastaları periferik kanda B hücresinin işlev bozukluğuna yol açabilecek fonksiyonel olarak bozulmuş T foliküler yardımcı hücrelerin (cTfh) birikimi ile anormal bir T hücresi dağılımı gösterir (116). Bir çalışmada DADA2'li hastalarda terminal B hücre farklılaşmasında bir kusur olduğu ve pro-B ile pre-B hücre aşamasında kemik iliğinde B hücresi gelişiminde bir blok meydana geldiği gösterildi (115). Ayrıca, ADA2 eksikliği olan B hücre alt gruplarının fenotip açısından bu hücrelerin sağlıklı donörlerde karşılık gelen B hücrelerinden daha az olgun olduğu bildirilmiştir (115). DADA2'li hastalarda B hücre farklılaşmasındaki

bu bozukluklar ve hücre ölümü, çalışmamız sonucunda elde ettiğimiz B hücrelerindeki ADA2 gen ifadesinin kaybı bulgusuyla ilişkili olabilir. Bu sonucun B hücrelerinin hücre kültüründe ADA2 gen ifadesi baskılanarak doğrulanması planlanmaktadır.

ADA2 enzim aktivitesi ölçüldüğünde hastalara ait plazma örneklerinde ADA2 aktivitesinin azaldığı gösterilmiştir. Fakat hücre kültür örneklerinde saptanamamıştır. Bunun sebebi ekstraselüler adenozinin hücre kültür medyumunda bulunmadığı için hücre dışı adenzin konsantrasyonunun düzenleyen ekto-ADA'nın (eADA) salgılanmaması olabilir. Hücre medyumuna adenzin eklenerek bu olasılığı test etmek mümkün olabilir. Zhou ve ark. (14) çalışmasında hastaların plazmasında önemli ölçüde azalmış ADA2 aktivitesi ve hücre lizatlarında Western blot analizi ile fonksiyon kaybıyla tutarlı olarak azalmış ADA2 protein seviyeleri saptamışlardır. Taşıyıcı ebevyenlerde ADA2 aktivitesi ve protein seviyeleri normalin yaklaşık %50'si olarak bulunmuştur. Van Montfrans ve ark. (24) çalışmalarında hastalardaki ADA2 enzim aktivitesinin sağlıklı kontroller ile kıyaslandığında ciddi ölçüde azaldığını göstermişlerdir. Farklı bir çalışmada (48) hastalarda farklı mutasyon grupları (missense, nonsense, insersiyon, delesyon) arasında fonksiyonel farklılıklar olup olmadığını tespit etmek amacıyla her ADA2 mutanşı için ekspresyon plazmidleri oluşturulmuş ve bunları 293T hücrelerine transfekte etmişlerdir. Fonksiyonel analizleri sonucunda ise tüm mutasyonların ADA2 aktivitesinde azalmaya neden olduğunu doğrulamışlardır. Hasta gruplarındaki tüm mutasyonlar minimum rezidüel ADA2 aktivitesi (yabanıl tipin (wild type) < %2'si) göstermiştir. Başka bir çalışmada ise klinik belirtileri farklı olsa da hastalarda ADA2 enzim aktivitesinin neredeyse %50 oranında azaldığı gösterilmiştir (117). Çalışmamızda ise hastaların farklı hücre tiplerinde mutant ADA2'nin yabanıl-tip ADA2'ye oranının farklılık gösterdiği gösterildi. Hastalarda daha çok nötrofil ve lenfositlerde ekzon 7 atlanan mutant ADA2 eksprese olmaktadır. Hastalarda görülen immun yetmezlik, lenfosit örneklerinde ekzon 7 atlanan mutant ADA2 ifade oranının yüksek olması ile açıklanabilir.

Sonuç olarak hücrelerde ADA2 gen ifadesinin zamanla azaldığı ve LPS uygulamasının gen ifadesinde belirgin farka neden olmadığı tespit edilmiştir. İnflamasyonun tetiklenmesi için farklı LPS konsantrasyonları ya da farklı inflamasyon ajanları kullanılarak gen ifadesi üzerindeki etkisi karşılaştırılabilir. Hücre kültüründe

ADA2 enzim aktivitesi saptanamamıştır ancak literatür çalışmalarında da gösterildiği gibi hasta plazmasında ADA2 aktivitesi azaldığı gösterilmiştir.

Bu tez çalışması farklı hücre gruplarının kullanılarak hem ADA2 gen ifadesinin hem ADA2 enzim aktivitesinin araştırıldığı ilk çalışmadır. Klinik fenotipteki farklılıklar ADA2 aktivitesinin hangi hücre tiplerinde daha çok azaldığına bağlı olabilir. Bu sonuçlar DADA2 patofizyolojisinin daha iyi anlaşılmasına ve yeni tedavi stratejilerinin belirlenmesine katkıda bulunacak yeni çalışmalara öncü olacaktır.



