



MERVE SARITAŞ

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İSTANBUL-2022

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

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**PRIMER İMMÜN YETERSİZLİK HASTALARINDA BELİRLENEN YENİ
VARYANTLARIN VALIDASYONU**

MERVE SARITAŞ

**DANIŞMAN
PROF.DR. MÜGE SAYITOĞLU**

**GENETİK ANABİLİMDALİ
TEZLİ YÜKSEK LİSANS**

İSTANBUL-2022

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

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**PRIMER İMMÜN YETERSİZLİK HASTALARINDA BELİRLENEN YENİ
VARYANTLARIN VALIDASYONU**

MERVE SARITAŞ

**İKİNCİ DANIŞMAN
DOÇ.DR. YUK YİNG**

**GENETİK ANABİLİMDALİ
TEZLİ YÜKSEK LİSANS**

İSTANBUL-2022

İTHAF

Aileme ithaf ediyorum...

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimime başladığım ilk günden beri beni destekleyen, bilgisini, tecrübesini benimle paylaşan desteğini ve sabrını benden esirgemeyen, yol gösteren sayın danışman hocam Prof.Dr. Müge Sayitoğlu'na sonsuz teşekkür ederim.

My second supervisor Assist. Prof. Peter Ng, thanks for your support, guidance and encouragement. I am glad to know you.

Sevgili Dr. Sinem Fırtına ve Dr. Yücel Erbilgin, Tez projem süresince deneyimlerinizi, bilgilerinizi benimle paylaştığınız için çok teşekkür ederim.

Sevgili arkadaşım Merve Ordu, yüksek lisansda hep yanımda olduğun, her düştüğümde bana destek verdiğin çok teşekkür ederim. Seninle tanıştığım için çok mutluyum.

Sevgili Khusan Khodzhaev, Bu süreçte ne zaman sorularım olsa her zaman hiç sıkılmadan bana vaktini ayırıp bana yardımcı olduğun için sabrına ve arkadaşlığına çok teşekkür ederim.

Sevgili Didem Altındirek, gerek deneyler olsun gerekse kişisel sorularımı sabırla dinleyip, beni bilgin ve tecrübenle hep desteklediğin çok teşekkür ederim.

Sevgili Tuğçe Sudutan, birlikte geçirdiğimiz bu süreçte her zaman bana destek olduğun, ilginç durumları çözmeye çalışırken yaşadığımız durumlardaki fikir alışverişlerimiz çok keyifliydi. Bütün desteklerin için çok teşekkür ederim.

Sevgili Emre Avcı, süreç boyunca bana verdiğin bütün destek ve beni her seferinde beni sabırla dinlediğin ve yardımcı olduğun için çok teşekkür ederim.

Bana her zaman destek olan ve yardımlarını esirgemeyen Hülya Aydın, Betül Zorkaya, Büneyan Tüzün, Hilal Hekimoğlu hepinize ayrı ayrı teşekkür ederim. Sizin kadar güler yüzlü ve samimi arkadaşlara sahip olduğum için çok şanslıyım.

Her zaman benim yanımda olup bana sonsuz sevgileri ve güvenleri olan sevgili aileme çok teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 37774

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	iii
BEYAN	iv
İTHAF	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLolar LİSTESİ	x
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xi
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	xiii
ÖZET	xiv
ABSTRACT.....	xvi
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 : İMMÜN SİSTEM	3
2.1.1 : Doğal bağışıklık.....	4
2.1.1.1 : Kompleman sistemi.....	5
2.1.2 Edinsel Bağışıklık.....	8
2.2 : Primer immün yetersizlikler.....	12
2.2.1 :Kombine immün yetersizlikler	13
2.2.2 Primer Antikor Yetersizlikleri.....	16
2.3 : Genler	17
2.3.1: <i>TCF3</i>	17
2.3.2: <i>AICDA</i>	19
2.3.3: <i>ATM</i>	20
2.3.4: <i>TM4SF4</i>	22
2.3.5. <i>RAG2</i>	24
2.3.6. <i>MASP2</i>	25
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	28
3.1. Gereç	28
3.1.1. Hasta seçimi	28
3.1.2. Kullanılan cihazların listesi.....	29

3.1.3. Kullanılan kitler	29
3.1.4. Kullanılan Materyaller	30
3.1.5. Kullanılan Kimyasallar	30
3.1.6. Kullanılan tamponlar	31
3.1.7. Kullanılan primerler	31
3.1.8. Kullanılan Elektronik Veritabanları.....	32
3.2. YÖNTEM.....	36
3.2.1. Periferik kandan DNA izolasyonu	36
3.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)	36
3.2.3. Agaroz Jel Elektroforezi.....	38
3.2.4. Agaroz jelin hazırlanması.....	38
3.2.5. SANGER dizileme.....	38
3.2.6. Komplementer DNA (cDNA) sentezi.....	39
3.2.7. Hücre kültürü	39
3.2.8. Hücre sayımı	39
3.2.9. Akan hücre ölçer cihazı kullanılarak <i>ATM</i> geninin fonksiyonel	39
3.2.10. ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)	41
3.2.11. Protein immunoblot (Western blot)	42
3.2.12. Bradford assay.....	43
4. BULGULAR.....	46
4.1 Hastalarda Aday Gen/Varyant Analizleri	46
4.1.1. Hasta #1.....	46
4.1.1.1. Tespit edilen varyantın in siliko tahmin araçları sonucu	46
4.1.1.2. Sanger dizileme ile doğrulama.....	47
4.2 Hasta #2.....	48
4.2.1 Tespit edilen varyantın in siliko tahmin araçları sonucu	48
4.2.2 Sanger dizileme ile doğrulama.....	48
4.3 Hasta #3.....	49
4.3.1. Tespit edilen varyantın in siliko tahmin araçları sonucu	50
4.3.2 . Sanger dizileme ile doğrulama ve ailesel segregasyon	51
4.3.3. <i>TM4SF4</i> gen anlatımı.....	52
4.4 Hasta #4.....	53

4.4.1. Tespit edilen varyantın in siliko tahmin araçları sonucu	54
4.4.2 Sanger dizileme ile doğrulama ve ailesel segregasyon	56
4.4.3 <i>RAG2</i> gen anlatımı	58
4.4.4. Western blot yöntemi ile protein anlatımı analizi.....	61
4.5 Hasta #5.....	62
4.5.1. Tespit edilen varyantın in siliko tahmin araçları sonucu	63
4.5.2. Sanger dizileme ile doğrulama ve ailesel segregasyon	64
4.5.3. MASP2 protein analizi.....	65
4.6. Hasta #6.....	65
4.6.1. Tespit edilen varyantın in siliko tahmin araçları sonucu	66
4.6.2. Sanger dizileme ile doğrulama ve ailesel segregasyon	67
4.6.3. Akan hücre ölçer ile ATM fonksiyon analizi.....	68
5. TARTIŞMA	70
6. KAYNAKLAR	81
HAM VERİLER.....	87
FORMLAR.....	88
ETİK KURUL KARARI.....	89
PATENT HAKKI İZNİ.....	92
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	93
ÖZGEÇMİŞ	94

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1:Uluslararası immünoloji toplulukları birliğinin (IUIS) PİY sınıflandırması (1)	13
Tablo 2:Çalışmadaki hastalara ait klinik veriler	28
Tablo 3: Çalışmada kullanılan cihaz listesi.....	29
Tablo 4: Çalışmada Kullanılan Kitler	30
Tablo 5: Çalışmada Kullanılan Materyaller	30
Tablo 6: Çalışmada Kullanılan Kimyasallar	31
Tablo 7: Çalışmada Kullanılan Primerler	32
Tablo 8: Çalışmada Kullanılan Veritabanları.....	34
Tablo 9: <i>AICDA</i> ve <i>TCF3</i> genleri için yapılan PZR içeriği	37
Tablo 10: <i>AICDA</i> PZR ısı koşulları	37
Tablo 11: <i>TCF3</i> PZR ısı koşulları.....	38
Tablo 12: Western blot işleminde kullanılan jel yüzdeleri ve içerik bilgisi	44
Tablo 13: <i>TCF3</i> genindeki c.1064C>T değişimin in-siliko analiz sonucu	47
Tablo 14: <i>AICDA</i> genindeki c.439C>T değişiminin in-silico tahmin sonuçları.....	48
Tablo 15: <i>TM4SF4</i> genindeki c.439C>T değişimin in-silico tahmin araçları sonucu	50
Tablo 16: <i>RAG2</i> ve <i>NBN</i> genlerinde tespit edilen varyasyonların <i>in siliko</i> analizleri	55
Tablo 17: <i>MASP2</i> geninde tespit edilen p.C618Y değişiminin <i>in siliko</i> analiz sonucu ..	63
Tablo 18: <i>ATM</i> geninde tespit edilen p.Y2036* değişiminin <i>in siliko</i> analiz sonucu	66

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: Kompleman sistem aktivasyonunda görev alan 3 yol [11]	8
Şekil 2: T ve B lenfositlerin olgunlaşma aşamaları [11]	10
Şekil 3: VDJ rekombinasyonu [17]	11
Şekil 4: Fenotipik olarak ağır kombine immün yetmezliğin sınıflandırılması [28]	14
Şekil 5: TCF3 protein yapısı	18
Şekil 6: B hücresinin geçirdiği düzenlenme mekanizmalarında <i>AICDA</i> gen rolü [44] ..	20
Şekil 7: <i>ATM</i> genin hasar onarım cevabı	21
Şekil 8: A) Tetraspanin protein yapısı B) Tetraspanin tarafından düzenlenen yollar [52]	23
Şekil 9: RAG2 protein şeması	25
Şekil 10: MASP2 protezin inaktif ve aktif hali	27
Şekil 11: MASP1 ve MASP2 proteinleri tarafından C3 dönüştürücü oluşumu	27
Şekil 12: DNA izolasyonu	36
Şekil 13: <i>TCF3</i> c.1064C>T değişimi Sanger dizileme sonucu	47
Şekil 14: <i>AICDA</i> geni c.427+91G>A değişiminin Sanger dizileme sonucu	49
Şekil 15: Hasta #3'e ait aile ağacı	50
Şekil 16: <i>TM4SF4</i> genindeki c.439C>T varyantının A) protein domainleri üzerindeki gösterimi B) değişim olan nükleotidin evrimsel korunmuşluğunun gösterimi	51
Şekil 17: <i>TM4SF4</i> varyantının ailevi segregasyonu	52
Şekil 18: <i>TM4SF4</i> gen anlatımı (50 bç marker, +/-: Het, -/-:Hom)	52
Şekil 19: İmageJ sonucu	53
Şekil 20: Hasta #4'e ait aile ağacı	54
Şekil 21: <i>NBN</i> genindeki NM_002485.5:c.1691A>G :p.Glu564Gly varyantının a) protein domainleri üzerindeki gösterimi b) değişen nükleotidin evrimsel korunmuşluğunun gösterimi	56
Şekil 22: RAG2 proteini üzerinde varyasyonun yerleşimi	56
Şekil 23: <i>NBN</i> varyantı ailevi segregasyonu	57
Şekil 24: <i>RAG2</i> varyantının ailevi segregasyonu	58
Şekil 25: <i>RAG2</i> ve <i>GAPDH</i> geni ekspresyon sonucu (+/+ : yabani tip, +/-: Het, -/-:Hom, sağlıklı kontrol: sağlıklı periferik kan örneği, pozitif hücre hattı: REH)	59

Şekil 26: İmageJ sonucu.....	59
Şekil 27: <i>NBN</i> ve <i>ATM</i> gen ekspresyon sonucu (50 bç marker, +/+ : yabani tip, +/- : Het, -/- : Hom)	60
Şekil 28: İmageJ sonucu.....	60
Şekil 29: <i>TP53</i> gen ekspresyon sonucu (+/+ : yabani tip, +/- : Het, -/- : Hom)	61
Şekil 30: A) jeldeki örnekler: marker, jurkat(80µg), molt4(80µg), nalm6(80µg) B) jeldeki örnekler: marker, jurkat(15µg), molt4(15µg), nalm6(15µg)	62
Şekil 31: Hasta#5'e ait aile ağacı	62
Şekil 32: <i>MASP2</i> genindeki c.1853G>A varyantının A) protein domainleri üzerindeki gösterimi B) değişim olan nükleotidin evrimsel korunmuşluğunun gösterimi.....	64
Şekil 33: <i>MASP2</i> varyantının ailesel segregasyonu	64
Şekil 34: <i>MASP2</i> protein konsantrasyonu (p=0,1298)	65
Şekil 35: Hasta #6'ya ait aile ağacı	67
Şekil 36: <i>ATM</i> geninde bulunan p.Y2036* varyantının değişime uğrayan aminoasidin domainleri üzerinde gösterimi	67
Şekil 37: <i>ATM</i> varyantının ailesel segregasyonu	68
Şekil 38: A) varyantı homozigot olarak taşıyan B, C) varyantı heterozigot olarak taşıyan ebeveynlerin akan hücre ölçer cihazı ile yapılan ölçümlerin analiz sonuçları.....	69
Şekil 39: <i>ATM</i> varyantının akım sitometrisi sonuç grafiği (-/- : homozigot, +/- : heterozigot)	69

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

PIY: Primer immün yetersizlikler
PZR: Polimeraz zincir reaksiyonu
AKİY: Ağır kombine immün yetersizlik
PAY: Primer antikor yetersizliği
YDIY: Yaygın değişken immün yetersizlik
HIGM: Hiper IGM sendromu
NK: “Natural killer”-doğal öldürücü hücreler
YND: Yeni nesil dizileme
THR: T hücre reseptörü
BHR: B hücre reseptörü
IG: Immunoglobulin
IUIS: Uluslararası İmmün Yetersizlik Derneği
BirliğiSHM: Somatik hipermutasyonlar
CSR: Sınıf değiştirme reaksiyonu
RT-PZR: Ters transkriptaz Polimeraz zincir reaksiyonu
bHLH: Temel sarmal-ilmek-sarmal
CD: Farklılaşma kümesi
MAC: Membran saldırı kompleks
PAMPs: Patojen ilişkili moleküler paternler
PRR: Patojen ilişkili reseptör
MAF: Minör allel frekansı

ÖZET

Sarıtaş, M. (2022). PRİMER İMMÜN YETERSİZLİK HASTALARINDA BELİRLENEN YENİ VARYANTLARIN VALİDASYONU. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul. 2022

Primer immün yetersizlikler (PİY), immün sistemin gelişimini, fonksiyonunu veya her ikisini de etkileyen 130'dan fazla farklı bozukluğu içeren hastalıklar grubudur [1]. PİY fenotipleri her biri nadir hastalık grubuna girerler ve yaklaşık 1:10000 canlı doğum prevalansına sahiptirler. Ancak Türkiye gibi akraba evliliğinin yüksek olduğu veya genetik olarak izole popülasyonlarda daha yüksek bir oran gözlenmektedir [2]. Klasik olarak, PİY'ler Mendel kalıtım ilkelerini izleyen hastalıklardır.

Hastalığın geniş fenotipik değişkenliğinin olması nedeniyle PİY tanısının konulması gecikmektedir. Bu sebeple Primer immün yetersizlik sendromlarının temelinde yatan moleküler bozuklukların belirlenmesinde, immünolojik ve genetik testler büyük önem taşımaktadır.

Grubumuzun önceki çalışmalarında PİY hastalarında yeni nesil dizileme temelli gen panelleri ve ekzom analizleriyle bilinen ve bilinmeyen gen varyasyonları saptanmıştır. Bu tez çalışması kapsamında, saptanan varyasyonlar indeks olguda Sanger dizileme ile doğrulanması yapılmış ve ailevi segregasyonu gösterilmiştir ve doğrulanmış varyasyonlarda *in-silico* tahmin araçları kullanılarak olası hasarların öngörülmesi ve saptanan varyasyonun özelliğine göre gen anlatımı (kantitatif PCR) ve protein anlatımının (Western blot, ELISA) araştırılması yapılmıştır. Çalışma sonucunda, çalışılan altı varyasyon/gen'in iki tanesi Sanger dizileme ile doğrulanamamıştır. *RAG2* geninde tespit edilen varyantın ekspresyon analizlerine dayalı çalışması sonucu sağlıklı bireylere göre azalmış ekspresyonu bulunmuştur. Bu varyanta ek olarak hastadaki lenfoma bulgularını açıklayan başka bir gende tespit edilmiştir. Çalışma ileri fonksiyonel analizler ile devam ettirilecektir. PİY fenotipi için yeni bir aday gen olan *TM4SF4*'ün hastalıkla genotip- fenotip ilişkisinin kurulması için çalışılmıştır. Çalışmada tanısı net olarak konulamayan bir hasta da tespit edilen *MASP2* genindeki varyantın hastalıkla ilişkisi belirlenmeye çalışılmıştır. Hastaya özgü genetik değişikliklerin bilinmesi klinisyen için hastalığın prognozu ve tedavi yaklaşımı bakımından yol gösterici olacaktır.

Anahtar Kelimeler: Primer immün yetersizlik, varyasyon, kantitatif PCR, akım sitometrisi, Sanger dizileme.

Bu alışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 37774



ABSTRACT

Sarıtaş, Merve (2022). Validation of New Variants Identified In Primary Immune Deficiency Patients. Istanbul University Institute of Health Sciences, Department of Genetics. Master Thesis İstanbul. 2022

Primary immunodeficiencies (PID) are a group of diseases that consist over 130 different diseases which influence function, development or both of the immune system. The PID phenotypes each fall into the rare disease group and have a prevalence of approximately 1:10000 live births. However, a higher rate is observed in populations where consanguineous marriage is high or genetically isolated populations such as Turkey. In the most cases, PIDs are monogenic diseases that follow a Mendelian principles of inheritance.

Diagnosis of PID is delayed due to the wide phenotypic variability of the disease. For this reason, immunological and genetic tests are of great importance in determining the molecular disorders underlying primary immune deficiency syndromes.

In previous studies of our group, known and unknown gene variations were detected by next generation sequencing-based gene panels and exome analyzes in PID patients. Within the scope of this thesis, the detected variations were verified with Sanger sequencing in the indeks case and familial segregation was shown, and predicting possible damage (protein, splice site, etc.) quantitative PCR and protein expression (Western blot, flow cytometry, ELISA) were investigated. In this thesis, two of the six variations/genes studied could not be confirmed by Sanger sequencing. For the remaining four variants/genes, the function of at least one method has been studied. As a result of the study based on the expression analysis of the variant detected in the *RAG2* gene, its expression was found to be decreased compared to healthy individuals. In addition to this variant, another gene has been identified that explains the lymphoma findings in the patient. The study will be continued with further functional analysis. A new candidate gene for the PID phenotype, *TM4SF4*, was studied to establish the genotype-phenotype relationship with the disease. In the study, the relationship of the variant in the *MASP2* gene, which was detected in a patient whose diagnosis could not be made clearly, with the disease was tried to be determined. Knowing the patient-specific genetic changes will guide the clinician in terms of the prognosis of the disease and the treatment approach.

Key Words: Primary immunodeficiency, variation, quantitative PCR, flow cytometry, Sanger sequencing.

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. 37774

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Primer immün yetersizlikler (PİY), primer ya da doğumsal immün yetersizlik bozuklukları sonucunda gelişen kronik ve/veya tekrarlayan bakteriyel, fungal, protozoal ve viral enfeksiyonlarla seyreden hastalıklar grubudur [3]. Bağışıklık sistemi hücrelerinin ve moleküllerinin birinin ya da sistem cevabı için gerekli olan uyarıcı sinyallerini reseptörlerin tam olmaması, fonksiyon kaybı veya aşırı işlevli olması gibi işlevsel olarak problemlili olmasından kaynaklanan nedenler immün yetersizliklere sebep olmaktadır. PİY'li hastalar, etkilenmiş olan immün sistemde yer alan öğelere/bileşenlere göre enfeksiyon, alerji, oto-immün hastalıklar ve kansere gibi hastalıklara yatkınlık gösterirler. PİY hastalıkları genel olarak 10 ana başlıkta toplanmaktadır: "I-Antikor Eksiklikleri, II- Kombine İmmün Yetersizlikler, III-Sendromik Kombine İmmün Yetersizlikler, IV-İmmün sistem regülasyon bozukluğuna bağlı hastalıklar, V- Fagositin sayısal ve/ veya işlevsel bozukluğu, VI- Doğal immün Sistemde eksiklikle seyreden, VII- Otoinflamatuvar hastalıklar VIII- Kompleman eksikliği, VIII- Fenokopik Primer İmmün Yetersizlikler, X- Kemik iliği Yetmezliği" [1]. Batı toplumlarında nadir hastalıklar olarak sınıflandırılan PİY'ler, toplumumuzdaki doğum hızının yüksek (1.3 milyon canlı doğum/yıl) oluşu, sık akraba evliliği oranları (%20-40) nedenleriyle genellikle otozomal çekinik geçiş gösteren PİY'lerin ülkemizde batı toplumlarına göre çok daha yüksek bir sıklıkta görülmektedir [4]. Bu hastalarda tanı daha çok erişkin çağda sık geçirilen enfeksiyonlar veya otoimmün/lenfoproliferatif hastalıklara yönelik yapılan tetkikler sırasında konmaktadır. PİY'ler, ülkemizdeki yaygınlığının yanında, semptom ve genetik alt yapı açısından oldukça heterojendir. Ayrıca bugüne kadar yapılan çalışmalarda PİY için 344 genin üzerinde etkili olduğu 354 farklı bozukluk karakterize edilmiştir ve bu sayı gün geçtikçe artmaktadır [5, 6]. Tanı koymak amacıyla yapılan klasik immünolojik tanısal testlerin zaman alıcı olması ve bu testler ile tam olarak tanı koyulamadığı için hastaların tanı alma süresi uzatmakta ve tanıya özgün güncel tedavilere ulaşmaları da gecikmektedir. Bu durum sonucu olarak hem hastanın hem de hastalığın tedavisinin başarı oranını düşürmektedir. Gelişen teknolojilerden birisi olan yeni nesil dizileme yöntemi sayesinde aynı anda birçok gen, genomun tümü tek seferde dizilenebilmektedir. Bu yaklaşımlar kullanılarak daha hızlı, kolay ve doğru

bir klinik ve moleküler tanı koyulmasını sağlanmaktadır bu sayede immün yetersizlikle ilişkili genler hızlı bir şekilde tanımlanmaya başlanmıştır [7] .

Üniversitemiz tarafından desteklenen önceki çalışmalarda panel ve ekzom yaklaşımları ile farklı primer immün yetersizlik hastalıklarında yeni gen varyantları tespit etmiştik (Sinem Fırtına doktora tezi, İstanbul Üniversitesi, 2017). Bu proje kapsamında ise hem panel hem de ekzom dizileme ile belirlenen yeni gen/varyantların PİY ile ilişkili daha önce literatürde tanımlanmamış varyantların validasyonu yapmak ve fonksiyonel analizler ile hastalık-varyant ilişkisinin belirlenmesi hedeflenmektedir. Bu amaçla Sanger dizileme ile bulunan varyantların validasyonu yapılacak ve varyasyonu doğrulanan hastanın ailevi segregasyonu yapılacaktır. Varyasyonlar çevirim içi tahmin araçları (Mutation taster, PolyPhen2, SIFT, Provean, CADD, Gene splicer vb) ile olası fonksiyonel etkileri bakımından değerlendirilecektir. ExAC, 1000G, dbSNP, ESP6500 vb veri tabanlarında bulunan nadir varyasyonlar belirlenecektir. Primer hasta örneklerinden elde edilen lenfositlerden DNA/RNA ve protein örneklerinde gen ve protein anlatımları araştırılacaktır. Aday genler/varyasyonların klinik korelasyonu için OMIM, HGMD, GeneTest, dbVar, ClinVar, Decipher vb veri tabanlarından yararlanılacaktır. Tüm varyantlar ACMG kriterlerine göre sınıflandırılacak ve klinik verileri ile birlikte değerlendirilecektir [8].