KAYNAKLAR

1. Chang Z, Chinault AC, Kellems RE, Nygaard P, Chinault AC, Kellems RE. Deduced amino acid sequence of Escherichia coli adenosine deaminase reveals evolutionarily conserved amino acid residues: implications for catalytic function. *Biochemistry* [Internet]. 1991 Feb 1 [cited 2022 Jun 16];30(8):2273–80. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1998686/>
2. Cortés A, Gracia E, Moreno E, Mallol J, Lluís C, Canela EI, et al. Moonlighting adenosine deaminase: a target protein for drug development. *Med Res Rev* [Internet]. 2015 Jan 1 [cited 2022 Feb 9];35(1):85–125. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24933472/>
3. Hashem H, Egler R, Dalal J. Refractory Pure Red Cell Aplasia Manifesting as Deficiency of Adenosine Deaminase 2. *J Pediatr Hematol Oncol* [Internet]. 2017 [cited 2022 Feb 5];39(5):e293–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28230570/>
4. Poswar F de O, da Fonseca RMT, de Albuquerque LCP, Zhou Q, Jardim LB, Monte TL, et al. Adenosine deaminase 2 deficiency presenting as spastic paraplegia and systemic vasculitis. *J Neurol* [Internet]. 2016 Apr 1 [cited 2022 Feb 6];263(4):818–20. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26914925/>
5. Van Eyck L, Hershfield MS, Pombal D, Kelly SJ, Ganson NJ, Moens L, et al. Hematopoietic stem cell transplantation rescues the immunologic phenotype and prevents vasculopathy in patients with adenosine deaminase 2 deficiency. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. 2015 Jan 1 [cited 2021 Dec 31];135(1):283–287.e5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2014.09.042>
6. Ben-Ami T, Revel-Vilk S, Brooks R, Shaag A, Hershfield MS, Kelly SJ, et al. Extending the Clinical Phenotype of Adenosine Deaminase 2 Deficiency. *J Pediatr* [Internet]. 2016;177:316–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpeds.2016.06.058>
7. Hashem H, Kumar AR, Müller I, Babor F, Bredius R, Dalal J, et al. Hematopoietic stem cell transplantation rescues the hematological, immunological, and vascular phenotype in DADA2. *Blood* [Internet]. 2017 Dec 14 [cited 2022 Feb 3];130(24):2682–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28974505/>
8. Hsu AP, West RR, Calvo KR, Cuellar-Rodriguez J, Parta M, Kelly SJ, et al. Adenosine deaminase type 2 deficiency masquerading as GATA2 deficiency: Successful hematopoietic stem cell transplantation. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. 2016 Aug 1 [cited 2022 Feb 6];138(2):628–630.e2. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27130863/>
9. Cipe FE, Aydogmus C, Serwas NK, Keskindemirci G, Boztuğ K. Novel Mutation in CECR1 Leads to Deficiency of ADA2 with Associated Neutropenia. *J Clin Immunol* [Internet]. 2018 Apr 1 [cited 2022 Feb 6];38(3):273–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29564582/>
10. Fellmann F, Angelini F, Wassenberg J, Perreau M, Arenas Ramirez N, Simon G, et al. IL-17 receptor A and adenosine deaminase 2 deficiency in siblings with recurrent infections and chronic inflammation. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. 2016 Apr 1 [cited 2022 Feb 6];137(4):1189–1196.e2. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26607704/>

11. Michniacki TF, Hannibal M, Ross CW, Frame DG, DuVall AS, Khoriaty R, et al. Hematologic Manifestations of Deficiency of Adenosine Deaminase 2 (DADA2) and Response to Tumor Necrosis Factor Inhibition in DADA2-Associated Bone Marrow Failure. *J Clin Immunol* [Internet]. 2018 Feb 1 [cited 2022 Feb 5];38(2):166–73. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29411230/>
12. Trotta L, Martelius T, Siitonen T, Hautala T, Hämäläinen S, Juntti H, et al. ADA2 deficiency: Clonal lymphoproliferation in a subset of patients. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. 2018 Apr 1 [cited 2022 Feb 6];141(4):1534-1537.e8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29391253/>
13. Bras J, Guerreiro R, Santo GC. Mutant ADA2 in vasculopathies. *N Engl J Med* [Internet]. 2014 Jul 31 [cited 2022 Feb 6];371(5):478–80. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25075847>
14. Zhou Q, Yang D, Ombrello AK, Zavialov A V., Toro C, Zavialov A V., et al. Early-Onset Stroke and Vasculopathy Associated with Mutations in ADA2. *N Engl J Med*. 2014;370(10):911–20.
15. Sundin M, Marits P, Nierkens S, Kolios AGA, Nilsson J. “Immune” Thrombocytopenia as Key Feature of a Novel ADA2 Deficiency Variant: Implication on Differential Diagnostics of ITP in Children. *J Pediatr Hematol Oncol* [Internet]. 2019 Mar 1 [cited 2022 Feb 6];41(2):155–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29620681/>
16. Batu ED, Karadag O, Taskiran EZ, Kalyoncu U, Aksentijevich I, Alikasifoglu M, et al. A Case Series of Adenosine Deaminase 2-deficient Patients Emphasizing Treatment and Genotype-phenotype Correlations. *J Rheumatol* [Internet]. 2015 Aug 1 [cited 2022 Feb 6];42(8):1532–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26233953/>
17. Navon Elkan P, Pierce SB, Segel R, Walsh T, Barash J, Padeh S, et al. Mutant Adenosine Deaminase 2 in a Polyarteritis Nodosa Vasculopathy A BS TR AC T. *NEJM.org N Engl J Med*. 2014;10(6):921–52.
18. Aksentijevich I, Moura NS, Barron K. Adenosine Deaminase 2 Deficiency. 2019 Aug 8 [cited 2022 Feb 3];1–23. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK544951/>
19. Rama M, Duflos C, Melki I, Bessis D, Bonhomme A, Martin H, et al. A decision tree for the genetic diagnosis of deficiency of adenosine deaminase 2 (DADA2): a French reference centres experience. *Eur J Hum Genet* 2018 267 [Internet]. 2018 Apr 23 [cited 2022 Jun 16];26(7):960–71. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41431-018-0130-6>
20. Gibson KM, Morishita KA, Dancey P, Moorehead P, Drögemöller B, Han X, et al. Identification of Novel Adenosine Deaminase 2 Gene Variants and Varied Clinical Phenotype in Pediatric Vasculitis. *Arthritis Rheumatol* [Internet]. 2019 Oct 1 [cited 2022 Jun 16];71(10):1747–55. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/art.40913>
21. Caorsi R, Penco F, Grossi A, Insalaco A, Omenetti A, Alessio M, et al. ADA2 deficiency (DADA2) as an unrecognised cause of early onset polyarteritis nodosa and stroke: a multicentre national study. *Ann Rheum Dis* [Internet]. 2017 Oct 1 [cited 2022 Feb 3];76(10):1648–56. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28522451/>
22. Bulut E, Erden A, Karadag O, Oguz KK, Ozen S. Deficiency of adenosine deaminase 2; special focus on central nervous system imaging. *J Neuroradiol*. 2019 May 1;46(3):193–8.