2. GENEL BİLGİLER

2.1 : İMMÜN SİSTEM

Bağıışıklık sistemi, kendisini yabancı maddelerden ayırt etme yeteneğine sahip, hastalığa neden olan bakteri ve virüsler gibi istilacı patojenlere karşı koruma sağlayan dinamik bir sistemdir. Bu sistem, yabancı patojenlere karşı bir savunma sistemi olmanın yanı sıra vücuttaki ölü veya hasarlı hücrelerin uzaklaştırılması, homeostaz, doku onarımı ve gelişimi gibi birçok işlevi yerine getirir. Farklı türdeki patojenleri tanıyıp onlara karşı immün siste elemanları tarafından farklı immün yanıtlar oluşturarak vücudu savunur. Vücuda giren yabancı maddeler peptid formda olan antijen molekülleri aracılığıyla tanınırlar. Immün sistem elemanlarının üzerinde de yabancı moleküllerdeki antijenleri tanıma işleminde görevli olan reseptörler bulunur. Reseptörler ile yabancı maddeler tanınmasının sonucu olarak immün yanıt oluşur. İmmün sistem elemanlarının hepsi kemik iliğinden köken alırlar.

Bağıışıklık sistemi hücrelerinin oluşumu, kemik iliğinde pluripotent bir hematopoietik kök hücrenin ortak miyeloid progenitör hücreye ve ortak lenfoid progenitöre farklılaşmasıyla başlar [9]. Ortak lenfoid progenitör, olgun lenfositlerin dört ana popülasyonunda daha da farklılaşır: B hücreleri, T hücreleri, doğal öldürücü (NK) hücreler ve NK-T hücreleri [9]. Miyeloid kök hücreler (ortak miyeloid progenitörleri olarak da adlandırılır) birkaç farklı granülosit formuna, megakaryositlere ve trombositlere ve eritrositlere farklılaşır. Önde gelen bağıışıklık işlevleri oynayan granülosit soyunun hücreleri arasında nötrofiller, monositler, makrofajlar, eozinofiller, bazofiller ve mast hücreleri bulunur [9]. Bu hücreler, boyut, renk, şekil gibi morfolojik özellikler açısından birbirinden ayırt edilebilmenin yanı sıra hücre zarlarındaki glikoprotein farklılaşma antijenlerinin spektrumunun analiziyle de ayırt edilebilir. Bu farklılaşma antijenleri, spesifik monoklonal antikorların bağlanmasıyla saptanır. Bu hücre fenotipini belirleyen antijenlere farklılaşma kümesi (CD) sayıları verilir. Bu CD sayıları ile hücrelerin hangi gelişim aşamasında olduğu, immün sistemdeki fonksiyonu gibi bilgiler edinilebilir. Immün sistem hücrelerinin olgunlaşma süreci de kemik iliğinde gerçekleşmektedir. Fakat bazıları olgunlaşmak için timus gibi başka organlara geçerler. Olgunlaşma süreci tamamlanan hücreler kan ve lenf dolaşımına katılarak vücut savunmasında ve diğer işlerde görev alırlar.

İmmün sistemi birbirleriyle ilişkili iki sistem altında incelenebilir: doğal bağışıklık ve edinsel bağışıklık.

2.1.1 : Doğal bağışıklık

Vücuda giren patojenlere karşı savunmada ilk cevabın oluşturulmasında görev alır. Yabancı molekülleri konakçıda bulunmayan ama sıklıkla patojenlerde bulunan patojen ilişkili moleküler paternler (PAMPs) olarak isimlendirilen belirli bazı ortak yapıları aracılığıyla tanınırlar. PAMP'lar doğal bağışıklık hücrelerinde bulunan patern tanıma reseptörleri (PRRs) aracılığıyla tanınmaktadır. Bu tanıma işlemi ortak yapılar üzerinden olduğu için doğal bağışıklık elemanları patojenleri birbirinden ayırabilecek bir özgüllüğe sahip değildir. Doğal bağışıklık yanıtı hızlıdır ve yeniden enfeksiyonu önlemeye yardımcı olmak için immünolojik hafıza oluşturma ve sürdürme yeteneğinden yoksundur [10]. Doğal bağışıklık; fiziksel ve kimyasal bariyerler ve immün yanıtta patojeni tanıyarak cevap oluşturan doğal öldürücü hücreler (NK), mast hücreleri, eozinofiller, bazofiller, nötrofiller, makrofajlar, kompleman sistemi, toll-benzeri reseptörler (TLR) ve dentritik hücrelerden oluşmaktadır.

Fiziksel bariyer olarak deri, gastroentestinal sistem gibi yapılardaki epitel tabakada yer alan epitel hücrelerden peptid yapıda antibiyotikler sentezlenerek mikrobun elimine edilmesi sağlanır. Myeloid hücre kökenli nötrofil, bazofil ve eozinofil granülositler olarak adlandırılırlar ve fagositoz ile hücre savunmasına katkı sağlarlar. Granülosit hücrelerin granüllerinin içeriği birbirinden farklı oldukları ve farklı özelliklerdeki boya ile boyandıkları için birbirlerinden kolaylıkla ayırt edilebilirler. Polimorfonükleer lökositler (PMN'ler) olarak da adlandırılan nötrofiller, konakçı bağışıklık sisteminin en bol bulunan bileşenidir. Nötrofiller, çoğu enfeksiyona, özellikle bakteriyel ve fungal enfeksiyonlara yanıt veren ilk hücre tipidir ve enfeksiyon ve doku hasarı bölgelerinde birikme, mikropları ve fagositleri hızla yok etme yetenekleriyle akut inflamasyon için baskın hücrelerdir. Nötrofiller dolaşımdaki mikropları yutarlar ve enfeksiyon bölgelerinde hızla ekstravasküler dokulara girerler, burada ayrıca fagositoz ile mikroorganizmaları yok ederler [11]. Deri ve mukozada bulunan eozinofiller, asidik yapıdaki (eosin) boya ile boyanan ve granüllerinde parazitlere karşı aktif olan toksik moleküller ve enzimler içerirler ve bu hücreler dalakta olgunlaşırlar. Bazofiller, bazik boya ile boyanırlar ve kanda bulunurlar enfeksiyon sırasında dokulara geçebilirler. Fagositoz yapma yetenekleri bulunmamaktadır. Bazofiller ve eozinofiller alerjik immün

yanıtların indüklenmesinde önemli roller oynayabilirler. Lenfoid kökenli doğal öldürücü hücre (NK) ise virüsle enfekte olmuş dokuyu tanır, enfekte olan hücrenin lizisine yol açar ve sitokin salgılayarak makrofajları aktive eder. Monositler enflemasyon durumunda dokularda farklılaşarak makrofajlara dönüşürler. Makrofajlar bulundukları doku da farklı büyüklük ve morfolojik özellikler gösterirler. Hem doğal bağışıklık hem de kazanılmış bağışıklıkta görev alan makrofajlar, konak savunmasında birkaç önemli role hizmet eder: mikropları alır ve yok eder, ölü dokuları temizler ve doku onarım sürecini başlatır ve inflamasyonu indükleyen ve düzenleyen sitokinler üretirler [11]. Dendritik hücreler, inflamasyonun başlatılmasında sitokinler üreterek görev yapmaktadır. Ayrıca adaptif immün sistem hücrelerine antijen sunarak onların aktive olmasını sağlarlar böylece iki sistem arasında bağlayıcı bir görevi de vardır.

Doğal immün yanıtlar: inflematuvar yanıt ve antiviral mekanizmaları ile mikropları yok edebilmektedir. Farklı türdeki mikroplar farklı yanıt oluşturularak elimine edilirler. Örneğin; bakteri ve mantarlara karşı kompleman sistemi aracılığıyla bölgeye toplanan nötrofiller ve makrofajlar tarafından yanıt oluşturulurken virüslere karşı koruma tip I interferon ve doğal öldürücü hücreler tarafından sağlanır [11]. Farklı türdeki patojenlere verilen tepkiler sırasında salgılanan sitokinler ve bazı doğal bağışıklık hücreleri aracılığıyla adaptif immün sistemde uyarılarak vücuda giren yabancı moleküllere karşı iki sistem birlikte savunmada görev alır.

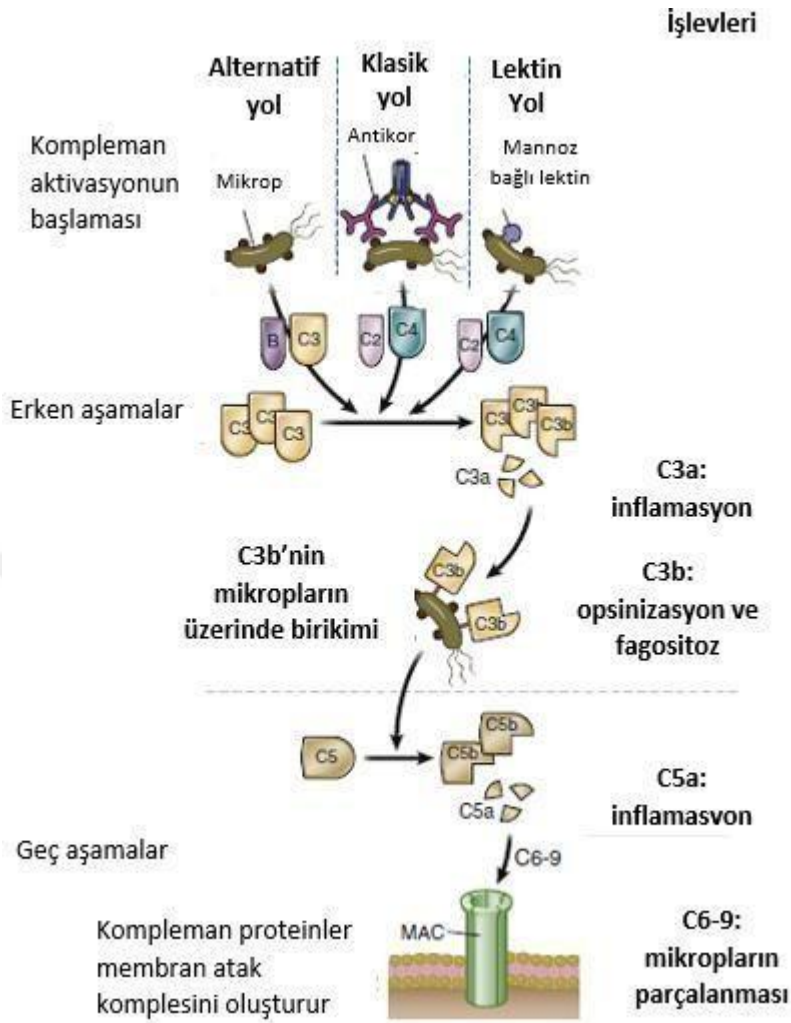
2.1.1.1 : Kompleman sistemi

Kompleman sistemi doğuştan gelen hümmoral/antimikrobiyal bağışıklık savunmasının önemli bir parçasıdır. Kompleman sistemi, esas olarak karaciğer veya hücre yüzeyinde eksprese edilen zar proteinleri tarafından üretilen 35'ten fazla plazma proteini, hücre yüzey reseptörleri ve düzenleyici proteinlerden oluşan bir sistemdir [12]. Proteinler fonksiyonel olarak inaktif halde sentezlenirler. Dolaşımında yabancı bir molekül ile karşılaştıklarında proteolitik bir yıkım gerçekleşir ve sıra ile bir kaskad şeklinde sistemde görev alan bütün plazma proteinlerinin aktivasyonu gerçekleşir. Kompleman proteinler, patojenleri opsonize etmek ve bağışıklık hücrelerinin enfeksiyonla savaşmasına ve homeostazı sürdürmesine yardımcı olan bir dizi inflamatuvar yanıtı indüklemek için bir kaskad olarak iş birliği yapar [12]. Ayrıca, kemotaksis, fagositoz, hücre yapışması ve B hücre farklılaşması dahil olmak üzere bağışıklık tepkisi içindeki hümmoral ve hücrel etkileşimlere aracılık eder [13].

Kompleman sistemi klasik yol, alternatif yol ve lektin yolu olmak üzere 3 farklı yol ile aktive olur. Klasik yol, kapsüllü bakteri ve viral enfeksiyonlarına karşı savunmada rol oynar. Klasik yol, çoğunlukla mikroblara ve diğer antijenlere bağlanan immün kompleksler (antikorlar) tarafından başlatılır. Bu sebeple antikor bağımlı yol olarak da adlandırılmaktadır. Tamamlayıcı sistemin ilk bileşeni olan C1; bir C1q molekülü ve C1r₂C1s₂ tetramerinden oluşan bir heteropentamerik enzim kompleksidir. C1q alt bileşeni, antijenlerle kompleks oluşturan IgG veya IgM antikorlarına bağlanır ve klasik yol aktive olur. Daha sonra C1s serin proteazı sistemin elemanları olan C2 ve C4 moleküllerini proteolitik olarak C2a, C2b ve C4a, C4b olarak parçalar [14]. C2b, daha sonra, bir C3 dönüştürücü olarak işlev gören C4bC2b'yi oluşturmak için C4b ile birleşebilir. C3 dönüştürücü, C3'ü C3a ve C3b'ye ayırır. C3a bir enflamasyon aracısıdır ve C3b, kovalent olarak bağlanabilen ve üretildiği bölgenin hemen yakınındaki herhangi bir yüzeyi etiketleyebilen bir opsonindir [4]. C4b2bC3b, C5 dönüştürücüler olarak işlev görür. Bu, C5a (başka bir anafilatoksin) ve C5b oluşumu ile sonuçlanır. C5b'nin oluşumu, C6, C7, C8 ve C9 moleküllerine bağlanarak C5b-9'u oluşturarak membran saldırı kompleksinin (MAC) oluşumunu başlatabilir. Ortaya çıkan MAC kompleksi, hücre zarlarına girebilir, çekirdeksiz hücrelerin parçalanmasıyla ve çekirdekli hücreler üzerinde daha hafif etkilere neden olabilir [15]. Kompleman sisteminin aktive olmasında görev alan bu 3 yolun şematize hali şekil 1'de gösterilmiştir. Alternatif yol, plazmadaki kompleman sisteminde görev yapan C3 molekülünün mikrobun üzerinde hidrolize olmasıyla aktif hale gelir. Kesilmiş olan C3b parçası C3 konvertazı oluşturmak için C2 molekülünün alternatif yoldaki homologu olan faktör B ile birleşir. Bu birleşimden önce faktör B faktör D tarafından Bb alt birimine parçalanır. Böylece C3bBb yapısı C3 konvertaz oluşmuş olur. Bir sonraki aşamada C3bBbC3b C5 konvertaz oluşturulur. Lektin yolu, bakteri ve virüslerin üzerindeki karbonhidrat ve asetil gruplarının patern tanıma molekülleri ile tanınması ile aktive olur. Bu moleküller patern tanıma molekülleri tarafından tanınırlar. Patern tanıma molekülleri (PTMs): kolektinler (mannoz bağlayıcı lektin (MBL), kolektin-10, kolektin-11) ve ficolinler (ficolin-1, ficolin-2, ficolin-3) olmak üzere iki grubu bulunur. Her bir PTM, MASP (Mannan ilişkili serin proteaz) olarak adlandırılan serin proteazlar ile bir kompleks halinde bulunur. Bugüne kadar MASP ailesi içinde 5 üye tanımlanmıştır: MASP1, MASP2, MASP3 ve iki tane de serin proteaz alanı olmayan MASP19 ve MASP44 proteinleridir [15]. MASP1 ve MASP2 lektin yolu için önemli serin proteazlardır.

MASP2, MBL ile kompleks halinde bulunur ve patojen tanınması gerçekleştiğinde MBL konformasyonel olarak bir değişime uğrar bunun sonucu olarak MASP2 aktive olur. Aktive olan MASP2, C4 ve C2 moleküllerini C2a, C2b ve C4a, C4b olarak parçalayarak C4bC2b C3 konvertaz yapısını oluşturur. C3 dönüştürücü, C3'ü C3a ve C3b'ye ayırır. Daha sonra C4b2bC3b yapısı oluşur ve bu birleşim C5 dönüştürücüler olarak işlev görür. 3 kompleman yolu kendilerine özgü şekillerde başlasa da C3 ve C5 moleküllerinin kesilmesinden en son oluşan MAC kompleksine kadar aynı olaylar gerçekleşmektedir.

Kompleman sistemi yabancı moleküllerle hem doğrudan hem de dolaylı olarak cevap oluşturur. Kompleman sistemi aktivasyon yolları sırasında oluşan opsonin görevi gören (C3b, C4b) ara molekülleri aracılığıyla patojen işaretlenerek makrofajlar gibi fagositoz görevi gören bağışıklık sistemi hücreleri tarafından tanınıp yok edilmesini sağlarlar. Sistemin patojenin üzerinde oluşturduğu MAC yapısı aracılığıyla hücre zarında gözenekler açarak direk olarak hücreyi lizise uğratıp yok edilmesini sağlar.



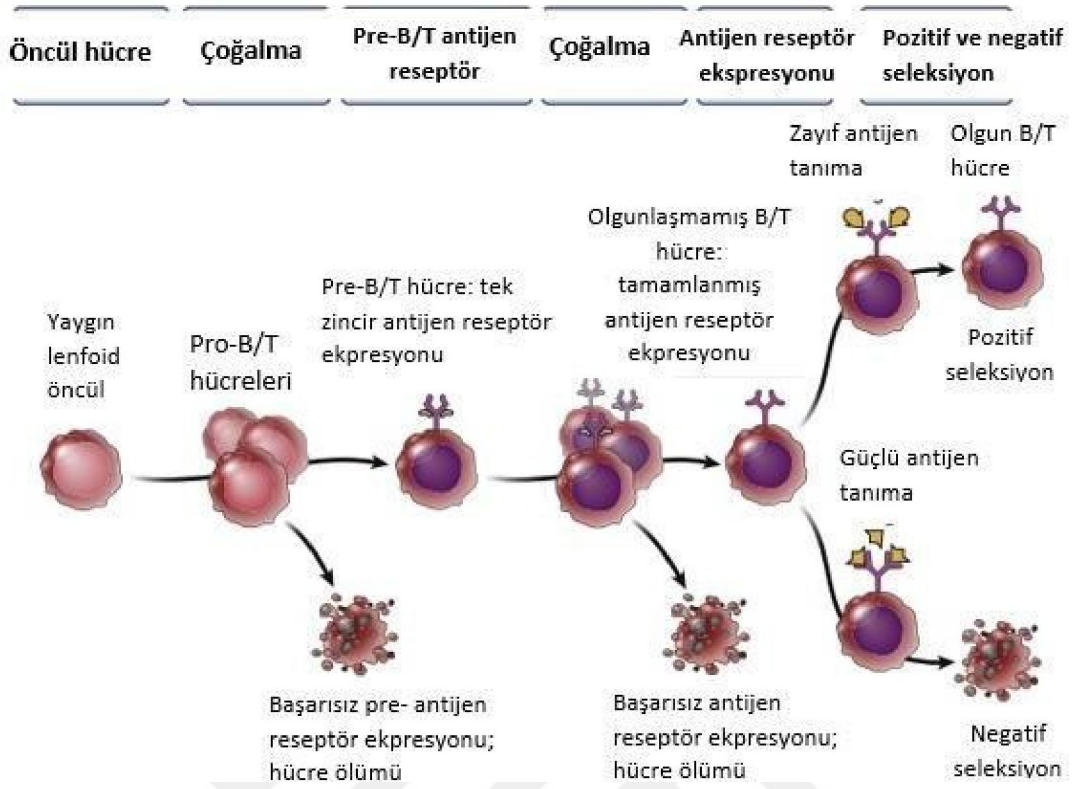
Şekil 1: Kompleman sistem aktivasyonunda görev alan 3 yol [11, 15]

2.1.2 Edinsel Bağışıklık

Çok sayıda patojeni belirli epitoplarından tanıyabilen ve onlara özgü yanıt oluşturabilen bağışıklık sistemidir. Doğal bağışıklık cevabının aksine daha yavaş bir cevap oluşur fakat oluşan yanıt patojen spesifik. Aynı patojenle tekrar karşılaşılması durumunda daha hızlı ve etkili bir yanıt oluşumu sağlayan immünolojik olarak kazanılan hafıza oluşturabilme özelliğine sahiptir. Yabancı maddeler için oldukça çeşitli ve değişken reseptörleri olan ve antikor üretebilen T ve B lenfosit hücreleri edinsel bağışıklığın elemanlarıdır. T ve B lenfositleri kemik iliğinde hematopoetik kök hücrelerden lenfoid progenitör hücrelere ve son olarak B ve T lenfositlerin oluşumunu

sağlayan çok basamaklı bir hematopoez aşamasından geçerler. B lenfositleri olgunlaşma aşamasını yine kemik iliğinde geçirirken T lenfositleri timus'a göç ederler.

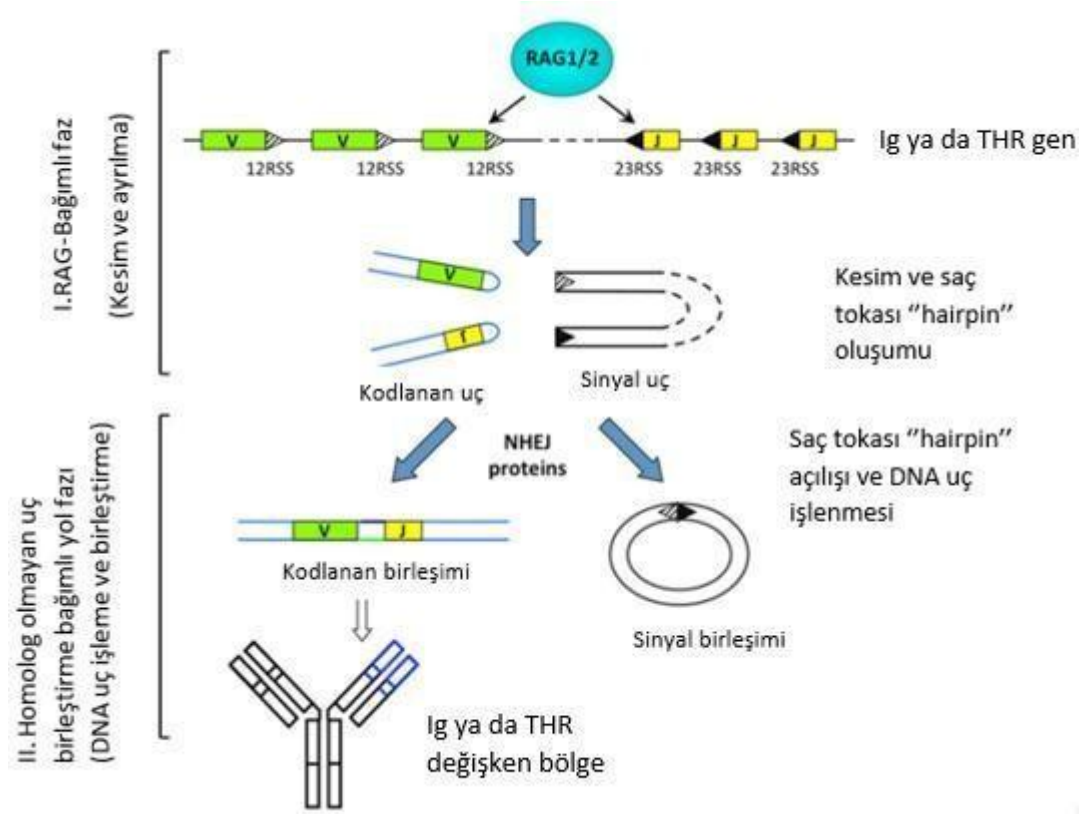
Adaptif bağışıklık tepkileri, antijenlerin lenfositlerin antijen reseptörleri tarafından tanınmasıyla başlatılır. B ve T lenfositleri, tanıdıkları antijen türlerine göre farklılık gösterir. B lenfositleri çözünür formda veya hücre yüzeyi ile ilişkili formdaki makromolekülleri (protein, polisakkarit, lipid vb) ve ayrıca küçük kimyasalları tanıyabilirken T lenfositlerin çoğu, antijen sunan hücrelerin (APC'ler) MHC molekülüne bağlanan ve bunlar tarafından gösterilen peptit antijenlerini tanır. MHC molekülleri, T lenfositleri tarafından tanınmak üzere peptit antijenlerini gösteren APC'ler üzerindeki zar proteinleridir [11]. T ve B lenfositleri kemik iliğinde hematopoetik kök hücrelerden lenfoid progenitör hücrelere ve son olarak B ve T lenfositlerin oluşumunu sağlayan çok basamaklı bir hematopoez aşamasından geçerler. Şekil 2'de bu aşamalar şematize edilerek gösterilmektedir. B lenfositleri olgunlaşma aşamasını yine kemik iliğinde geçirirken T lenfositleri timus'a göç ederler. Bu süreç, hücre proliferasyonunu, antijen reseptör genlerinin yeniden düzenlenmesini ve ekspresyonunu ve potansiyel olarak aktif antijeni eksprese eden, kendi hücrelerine saldırmayan lenfositlerin seçimi olaylarını içerir.