23. Westendorp WF, Nederkoorn PJ, Aksentijevich I, Hak AE, Lichtenbelt KD, Braun KPJ. Unexplained early-onset lacunar stroke and inflammatory skin lesions: Consider ADA2 deficiency. *Neurology* [Internet]. 2015 May 19 [cited 2022 Feb 9];84(20):2092–3. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25888558/>
24. Van Montfrans JM, R Hartman EA, J Braun KP, M Hennekam EA, Hak EA, Nederkoorn PJ, et al. Phenotypic variability in patients with ADA2 deficiency due to identical homozygous R169Q mutations *Rheumatology key messages*. *Rheumatology* [Internet]. 2016;55:902–10. Available from: <https://academic.oup.com/rheumatology/article/55/5/902/1744678>
25. Schepp J, Bulashevskaya A, Mannhardt-Laakmann W, Cao H, Yang F, Seidl M, et al. Deficiency of Adenosine Deaminase 2 Causes Antibody Deficiency. *J Clin Immunol* [Internet]. 2016 Apr 1 [cited 2022 Feb 9];36(3):179–86. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26922074/>
26. Santiago TMG, Zavialov A, Saarela J, Seppanen M, Reed AM, Abraham RS, et al. Dermatologic Features of ADA2 Deficiency in Cutaneous Polyarteritis Nodosa. *JAMA dermatology* [Internet]. 2015 Nov 1 [cited 2022 Feb 9];151(11):1230–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26131734/>
27. Nanthapisal S, Murphy C, Omoyinmi E, Hong Y, Standing A, Berg S, et al. Deficiency of Adenosine Deaminase Type 2: A Description of Phenotype and Genotype in Fifteen Cases. *Arthritis Rheumatol* (Hoboken, NJ) [Internet]. 2016 Sep 1 [cited 2022 Feb 3];68(9):2314–22. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27059682/>
28. Belot A, Wassmer E, Twilt M, Lega JC, Zeef LAH, Oojageer A, et al. Mutations in CECR1 associated with a neutrophil signature in peripheral blood. *Pediatr Rheumatol Online J* [Internet]. 2014 Sep 24 [cited 2022 Feb 9];12(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25278816/>
29. Caorsi R, Penco F, Grossi A, Insalaco A, Omenetti A, Alessio M, et al. ADA2 deficiency (DADA2) as an unrecognised cause of early onset polyarteritis nodosa and stroke: a multicentre national study. *Ann Rheum Dis* [Internet]. 2017 Oct 1 [cited 2022 Jun 16];76(10):1648–56. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28522451/>
30. Batu ED, Karadag O, Taskiran EZ, Kalyoncu U, Aksentijevich I, Alikasifoglu M, et al. A Case Series of Adenosine Deaminase 2-deficient Patients Emphasizing Treatment and Genotype-phenotype Correlations. *J Rheumatol* [Internet]. 2015 Aug 1 [cited 2022 Jun 16];42(8):1532–4. Available from: <https://www.jrheum.org/content/42/8/1532>
31. Schepp J, Proietti M, Frede N, Buchta M, Hübscher K, Rojas Restrepo J, et al. Screening of 181 Patients With Antibody Deficiency for Deficiency of Adenosine Deaminase 2 Sheds New Light on the Disease in Adulthood. *Arthritis Rheumatol* (Hoboken, NJ) [Internet]. 2017 Aug 1 [cited 2022 Feb 5];69(8):1689–700. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28493328/>
32. Alsultan A, Basher E, Alqanatish J, Mohammed R, Alfadhel M. Deficiency of ADA2 mimicking autoimmune lymphoproliferative syndrome in the absence of livedo reticularis and vasculitis. *Pediatr Blood Cancer* [Internet]. 2018 Apr 1 [cited 2022 Jun 16];65(4). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29271561/>
33. Carmona-Rivera C, Khaznadar SS, Shwin KW, Irizarry-Caro JA, O'neil LJ, Liu Y, et al. Deficiency of adenosine deaminase 2 triggers adenosine-mediated