Şekil 2: T ve B lenfositlerin olgunlaşma aşamaları [11]

Kemik iliğindeki hematopoietik kök hücreler ve lenfoid progenitörler, kalıtsal veya germ hattı konfigürasyonlarında Ig ve T hücre reseptör (THR) genlerini içerir. Bu konfigürasyonda, Ig ağır zincir ve hafif zincir lokusları ve THR α ve β zincirlerinden her biri, değişken bölge (V) gen segmenti, sabit bölge (C), çeşitlilik (D) ve birleştirme (J) geni içerir. V bölgeleri, ağır zincir üzerindeki VH, DH ve JH genlerinin ve hafif zincir üzerindeki VL ve JL gen bölümleri arasında V(D)J rekombinasyonu gerçekleşir [11]. VDJ rekombinasyonu, kemik iliğinde pro-B hücrelerinde timusta çift negatif T hücrelerinde gerçekleşir. Bu olayın gerçekleşmesine VDJ rekombinaz ve çift DNA kırıklarının onarımında yer alan ek enzimler aracılık eder. VDJ rekombinaz, rekombinasyon aktive edici gen 1 ve 2 (*RAG-1* ve *RAG-2*) proteinlerinden oluşur ve rekombinasyon bu proteinler tarafından her V, D ve J kodlama dizilerinin yanında bulunan rekombinasyon sinyal dizilerinde (RSS) çift iplikli DNA kırıkları oluşturmasıyla başlatılır. Oluşturulan DNA kırıkları ligaz enzimi tarafından onarılır ve araya giren DNA segmentleri olmaksızın tam uzunlukta bir yeniden birleştirilmiş VJ veya VDJ ekzonu üretilir [16]. Rekombinasyon işlemi şekil 3'te gösterilmiştir.

Rekombinasyon işlemini tamamlayan T ve B lenfositleri bulundukları dokularda kendi hücrelerine tepki oluşturup oluşturmadığı kontrol edildikten sonra doğru/sağlam olgun lenfositler olarak dolaşıma katılırlar.



Şekil 3: VDJ rekombinasyonu [17]

B lenfositleri germinal merkezde gerçekleşen somatik hipermutasyon (SHM) ve sınıf değiştirme reaksiyonu (CSR) olmak üzere rekombinasyona ek olarak iki tane daha genetik modifikasyon geçirir. Bu değişikliklerin amacı, antijene özgüllükle birlikte immünoglobulinin biyolojik özelliklerini değiştirmek ve afiniteyi arttırmaktır [18]. CSR sırasında, genellikle B hücreleri, IgH zincirinin sabit bölgesi, DNA çift sarmallı kırılma aracılığıyla farklı bir izotipin ekspresyonuna ve dolayısıyla üretilen antikorların efektör fonksiyonunun değişmesi sonucuna yol açan bir olay ile değiştirilir.

SHM sırasında B hücreleri, IgH ve IgL'nin değişken bölgesini (IgV) çeşitlendirir ve antijen (Ag) için daha yüksek afiniteye sahip Ig'lerin seçimi için yapısal bir substrat sağlar. Hem CSR hem de SHM, tek sarmallı DNA üzerinde üridinde sitidini deamine eden bir DNA düzenleyici enzim olan aktivasyonla indüklenen sitidin deaminaz (AID)

tarafından başlatılır [19]. SHM sırasında AID, hem IgH hem de IgL zincirlerinin değişken bölgelerinde (IgV) bulunan sitidin kalıntılarını deamine eder.

Edinsel immün yanıt; olgunlaşmış T lenfositleri tarafından oluşturulan hücre aracılı ve B lenfositleri tarafından oluşturulan humoral immün yanıt olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Naif olgun B hücreleri antijen ile karşılaşmaları halinde klonal olarak çoğalır ve antijene cevap olarak immünoglobülin üreterek humoral immün yanıtın başlamasını sağlarlar. Yüzey reseptörü olarak sadece IgD ve IgM sentezleyen naif olgun B hücreleri immün yanıtın başlamasıyla izotip dönüşümü geçirerek karşılaştıkları antijene karşı yüzeylerinde IgG, IgM ya da IgA, IgE immünoglobulinlerin üretimini sağlar. Hücre aracılı yanıtı oluşturan T lenfositleri CD4+ yardımcı ve CD8+ sitotoksik T hücreolarak ikiye ayrılır. Yanıtın oluşmasında CD4+ hücreler humoral immün yanıtın oluşmasına yardımcı olurken CD8+ hücreler patojeni direk yok edebilir. Her ikisi de bağışıklık sisteminin diğer elemanlarını bölgeye çağırmak için sitokinler de üretir [20]. Tüm bu farklılaşma ve secilim aşamalarından geçen B hücrelerinin bazıları plazma hücrelerine farklılaşarak antikor salgılamaya devam ederler. Bazıları ise antijenle yeniden karşılaşma durumunda hızlı yanıt verebilen bellek B hücrelerine farklılaşır [18].

2.2: Primer immün yetersizlikler

İmmün sistem hücreleri ve moleküllerinden birinin veya immün yanıt için gerekli uyarıcı sinyallerin/reseptörlerin eksik olması, fonksiyonel olarak işlevsiz olması veya aşırı işlevli olması immün yetersizliklere neden olmaktadır. Immün yetersizlikler primer veya sekonder olarak iki grup altında incelenmektedir. Primer immün yetersizlikler (PİY), immün sistemin doğal işlev bozukluğundan kaynaklanır ve bu bozukluklar etiyolojisinde esas olan genetik nedenlere bağlı olarak gelişir, ikincil immün yetersizlikler altta yatan hastalıklar, enfeksiyon, yaş gibi nedenlere bağlıdır [3]. En son genetik teknolojinin ortaya çıkmasıyla birlikte PİY için 344 genin üzerinde etkili olduğu 354 farklı bozukluk karakterize edilmiştir ve sayısı artmaya devam ediyor [5, 6]. En son yayınlanan Uluslararası İmmün Yetersizlik Derneği Birliği (IUIS) raporuna göre, PİY'lerbağışıklık kusurunun türüne göre on kategoride sınıflandırılmıştır [5]. Bu 10 PİY grubu tablo 1'de gösterilmektedir. Enfeksiyonlara karşı artan hassasiyet, otoimmünite ve inflamatuvar komplikasyonların yanı sıra malignite geliştirme riski, PİY'den etkilenen

bireylerde gözlenen başlıca klinik belirtilerdir [21]. PİY hastalarının büyük bir çoğunluğunda B ve T hücre kusurları gözlenmiştir [22]. T hücre hasarı sonucunda hem hücresel hem de hümmoral yanıtı etkileyen kombine immün yetersizlik (KİY) görölmektedir. B hücresi kusurları genellikle antikor eksikliğine yol açar. Hümmoral bağışıklıktaki bu kusur, kapsüllenmiş bakterilere karşı artan duyarlılıkla sonuçlanır.

Tablo 1:Uluslararası immünoloji toplulukları birliğinin (IUIS) PİY sınıflandırması [5]

IUIS Sınıflandırma grubu	Primer İmmün Kategorisi
1	Kombine İmmün Yetersizlikler
2	Sendromik Kombine İmmün Yetersizlikler
3	Primer Antikor Eksiklikleri
4	İmmün Disregölasyon Hastalıkları
5	Fagositik Bozukluklar
6	Doğal İmmün Sistem Bozuklukları
7	Otoinflamatuvar Hastalıklar
8	Kompleman Eksiklikleri
9	Kemik İliğı Yetmezliğı
10	Fenokopik Primer İmmün Yetersizlikler

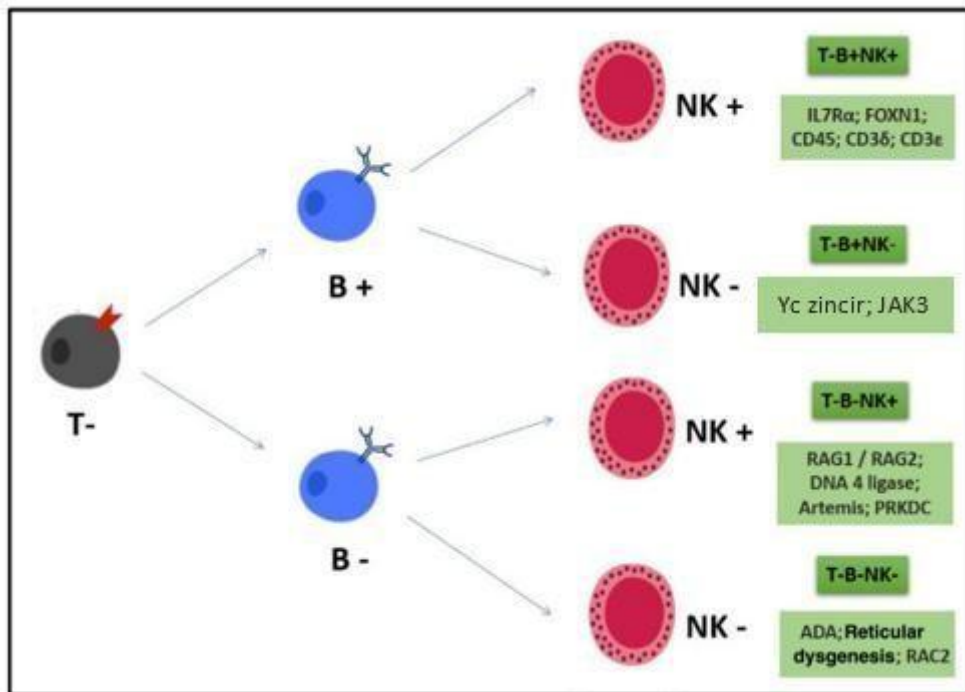
PİY, kalıcı veya tekrarlayan enfeksiyonlara, otoinflamatuvar bozukluklara, tümörlere ve çeşitli organların bozukluklarına neden olabilir ve hem yetişkinleri hem de çocukları etkileyebilmekle birlikte çocuklukta daha sık görülür. PİY'lerin dağılımı ve prevalansı popölasyonlar arasında değişmektedir [23]. Genellikle otozomal resesif kalıtım biçimine sahip olduğundan, bizimki gibi akraba evliliğı oranlarının yüksek olduğu toplumlarda görülme sıklığı fazladır [24].

2.2.1 :Kombine immün yetersizlikler

Kombine immün yetersizlikler (KİY'ler), T ve B hücre fonksiyonu eksiklikleri ile karakterize edilen hastaları hem enfeksiyöz hem de enfeksiyöz olmayan komplikasyonlara yatkın hale getiren, fenotipik olarak heterojen genetik bozukluktur.

KİY genel insidansının 75.000 ila 100.000 canlı doğumda 1 olduğu tahmin edilmektedir [25].

KİY'lerin en ağır formu ağır kombine immün yetersizlikler (AKİY)'dir. Lenfosit gelişimin farklı basamaklarındaki genlerin hasarı farklı AKİY fenotipine sebep olmaktadır. AKİY, T hücre gelişimi veya işlevindeki bir sapmadan kaynaklanan, potansiyel olarak yaşamı tehdit eden bir bozukluktur ve bugüne kadar AKİY ile sonuçlanan 20'den fazla genetik kusur tanımlanmıştır [26]. AKİY insidansı, canlı doğum başına 40.000 ila 75.000 arasında 1'dir [26]. T hücre yokluğu ile karakterize olan hastalık, B lenfosit ve doğal öldürücü hücre'nin varlığına ya da yokluğuna göre alt gruplara ayrılmaktadır (şekil 4). İlk defa 1972 yılında Dr Robert A. Good tarafından adenoazin deaminaz (*ADA*) gen eksikliğinin AKİY fenotipine sebep olduğu bulunmuştur [27]. Daha sonra yapılan çalışmalarda *IL2RG* gen kusurlarının X'e bağlı AKİY'e sebep olduğu anlaşılmıştır. Bugüne kadar 14 adet gen kusurunun AKİY'e sebep olduğu bulunmuştur [27]. Klasik AKİY'in yanı sıra hastalığın atipik ("leaky") AKİY, Omenn, "nude" gibi daha nadir olan varyantları da mevcuttur.



Şekil 4: Fenotipik olarak ağır kombine immün yetmezliğin sınıflandırılması [28]

T- B+NK- AKİY: Bu fenotipin en yaygın sebebi *IL2RG* genindeki kusurlardır. *IL2RG* geni (IL)-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15, and IL-21 için sitokin reseptörlerinin gama bileşenini kodlar. IL-7 sinyalinde oluşan sorun sebebi ile T hücre, IL-15 sitokin sinyalindeki kuusurdan dolayı NK hücre eksiliği ortaya çıkmaktadır. *IL2RG* geni X kromozomunda bulunduğundan dolayı bu fenotip X'e bağlı kalıtılır [27].

T-B-NK+ AKİY: Bu fenotipe sebep olan kusurun T ve B lenfositlerinde ortak olan fakat NK hücrelerinin dahil olmadığı bir mekanizmada olabileceği fikri üzerinden düşünüldüğünde T ve B hücreleri gelişimleri sırasında reseptör genlerinde yaptıkları yeniden düzenleme mekanizmalarına bakılabilir. Yeniden düzenleme mekanizmalarından birisi olan VDJ rekombinasyonu, reseptör çeşitliliği ve antijene özgün cevap oluşturan adaptif immün yanıt için yapılır. Bu rekombinasyonda görev alan genlerde oluşacak bir kusur bu fenotipe neden olabilir. Nitekim yapılan çalışmalarda, T-B-NK+ AKİY fenotipine VDJ rekombinasyonu sırasında gerekli olan *RAG1*, *RAG2*, *DCLRE1C* gen ürünlerinin kusurları etkili olduğu gözlenmiştir [27].

T-B+NK+ AKİY: T hücrenin bulunmadığı bu fenotiple ilgili sadece T hücresinde gerçekleşen bir mekanizmada olan kusur sebebiyle geliştiği düşünülebilir. T hücreleri, apoptozu önlemek için gelişimi sırasında IL-7 ve T-hücre reseptörleri aracılığıyla sinyalleşmeye ihtiyaç duyar [27]. Yapılan çalışmalarda görülmüştür ki B pozitif, NK-pozitif AKİY'in en yaygın nedenleri, bu 2 sinyal yolunda görev alan kusurları içerir [27].

T-B-NK- AKİY: T,B ve NK hücrelerinin üçünde bulunmadığı bu durumda T, B ve NK hücresinin hepsini etkileyen bir mekanizmada oluşan kusurların sorumlu olduğu düşünülebilir. Yapılan çalışmalarda, adenoazin deaminaz (*ADA*) ve Purin nükleozid fosforilaz (*PNP*) genlerindeki kusurların fenotipin ortaya çıkmasında etkili olduğu bulunmuştur [27]. ADA ve PNP eksikliği pürin metabolitlerinin birikmesine neden olur. Bu metabolik ara ürünler sadece lenfositler için toksik olmakla kalmaz, aynı zamanda reseptör etkileşimleri yoluyla doğrudan apoptozu indükleyerek B-negatif, NK-negatif AKİY'e yol açar [27].

2.2.2 Primer Antikor Yetersizlikleri

Primer antikor yetersizlikleri (PAY), tüm primer immün yetersizlik sendromları içerisinde en sık gözlenen hastalık grubudur [28]. Bu hastalık grubu, B hücresi gelişimi veya işlevindeki hasarlardan dolayı ortaya çıkar. Hastalar düşük seviyelerde bir veya daha fazla immünoglobulin izotip ve/veya yetersiz antikor üretimine sahiptir. Bu hastalık grubunun B hücre hasarlarına ek olarak bireyler arasında görülen klinik ve immünolojik heterojenite nedeniyle bu hastalık grubunda genotip-fenotip korelasyonu belirgin değildir ve bu durum hastaların tanı sürecini uzatmaktadır.

PAY'lar immünolojik fenotiplerine göre 3 alt grupta incelenmektedir.

Agammaglobulinemi: B lenfosit gelişimi sırasında gerçekleşen kusurlardan kaynaklanmaktadır. Bu hastalık, pre-B hücre reseptörünün (BCR öncesi) veya pre-BCR sinyalinin ekspresyonunu etkileyen genetik kusurların sonucu olarak periferik B hücrelerinin sayısında ciddi azalma veya yokluk ile karakterize edilir [28]. Bu durum sonucunda, immünoglobulin üretimi çok azdır ya da yoktur, tüm izotiplerin Ig seviyelerinde bir azalma vardır ve IgA genellikle saptanamaz [29]. X'e bağlı agammaglobulinemidir (XLA), B hücre gelişim sırasındaki hasarlarla ilişkilendirilen hastaların %85'inde görülerek en yaygın PAY olarak sınıflandırılmaktadır. Bu duruma B hücre aktivasyonu ve farklılaşmasında rol oynayan Bruton tirozin kinaz (*BTk*) genindeki mutasyonlar neden olur. *BTk* geni dışında B hücre reseptörü ve/veya gelişiminde görev yapan *CD79a*, *CD79b*, *BLINK* genleri agammaglobulinemi'ye neden olduğu bilinen ve otozomal resesif kalıtılan genlerden bazılarıdır. Ayrıca, *TCF3* geni de agammaglobulinemi'ye sebep olduğu bilinen otozomal dominant olarak kalıtılan tek gendir [28]. Tahmini insidans 1:200.000 ile 1:100.000 canlı doğum arasında değişmektedir [28].

Yaygın Değişken İmmün Yetersizlik (YDİY):

Yaygın değişken immün yetersizlik (YDİY), düşük IgG, IgA ve bazen IgM seviyeleri ve antikor üretimi kusurları ile karakterize edilen heterojen bir hastalık grubudur [30]. YDİY yetişkinlerde en sık görülen primer antikor yetmezliğidir. B hücresi olgunlaşması ve aktivasyonunda veya T ve B hücresinin ortak olarak rol aldığı mekanizmlarda görev alan genlerdeki kusurlardan kaynaklanmaktadır [11]. Hastalarda bulgular geç başlaması ve heterojen bir sendrom olmasından dolayı poligenik bir sendrom olduğu varsayılmıştı ama yapılan çalışmalarda otozomal resesif olarak kalıtılan

T-hücresi yüzey reseptörünü kodlayan geni, indüklenebilir T-hücresi kostimulatörünü (ICOS), BAFF reseptörü; ve B-hücresi reseptör kompleksi ile ilişkili proteinler CD19, CD20, CD21, CD81 gibi genlerdeki mutasyonlar YDİY'li hastaların %8-10'unu kapsamaktadır [30]. Kafkasyalılarda YDİY insidansının 1:20.000 ile 1:50.000 arasında olduğu ve Asya veya Afrika kökenli Amerikalılarda daha az yaygın olduğu tahmin edilmektedir [31]. Hastalarda, tekrarlayan enfeksiyonlar, otoimmün bozukluklar, granümatöz interstisyel akciğer hastalığı, maligniteler (lenfoma dahil) görülmektedir [31].

Somatik Hipermutasyon Bozuklukları: somatik hipermutasyon bozuklukları, normal veya artmış IgM ve düşük IgG ve IgA konsantrasyonları ile karakterize edilmektedir [32]. Hiper-IgM sendromu (HIGM), ya CD40:CD40-ligand etkileşiminin yokluğu gibi yeterli olamayan B-hücre birlikte uyarılmasından ya da aktivasyon kaynaklı sitidin deaminaz (*AICDA*), urasil DNA glikozilaz (*UNG*), ataxia telangiectasia mutated (*ATM*), recombination activating gene 2 (*RAG2*) gibi sınıf değiştirme ve somatik hipermutasyon mekanizmasında görev alan genlerdeki kusurdan kaynaklanabilir [33]. *CD40L* genindeki hatalardan dolayı gelişen X'e bağlı Hiper-IgM sendromu (X-HIGM), HIGM'nin en yaygın şeklidir ve tüm vakaların yaklaşık % 65-70'ini kapsamaktadır [33].

2.3: Genler

Bu tez çalışması kapsamında incelenecek olan genler hakkında aşağıda bilgi verilmiştir.

2.3.1: *Transkripsiyon Faktör 3 (TCF3)*

E2A olarak da adlandırılan *TCF3* geni, E-proteini ailesinin bir üyesidir ve 19 ekzondan oluşmakta olup 19p13.3 kromozomal bölgesinde bulunmaktadır. E protein ailesi, temel sarmal-ilmek-sarmal (bHLH) alanını içeren transkripsiyon faktörü ailesidir [34]. E protein ailesi üyeleri arasında *E2A* (TCF-3), *HEB* (TCF-12) ve *E2-2* (TCF-4) genleri bulunur [35]. Bu protein ailesi alternatif kırılma yoluyla birkaç proteini kodlayabilir: *E2A* geni, *E12* ve *E47* proteinlerini kodlarken, *HEB* geni, kanonik *HEB* proteinini (*HEBcan*) ve ayrıca daha kısa bir alternatif varyantı (*HEBalt*) kodlar [36].

TCF3 proteini N terminal uçta üç adet aktivasyon domaini/alanı (AD), AD1(1–99), AD2 (310–430) ve AD3 (211–298), aşağı akış sekiz-yirmi-bir (ETO) etkileşimli dizi (DES) alanı (100–239) ve C terminalde korunmuşluğu yüksek olan bir sarmal-döngü-

sarmal (bHLH) (547–608) alanından oluşmaktadır [34]. Genin protein yapısı şekil 5'te şematize edilmiştir. Aktivasyon alanları genin transkripsiyonel aktivasyon görevinden sorumlu iken bHLH dimerizasyon ve hedef DNA'ya bağlanmasından sorumludur [34].



Şekil 5: TCF3 protein yapısı

AD1 alanı, transkripsiyonel aktivitesini kromatin yapısını düzenleyen proteinlerle birlikte çalışarak gerçekleştirmektedir. AD2 alanı: yüksek miktarda serin aminoasiti ve lösin aminoasitinin heptad tekrarlarını içermektedir. Bu tekrarlar, HLH aracılı dimerizasyonu stabilize etmede rol oynamaktadır. AD2'nin tekrarındaki ilk iki lösin tortusunun bölgeye yönelik mutasyonu ile yapılan bir çalışmada, trans-aktivasyon potansiyelinde önemli bir azalmaya yol açtığı fakat bu bölgenin tek başına aktivasyon işleminden sorumlu olmadığı bulunmuştur [37]. DES alanı, E protein inhibitörü olarak adlandırılan ETO proteini ile ilişkilidir [34]. Bu özelliğinden yola çıkılarak DES alanının TCF3 proteininin aktivitesini negatif olarak düzenlediği söylenebilir. AD3 alanı ise transkripsiyon faktör II ile ilişkilidir ve TATA kutusunun promotore bağlanmasını artırarak hedef genin transkripsiyonuna yardımcı olmaktadır [34].

TCF3 geninin kodladığı E12 ve E47 proteinleri yalnızca temel sarmal döngü sarmal bHLH bölgelerinde farklılık göstermektedir. E47, DNA'yı bir homodimer olarak kolayca bağlama yeteneğine sahipken, E12, diğer sarmal-döngü-sarmal proteinleri ile bir heterodimer olarak işlev görmesini sağlayan farklı bir bölge içerir [38]. Bu transkripsiyon faktörleri, immünooglobulinlerin rekombinasyonunu, B ve T lenfosit farklılaşmasını, lenfoid dokuların işlevini ve çoğu lenfoid dokunun gelişimini düzenler [34]. *TCF3* geninin olmadığı fare deneyleri çalışmaları sonucunda B hücre gelişim aşamasında, pre-B hücre ve pro-B hücre oluşum aşamalarında ciddi problemler olduğu tespit edilmiş [39]. *TCF3* genindeki varyantların B hücrelerinin sayısının azalmasına, var olan B hücrelerinin işlevsiz reseptörlere sahip olmasına yol açabileceği düşünüldüğünde antikor üretiminde azalma veya yokluk görülebilir. Bu durum da agamaglobulinemi sendromuna yol açmaktadır. Bu sendromlu hastalarda yapılan çalışmalarda *TCF3* geninde varyantlar tespit edilmiştir ve bugün otozomal dominant

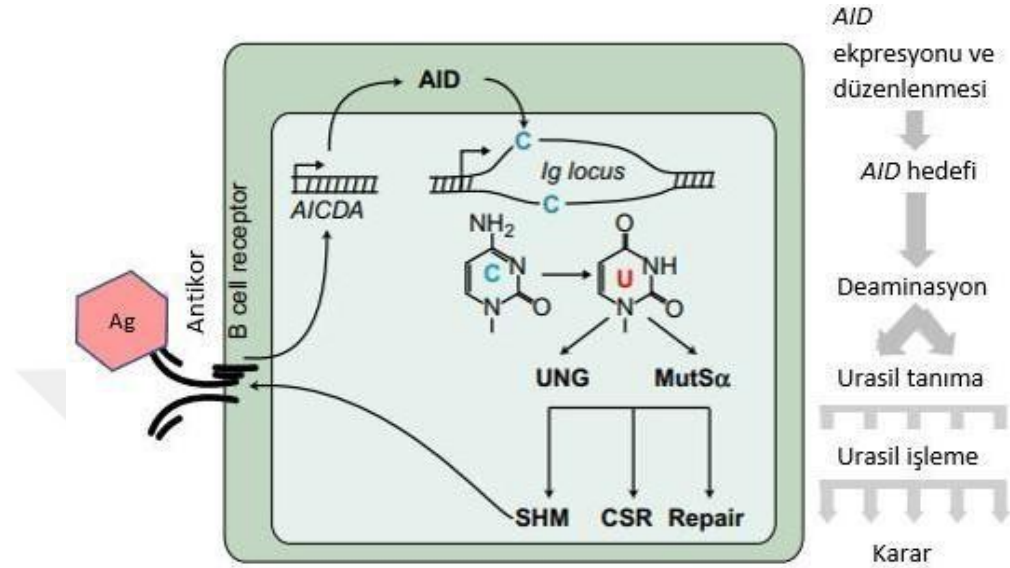
olarak kalıtılan agamaglobulinemi ve gen ilişkisinden net olarak bahsetmek mümkündür [40]. Ayrıca, TCF3 proteinleri siklin bağımlı kinaz inhibitörü olan p21'in transkripsiyonunu aktive ederek hücre döngüsünü düzenlemede de rol oynamaktadır [39].

2.3.2 : Aktivasyonla indüklenen sitidin deaminaz (*AICDA*)

Aktivasyonla indüklenen sitidin deaminaz (AICDA) geni, 12p13.31 lokasyonunda bulunur ve 198 aminoasitlik sitidin deaminaz ailesinin bir üyesi olan bir RNA düzenleyici deaminazı kodlar. Dizi homolojisine dayanarak yapılan sınıflandırmada *AICDA* geni APOBEC ailesinin bir üyesi olarak sınıflandırılmıştır [41]. *AICDA* proteini 4 bölgeden oluşmaktadır: bir nükleer lokalizasyon sinyali (NLS; 8–26 aa), bir sitidin deaminaz bölgesi (55–94 aa), bir apolipoprotein B düzenleme kompleksi (APOBEC) benzeri alan (aa 119–183) ve bir nükleer taşıma sinyali (NES; 183–198 aa) [42]. Gen, germinal merkez benzeri B hücrelerinde spesifik olarak eksprese edilir ve germinal merkezde, somatik hipermutasyon, gen dönüşümü ve immünoglobulin genlerinin sınıf değiştirme rekombinasyonunda yer alır.

Lenfosit gelişimi sırasında T ve B hücreleri VDJ rekombinasyonu yoluyla antijen reseptörlerini kodlayan genlerin somatik olarak yeniden programlanmasıyla primer reseptör repertuarlarını oluştururlar. Buna ek olarak B lenfositler germinal merkezde antikor çeşitliliğini artırmak için somatik hipermutasyon (SHM) ve sınıf değiştirme rekombinasyonu (CSR) olmak üzere iki moleküler mekanizma daha kullanırlar. SHM, immünoglobulin (Ig) genlerinin değişken antijen tanıma bölümünde, genellikle tek nükleotid mutasyonlarının eklenmesini içerir [43]. CSR, ağır zincir Ig lokusunun iki anahtar bölgesi arasında gerçekleşen bölgeye özgü bir rekombinasyon reaksiyonudur [43]. Somatik hipermutasyon ve sınıf değiştirme rekombinasyonu RNA düzleme geni olan *AICDA*'nın Ig genlerindeki sitozini urasile dönüştürmesi ve DNA onarımını tetiklemesiyle başlayan işlemlerdir. *AICDA* Ig lokusunun değişken bölgesindeki sitidinleri doğrudan deaminasyona uğratar ve bu durum sonucunda DNA'da normalde olmaması gereken U:G uyumsuzluğu oluşturur [43]. DNA'daki uyumsuzluk MSH2 and MSH6 enzimlerinden oluşan heterodimer yapıdaki MutSα enzimi ve urasil-N-DNA glikosilaz (*UNG*) geni tarafından tanınır [44]. Genin işlevi şekil 6'da şematize edilerek gösterilmiştir. Tanıma işleminden sonra urasil bazı *UNG*

geni tarafından çıkarılır ve o bölge DNA tamir mekanizmaları tarafından onarılır. Bu reaksiyonların bir sonucu olarak, yeni efektör yeteneklerine sahip antikorlar üretilmiş olur.



Şekil 6: B hücresinin geçirdiği düzenlenme mekanizmalarında *AICDA* gen rolü [44, 45]

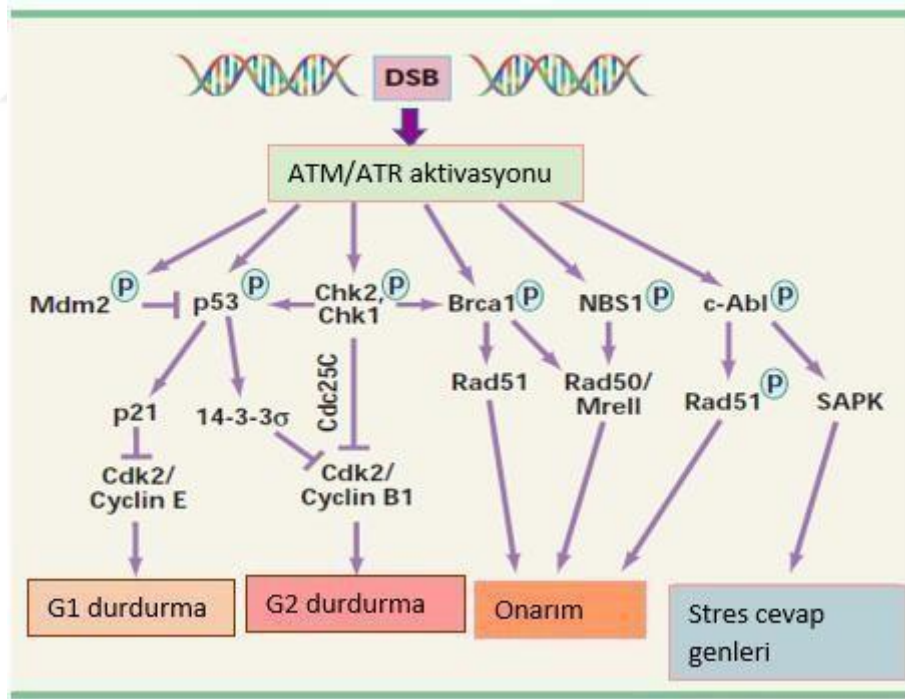
Bu gendeki kusurlar, otozomal resesif hiper-IgM immün yetersizlik sendromu tip 2'nin (HIGM2) nedenidir. HIGM2 sendromu AICDA eksikliğinde görülen 3 ana anormalliğin karakterize etmektedir: Ig sınıfı geçiş rekombinasyonunun (CSR) yokluğu, Ig somatik hipermutasyonlarının olmaması ve dev germinal merkezlerin varlığından kaynaklanan lenf nodu hiperplazisi [46].

2.3.3 : *Ataxia telangiectasia mutated (ATM)*

ATM (Ataxia telangiectasia mutated) geni, 11q22-23 kromozom üzerinde bulunur ve çift sarmallı DNA kırıklarını tanıyan 3050 aminoasitten oluşan PI3/PI4-kinaz ailesine ait olan bir serin-treonin protein kinazı kodlar. ATM geni çok büyüktür, 150 kb'lık bir genomik bölgeyi kapsar ve 66 ekzondan oluşur [47].

Hücrede homodimer olarak bulunan ATM proteini, DNA'da bir çift iplikli kırık oluşması durumunda konformasyonel bir değişikliğe uğrar. ATM'nin aktivasyonu, Ser1981 üzerindeki otofosforilasyonu yoluyla gerçekleşir ve Tip60 histon

asetiltransferazın aracılık ettiği önceden ATM asetilasyonunu gerektirir [48]. Ser1981'deki ATM fosforilasyonu, homodimer yapının monomerik birimlere ayrışması için gerekliken, ATM'nin katalitik alanı, Ser1981 bölgesinin dışında bulunur ve yalnızca bir monomer biçiminde ATM'ler olduğunda substratlara erişilebilir hale gelir [49]. MRE11-Rad50-NBS1(MRN) kompleksi, DNA hasarını algıladığı, ATM'yi hasar bölgesine yönlendirdiği ve hasarın onarımında yer alan diğer ilgili proteinlerin fosforilasyonunu başlatmak için ATM'yi hedefleme işlevi gördüğü için ATM aktivasyonu sürecinde önemlidir [50]. DNA hasarına cevap olarak aktif hale gelen ATM DNA hasar kontrol noktalarının aktivasyonu ve hasarı işleyen enzimatik aktivetelerle birlikte diğer hasar onarım elemanlarının aktivasyonu ve modülasyonunu tetikler [51]. Aktive olan ATM, G1/S kontrol noktasına aracılık eden p53 proteini ve CDC25 fosfatazi inhibe ederek G2/M kontrol noktasını aktive eden Chk2, BRCA1 gibi hücre döngüsünü kontrol eden proteinleri fosforile ederek DNA hasar onarımına yardımcı olur. ATM proteininin çift iplikli DNA hasarına verdiği cevapları şematize edilerek şekil 7'de gösterilmiştir.



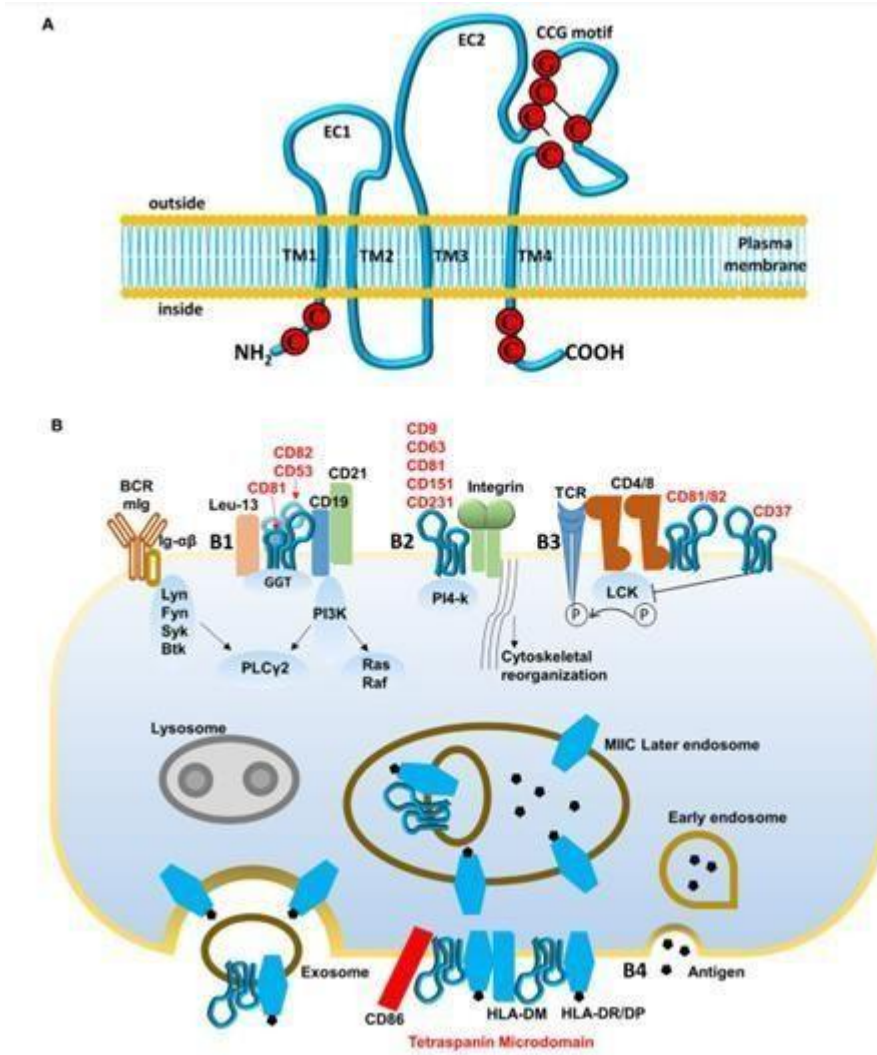
Şekil 7: ATM genin hasar onarım cevabı

ATM genindeki anlamsız, çerçeve kayması veya proteini kesen ekleme mutasyonları Ataksi-Telanjektazi hastalığına sebep olur. Ataksi telenjektazi (A-T), esas olarak ilerleyici serebellar ataksi, okulokutanöz telenjektazi ve immün yetersizlik ile karakterize otozomal resesif geçişli bir hastalıktır. Şimdiye kadar A-T'den sorumlu 500'den fazla *ATM* mutasyonu tanımlanmıştır [47].

2.3.4 : Transmembran 4 L6 aile üyesi 4 (*TM4SF4*)

Transmembran 4 L6 aile üyesi 4 (TM4SF4), hücre büyümesi, gelişimi düzenlenmesinde rol oynayan, tetraspanin ailesi olarak da bilinen transmembran 4 süper ailesine ait çok geçişli bir membran glikoproteindir.

Tetraspaninler, ~200–350 amino asit uzunluğunda ve hücre yüzeyinden 3–5 nm çıkıntı yapan küçük hidrofobik proteinlerdir [52]. Dört transmembran (TM) bölgesinden, bir küçük hücre dışı döngüden (EC1) ve bir büyük hücre dışı döngüden (EC2), bir küçük sitoplazmik döngüden ve iki kısa sitoplazmik kuyruktan oluşurlar. Tetraspaninlerin adezyon, migrasyon, füzyon ve sinyalleşme dahil olmak üzere birçok hayati hücre biyolojik sürecinde rol oynadığı gösterilmiştir [52]. TM bölgesi, proteinlerin katlanmasından sorumludur. Yapılan çalışmalarda bu bölgedeki mutasyonların, bazı tetraspanin proteinlerin katlanmasını, stabilitesini ve taşınmasını etkilediği gösterilmiştir. EC2 bölgesi, diğer moleküllerle ve protein-protein etkileşiminden sorumlu olan bölgedir [52].



Şekil 8: A) Tetraspanin protein yapısı B) Tetraspanin tarafından düzenlenen yollar [53]

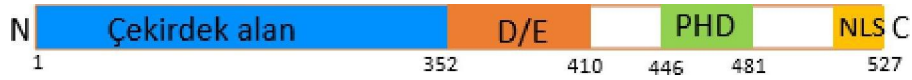
TM4SF4 proteini, insan bağırsağında ve karaciğerde bol miktarda eksprese edilir ve hücre proliferasyonunda rol oynar [54]. Hücresel düzeyde, insan TM4SF4, polarize insan enterositlerinin apikal membran alanında eksprese edilir. Fare model organizmasında yapılan çalışmalara göre, *TM4SF4* gen ekspresyonu karaciğer hasarı olduğunda ve yenilenmesi durumlarında yüksektir [55].

Tetraspanin ailesi üyeleri immün sistem hücrelerinde sinyal iletimi ve düzenlenmesinde görev yapmaktadır [53] (şekil 8). Tetraspaninler etkileşim içinde olduğu başka moleküller ile B hücre aktivasyonu, hayatta kalma, gelişme, antikor üretimi, virüs enfeksiyonu ve sinyal iletiminin düzenlenmesi dahil olmak üzere B hücrelerinde birçok

fonksiyona sahiptir [53]. *TM4SF4* geninin B hücre reseptörü olan CD79a ile ilişkili olduğu iki hibrid deneyi ile valide edilerek IntAct veritabanında bildirilmiştir (<https://www.ebi.ac.uk/intact/search?query=id:EBI-7797864%20AND%20id:EBI-8650934#interaction>).

2.3.5. Rekombinasyon aktivasyon gen 2 (*RAG2*)

Rekombinasyon aktivasyon gen 2 (*RAG2*), 11.kromozom üzerinde bulunur ve 527 aminoasitlik uzunluğunda lenfosit spesifik bir protein kodlar. *RAG2*, olgunlaşmamış lenfoid hücrelerde eksprese edilir [56]. *Rag2* proteini, proteinin 3'te 2'sine denk gelen uzunlukta bir çekirdek alandan ve bitki homodomain (PHD) alanı ve nükleer lokalizasyon sinyali (NLS) alanlarından oluşur. Şekil 9'da *RAG2* protein alanları şematize edilerek gösterilmiştir. Çekirdek alanı DNA bölünme aktivitesi için çok önemli olan *RAG2* aktif çekirdeği, *RAG1* ile etkileşime girer ve *RAG* kompleksinin DNA'ya bağlanma afinitesini ve özgüllüğünü artırır. Büyük çoğunluğunu çekirdek alanın oluşturduğu *RAG2* geninin (1-383) N terminali, kromatin bağlanması ve çoklu biyokimyasal işlevler için önemlidir [56]. Karboksi terminali (a.a. 384-527) ise rekombinasyon işlemleri için vazgeçilmezdir. NLS, *RAG2* proteinin nükleer translokasyonuna aracılık etmektedir [57]. PHD alanı, lizin 4 (H3-K4me3) üzerinde trimetillenmiş histon H3'e ve ayrıca H3 peptidine spesifik olarak bağlanır. Bu bağlanma, *RAG* kompleksinin katalitik aktivitesini artırır ve *RAG2*'yi aktif kromatin bölgelerine yönlendirir. *RAG* kompleksi *RAG1* ve *RAG2*'den oluşmaktadır. T ve B lenfositlerinin gelişimi sırasında immünoglobulin genlerinin yeniden düzenlemesini içeren VDJ rekombinasyonunda görev yaparlar. *RAG1* ve *RAG2* genleri kromozom 11p13 üzerinde aynı lokusta yer alır [56]. *RAG1* proteini N terminalinde bir C2H2 çinko parmak (ZFA) ve bir C3HC4 çinko-bağlama motifi tarafından tanımlanan çoklu çinko bağlayıcı motifler içerir; bu motif, E3 ligazları olarak bilinen bir grup enzim ve bunların substratları arasındaki etkileşimde kritik bir rol oynar [56]. Ayrıca, N-terminali yarısı, *RAG1* taşınmasını kolaylaştıran bir nükleer lokalizasyon sinyali ve Hin rekombinazının DNA bağlanma alanına homolog olan bir sarmal-dönüş-sarmal motifine sahip bir nonamer bağlanma alanı (NBD) içerir. *RAG1* çekirdek alanı DDE motifi olarak isimlendirilen aktif bir bölge içerir ve bu bölge aracılığıyla *RAG2* proteini ile etkileşir [56].



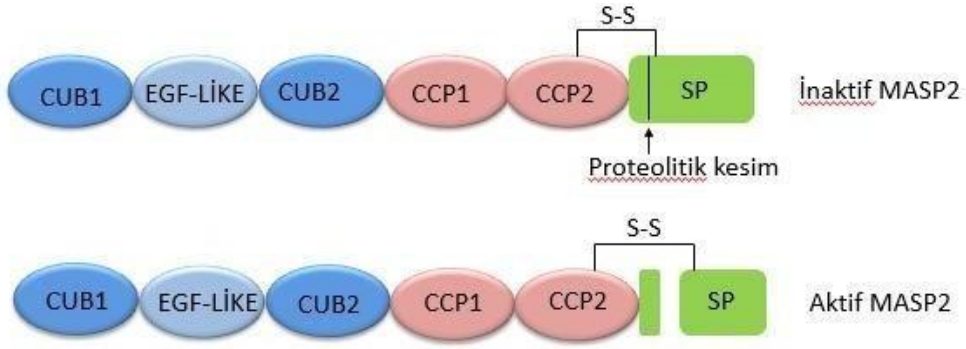
Şekil 9: RAG2 protein şeması

T ve B lenfositlerinin gelişimi sırasında immünoglobulin genlerinin yeniden düzenlenmesini içeren VDJ rekombinasyonunda, bileşen değişkeni (V), çeşitlilik (D) ve birleştirme (J) gen bölümlerinin her bir tipinden biri, antijen bağlama bölgelerinin kodlama dizisini oluşturmak için birleştirilir [58]. Her bir gen segmentini çevreleyen rekombinasyon sinyal dizisi (RSS), RAG proteinlerini uygun DNA bölünme bölgelerine yönlendirir. RSS, hem korunmuş bir heptamerden hem de 12 veya 23 baz çiftinden oluşan kötü korunmuş bir aralayıcı ile ayrılmış bir non-mer dizisinden oluşur [58]. RAG1 ve RAG2 proteinlerinden oluşan V(D)J rekombinaz, AR lokuslarındaki her bir gen segmentinin sınırında yer alan seçilmiş rekombinasyon sinyal dizilerinde (RSS) DNA çift zincir kırıkları oluşturarak işlev görür [59]. V (D) J rekombinasyonu kodlama bölgelerinin çeşitli kombinasyonlarla birleştirilmesiyle milyonlarca farklı fonksiyonel immünoglobulin ve T hücresi reseptör genini bir araya getirebilir. Bu rekombinasyon, spesifik rekombinasyon sinyal sekansları (RSS) ile çevirili bölgelerde RAG1/RAG2 rekombinazlar ile DNA çift iplikli kırıklarının oluşturulması ile başlar. İki tane RSS çeşidi vardır ve bunlar V den J ye y da V D J birleştirme üzerine odaklanmak için bölümlere ayrılmıştır. *RAG1/RAG2* genlerinin oluşturduğu DSB non homolog end joining ile birleştiriliyor. Bu birleştirme de DNA onarım komplekslerinden biri olan histon H2AX ve Mre11 / Rad50 / Nbs1 kompleksi muhtemelen görev alıyordu.

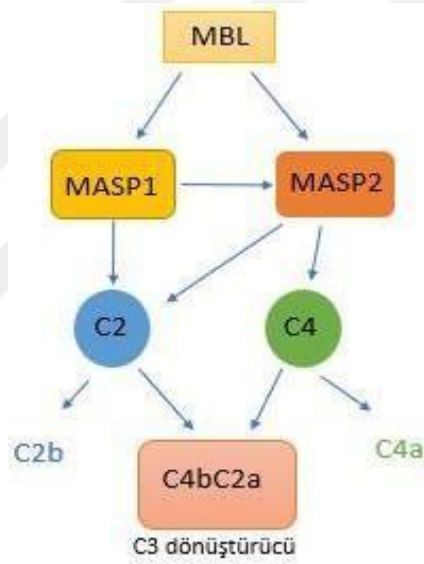
Farklı *RAG* mutasyonları, bazı örtüşmelerle birlikte farklı klinik ve immünolojik fenotiplere neden olabilir. *RAG1* ve *RAG2* genlerinin null mutasyonları, T ve B hücrelerinin bulunmadığı otozomal resesif bir SCID formuna neden olur. Bununla birlikte, RAG genlerinin artık T ve B lenfosit üretimine izin veren hipomorfik mutasyonları, Omenn sendromu (OS), atipik SCID ve granülomlar ve/veya otoimmünite (CID-G/AI) gibi geniş bir klinik bulgular ve immünolojik bulguları gösteren fenotiplere neden olabilir [58].