- NETosis and TNF production in patients with DADA2 [Internet]. Available from: <http://ashpublications.org/blood/article-pdf/134/4/395/1554092/blood892752.pdf>
34. Barzaghi F, Minniti F, Mauro M, De Bortoli M, Balter R, Bonetti E, et al. ALPS-like phenotype caused by ADA2 deficiency rescued by allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Front Immunol*. 2019;10(JAN):2767.
 35. Chong-Neto HJ, Segundo GRS, Bandeira M, Chong-Silva DC, Rosário CS, Riedi CA, et al. Homozygous Splice ADA2 Gene Mutation Causing ADA-2 Deficiency. *J Clin Immunol* 2019 398 [Internet]. 2019 Oct 15 [cited 2022 Feb 9];39(8):842–5. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10875-019-00697-2>
 36. Hara T, Ando K, Tsurumi H, Moriwaki H. Excessive production of tumor necrosis factor-alpha by bone marrow T lymphocytes is essential in causing bone marrow failure in patients with aplastic anemia. *Eur J Haematol* [Internet]. 2004 Jul 1 [cited 2022 Jun 17];73(1):10–6. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1600-0609.2004.00259.x>
 37. Insalaco A, Moneta GM, Pardeo M, Caiello I, Messia V, Bracaglia C, et al. Variable Clinical Phenotypes and Relation of Interferon Signature with Disease Activity in ADA2 Deficiency. *J Rheumatol* [Internet]. 2019 May 1 [cited 2022 Jun 17];46(5):523–6. Available from: <https://www.jrheum.org/content/46/5/523>
 38. Skrabl-Baumgartner A, Plecko B, Schmidt WM, König N, Hershfield M, Gruber-Sedlmayr U, et al. Autoimmune phenotype with type I interferon signature in two brothers with ADA2 deficiency carrying a novel CECR1 mutation. *Pediatr Rheumatol* [Internet]. 2017 Aug 22 [cited 2022 Jun 17];15(1):1–5. Available from: <https://ped-rheum.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12969-017-0193-x>
 39. Uettwiller F, Sarabay G, Rodero MP, Rice GI, Lagrue E, Marot Y, et al. ADA2 deficiency: case report of a new phenotype and novel mutation in two sisters. *RMD Open* [Internet]. 2016 May 1 [cited 2022 Jun 4];2(1):e000236. Available from: <https://rmdopen.bmj.com/content/2/1/e000236>
 40. Lee PY. Vasculopathy, immunodeficiency, and bone marrow failure: The intriguing syndrome caused by deficiency of adenosine deaminase 2. *Front Pediatr*. 2018;6:282.
 41. Liu L, Wang W, Wang Y, Hou J, Ying W, Hui X, et al. A Chinese DADA2 patient: report of two novel mutations and successful HSCT. *Immunogenetics* [Internet]. 2019 Apr 1 [cited 2022 Jun 17];71(4):299–305. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00251-018-01101-w>
 42. Hashem H, Egler R, Dalal J. Refractory Pure Red Cell Aplasia Manifesting as Deficiency of Adenosine Deaminase 2. *J Pediatr Hematol Oncol* [Internet]. 2017 [cited 2022 Jun 16];39(5):e293–6. Available from: https://journals.lww.com/jpho-online/Fulltext/2017/07000/Refractory_Pure_Red_Cell_Aplasia_Manifesting_as.31.aspx
 43. Kaljas Y, Liu C, Skaldin M, Wu C, Zhou Q, Lu Y, et al. Human adenosine deaminases ADA1 and ADA2 bind to different subsets of immune cells. *Cell Mol Life Sci*. 2017;74(3):555–70.
 44. Tull TJ, Martin B, Spencer J, Sangle S, Chua S, McGrath JA, et al. Sneddon syndrome associated with two novel ADA2 gene mutations. *Rheumatology* [Internet]. 2020 Jun 1 [cited 2022 Jun 17];59(6):1448–50. Available from: <https://academic.oup.com/rheumatology/article/59/6/1448/5607340>

45. Kendall JL, Springer JM. The Many Faces of a Monogenic Autoinflammatory Disease: Adenosine Deaminase 2 Deficiency. *Curr Rheumatol Rep* [Internet]. 2020 Oct 1 [cited 2022 Jan 5];22(10). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32845415/>
46. Malik R, Chauhan G, Traylor M, Sargurupremraj M, Okada Y, Mishra A, et al. Multiancestry genome-wide association study of 520,000 subjects identifies 32 loci associated with stroke and stroke subtypes. *Nat Genet* [Internet]. 2018 Apr 1 [cited 2022 Feb 9];50(4):524–37. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29531354/>
47. Traylor M, Bevan S, Baron JC, Hassan A, Lewis CM, Markus HS. Genetic Architecture of Lacunar Stroke. *Stroke* [Internet]. 2015 Sep 28 [cited 2022 Feb 9];46(9):2407–12. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26243229/>
48. Lee PY, Kellner ES, Huang Y, Furutani E, Huang Z, Bainter W, et al. Genotype and functional correlates of disease phenotype in deficiency of adenosine deaminase 2 (DADA2). *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. 2020 Jun 1 [cited 2020 Dec 30];145(6):1664-1672.e10. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2019.12.908>
49. Westendorp WF, Nederkoorn PJ, Aksentijevich I, Hak AE, Lichtenbelt KD, Braun KPJ. Unexplained early-onset lacunar stroke and inflammatory skin lesions: Consider ADA2 deficiency. *Neurology* [Internet]. 2015 May 19 [cited 2022 Jun 16];84(20):2092–3. Available from: <https://n.neurology.org/content/84/20/2092>
50. Claassen D, Boals M, Bowling KM, Cooper GM, Cox J, Hershfield M, et al. Complexities of genetic diagnosis illustrated by an atypical case of congenital hypoplastic anemia. *Cold Spring Harb Mol case Stud* [Internet]. 2018 Dec 1 [cited 2022 Jun 17];4(6). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30559313/>
51. Krutzke S, Horneff G. Treatment of Two Boys Suffering From Deficiency of Adenosine Deaminase Type 2 (DADA2) With TNF-Inhibitor Etanercept. *J Clin Rheumatol* [Internet]. 2021 Dec 1 [cited 2022 Jun 17];27(8S):S509–12. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31651641/>
52. Van Eyck L, Liston A, Meyts I. Mutant ADA2 in vasculopathies. *N Engl J Med* [Internet]. 2014 Jul 31 [cited 2022 Feb 9];371(5):478–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25075846>
53. Nanthapisal S, Murphy C, Omoyinmi E, Hong Y, Standing A, Berg S, et al. Deficiency of Adenosine Deaminase Type 2: A Description of Phenotype and Genotype in Fifteen Cases. *Arthritis Rheumatol*. 2016 Sep 1;68(9):2314–22.
54. Van Eyck L, Hershfield MS, Pombal D, Kelly SJ, Ganson NJ, Moens L, et al. Hematopoietic stem cell transplantation rescues the immunologic phenotype and prevents vasculopathy in patients with adenosine deaminase 2 deficiency. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. 2015 Jan 1 [cited 2022 Jun 17];135(1):283-287.e5. Available from: <http://www.jacionline.org/article/S0091674914014808/fulltext>
55. Ombrello A, Stone D, Hoffmann P, Jones A, Barham B, Barron K, et al. The deficiency of adenosine deaminase type 2-results of therapeutic intervention. *Pediatr Rheumatol Online J* [Internet]. 2015 Dec [cited 2022 Jun 17];13(Suppl 1):O40. Available from: [/pmc/articles/PMC4597175/](https://pmc/articles/PMC4597175/)
56. Ombrello AK, Qin J, Hoffmann PM, Kumar P, Stone D, Jones A, et al. Treatment Strategies for Deficiency of Adenosine Deaminase 2. *N Engl J Med*

- [Internet]. 2019 Apr 18 [cited 2022 Jun 17];380(16):1582–4. Available from: <https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMc1801927>
57. Sahin S, Adrovic A, Barut K, Ugurlu S, Turanli ET, Ozdogan H, et al. Clinical, imaging and genotypical features of three deceased and five surviving cases with ADA2 deficiency. *Rheumatol Int* [Internet]. 2018 Jan 1 [cited 2022 Jun 17];38(1):129–36. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00296-017-3740-3>
 58. Zoccolillo M, Brigida I, Barzaghi F, Scala S, Hernandez RJ, Basso-Ricci L, et al. Lentiviral correction of enzymatic activity restrains macrophage inflammation in adenosine deaminase 2 deficiency. *Blood Adv* [Internet]. 2021 Aug 24 [cited 2022 Jun 18];5(16):3174–87. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34424322/>
 59. GIBLETT ER. ADA and PNP deficiencies: how it all began. *Ann N Y Acad Sci* [Internet]. 1985 [cited 2022 Jun 17];451(1):1–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3935025/>
 60. Sauer AV, Brigida I, Carriglio N, Aiuti A. Autoimmune dysregulation and purine metabolism in adenosine deaminase deficiency. *Front Immunol*. 2012;3(AUG).
 61. Bradford KL, Moretti FA, Carbonaro-Sarracino DA, Gaspar HB, Kohn DB. Adenosine Deaminase (ADA)-Deficient Severe Combined Immune Deficiency (SCID): Molecular Pathogenesis and Clinical Manifestations. *J Clin Immunol* [Internet]. 2017 Oct 1 [cited 2022 Feb 8];37(7):626–37. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28842866/>
 62. Flinn AM, Gennery AR. Adenosine deaminase deficiency: a review. *Orphanet J Rare Dis* [Internet]. 2018 Apr 24 [cited 2022 Feb 8];13(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29690908/>
 63. Köse M, Schiedel AC, Bauer AA, Poschenrieder H, Burbiel JC, Akkinepally RR, et al. Focused screening to identify new adenosine kinase inhibitors. *Bioorg Med Chem* [Internet]. 2016 [cited 2022 Feb 8];24(21):5127–33. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27595538/>
 64. Bin A, Caputi V, Bistoletti M, Montopoli M, Colucci R, Antonioli L, et al. The ecto-enzymes CD73 and adenosine deaminase modulate 5'-AMP-derived adenosine in myofibroblasts of the rat small intestine. *Purinergic Signal* 2018 144 [Internet]. 2018 Sep 29 [cited 2022 Feb 8];14(4):409–21. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11302-018-9623-6>
 65. Pastor-Anglada M, Pérez-Torras S. Who is who in Adenosine transport. *Front Pharmacol*. 2018 Jun 14;9(JUN):627.
 66. Camici M, Garcia-Gil M, Tozzi MG. The Inside Story of Adenosine. *Int J Mol Sci* 2018, Vol 19, Page 784 [Internet]. 2018 Mar 9 [cited 2022 Feb 8];19(3):784. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/19/3/784/htm>
 67. Soslau G. Extracellular adenine compounds within the cardiovascular system: Their source, metabolism and function. *Med Drug Discov*. 2019 Dec 1;4:100018.
 68. Fredholm BB. Adenosine, an endogenous distress signal, modulates tissue damage and repair. *Cell Death Differ* 2007 147 [Internet]. 2007 Mar 30 [cited 2022 Jun 17];14(7):1315–23. Available from: <https://www.nature.com/articles/4402132>
 69. Haskó G, Linden J, Cronstein B, Pacher P. Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases. *Nat Rev Drug Discov* 2008 79 [Internet]. 2008 [cited 2022 Jun 17];7(9):759–70. Available from: <https://www.nature.com/articles/nrd2638>