2.3.6. Mannan bağlayıcı serin proteaz 2 (MASP2)

Mannan bağlayıcı serin proteaz 2 (MASP2) geni 1p36.23-31 kromozomu üzerinde bulunur. 12 ekzona sahip olan gen *MASP2* ve MAP19 olarak adlandırılan iki tane protein kodlar [60]. Genin; Ekzon 1 çevrilmez, ekzon 2 sinyal peptidini kodlar ve ekzon 3 ile birlikte CUB1 alanını kodlar. Ekzon 4, EGF benzeri alanı kodlar, ekzonlar 6 ve 7, ikinci CUB1 alanını kodlar, ekzonlar 8–9 ve 10–11, iki CCP alanını kodlar ve ekzon 12, serin proteaz alanını ve 3' UTR bölgesini kodlar [60]. MAP19, *MASP2* geninin ilk transkriptinin alternatif kırılması sonucunda oluşan ve poliadenilasyonu ile üretilen kesilmiş bir proteindir. *MASP2* geni mannan ilişkili serin proteaz ailesinin bir üyesidir. *MASP1*, *MASP3*, MAP19 ve MAP44 bu ailenin diğer üyeleridir. *MASP2*, insan serumunda fonksiyonel olarak naktif formda bulunan bir serin proteazdır ve kompleman sistemin lektin yolağında görev yapmaktadır. Protein, CUB1 (C1r/C1s, kemik morfogenetik proteini), EGF (epidermal büyüme faktörü), CUB2, CCP1 (tamamlayıcı kontrol proteini), CCP-2 ve SP (serin proteaz, katalitik) olmak üzere altı alandan oluşan tek polipeptit zinciri halinde proenzim olarak karaciğerden sentezlenir. CUB1 ve EGF alanları proteinin mannoz bağlı lektin (MBL) ve diğer kollektinler ile etkileşiminden sorumludur, CUB2 alanı bu etkileşimin güçlendirmede rol oynar. İki tamamlayıcı kontrol proteini (CCP) molekülü ve SP alanı, katalitik aktiviteden sorumlu iken CCP2, C4 bölünmesinde temel rol oynamaktadır [61]. MBL'nin hedef moleküle bağlanması sonucu gerçekleşen konformasyonel değişim sonucunda *MASP2* proteazı uyarılır ve CCP-2 ve SP alanları arasındaki korunmuş Arg-11 bölgesinden kesilerek birbirine bir disülfid bağı ile bağlanan ağır ve hafif zincir olarak adlandırılan iki polipeptit zincirine ayrılarak aktif forma dönüşür. Şekil 10'da inaktif ve aktif *MASP2* proteazı gösterilmiştir. Aktif *MASP-2* enzimi, C4 ve C2'yi yüksek verimlilikle parçalayarak lektin yolunun ana bileşeni olan C3'ü kesen C4Bc2b C3 konvertazını oluşturur. C3 konvertazın oluşumu şekil 11'de gösterilmektedir. Ayrıca *MASP1* proteazı da C2 molekülünü enzimatik olarak parçalayabilme özelliği sayesinde kompleks oluşumuna yardımcı olmaktadır.



Şekil 10: MASP2 proteazın inaktif ve aktif hali



Şekil 11: MASP1 ve MASP2 proteinleri tarafından C3 dönüştürücü oluşumu

MASP2 eksikliği ilk olarak 2003'te otoimmün ve inflamatuvar bozuklukların yanı sıra şiddetli ve tekrarlayan pnömokok enfeksiyon şikayeti olan yetişkin bir bireyde rapor edilmiştir [62].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Hasta seçimi

Bu çalışmaya grubumuz tarafından daha önce yapılan “Primer İmmün Yetersizliklerde Genetik Alt Yapının Yeni Nesil Dizileme Yöntemi İle Belirlenmesi” (Sinem Fırtına doktora tezi, İstanbul Üniversitesi, 2017) başlıklı tez kapsamında İstanbul Tıp Fakültesi (n=2), Marmara Eğitim Araştırma Hastanesi (n=2), Cerrahpaşa Tıp Fakültesi (n=1) ve Khusan Khozdhaev “Çocukluk Çağı Lösemi Lenfomalarında Yatkinlik Genlerinin Belirlenmesi” (devam eden doktora tezi doktora tezi, İstanbul Üniversitesi, Khusan Khozdhaev) kapsamında İstanbul Tıp Fakültesinde (n=1) immün yetersizlik tanısı almış olan hastalarla yapılan panel ve ekzom dizileme sonucunda ortaya çıkan yeni varyantlar ve aday genler bulunan hastalar dahil edilmiştir.

Çalışmaya toplam 6 çocuk hasta (3 K ve 3 E) dahil edilmiştir. Ortalama yaş 6, en küçük yaş 1 ve maksimum yaş 12’dir. Hastalara ait klinik veriler tablo 2’de özetlenmektedir.

Tablo 2: Çalışmadaki hastalara ait klinik veriler

Klinik parametreler	Hasta #1	Hasta #2	Hasta #3	Hasta #4	Hasta #5	Hasta #6
İmmunfenotip	AGM	HIGM	AGM	DLBCL+ İmmünyetmezlik	OİHA	T-B-NK+
Cinsiyet	KIZ	KIZ	ERKEK	KIZ	ERKEK	ERKEK
Yaş	9	9	5	12	1,5	1
Lökosit Sayısı (ort) (hücre/µL)	4300	4900	17200			4000
B Lenfosit Sayısı (ort) (hücre/µL)	0	16	1			500
Akraba evliliği	Yok	Yok	Var	Var	Yok	Var
Son durum	SAĞ	SAĞ	SAĞ	SAĞ	SAĞ	SAĞ

AGM: Agammaglobulinemia, HIGM: Hiper Ig-M sendromu, OİHA: Otoimmün hemolitik anemi, DLBCL: Diffuse large B cell lenfoma

Çalışmaya dahil edilen tüm hastalar ve aile bireyleri ve sağlıklı kontrollerden gönüllü onam formu alınmıştır. Çalışma İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Klinik araştırmalar Etik Kurulu tarafınca onaylanmıştır (2020/125).

3.1.2. Kullanılan cihazların listesi

Tablo 3: Çalışmada kullanılan cihaz listesi

Cihazlar	Firma
Otoklav	Kermanlar
Otomatik Pipet	Eppendorf
Laminar akım kabini	Thermo Scientific
PCR cihazı	Biorad
Sogutmalı santrifüj	Eppendorf
Spektrofotometre	Nanodrop ND-1000
Vorteks	Kermanlar
Akan Hücre Ölçer cihazı	Beckman Coulter
TC20 Hücre sayım cihazı	Biorad
Buzdolabı ve derin dondurucu (+4°C, -20°C, -80°C)	Arçelik, Sanyo, Bosch
Masa üstü mini santrifüj	Hettich, Eppendorf
Elisa plaka okuyucu	BMG Labtech-Spectrostar Nano
Jel görüntüleme sistemi	UVP

3.1.3. Kullanılan kitler

Çalışmada kullanılan kitler ve kullanım amaçları Tablo 4’de verilmiştir.

Tablo 4: Çalışmada Kullanılan Kitler

Kit adı	Firma	Kullanım amacı
PureLink Genomik DNA mini kit	Invitrogen	DNA izolasyonu
Total RNA izolasyon kiti	GeneMark	RNA izolasyonu
First-Strand cDNA Synthesis kit	Invitrogen	cDNA Sentezi
FlowCelect™ Cell Cycle Checkpoint	Millipore	<i>ATM</i> gen fonksiyon analizi
Human MASP2 Elisa kit	Mybiosource	ASP2 protein konsantrasyonu belirlemek

3.1.4. Kullanılan Materyaller

PZR reaksiyonu için kullanılan materyaller Tablo 5’de verilmiştir.

Tablo 5: Çalışmada Kullanılan Materyaller

Kullanılan materyal	Firma
10X (NH ₄) ₂ SO ₄ Taq Buffer	Thermo Scientific
Taq DNA Polimeraz (5U/μl)	Thermo Scientific
25 mM MgCl ₂	Thermo Scientific
10mM dNTP miks	Thermo Scientific
DMSO	Thermo Scientific
5M BETAİN	Thermo Scientific
Dreamtaq polimeraz	Thermo Scientific
Dreamtaq Buffer	Thermo Scientific

3.1.5. Kullanılan Kimyasallar

Çalışmada kullanılan kimyasallar Tablo 6’da verilmiştir.

Tablo 6: Çalışmada Kullanılan Kimyasallar

Kullanılan kimyasallar	Firma
Etidyum Bromür	Sigma,Almanya
Agaroz	Thermo Scienfic
Trypan blue	Gibco- Thermo Scienfic
Tris Baz	Sigma,Almanya
Glasiyal Asetik Asit	Merck,Almanya
EDTA	Sigma,Almanya
RPMI	Gibco- Thermo Scienfic
FCS serum	Gibco- Thermo Scienfic

3.1.6. Kullanılan tamponlar

➤ 50X TAE(Tris-Asetik asit-EDTA)

100 ml EDTA (0.5M)

242 g Tris baz,

57,1 g Glasiyal asetik asit

1 lt distile su ile tamamlanarak 20 dakika otoklavda sterilize edildi.

3.1.7. Kullanılan primerler

Varyantı doğrulamak ailesel segregasyonu göstermek ve kırılma etkisini incelemek için varyanta uygun olarak tasarlanmış olan primerler Tablo 7’de gösterilmiştir.

Tablo 7: Çalışmada Kullanılan Primerler

Analiz yöntemi	Gen adı	NM kodu	Primerler	Ürün boyu (bp)
Segregasyon	<i>TCF3</i>	NM_003200.5	F:5'AAAGCACTGGCCTCGGTG-3' R:5'AAGGTGCAGACACCAGAACC-3'	299
Segregasyon	<i>AICDA</i>	NM_020661.4	F: 5'TACTTCTGTGAGGACCGCAA-3' R: 5'TCATTTCTCGGGGCCTT-3'	441
Segregasyon	<i>TM4SF4</i>	NM_004617.3	F: 5'TGGAGGGAATTGCACACTTT-3' R: 5'GCAAAAGCCTGAACTTACCC-3'	265
Ekspresyon	<i>TM4SF4</i>	NM_004617.3	F:5'CCACGACGGGGATTATCTCA-3' R: 5'GGATTCCTCCTACGACCAGC-3'	116
Segregasyon	NBN	NM_002485.3	F:5'CCTCATTGTGGAAAAATAAGGAGC-3' R: 5'GCTACTTTCTGGTACTGCTTCA-3	344
Segregasyon	<i>ATM</i>	NM_000051	F:5'AGAGTTGGGAGTTACATATTGGT AATG-3' R:5'TGGCTGTGTAAATATCCACCAA-3'	479

3.1.8. Kullanılan Elektronik Veritabanları

Bu tez çalışması kapsamında varyantın özelliklerini öğrenmek, etkisini belirlemek amacıyla çeşitli veritabanları kullanılmıştır. Kullanılan veri tabanları tablo 8'de verilmiştir. SIFT, bir amino asitin, dizi homolojisine ve amino asitlerin fiziksel özelliklerine dayalı olarak protein fonksiyonunu etkileyip etkilemediğini tahmin eder. PROVEAN (Protein Variation Effect Analyzer), bir amino asit değişiminin veya indel'in bir proteinin biyolojik işlevi üzerinde bir etkisi olup olmadığını tahmin etmek

için kullanılan bir araçtır [63]. PolyPhen-2 (Polimorfizm Fenotipleme v2), basit fiziksel ve karşılaştırmalı değerlendirmeleri kullanarak bir amino asit kalıntısının bir insan proteininin yapısı ve işlevi üzerindeki olası etkisini tahmin eden bir araçtır. Mutation taster, varyantın gen ürünü / proteini üzerindeki etkisini tahmin etmek için bir dizi “in silico” testleri gerçekleştirir. Testler hem protein hem de DNA düzeyinde yapılır. CADD, insan genomundaki tek nükleotid değişiklikleri ve indellerin patojenik etkisini işlev açısından ve korunmuşluk gibi durumları değerlendiren bir araçtır. ClinVar, insan genetik varyantlarının ve bu varyantların hastalıklarla olan bağlantısının değerlendirilip bunun önemine ilişkin yorumların bulunduğu bir arşivdir. Bir varyantın veya varyant setinin klinik önemine ilişkin iddialar, klinik test laboratuvarları, araştırma laboratuvarları, lokusa özel veri tabanları, uzman panelleri ve diğer gruplar tarafından ClinVar'a sunulur [64]. Varsome, genomdaki varyantlar hakkında bilgi alınabilmesini, varyantların patojenitesini ACMG kriterlerine göre değerlendirilerek sınıflandıran, birden fazla veri tabanlarıyla bağlantılı olarak çeşitli veri tabanlarından veri toplayan ve varyasyonlar hakkında kolay bir şekilde bilgi paylaşmasını sağlamayı amaçlayan insan genomik varyasyonu için bir arama motorudur [65]. Missense3D, tek nükleotidlik değişimin protein yapısındaki etkisini tahmin eden bir araçtır. VEP, varyantlar hakkında hangi transkriptte olduğu, düzenleyici bölgeleri, alıntılar, klinik önem bilgileri ve biyofiziksel etkilerinin tahminleri dahil olmak üzere çeşitli referans verilerini kullanarak bilgi verir [66]. İnsan Gen Mutasyonu Veritabanı (HGMD), insan kalıtsal hastalıklarının sebeplerini veya bunlarla ilgili literatürde yayınlanan hastalıkla ilişkili/fonksiyonel polimorfizmlerinin kapsamlı bir koleksiyonunu oluşturur [67]. InterPro veritabanı, protein dizilerinin ailelere sınıflandırmasını sağlar ve işlevsel olarak önemli alanları ve korunan bölgeleri tanımlayan, protein aileleri, etki alanları ve işlevsel bölgeler hakkında bilgi alınabilen kapsamlı bir kaynaktır [68].

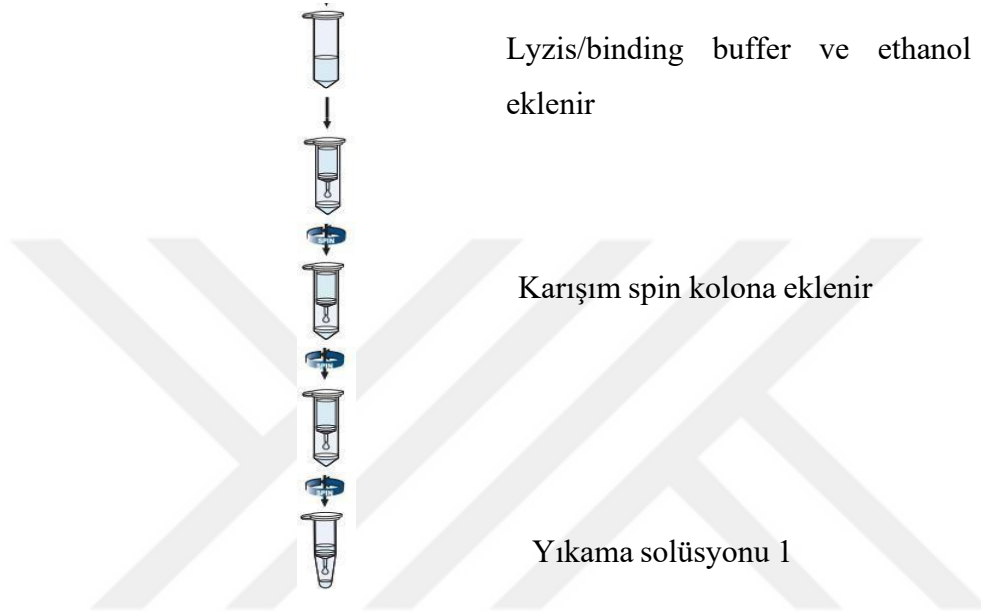
Tablo 8: Çalışmada Kullanılan Veritabanları

POPÜLASYON VERİTABANLARI	
ExAC (Exome Aggregation Consortium)	http://exac.broadinstitute.org/
gnomAD(Genome Aggregation Database)	https://gnomad.broadinstitute.org/
DbSNP	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp
DbVar	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbvar/
GENOMİK DİZİ ANALİZ VERİTABANI	
Ensembl Genome Browser	http://www.ensembl.org/index.html
UCSC (University of Santa Cruz California)	https://genome.ucsc.edu/
NCBI	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/
FENOTİP VERİTABANLARI	
ClinVar	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/
OMIM	https://www.omim.org/
Human Gene Mutation Database	http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php
VARYANTIN OLASI ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLDİĞİ TAHMİN ARAÇLARI	
Mutation taster	https://www.mutationtaster.org/
Polyphen2	http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/
Sift	https://sift.bii.a-star.edu.sg/
Human splicing finder	http://umd.be/Redirect.html
Variant effector predictor	https://www.ensembl.org/info/docs/tools/vep/index.html
CADD	https://cadd.gs.washington.edu/
Varsome	https://varsome.com/
Missense3D Database	http://missense3d.bc.ic.ac.uk:8080/
PROTEİN VERİTABANLARI	
UniProt	https://www.uniprot.org/
Human protein Atlas	https://www.proteinatlas.org/
PDB	https://www.rcsb.org/
InterPro	https://www.ebi.ac.uk/interpro/
Visual Molecular Dynamics (VMD)	https://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Periferik kandan DNA/RNA izolasyonu

Hastalardan EDTA'lı tüplere alınan kan örnekleri kit protokolü (genomic DNA mini kit, invitrogen ve total RNA izolasyon kiti, GeneMark) uygulanarak DNA ve RNA izole edildi. DNA/RNA izolasyon aşamaları şematize olarak şekil 12'de gösterilmiştir.



Şekil 12: DNA/RNA izolasyonu

Elde edilen DNA'nın konsantrasyonunun belirlenmesi

DNA ve RNA'ların konsantrasyon ve saflık tayini spektrofotometrede 260 ve 280 nm dalga boyunda ışığı soğurma (OD) ölçümü kullanılarak yapıldı. Spektrofotometre ölçümlerinde 260 nm/280 nm oranının 1.8 ile 2,0 aralığında olmasına dikkat edildi.

3.2.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Tablo 9'da çalışmada *AICDA* ve *TCF3* genleri için yapılan PZR içeriği gösterilmiştir. Tablo 10'da *AICDA* geni için PZR işleminin sıcaklık koşulları Tablo 11'de ise *TCF3* geni için olan sıcaklık koşulları verilmiştir.

Tablo 9: *AICDA* ve *TCF3* genleri için yapılan PZR içeriği

<i>AICDA</i>	Konsantrasyon	Miktar (µl)	<i>TCF3</i>	Konsantrasyon	Miktar (µl)
Distile su	-	15,4	Distile su	-	10,3
Taq Buffer	10X	2,5	Dream Taq Buffer	10X	2,5
Dntp	2,5Mm	2	dNTP	2,5mM	2
MgCl ₂	25Mm	2	DMSO	25Mm	0,5
Primer	10 pmol	2	Primer	10 pmol	2
Taq polimeraz	500 units	0,1	Betain	5M	6
DNA	50 ng	2	DreamTaq polimeraz	500 units	0,4
TOPLAM		25 µl	DNA	50 ng	2
			TOPLAM	-	25 µl

Tablo 10: *AICDA* PZR ısı koşulları

	Sıcaklık	Zaman
Ön denetürasyon	94	3 dakika
Denatürasyon	94	40 saniye
Primer bağlanması	58	45 saniye
Zincir uzaması	72	45 saniye
Son uzama	72	7 dakika

Tablo 11: TCF3 PZR ısı koşulları

	Sıcaklık	Zaman
Ön denatürasyon	65°C	5 dakika
Denatürasyon	64°C	40 saniye
Primer bağlanma	68°C (sıcaklık her döngüde 0,5°C düşecek)	45 saniye } 15 döngü
Zincir uzama	72°C	1 dakika
Denatürasyon	94°C	40 saniye
Primer bağlanma	60°C	45 saniye } 20 döngü
Zincir uzama	72°C	1 dakika
Son uzama	72°C	7 Dakika

3.2.3. Agaroz Jel Elektroforezi

PZR işleminden elde edilen ürünler 6X agaroz yükleme boyası ile karıştırılarak hazırlanmış olan %2'lik agaroz jeli 100 bp marker ile yüklendi. Elektroforez cihazında 80-90volt elektrik akımı ile 20-30 dk yürütüldü ve ilerlemiş olan ürünler UV ile görüntülendi.

3.2.4. Agaroz jelin hazırlanması

Örnekleri yürütmek için %2 konsantrasyonda agaroz jel hazırlandı. Jeli hazırlamak için 1gr agaroz tartıldıktan sonra 50 ml 1X TAE içinde mikrodalga fırında ısıtıldı ve agaroz eridikten sonra çeker ocak altında 2,5 µl etidyum bromür eklendi. Sıvılaştıran agaroz, jel tepsisine döküldü. Taraklar yerleştirildi ve katılaşması için beklendi. Katılaşan jel, içerisinde 1X TAE solüsyonu bulunan elektroforez tankına yerleştirildi.

3.2.5. SANGER dizileme

PZR yöntemiyle amplifiye edilen hasta ve aile bireylerinin DNA örnekleri agaroz jel elektroforezinde yürütüldükten sonra varyasyon varlığını doğrulamak amacıyla çift yönlü dizilemeye gönderildi. SANGER dizileme için hizmet alımı yapıldı. Alınan sonuçlar CLC Main Workbench programı kullanılarak analiz edildi.

3.2.6. Komplementer DNA (cDNA) sentezi

İzolasyonları RNA örnekleri kalıp olarak kullanılarak ters transkriptaz enzimi ile cDNA sentezi gerçekleştirildi. cDNA sentezi basamakları aşağıda verilmiştir.

- Kullanılacak nanogram miktarında olacak şekilde dilüe edilen RNA örneklerinden 10 ul alınarak, 10mM 1 µl dNTP mix ve 50 ng/µl 1 ul Randomhekzamer ile karıştırılarak PZR cihazında 65°C’de 5 dakika inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrasında 4 µl 5x First strand buffer, 2 µl 0,1 M DTT ve 1 µl 40u/µl RNaz İnhibitör karışımı örneklerin üzerine eklendi.
- Karışım 25°C’de 10 dakika bekletildikten sonra, üzerine 1 µl 200U M-MLV RT eklendi ve 37°C’de 50 dk ve 70°C’de 15 dakika inkübe edildi. İşlem sonucunda elde edilen cDNA örnekleri -20 °C’de saklandı.

3.2.7. Hücre kültürü

Hücre kültürü; ökaryotik ve prokaryotik hücrelerin çoğalabilmesi için verimli/uygun bir ortamın in vitro olarak sağlanması ile hücrelerin büyümesini/çoğalmasını sağlayan bir tekniktir. Hasta lökosit hücrelerinin laminar akımlı kabinde aseptik koşullar altında %10 FCS ve %1 antibiyotik içeren RPMI besiyeri içerisinde 24 kuyuluk plakalara ekimi yapıldı. Ekilen bu hasta lökosit hücrelerinin çoğalması için %5CO₂ ve 37°C sıcaklık koşullarındaki inkübatör(etüv) içerisinde bir gece bırakıldı.

3.2.8. Hücre sayımı

Hücre kültüründeki hücrelerin sayımı için Thoma lamı kullanıldı. Her kuyudaki hücreler ayrı ayrı sayıldı. Hücrelerin cihaz tarafından tespit edilebilmesi için Trypan blue boyası kullanıldı. Bu boya ölü hücreleri boyayan bir maddedir. Boya ve hücreler 1:1 oranında karıştırılarak Thoma lamına aktarılarak TC20 hücre ölçüm cihazında yapılmıştır.

3.2.9. Akan hücre ölçer cihazı kullanılarak *ATM* geninin fonksiyonel

Akış Sitometrisi, bir hücre veya parçacık grubunun fiziksel ve kimyasal özelliklerini saptamak ve ölçmek için kullanılan bir tekniktir.