70. Vecchio EA, White PJ, May LT. Targeting Adenosine Receptors for the Treatment of Cardiac Fibrosis. *Front Pharmacol* [Internet]. 2017 May 5 [cited 2022 Feb 8];8(MAY). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28529484/>
71. Headrick JP, Ashton KJ, Rose'Meyer RB, Peart JN. Cardiovascular adenosine receptors: expression, actions and interactions. *Pharmacol Ther* [Internet]. 2013 [cited 2022 Feb 8];140(1):92–111. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23764371/>
72. Ballesteros-Yáñez I, Castillo CA, Merighi S, Gessi S. The Role of Adenosine Receptors in Psychostimulant Addiction. *Front Pharmacol* [Internet]. 2018 Jan 10 [cited 2022 Feb 8];8(JAN). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29375384/>
73. Kutryb-Zajac B, Mierzejewska P, Sucajtys-Szulc E, Bulinska A, Zabielska MA, Jablonska P, et al. Inhibition of LPS-stimulated ecto-adenosine deaminase attenuates endothelial cell activation. *J Mol Cell Cardiol* [Internet]. 2019 Mar 1 [cited 2022 Feb 7];128:62–76. Available from: <http://www.jmcc-online.com/article/S0022282818309647/fulltext>
74. Kutryb-Zajac B, Jablonska P, Serocki M, Bulinska A, Mierzejewska P, Friebe D, et al. Nucleotide ecto-enzyme metabolic pattern and spatial distribution in calcific aortic valve disease; its relation to pathological changes and clinical presentation. *Clin Res Cardiol* [Internet]. 2020 Feb 1 [cited 2022 Feb 8];109(2):137–60. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31144065/>
75. Jacobson KA, Gao ZG. Adenosine receptors as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov* 2006 53 [Internet]. 2006 Mar [cited 2022 Feb 8];5(3):247–64. Available from: <https://www.nature.com/articles/nrd1983>
76. Grenz A, Homann D, Eltzschig HK. Extracellular Adenosine: A Safety Signal That Dampens Hypoxia-Induced Inflammation During Ischemia. <https://home.liebertpub.com/ars> [Internet]. 2011 Sep 1 [cited 2022 Feb 8];15(8):2221–34. Available from: <https://www.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/ars.2010.3665>
77. Müller CE, Jacobson KA. Xanthines as Adenosine Receptor Antagonists. *Handb Exp Pharmacol* [Internet]. 2011 [cited 2022 Feb 8];200:151–99. Available from: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-13443-2_6
78. da Rocha Lapa F, de Oliveira APL, Accetturi BG, de Oliveira Martins I, Domingos HV, de Almeida Cabrini D, et al. Anti-inflammatory effects of inosine in allergic lung inflammation in mice: evidence for the participation of adenosine A2A and A3 receptors. *Purinergic Signal* 2013 93 [Internet]. 2013 Jan 26 [cited 2022 Feb 8];9(3):325–36. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11302-013-9351-x>
79. Mager LF, Burkhard R, Pett N, Cooke NCA, Brown K, Ramay H, et al. Microbiome-derived inosine modulates response to checkpoint inhibitor immunotherapy. *Science* [Internet]. 2020 Sep 1 [cited 2022 Feb 8];369(6510):1481–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32792462/>
80. Herman-de-Sousa C, Pinheiro AR, Paramos-de-Carvalho D, Costa MA, Ferreira F, Magalhães-Cardoso T, et al. Opposing Effects of Adenosine and Inosine in Human Subcutaneous Fibroblasts May Be Regulated by Third Party ADA Cell Providers. *Cells* [Internet]. 2020 Mar 7 [cited 2022 Feb 8];9(3). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32156055/>