ATM geni, DNA hasar tamirinde görevli olan önemli bir gendir. *ATM* genindeki varyasyonun genin fonksiyonuna olan etkisini analiz etmek amacıyla Millipore’s FlowCollect *ATM* DNA Hasarı ve Hücre Döngüsü Analiz Kit protokolü uygulanarak işlem sonucu ölçüm akan hücre ölçer cihazında yapılmıştır. Kullanılan kit, akan hücre

ölçer uygulamalarında hücre döngüsü kontrol noktaları ile ilgili olarak DNA hasarı arasındaki bağlantıyı tanımlamak için tasarlanmıştır. Bu kiti kullanarak, *ATM* geninde varyasyonu olan hasta ve sağlıklı hücrelerdeki hücre döngüsü kontrol noktalarına bakarak varyasyonun genin fonksiyonuna olan etkisi incelenmek istenmiştir. Kit işlem basamakları aşağıda verilmiştir.

Protokol:

1. Hasta ve ebeveynlerden alınan periferik kandan lökositler ayrılarak RPMI besiyerinde çözülerek 37 derecede %5CO₂ ortamında bütün gece inkübasyona bırakıldı.
2. Besiyerinden hücreler toplandı ve hücre sayısı vi-cell cihazında ölçüldü.
3. Örnekler 24 kuyuluk plakalara 1ml RPMI besiyeri içerisine 1 milyon hücre olacak şekilde duplike olarak ekim yapıldı.
4. Hücrelere 100µM etiposid uygulanmıştır. Her örnek için duplike olarak etiposid uygulanmış ve negatif kontrol olarak madde uygulanmamış iki kuyu oluşturuldu. 37 derecede 3 saat inkübasyona bırakıldı.
5. Inkübasyon sonunda hücreler 300g'de santrifüj ile toplandı.
6. Toplanan hücrelere 100µl soğuk 1X yıkama solüsyonu ve 100µl soğuk 1X fiksasyon solüsyonu eklendi ve 20 dk buz üzerinde inkübe edildi.
7. 700g'de 5 dk santrifüj edildi ve supernatant atıldı.
8. Pellet üzerine 100µl soğuk 1X permeabilization solüsyonu eklendi ve 20 dk buz üzerinde inkübe edildi.
9. 700g'de 5 dk santrifüj edildi ve supernatant atıldı.
10. Pellet 200µl soğuk 1X assay solüsyonu eklendi ve hücreler iyice homojenize edildi.
11. 700g'de 5 dk santrifüj yapıldı ve supernatant atıldı.
12. Pellet üzerine 95µl 1X assay solüsyonu + 5µl 20X fosfo-ATM eklenerek buz üzerinde karanlıkta 30dk inkübe edildi.
13. 200µl soğuk 1X assay solüsyonu eklendi.
14. 700g'de 5 dk santrifüj edildi.
15. Pellete 200µl PI+ Rnase solüsyonundan eklendi ve karanlıkta oda sıcaklığında 30dk inkübe edildi.
16. Sonuçlar akan hücre ölçer cihazında ölçüldü.

3.2.10. ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

ELISA yönteminde, enzimle işaretlenmiş(etikelenmiş) bir antijen veya antikor içeren çeşitli antijen-antikor eşleşmeleri kullanılır ve enzim aktivitesi kolorimetrik olarak ölçülür. Enzim aktivitesi, enzim tarafından modifiye edildiğinde renk değiştiren bir substrat kullanılarak ölçülür. Substrat ilavesinden sonra oluşan ürünün ışık absorpsiyonu ölçülür ve sayısal değerlere dönüştürülür.

ELISA deneyi *MASP2* genindeki bulunan değişimin protein konsantrasyonu üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla yapılmıştır. *MASP2* gen ürünü kompleman sisteminde görevlidir. Bu proteaz mannan bağlı lectin (MBL) denilen bir proteinle birlikte çalışmaktadır. MBL proteini yabancı moleküller üzerindeki mannan gibi karbonhidrat yapılarını tanıyarak aktive olur ve *MASP2*'ni proteazını aktive eder. Deney kapsamı içerisinde *MASP2* proteinini aktive etmek için deneyde kullanılacak olan hasta ve annesine ait ve 5 adet sağlıklı bireyden (3 kadın, 2 erkek, 28 yaş) alınan plazma örnekleri ticari olarak satın alınan mannan ile muamele edilmiştir. Bu deney için markası Mybiosource olan 'Human MASP2 Elisa Kit' isimli kit kullanılmıştır.

Mannan uygulaması:

- 1.8 mg mannan 1800ml 1X PBS içerisinde çözülerek 10X konsantrasyonda mannan solüsyonu elde edildi.
- 500µl 10X mannan solüsyonuna 4500µl 1X PBS ekleyerek 1X konsantrasyona düşürüldü.
- 48 adet 0.2ml'lik tüplere bu 1X mannan solüsyonu eklenerek +4'de bir gece inkübe edildi. Böylece kuyuların mannan ile kaplanması sağlandı.
- Tüplerden solüsyon atılıp 1X PBS+%0.05 tween solüsyonu ile 3 kez yıkama yapıldı.
- Tüplere 100'er µl 1X PBS+%1 BSA solüsyonu eklenerek 37 derecede 1 saat inkübe edildi.
- Inkübasyon sonrası tüplere sulandırılmıştır hasta ve annesine ait ve 6 adet sağlıklı örnekler 100'er µl olarak eklenerek 37°C 1 saat inkübe edildi.

Protokol:

1. Çalışmaya başlamadan önce kit içerisindeki bütün solüsyonlar oda sıcaklığına çıkarılmıştır.
2. Mannan inkübasyonu sonrasında kit protokolüne başlandı.

3. 48 kuyuluk plaka ilk iki kolonuna 200ng/ml, 100ng/ml, 50ng/ml, 25ng/ml, 12,5ng /ml, 6,25ng /ml, 3,13ng /ml, 0(blank) şeklinde dilüsyon yapılan standart örnekler 100'er µl duplike olarak eklendi.
4. Diğer kuyulara da 1:4 ve 1:8 oranlarında dilüsyon yapılmış sağlıklı kontrol örnekleri 100'er µl duplike olarak eklendi. Hasta ve annesine ait örnekler 1:4 dilüsyon oranında 100'er µl triplike olarak kuyulara eklendi. Örneklere mannan uygulaması yapıldığı için duplike olarak mannan uygulanmış blank de kuyulara eklendi.
5. Bütün örnekler 48 kuyuluk plakaya aktarıldıktan sonra 90 dakika 37°C inkübe edildi.
6. Inkübasyondan sonra kuyulardaki sıvı atıldı ve yıkama yapılmadan 100µl Biotinli detection antikor çalışma solüsyonu her kuyuya eklendi ve yavaşça karıştırılarak plakanın üzeri kapatıldı. 37°C'de 1 saat inkübe edildi.
7. Kuyulardaki sıvılar atıldı ve her kuyuya 350µl yıkama solüsyonu eklenerek yıkama yapıldı sonra solüsyon kuyulardan atıldı. Bu aşama 3 kez tekrar edildi. En sonda kurutma kağıdına plakayı ters çevirmek suretiyle kalan solüsyondan tamamen kurtulmaya çalışıldı.
8. Her kuyuya 100 µl HRP-iliştirilmiş (conjugate) çalışma solüsyonu eklendi. 30 dakika 37°C'de inkübe edildi.
9. 8.aşamadaki yıkama işlemi 5 kez tekrarlandı.
10. Kuyulara 90µl substrat reagent eklendi ve 37°C'de 15 dakika inkübe edildi. Plaka ışıktan korunması amacıyla alimünyum folyoya sarıldı.
11. Kuyulara 50µl stop solüsyonu eklendi.
12. 450nm'de BMG Labtech markalı Spectrostar Nano mikropate okuyucuda örneklerin okuması yapılarak işlem tamamlandı.

3.2.11. Protein immunoblot (Western blot)

Total protein karışımı içerisinde antikor kullanarak istenilen/belirli bir proteinin tespiti sağlayan bir yöntemdir. Bu yöntemde, proteinler jel elektroforezi ile moleküler ağırlıklarına göre ayrılırlar. Ayrılan proteinler membrana aktarılır. Membran ilgili protein antikor ile inkübe edilir. Gerekli yıkama aşamaları yapıldıktan sonra membran görüntülenir. Sadece istenilen proteine ait bant görünmesi beklenmektedir ve bandın

kalınlığı görece olarak protein konsantrasyonu hakkında bilgi verir. Bu yöntemde, kantitatif olarak miktar tayini yapılamadığı için semi-kantitatif olarak tayin yapılır. Protein immunoblot aşamaları aşağıda verilmiştir.

3.2.12. Bradford assay

Bradford assay renk değişimine dayalı olarak protein konsantrasyonunu hesaplar. Commasie blue G250 boyasının 3 formu bulunur: anyonik(blue), nötr(yeşil), kaytonik(kırmızı). Asidik koşullar altında red maviye döner, protein bağlandığında. Hidrofobik ve iyonik etkileşimlerle bir arada tutulan boyanın anyonik bağlı formu, tarihsel olarak maksimum 595 nm'de tutulan bir absorpsiyon spektrumuna sahiptir. 595 nm'de absorbans artışı, bağlı boya miktarı ve dolayısıyla numunede bulunan protein miktarı (konsantrasyon) ile orantılıdır.

Protokol:

1. Öncelikle BSA standartları oluşturuldu.
2. Biorad bradford kiti kullanıldı. Burada boya solüsyonunu hazırlamak için 1 part konsantre boyaya 4 part distile su ile dilue edildi.
3. Sulandırılmış boyadan 1 ml üzerine standartlardan ve örneklerden 20 µl eklenir 5 dk inkübe edildi. Renk değişimi gözlemlendi.
4. Spektrofotometre cihazında 595 nm dalga boyunda ölçüm gerçekleştirildi.
5. Ölçülen standartların absorbans değerleriyle X-axis konsantrasyon y-axis absorbans değerleri olacak şekilde standart curve oluşturuldu.
6. Oluşturulan grafikten çıkan denklemini kullanarak konsantrasyonu bilinmeyen örneklerin konsantrasyonu hesaplandı.

Western blot protokol:

1. %70 lik etanol ile camlar temizlendi. Uzun camın üzerine küçük camı konular düzgünce kısaçallı aparata yerleştirildi.
2. Temel en son olmak üzere aşağıdaki malzemeler tablo 12'de verilen miktarlarda eklenerek karıştırıldı.

Tablo 12: Western blot işleminde kullanılan jel yüzdeleri ve içerik bilgisi

	%10 lik yürütme jel	Stacking gel
Su	4,8 ml	2,96 ml
%40akrilamid solüsyon	2,5 ml	0,5 ml
1M tris(ph:8.8)/ ph:6.8(stac)	2,5 ml	0,5 ml
%10 SDS	0,1 ml	0,04 ml
%10 APS	0,1 ml	0,04 ml
TEMED	0,004 ml	0,004 ml

3. Yürütme (Running) jeli yukarıdaki tablodaki miktarlara göre hazırlanarak döküldü. 10-15 dk donması bekledi.
4. Donduktan sonra hazırlanan stacking jel yürütme jelinin üzerine dökülerek tarak yerleştirilir. 10-15 dk donması bekledi.
5. Bu sırada örnekler hazırlandı.
6. Buz üzerinde örnekler çözülür, ependorf tüplere her bir örnekten 20 mikrolitre alarak üzerine 5X loading bufferdan 4 mikrolitre ekleyip 98 derece 5 dk inkübe edildi.
7. Örnekler ve marker hazırlanan jele yüklendi.
8. Önce iç hazneye daha sonra dış kısma 1X yürütme buffer eklenerek 50 miliAmper de 45 dk yürütüldü.
9. Blotting hazırlama aşamaları:
 - Önce whatman kâğıtları membranın boyunda kesilip hazırlandı.
 - Blotting buffer hazırlanır: 100µl 10X blot buffer+ 200µl methanol+700µl distile su
 - PVDF membran metahnl ile aktive edildi
 - Sünger, whatman kâğıdı, membranlar 1x blotting buffer içinde ıslatılır. Bu aşamada her şey ıslak olmalıdır.
10. Yürütme işlemi sonrası stacking gel kesildi ve proteinlerin bulunduğu yürütme jeli 1x blot buffer içerisine dikkatlice yerleştirildi.
11. Blot işlemi için sandviç yapısı hazırlanması: aparata sünger +whatman kağıdı +jel+membrane+whatman kağıdı+ sünger bu sıra ile konularak aparat kapatıldı. Elektroforez tankına yerleştirildi.
12. Elektroforez tankına 1X blotting buffer eklenir haznenin içine buz kalıbı konuldu. Ayrıca yürütme tankı buzun içine konularak 120 V 1,5 saat yürütülür.
13. Membran protein kısmı içe bakacak şekilde 50 ml lik falkon içine alındı. 5ml %5'lik PBS+süt tozu solüsyonu eklenerek çalkalayıcıda 1 saat bloking yapıldı.
14. Süt tozu solüsyonu dökülür yine 5 ml bu bufferdan eklendi ve içerisine aşağıdaki dilüsyon oranına uygun miktarda primer antikorlar eklendi.
 - ❖ MA5-32093(NBN)- 1:500
 - ❖ PA5-22048(RAG2)- 1:500
 - ❖ β-aktin -1:100
15. +4 derecede çalkalayıcıda overnight inkübasyona bırakıldı.

16. TPBS (1X PBS+%0,005 Tween) ile 3 defa 10 ar dakika yıkama işlemi yapıldı.
17. Sekonder antikor 1:10000 dilüsyon oranında 5ml süt tozu karşımına eklenerek 1 saat oda sıcaklığında inkübasyon yapıldı.
18. 3 defa TPBS ve 2 defa 1X PBS ile 10 ar dakika yıkama işlemi yapıldı.
19. Membran 1:1 oranında hazırlanan 2 ml substrat regeant (ECL) karanlıkta 5 dk inkübasyona bırakıldı.
20. LI-COR markalı C-Dıgıt görüntüleme cihazına yerleştirilip 12 dakika yüksek rezolüsyonda görüntü alındı.



4. BULGULAR

4.1 Hastalarda Aday Gen/Varyant Analizleri

4.1.1. Hasta #1

Tekrarlayan enfeksiyon şikayeti ile 9 yaşında İstanbul Tıp Fakültesi hastanesine başvuru yapılan çocukta yapılan testler sonucunda B lenfositlerinin olmadığı gözlenerek agammaglobulinemi tanısı almış olan hasta, Sinem Fırtına'ya ait doktora tezi (İstanbul Üniversitesi, 2017) kapsamında gerçekleştirilen PAY paneline dahil edilmiştir. Panelden çıkan sonuçlar analiz edildiğinde bu hastada *TCF3* geninde homozigot NM_003200: c.1064C>T bölgesindeki değişim tespit edilmiştir. Bu değişim 355. Treonin aminoasitinin izolösin aminoasitine dönüşümüne neden olmaktadır ve oldukça korunmuş bir domain olan TCF3-AD2 bölgesinde yer almaktadır. Bu alanda oluşan yanlış anlamlı değişimin sonucu olarak B hücrelerin gelişimi ve reseptörlerin oluşumunu engelleyecek bir transkripsiyonel aksaklık meydana gelmiş olabileceği düşünülmektedir. Böyle bir durum olması halinde, periferik kandaki B lenfositlerin sayısının azalması ya da olmaması, immünoglobulinlerin miktarında azalma ya da hiç bulunmama gibi durumların ortaya çıkması beklenir. Gen ve hastalığın kliniği ilişkili olabileceği düşünüldüğü için bu varyant aday varyant olarak kabul edilmiştir.

4.1.1.1. Tespit edilen varyantın in siliko tahmin araçları sonucu

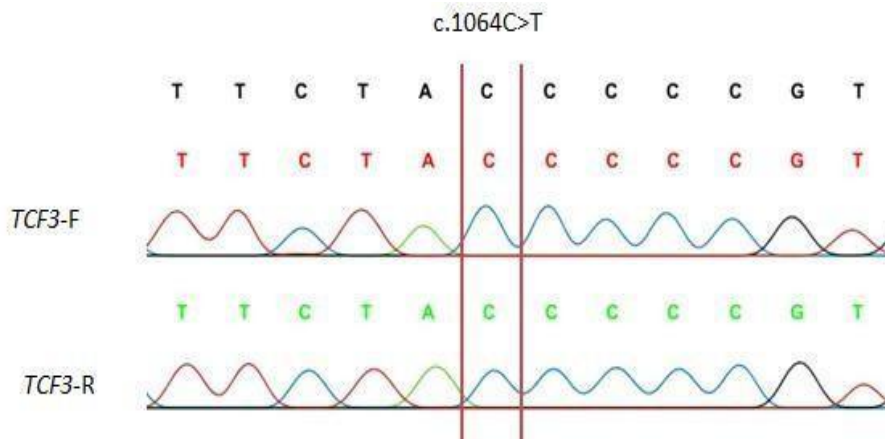
Hasta #1 tespit edilen *TCF3* genindeki heterozigot NM_003200: .1064C>T değişiminin SANGER dizileme analiz sonucu Şekil 13'de gösterilmiştir. Varyantın olası etkilerini belirlemek için yapılan in siliko analiz sonuçları Tablo 13'de verilmiştir.

Tablo 13: *TCF3* genindeki c.1064C>T değişimin in-siliko analiz sonucu

VARYANT	ÖZELLİKLERİ
Genotip	Heterozigot
cDNA	c.1064C>T
Protein	P356S
Değişim	Yanlış anlamlı
dbSNP	Yeni varyant
Mutation taster	Hastalık yapıcı
Varsome/ACMG	VUS/LP
PROVEAN	Hasar verici
SIFT	Hasar verici
Polyphen2	Muhtemel hasar verici

4.1.1.2. Sanger dizileme ile doğrulama

Hasta #1'in *TCF3* geninde tespit edilen NM_003200:c.1064C>T değişimini doğrulamak amacıyla Sanger dizileme yapılmıştır. Dizileme sonucunda varyant **doğrulanmamıştır**. Şekil 13 Sanger dizileme sonucunu göstermektedir.

**Şekil 13:** *TCF3* c.1064C>T değişimi Sanger dizileme sonucu

4.2 Hasta #2

Sinem Fırtına'ya ait doktora tezi (İstanbul Üniversitesi, 2017) kapsamında gerçekleştirilen YND analizleri sonucunda *AICDA* geninde bir varyant tespit edilmiştir.

Tekrarlayan enfeksiyon şikâyeti ile 9 yaşında Marmara Eğitim Araştırma hastanesine başvurulmuş çocukta yapılan testler sonucunda B lenfosit sayısının çok düşük olduğu gözlenerek hiper IgM tanısı konulmuştur. Hasta, PAY paneline dahil edilmiştir. Panelden çıkan sonuçlar analiz edildiğinde hastada *AICDA* genindeki homozigot c.439C>T/p.Arg147* bölgesindeki anlamsız değişime sebep olan bir varyant tespit edilmiştir. Gen ve hastalığın kliniği ilişkili olduğu için aday varyant olarak kabul edilmiştir.

4.2.1 Tespit edilen varyantın in silico tahmin araçları sonucu

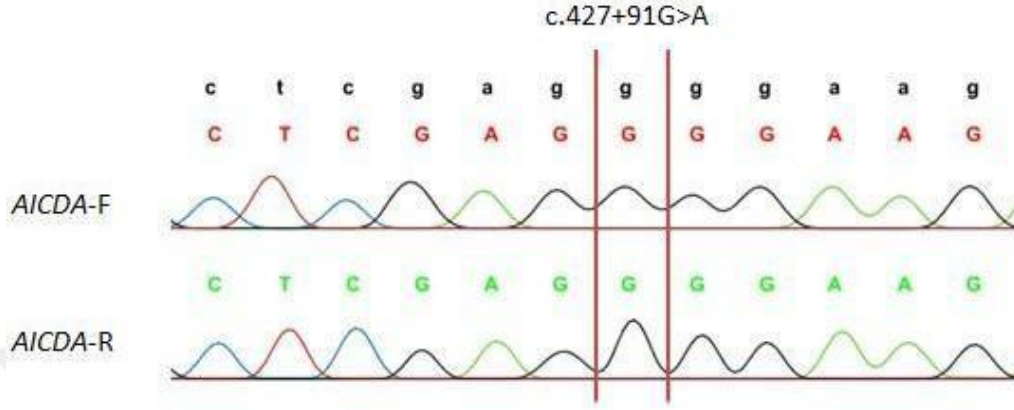
Hasta #2'de tespit edilen *AICDA* genindeki homozigot c.439C>T/p.Arg147* değişiminin SANGER dizileme analiz sonucu Şekil 14'de gösterilmiştir. Varyantın olası etkilerini belirlemek için yapılan in silico analiz sonuçları Tablo 14'de verilmiştir.

Tablo 14: *AICDA* genindeki c.427+91G>A değişiminin in-silico tahmin sonuçları

VARYANT	ÖZELLİKLERİ
Genotip	Homozigot
Cdna	c.427+91G>A
Değişim	İntronik/kırılma
DbSNP	Yeni varyant
Mutation taster	Benign
Varsome/ACMG	VUS
CADD	16.25

4.2.2 Sanger dizileme ile doğrulama

Hasta#2’de *AICDA* geninde tespit edilen NM_020661:c.427+91G>A değişimini doğrulamak amacıyla Sanger dizileme yapılmıştır. Dizileme sonucunda kırılma mutasyonuna sebep olan varyant **doğrulanmamıştır** (Şekil 14).

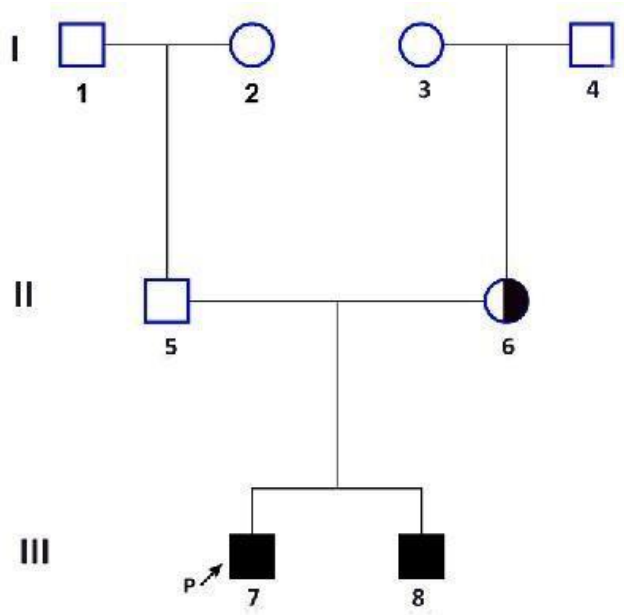


Şekil 14: *AICDA* geni c.427+91G>A değişiminin Sanger dizileme sonucu

4.3 Hasta #3

Sinem Fırtına’ya ait doktora tezi (İstanbul Üniversitesi, 2017) kapsamında gerçekleştirilen YND analizlerinde agammaglobulinemi tanısı ile izlenen hastada *TM4SF4* geninde tek nükleotid değişimi olan varyasyon tespit edilmiştir.

Beş yaşında İstanbul Tıp fakültesi hastanesine başvuru alan çocukta yapılan testler sonucunda CD19 hücresinin %1 oranında olduğu ve B lenfositlerinin olmadığı tespit edilen hasta bireye agammaglobulinemi tanısı konulmuştur. Hastada alerjik rinit ve astım gözlenmiştir. İndeks olgunun klinik bulgularında alerjik rinit ve astım vardır, immün yetersizlik bulgularına ek olarak zihinsel gelişim geriliği, epilepsi, hipoksik iskemik ansefali gibi bulgulara mevcuttur. Aynı zamanda rutin kontroller sırasında hastanın 3 yaşındaki erkek kardeşinde de CD19 hücresinin %1 ve B lenfositlerinin olmadığı tespit edilmiş ve kardeşe de agammaglobulinemi tanısı konulmuştur. Kardeşin klinik bulgularında zatürre, gelişim geriliği, görme ve duyma bozukluğu mevcuttur. Hasta ekzom dizileme çalışması dahil edilmiştir. Ekzom analizleri sonucunda *TM4SF4* geninde homozigot NM_004617.4: c.439C>T/p.Arg147* durdurma kodonu oluşumuna sebep olan varyant tespit edilmiştir. Klinik bulgular ve gen fonksiyonu değerlendirildiğinde *TM4SF4* geni aday gen olarak çalışmaya dahil edilmiştir.



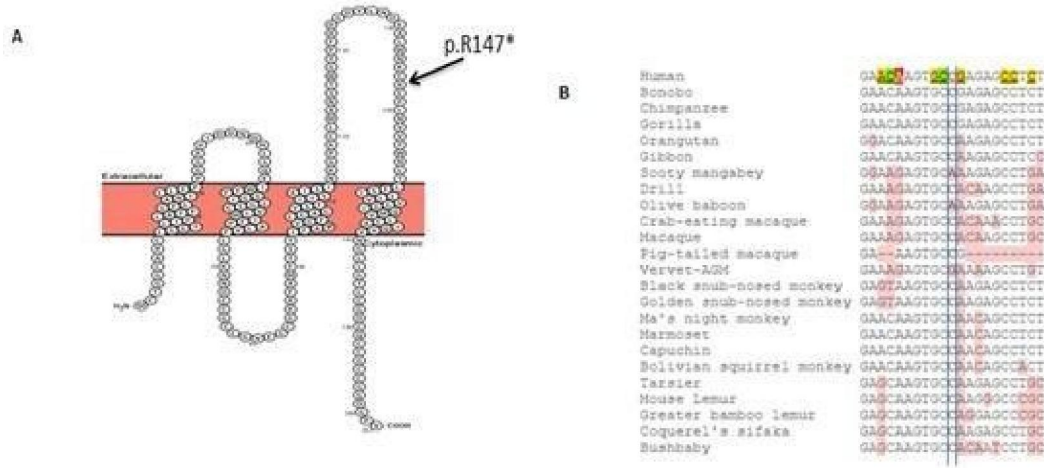
Şekil 15: Hasta #3'e ait aile ağacı

4.3.1. Tespit edilen varyantın in siliko tahmin araçları sonucu

Hasta #3'de tespit edilen *TM4SF4* genindeki *TM4SF4* geninde homozigot c.439C>T/p.Arg147* değişiminin protein domainleri üzerinde gösterimi ve evrimsel korunmuşluğu Şekil 16'da gösterilmiştir. Varyantın olası etkilerini belirlemek için yapılan in siliko analiz sonuçları Tablo 15'de verilmiştir.

Tablo 15: *TM4SF4* genindeki c.439C>T değişimin in-silico tahmin araçları sonucu

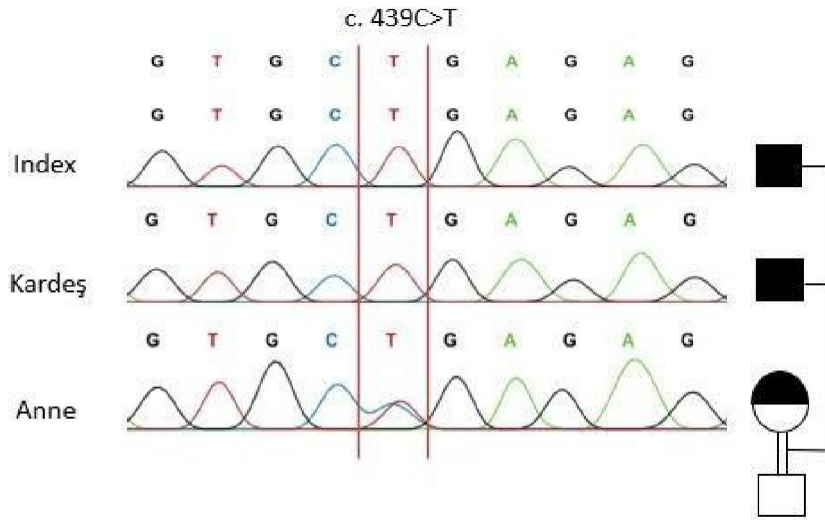
Varyant	Özellikleri
Genotip	Homozigot
Cdna	c.439C>T
Protein	p.Arg147*
Değişim	Durdurma kodonu oluşumu
dbSNP	rs374686102
Mutation taster	Hastalık yapıcı
Varsome/ACMG	VUS/B
Provean	Hasar verici
CADD	26.4



Şekil 16: *TM4SF4* genindeki c.439C>T varyantının A) protein domainleri üzerindeki gösterimi B) değişim olan nükleotidin evrimsel korunmuşluğunun gösterimi

4.3.2 Sanger dizileme ile doğrulama ve ailesel segregasyon

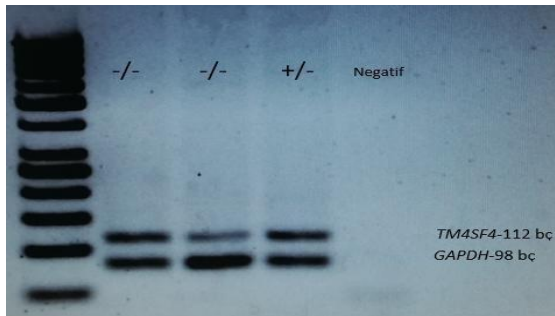
Hasta #3'de *TM4SF4* geninde homozigot c.439C>T/p.Arg147 değişimi tespit edilmiştir. Varyantı doğrulamak amacıyla PZR işlemi yapılan indeks olgu ve ebeveynleri Sanger dizileme yapılmıştır ve dizileme sonucu CLC workbench ile analiz edilmiştir. Analiz sonuçlarında homozigot varyant indeks olguda **doğrulanmıştır** ve hasta kardeşte homozigot ve annede heterozigot olarak ailevi segregasyonu gösterilmiştir. Şekil 17'de ailevi segregasyon sonucu gösterilmektedir.



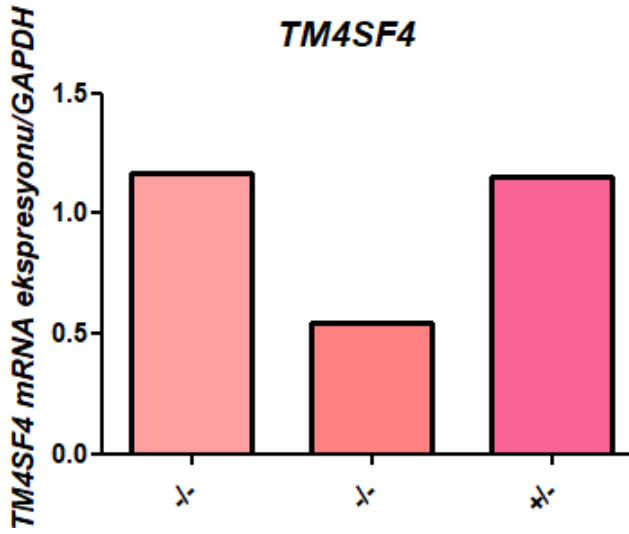
Şekil 17: *TM4SF4* varyantının ailevi segregasyonu

4.3.3. *TM4SF4* gen anlatımı

İndeks olgu (homozigot), etkilenmiş kardeş (homozigot) ve annede (heterozgot) *TM4SF4* mRNA'sına özgü primerleri kullanılarak RT-PCR ile gen anlatımına bakılmıştır. Referans gen olarak *GAPDH* geni kullanılmıştır. Gen anlatım sonucu şekil 18'de verilmiştir. Şekil 19'da deney sonucunun imagej programı kullanılarak yapılan semi-kantitatif analiz sonucu gösterilmektedir.



Şekil 18: *TM4SF4* gen anlatımı (50 bp marker, +/-: Het, -/-:Hom)

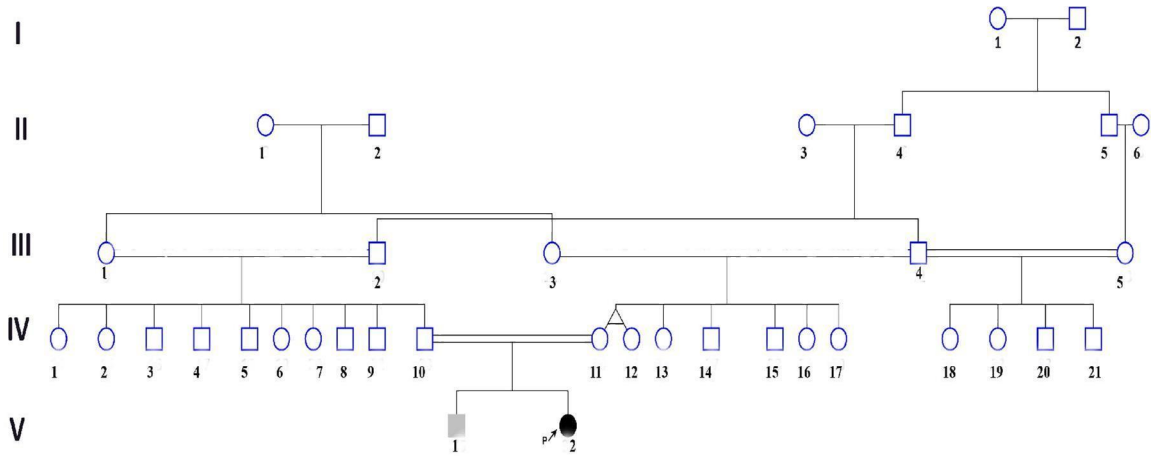


Şekil 19: *TM4SF4* İmageJ analiz grafiği (p:0.3679)

4.4 Hasta #4

Khusan Khodzahev'e ait doktora tezi (devam eden, İstanbul Üniversitesi, 2022) kapsamında yaptığı ekzom analizleri kapsamında, T-B-NK+ immünofenotipe sahip hastada *RAG2* geninde tek nükleotid değişimi tespit edilmiştir. *RAG2* proteininde oluşan aminosit değişimi (35.pozisyon) N terminal bölgede bulunan çekirdek alanında oluşmuştur. Bu alan proteinin VDJ rekombinasyonundaki asıl görevi olan DNA kırığının oluşturmaktır. Bu bölgede oluşan değişikliğin *RAG2* proteinin fonksiyonunu tamamen engelleyebileceği ya da azalmaya sebep olabileceği düşünülmektedir. Tahmin araçları ile yapılan analizlere göre varyantın etkisinin klinik bulgularla doğru orantılı olmasından dolayı bu varyant aday olarak seçilmiştir.

Altı aylıkken sık enfeksiyon, bronşit, alerji, ciltte kızarıklık, kaşıntı, pnömoni semptomları ile kliniğe başvuran hastada 1.5 yaşında iken otoimmün hemolitik anemi tanısı almıştır. Daha sonraki muayeneleri sırasında diffuse large B cell lenfoma (DLBCL) tanısı almıştır. Ekzom analizleri sonucunda *RAG2* geninde homozigot NM_000536: ekzon 2: c.104G>C: p.G35A yanlış anlamlı bir varyasyon tespit edilmiştir. Klinik bulgular ve gen korelasyonu yapıldığında bu gen aday gen olarak değerlendirilmeye alınmıştır. İlave olarak *NBN* geninde NM_002485.5: c.1691A>G:p.Glu564Gly yanlış anlamlı heterozigot varyasyon saptanmıştır.



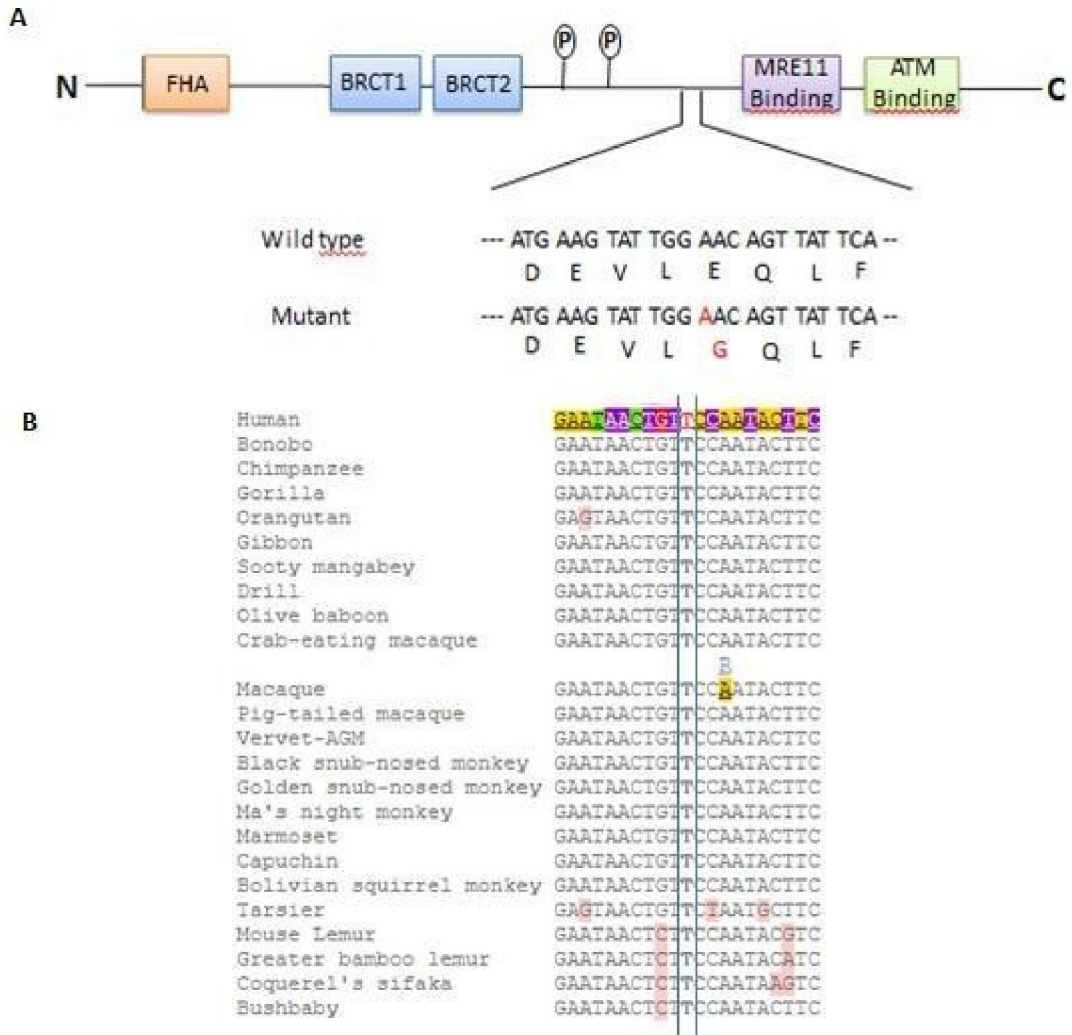
Şekil 20: Hasta #4'e ait aile ağacı

4.4.1. Tespit edilen varyantın in siliko tahmin araçları sonucu

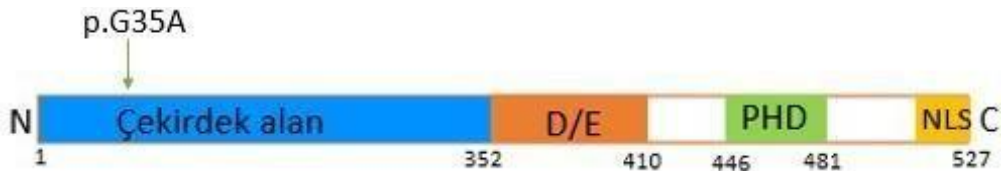
Khusan Khodzahev'in doktora tezi kapsamında immünyetersizlik ve lenfoma ile birlikte seyreden indeks olgu #4 için tüm ekzom dizilemesi yapılmıştır. Enformatik analizler sonucunda *RAG2* geninin 2. ekzonunda homozigot c.104G>C:p.G35A(NM_000536) varyasyonu saptanmıştır. İlave olarak lenfoma gelişimi ile ilişkili olduğu düşünülen *NBN* geninde heterozigot c.1691A>G:p.Glu564Gly (NM_002485.5) ve protein domainleri üzerinde gösterimi ve evrimsel korunmuşluğu şekil 21'de gösterilmiştir. Varyantın olası etkilerini belirlemek için yapılan in siliko analiz sonuçları tablo 16'da verilmiştir. Şekil 22'de *RAG2*'de bulunan varyantın protein yapısı üzerindeki gösterimi verilmiştir.

Tablo 16: *RAG2* ve *NBN* genlerinde tespit edilen varyasyonların *in siliko* analizleri

	NBN	RAG2
Genotip	Heterozigot	Homozigot
cDNA	c.1691A>G	c.104G>C
Protein	E564G	p.G35A
Değişim	Yanlış anlamlı	Yanlış anlamlı
dbSNP	rs1554558323	rs148508754
Mutation taster	Polimorfizm	Hastalık yapıcı
Varsome/ACMG	VUS	VUS/LP
SIFT	Hasar verici	Hasar verici
Polyphen2	Muhtemel Hasar verici etki	Muhtemel Hasar verici etki
Provean	Hasar verici	Hasar verici
REVEL	Likely benign	Hasar verici
METALR	Tolerated	Patojenik



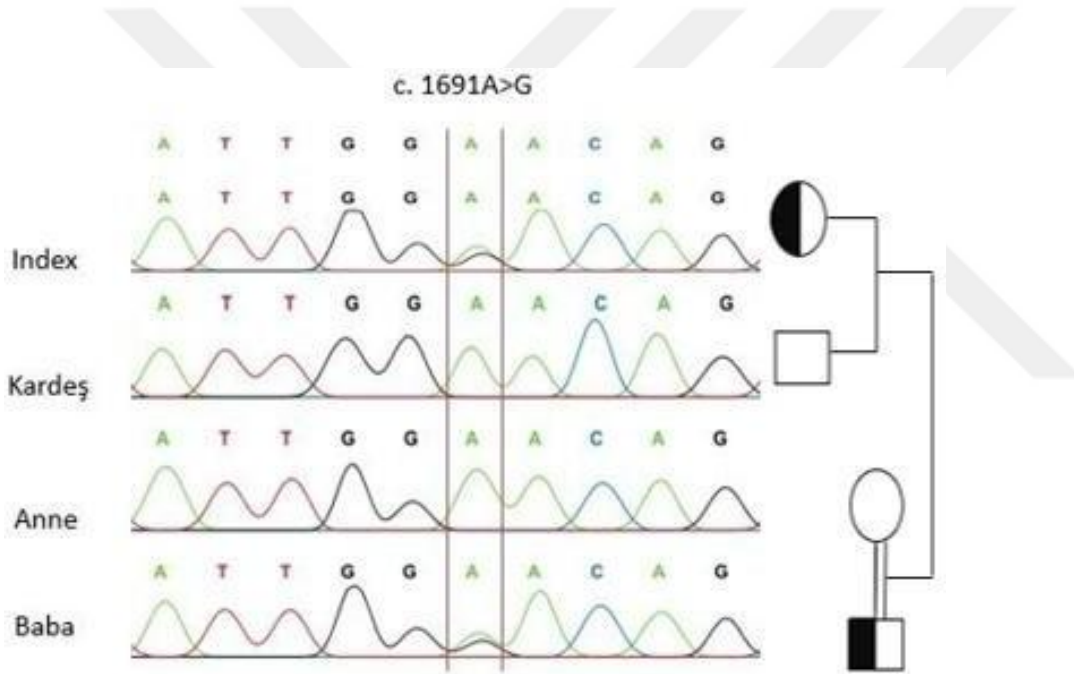
Şekil 21: *NBN* genindeki NM_002485.5:c.1691A>G :p.Glu564Gly varyantının a) protein domainleri üzerindeki gösterimi b) değişen nükleotidin evrimsel korunmuşluğunun gösterimi



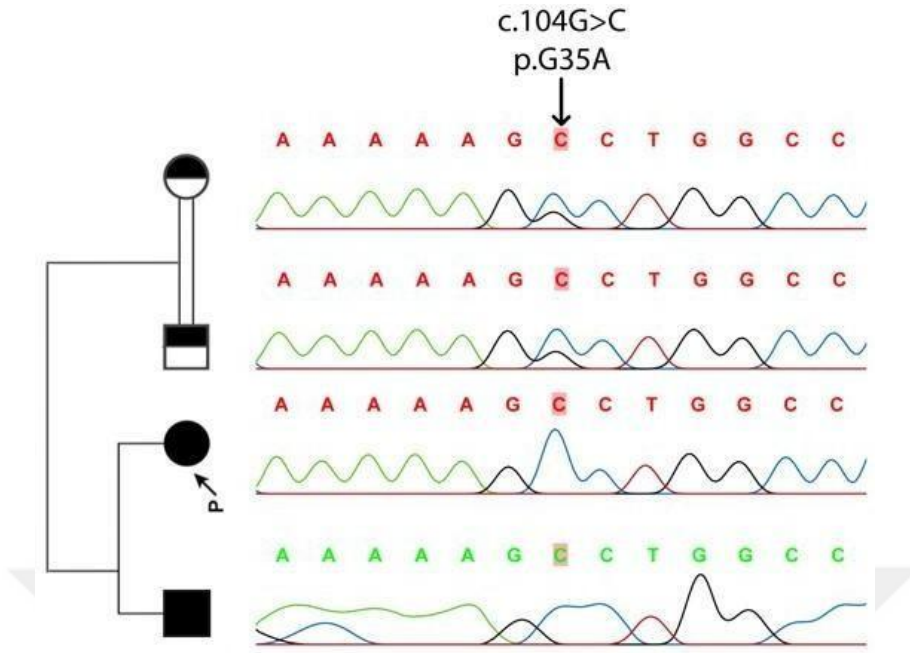
Şekil 22: RAG2 proteini üzerinde varyasyonun yerleşimi

4.4.2 Sanger dizileme ile doğrulama ve ailesel segregasyon

Hasta #4’de ekzom analizleri sonucunda *NBN* genindeki NM_002485.5:c.1691A>G :p.Glu564Gly değişimi ve *RAG2* geninde c.104G>C:p.G35A(NM_000536) değişimi tespit edilmiştir. Varyantı doğrulamak amacıyla PZR işlemi yapılan indeks olgu ve ebeveynleri Sanger dizileme yapılmıştır ve dizileme sonucu CLC workbench ile analiz edilmiştir. Analiz sonuçlarındaki *NBN* genindeki aday varyant indeks olguda heterozigot olarak **doğrulanmıştır** ve babada heterozigot ve kardeş ve annede yabani tip olarak ailevi segregasyonu gösterilmiştir. şekil 23’de *NBN* ailevi segregasyonu göstermektedir. *RAG2* genindeki aday varyant homozigot olarak indeks olguda **doğrulanmıştır** ve kardeşte homozigot ve ebeveynlerde heterozigot olarak ailevi segregasyonu gösterilmiştir. şekil 24 *RAG2* ailevi segregasyonu göstermektedir.