81. Gracia E, Farré D, Cortés A, Ferrer-Costa C, Orozco M, Mallol J, et al. The catalytic site structural gate of adenosine deaminase allosterically modulates ligand binding to adenosine receptors. *FASEB J* [Internet]. 2013 Mar [cited 2022 Feb 8];27(3):1048–61. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23193172/>
82. Moreno E, Canet J, Gracia E, Lluís C, Mallol J, Canela EI, et al. Molecular evidence of adenosine deaminase linking adenosine A2A receptor and CD26 proteins. *Front Pharmacol*. 2018 Feb 15;9(FEB):106.
83. Kutryb-Zajac B, Mierzejewska P, Slominska EM, Smolenski RT. Therapeutic perspectives of adenosine deaminase inhibition in cardiovascular diseases. *Molecules* [Internet]. 2020 Oct 1 [cited 2021 Dec 30];25(20). Available from: <https://encyclopedia.pub/3578>
84. Hosmane RS, Hong M. How Important Is the N-3 Sugar Moiety in the Tight-Binding Interaction of Coformycin with Adenosine Deaminase? *Biochem Biophys Res Commun*. 1997 Jul 9;236(1):88–93.
85. Wang Z, Quijcho FA. Complexes of Adenosine Deaminase with Two Potent Inhibitors: X-ray Structures in Four Independent Molecules at pH of Maximum Activity^{†,‡}. *Biochemistry* [Internet]. 1998 Jun 9 [cited 2022 Feb 8];37(23):8314–24. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bi980324o>
86. Sideraki V, Wilson DK, Kurz LC, Quijcho FA, Rudolph FB. Site-Directed Mutagenesis of Histidine 238 in Mouse Adenosine Deaminase: Substitution of Histidine 238 Does Not Impede Hydroxylate Formation^{†,‡}. *Biochemistry* [Internet]. 1996 Nov 26 [cited 2022 Feb 8];35(47):15019–28. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bi961427e>
87. Nagano N, Orengo CA, Thornton JM. One Fold with Many Functions: The Evolutionary Relationships between TIM Barrel Families Based on their Sequences, Structures and Functions. *J Mol Biol*. 2002 Aug 30;321(5):741–65.
88. Niu W, Shu Q, Chen Z, Mathews S, Di Cera E, Frieden C. The Role of Zn²⁺ on the Structure and Stability of Murine Adenosine Deaminase[†]. *J Phys Chem B* [Internet]. 2010 Dec 16 [cited 2022 Feb 8];114(49):16156–65. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jp106041v>
89. Wu JZ, Walker H, Lau JYN, Hong Z. Activation and deactivation of a broad-spectrum antiviral drug by a single enzyme: Adenosine deaminase catalyzes two consecutive deamination reactions. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2003 Jan 1 [cited 2022 Feb 8];47(1):426–31. Available from: <https://journals.asm.org/doi/abs/10.1128/AAC.47.1.426-431.2003>
90. Zavialov A V., Engström Å. Human ADA2 belongs to a new family of growth factors with adenosine deaminase activity. *Biochem J* [Internet]. 2005 Oct 1 [cited 2022 Feb 3];391(Pt 1):51. Available from: <https://pmc/articles/PMC1237138/>
91. Buckley RH. Molecular Defects in Human Severe Combined Immunodeficiency and Approaches to Immune Reconstitution. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.immunol.22.012703.104614> [Internet]. 2004 Mar 19 [cited 2022 Jun 17];22:625–55. Available from: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.immunol.22.012703.104614>
92. Zavialov A V., Gracia E, Glaichenhaus N, Franco R, Zavialov A V., Lauvau G. Human adenosine deaminase 2 induces differentiation of monocytes into macrophages and stimulates proliferation of T helper cells and macrophages. *J Leukoc Biol* [Internet]. 2010 Aug 1 [cited 2022 Feb 2];88(2):279–90. Available

- from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20453107/>
93. Zavialov A V., Yu X, Spillmann D, Lauvau G, Zavialo A V. Structural basis for the growth factor activity of human adenosine deaminase ADA2. *J Biol Chem* [Internet]. 2010 Apr 16 [cited 2022 Jun 17];285(16):12367–77. Available from: <http://www.jbc.org/article/S002192581961118X/fulltext>
 94. Dolezal T, Dolezelova E, Zurovec M, Bryant PJ. A Role for Adenosine Deaminase in Drosophila Larval Development. *PLOS Biol* [Internet]. 2005 [cited 2022 Jun 17];3(7):e201. Available from: <https://journals.plos.org/plosbiology/article?id=10.1371/journal.pbio.0030201>
 95. Iijima R, Kunieda T, Yamaguchi S, Kamigaki H, Fujii-Taira I, Sekimizu K, et al. The Extracellular Adenosine Deaminase Growth Factor, ADGF/CECR1, Plays a Role in Xenopus Embryogenesis via the Adenosine/P1 Receptor *. *J Biol Chem* [Internet]. 2008 Jan 25 [cited 2022 Jun 17];283(4):2255–64. Available from: <http://www.jbc.org/article/S0021925820776593/fulltext>
 96. Zavialov A V., Engström Å. Human ADA2 belongs to a new family of growth factors with adenosine deaminase activity. *Biochem J* [Internet]. 2005 Oct 1 [cited 2022 Jun 17];391(1):51–7. Available from: </biochemj/article/391/1/51/78742/Human-ADA2-belongs-to-a-new-family-of-growth>
 97. Caorsi R, Penco F, Schena F, Gattorno M. Monogenic polyarteritis: The lesson of ADA2 deficiency. *Pediatr Rheumatol* [Internet]. 2016 Sep 8 [cited 2021 Dec 31];14(1):1–16. Available from: <https://ped-rheum.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12969-016-0111-7>
 98. Andreasyan NA, Hairapetyan HL, Sargisova YG, Mardanyan SS. ADA2 isoform of adenosine deaminase from pleural fluid. *FEBS Lett* [Internet]. 2005 Jan 31 [cited 2022 Feb 7];579(3):643–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15670822/>
 99. Lee PY. Vasculopathy, Immunodeficiency, and Bone Marrow Failure: The Intriguing Syndrome Caused by Deficiency of Adenosine Deaminase 2. *Front Pediatr* [Internet]. 2018 [cited 2022 Feb 2];6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30406060/>
 100. Arts K, Bergerson JRE, Ombrello AK, Similuk M, Oler AJ, Agharahimi A, et al. Warts and DADA2: a Mere Coincidence? *J Clin Immunol* [Internet]. 2018 Nov 1 [cited 2022 Feb 5];38(8):836–43. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30386947/>
 101. Akgun-Dogan O, Simsek-Kiper PO, Taskiran E, Lisowski C, Brinkmann J, Schanze D, et al. ADA2 deficiency in a patient with Noonan syndrome-like disorder with loose anagen hair: The co-occurrence of two rare syndromes. *Am J Med Genet Part A* [Internet]. 2019 Dec 1 [cited 2022 Feb 9];179(12):2474–80. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ajmg.a.61363>
 102. Garg N, Kasapcopur O, Foster J, Barut K, Tekin A, Kızılkılıç O, et al. Novel adenosine deaminase 2 mutations in a child with a fatal vasculopathy. *Eur J Pediatr* [Internet]. 2014 [cited 2022 Feb 9];173(6):827–30. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24737293/>
 103. Riazi MA, Brinkman-Mills P, Nguyen T, Pan H, Phan S, Ying F, et al. The human homolog of insect-derived growth factor, CECR1, is a candidate gene for features of cat eye syndrome. *Genomics*. 2000;64(3):277–85.
 104. Bagheri S, Saboury AA, Haertlé T. Adenosine deaminase inhibition. *Int J Biol Macromol*. 2019 Dec 1;141:1246–57.

105. Terasaka T. Non-nucleoside adenosine deaminase inhibitors: 2000 – 2004. <http://dx.doi.org/10.1517/13543776157817> [Internet]. 2005 Jul [cited 2022 Feb 9];15(7):817–28. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1517/13543776.15.7.817>
106. Kandalkar SR, Ramaiah PA, Joshi M, Wavhal A, Waman Y, Raje AA, et al. Modifications of flexible nonyl chain and nucleobase head group of (+)-erythro-9-(2'-s-hydroxy-3'-s-nonyl)adenine [(+)-EHNA] as adenosine deaminase inhibitors. *Bioorg Med Chem*. 2017 Oct 15;25(20):5799–819.
107. Porter DJT, Abushanab E. Kinetics of inhibition of calf intestinal adenosine deaminase by (+)- and (-)-erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)adenine. *Biochemistry* [Internet]. 1992 Feb 1 [cited 2022 Feb 9];31(35):8216–20. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1525161/>
108. Curtis MA, Varkhedkar V, Pragnacharyulu PVP, Abushanab E. Adenosine deaminase inhibitors. Synthesis and biological evaluation of aralkyladenines (ARADS). *Bioorg Med Chem Lett*. 1998 Jul 7;8(13):1639–42.
109. Cristalli G, Eleuteri A, Volpini R, Vittori S, Camaioni E, Lupidi G. Adenosine deaminase inhibitors: synthesis and structure-activity relationships of 2-hydroxy-3-nonyl derivatives of azoles. *J Med Chem* [Internet]. 2002 Jan 1 [cited 2022 Feb 9];37(1):201–5. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jm00027a026>
110. Cristalli G, Eleuteri A, Franchetti P, Grifantini M, Vittori S, Lupidi G. Adenosine deaminase inhibitors: synthesis and structure activity relationships of imidazole analogs of erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)adenine. *J Med Chem* [Internet]. 2002 Mar 1 [cited 2022 Feb 9];34(3):1187–92. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jm00107a044>
111. Cristalli G, Vittori S, Eleuteri A, Volpini R, Camaioni E, Lupidi G, et al. Synthesis and Biological Evaluation of N6-Cycloalkyl Derivatives of 1-Deazaadenine Nucleosides: A New Class of Anti-Human Immunodeficiency Virus Agents. *J Med Chem* [Internet]. 2002 Sep 1 [cited 2022 Feb 9];38(20):4019–25. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jm00020a017>
112. Gakis C. Adenosine deaminase (ADA) isoenzymes ADA1 and ADA2: Diagnostic and biological role. *Eur Respir J*. 1996;9(4):632–3.
113. Kant B, Van Nistelrooij A, Ekmekci SS, Henriët SS V, Hoppenreijds E, Van Deuren M, et al. S-142. Vol. 37, *Clin Exp Rheumatol*. 2019.
114. Brenchley JM, Karandikar NJ, Betts MR, Ambrozak DR, Hill BJ, Crotty LE, et al. Expression of CD57 defines replicative senescence and antigen-induced apoptotic death of CD8⁺ T cells. *Blood* [Internet]. 2003 Apr 1 [cited 2022 Jun 22];101(7):2711–20. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12433688/>
115. Yap JY, Moens L, Lin M-W, Kane A, Kelleher A, Toong C, et al. Intrinsic Defects in B Cell Development and Differentiation, T Cell Exhaustion and Altered Unconventional T Cell Generation Characterize Human Adenosine Deaminase Type 2 Deficiency. 3:18. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10875-021-01141-0>
116. Schena F, Penco F, Volpi S, Pastorino C, Caorsi R, Kalli F, et al. Dysregulation in B-cell responses and T follicular helper cell function in ADA2 deficiency patients. *Eur J Immunol* [Internet]. 2021 Jan 1 [cited 2022 Jun 18];51(1):206–19. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32707604/>

117. Uettwiller F, Sarabay G, Roderio MP, Rice GI, Lagrue E, Marot Y, et al. ADA2 deficiency: case report of a new phenotype and novel mutation in two sisters. *RMD open* [Internet]. 2016 [cited 2021 Dec 31];2(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27252897/>



HAM VERİLER



FORMLAR

ETİK KURUL KARARI

PATENT HAKKI İZİNİ

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

ADENOSİN DEAMİNAZ 2 EKSİKLİĞİ HASTALIĞINDA ADA2 MUTANT ALLELİN EKSPRESYON DÜZEYLERİNİN HASTALIĞIN ŞİDDETİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

ORJİNALLİK RAPORU

% 7	% 6	% 1	% 3
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 3
2	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Öğrenci Ödevi	% 1
3	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	% 1
4	Submitted to Gaziantep Aniversitesi Öğrenci Ödevi	<% 1
5	Submitted to Chapman University Öğrenci Ödevi	<% 1
6	polen.itu.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
7	archiv.ub.uni-heidelberg.de İnternet Kaynağı	<% 1
8	www.ncbi.nlm.nih.gov İnternet Kaynağı	<% 1

ÖZGEÇMİŞ