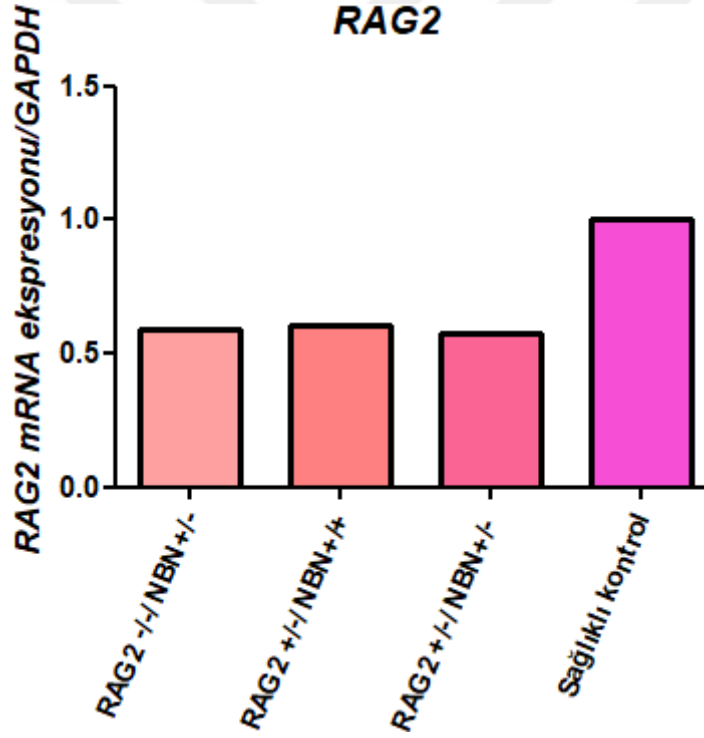
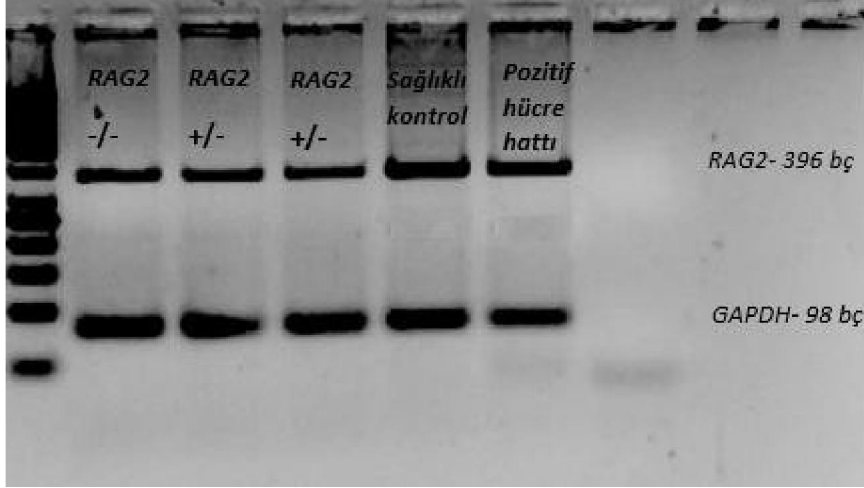
şekil 23: *NBN* varyantı ailevi segregasyonu



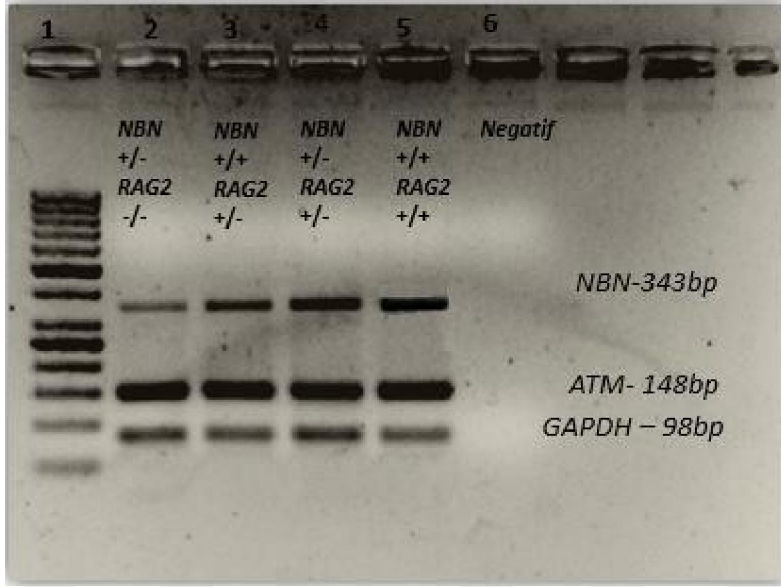
Şekil 24: *RAG2* varyantının ailevi segregasyonu

4.4.3 *RAG2* gen anlatımı

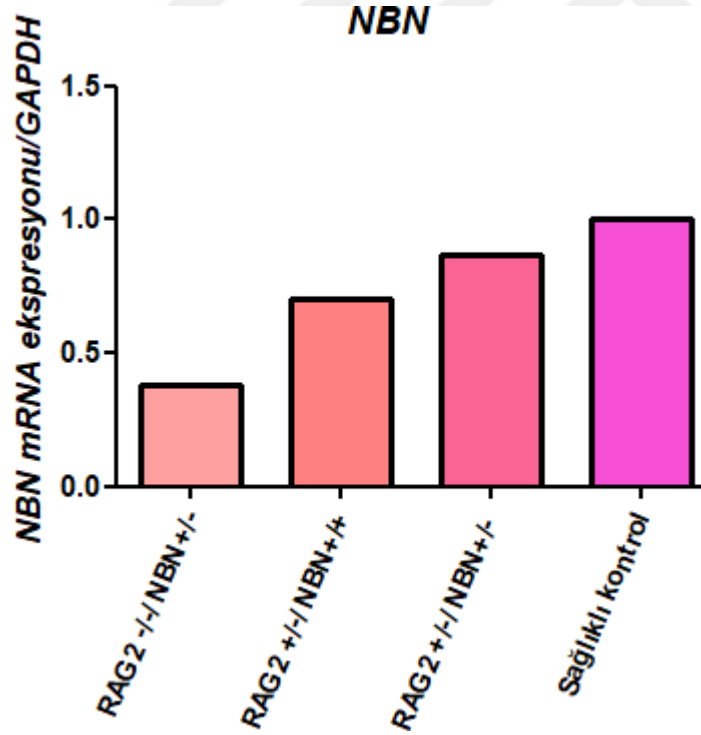
İndeks olgu, etkilenmiş kardeş (homozigot) ve ebeveynlerde (heterozigot) *RAG2*, *NBN* ve *TP53* gen anlatımlarına bakılmıştır. Referans gen olarak *GAPDH* kullanılmıştır. *RAG2* gen anlatımı şekil 25 'te verilmiştir ve şekil 26'da deneyin imagej programı ile yapılan semi-kantitatif analiz sonucu verilmiştir. *NBN* ve *ATM* gen anlatımları Şekil 27 'da ve bu deneyin imagej programı ile yapılan semi-kantitatif analiz sonucu ise şekil 28'de gösterilmiştir. Şekil 29'da gerçek zamanlı PZR yöntemiyle β -*Aktin* referans geni kullanılarak yapılan *TP53* gen ekspresyon deney sonucu verilmiştir.



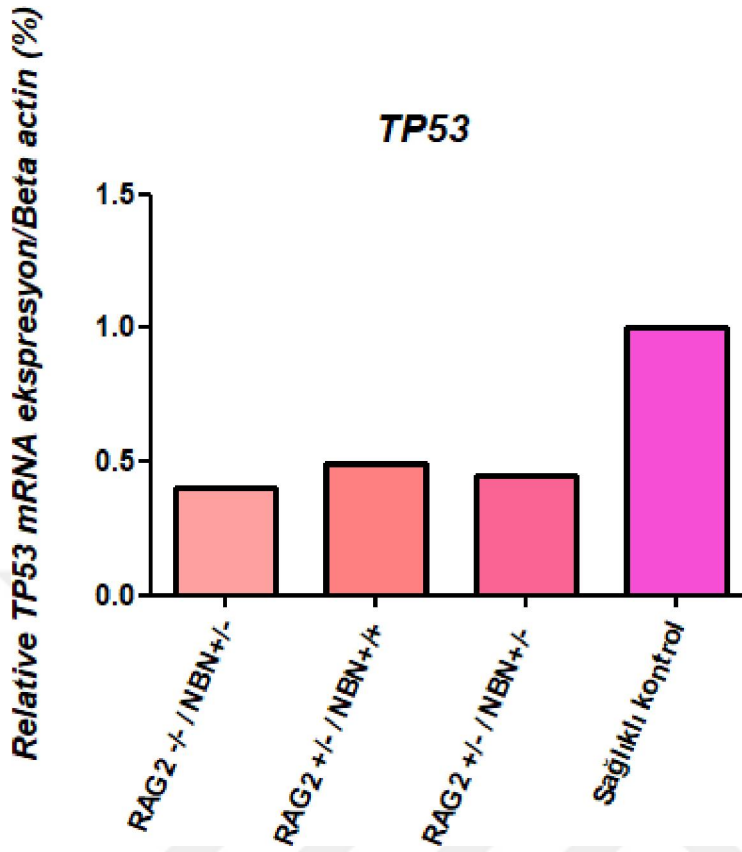
Şekil 26: RAG2 ImageJ analiz grafiği



Şekil 27: *NBN* ve *ATM* gen ekspresyon sonucu (50 bç marker, +/+ : yabani tip, +/-: Het, -/-:Hom)



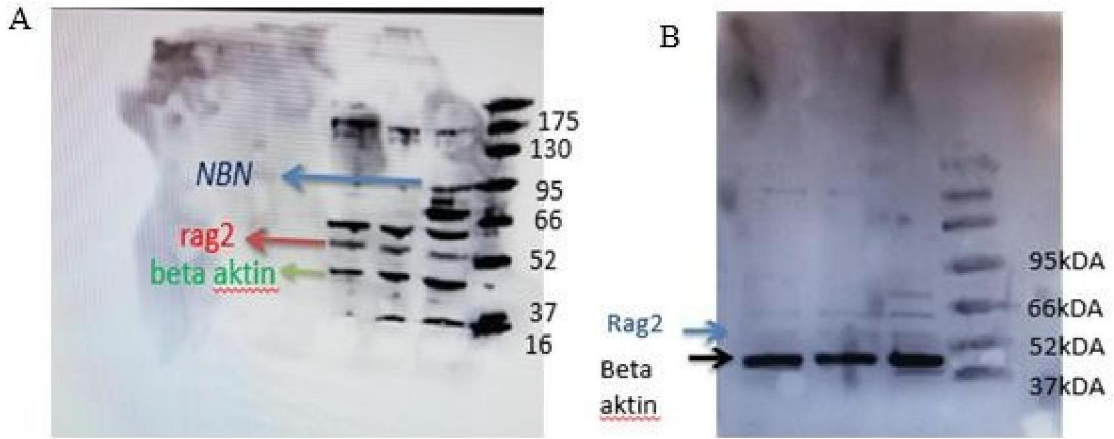
Şekil 28: *NBN* İmageJ analiz grafiği (p:0.3916)



Şekil 29: TP53 gen ekspresyon sonucu (+/+ :yabani tip, +/-: Het, -/-:Hom, p: 0.6916)

4.4.4. Western blot yöntemi ile protein anlatımı analizi

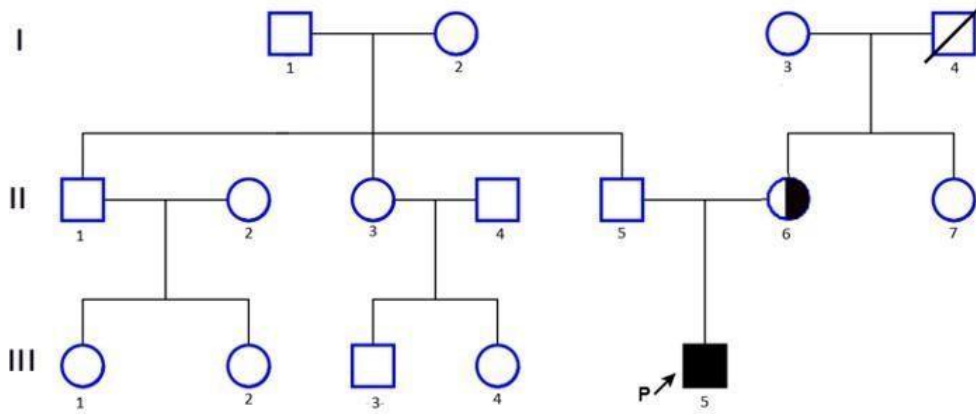
NBN ve *RAG2* gen varyantı açısından farklı genotipte olan hasta ve aile bireylerindeki bu genlerin protein ürünlerinin ekspresyonu açısından incelemek amacıyla western blot yöntemi kullanılmıştır. Antikor ve yüklenmesi gereken örnek konsantrasyonlarını belirlemek amacıyla bu proteinlerin ekspresyonu olduğu bilinen Jurkat, Molt4 ve Nalm6 hücre hatları ile optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Hücre hatlarında yapılan deneme farklı protein konsantrasyonlarında optimizasyon çalışmaları şekil 30'da gösterilmektedir. Hasta örneklerinin konsantrasyonu az olduğu için hücre modellerinde çalışmaların devam etmesine karar verilmiştir.



Şekil 30: A) jeldeki sağdan sola örnekler: marker, jurkat(80µg), molt4(80µg), nalm6(80µg) B) jeldeki örnekler: marker, jurkat(15µg), molt4(15µg), nalm6(15µg)

4.5 Hasta #5

Bir buçuk yaşında otoimmün hemolitik anemi tanısı alan hastaya yapılan ekzom analizleri sonucunda *MASP2* geninde yanlış anlamalı değişime sebep olan varyant tespit edilmiştir. Gen ve klinik birlikte değerlendirildiğinde *MASP2* geni aday gen olarak kabul edilmiştir. Hastaya ait aile ağacı şekil 31’de gösterilmektedir.



Şekil 31: Hasta#5’e ait aile ağacı

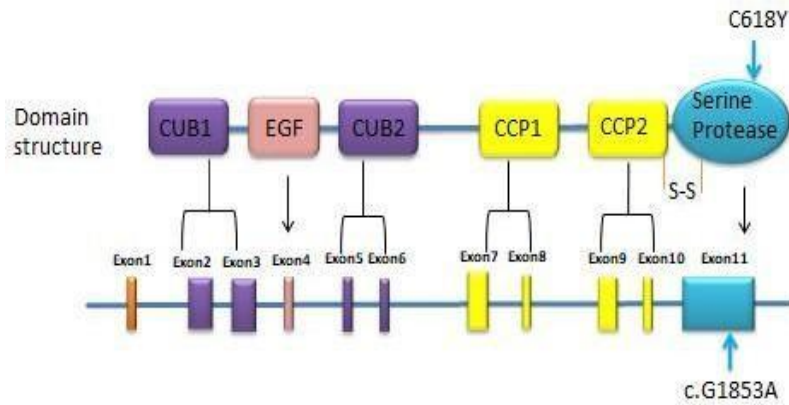
4.5.1. Tespit edilen varyantın in siliko tahmin araçları sonucu

Hasta#5’de tespit edilen *MASP2* geninde tespit edilen NM_006610:c.1853G>A:p.C618Y değişiminin protein domainleri üzerinde gösterimi ve evrimsel korunmuşluğu şekil 32’de gösterilmiştir. Varyantın olası etkilerini belirlemek için yapılan *in siliko* analiz sonuçları Tablo 17’de verilmiştir.

Tablo 17: *MASP2* geninde tespit edilen p.C618Y değişiminin *in siliko* analiz sonucu

Varyant	Özellikleri
Genotip	Heterozigot
cDNA	c.1853G>A
Protein	p.C618Y
Değişim	Yanlış anlamlı
Kalıtım	OD/OR
dbSNP	rs764932450
Mutation taster	Hastalık yapıcı
Varsome/ACMG	VUS/LP
SIFT	Hasar verici
Polyphen2	Muhtemel hasar verici etki
CADD	26.1
Provean	Hasar verici
REVEL	Likely benign
METALR	Hasar verici
Mutation Assessor	Yüksek

A



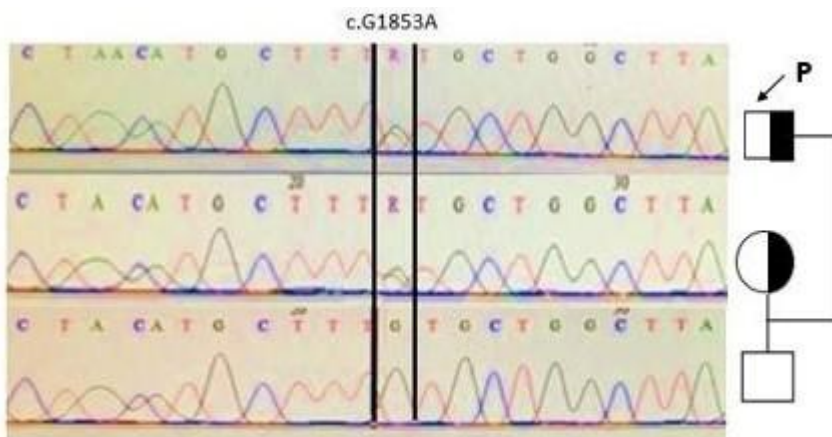
B

Homosapiens	ATCCAAGGGGAAGT-----GTAACGCTAACATGCTTTGCTGGCTTA
Pan troglodytes	ATCCAAGGGGAAGT-----GTAACGCTAACATGCTTTGCTGGCTTA
Macaca mulatta	ATTCAGGGGAAGT-----GTAACGCTAACATGCTTTGCTGGCTTA
Bos taurus	ACAGAAGAGAACAC-----ACACCATACAGCATTCACAGCAGTTGACAA
Felis catus	-----
Equus caballus (horse)	-----
Rattus norvegicus	-----
Mus musculus	-----
Gallus gallus	ACAACGGCAACCCTCTGGTGATAACAGAAAACATGCTGTGCTGGAGCT
Trachemys scripta elegans	GACCAAGAAAGTCTG-AAAACGCTATAAACTTTCAGGAATTTCTTTGA
Danio rerio	CTAGTAAAGGGAACTAGTGGTGACGGAGAAATATGATTTGCTGGGTTT
Xenopus tropicalis	GTTCTTGAAAAATGTGTGAGGCAACCTTAAAAATGTATTCCTCAAAGATA

Şekil 32: *MASP2* genindeki c.1853G>A varyantının A) protein domainleri üzerindeki gösterimi B) değişim olan nükleotidin evrimsel korunmuşluğunun gösterimi

4.5.2. Sanger dizileme ile doğrulama ve ailesel segregasyon

Hasta #5’de ekzom analizleri sonucunda *MASP2* genindeki c.1853G>A: p.C618Y değişimi tespit edilmiştir. Varyantı doğrulamak amacıyla PZR işlemi yapılan indeks olgu ve ebeveynleri Sanger dizileme yapılmıştır ve dizileme sonucu CLC workbench ile analiz edilmiştir. Analiz sonuçlarında aday varyant indeks olgu da heterozigot olarak **doğrulanmıştır** ve anne de heterozigot babada ise yabani tip olarak ailevi segregasyonu gösterilmiştir. Şekil 33 ailevi segregasyonu göstermektedir.

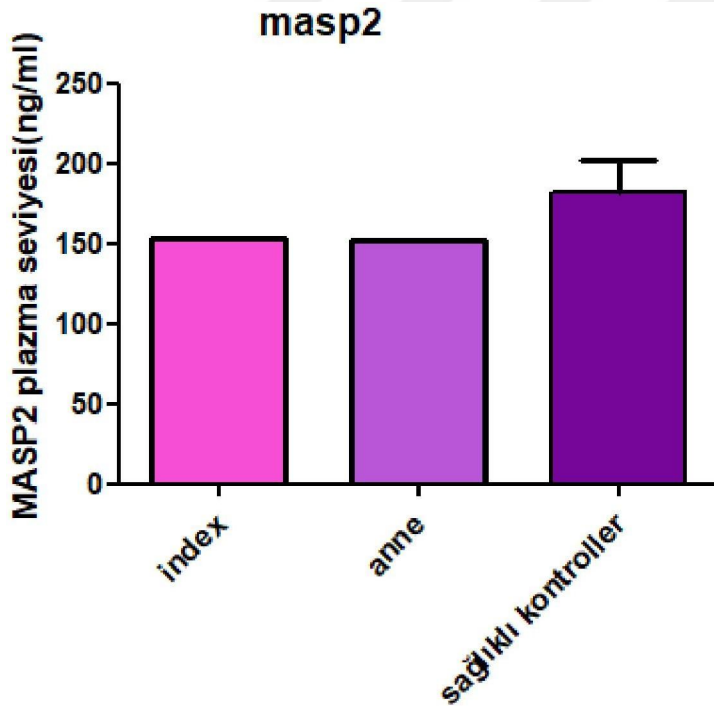


Şekil 33: *MASP2* varyantının ailesel segregasyonu

4.5.3. MASP2 protein analizi

Serum MASP2 protein miktarını belirlemek amacıyla hasta birey, annesi ve 6 adet sağlıklı örnekten alınan serum örnekleri ile ELİSA testi yapılmıştır. Elisa okuma sonuçları Dört Parametre Lojistik (4PL) analizi yapılarak konsantrasyonlar belirlenmiştir. Simetrik sigmoidal kalibratörlerden konsantrasyonları hesaplamak için uygun bir 4PL eğrisi kullanılarak numunelerin kantitatif analizinin yapıldığı bir yöntemdir.

Standart örneklerin absorbans değerlerini kullanarak bir 4PL eğrisi oluşturulur. Örneklerin konsantrasyonu yapılan dilüsyon oranları ile birlikte bu eğriye göre hesaplanır. %CV, Standart Sapma/Hata, her numune için hesaplanır. Bu hesaplama göre yapılan örneklerin konsantrasyon grafiği şekil 34'te verilmiştir. Sonuçlar one-way Anova ile analiz edilmiş ve p değeri 0,1454 olarak bulunmuştur.



Şekil 34: MASP2 protein konsantrasyonu

4.6. Hasta #6

Sinem Fırtına'ya ait doktora tezi (İstanbul Üniversitesi, 2017) kapsamında gerçekleştirilen ekzom analizleri kapsamında incelenen hastada *ATM* geninde varyant tespit edilmiştir.

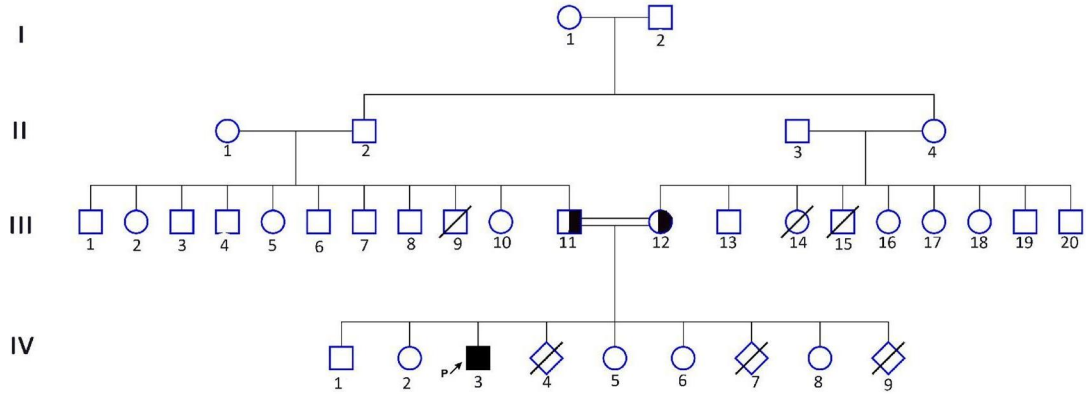
Bir yaşında iken ateş, kilo kaybı, otit ve hepatomegali klinik bulguları olan erkek hasta yapılan testler sonucunda T-B-NK+ immün fenotipli ağır kombine immün yetersizlik tanısı almıştır. Hasta ekzom dizileme analizi ile değerlendirilmiştir. Analiz sonucunda *ATM* geninde durdurma kodonuna sebep olan bir varyant tespit edilmiştir. *ATM* geni ve hastanın kliniği birlikte değerlendirildiğinde bu gen aday gen olarak kabul edilmiştir.

4.6.1. Tespit edilen varyantın in siliko tahmin araçları sonucu

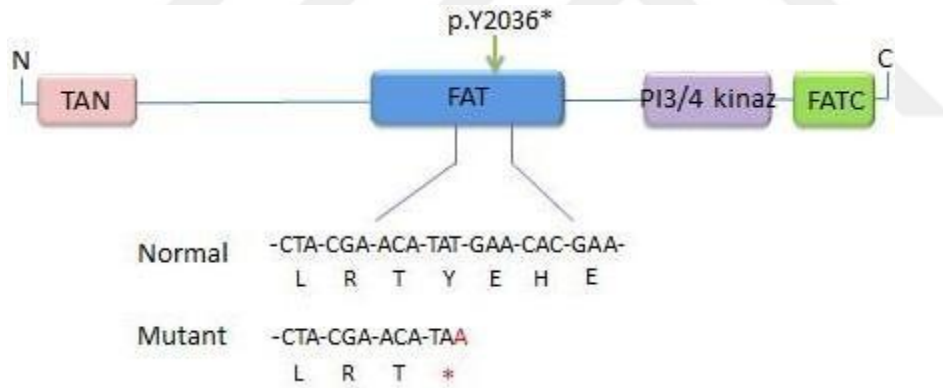
ATM geninin 42. ekzonunda anlamsız değişime sebep olan NM_000051: c.6108T>A varyantı (p.Y2036*) tespit edilmiştir. Hasta #6'ya ait aile ağacı şekil 35'de gösterilmiştir. Değişiminin protein domainleri üzerinde gösterimi şekil 36'de verilmiştir. Varyantın olası etkilerini belirlemek için yapılan *in siliko* analiz sonuçları Tablo 18'da verilmiştir.

Tablo 18: *ATM* geninde tespit edilen p.Y2036* değişiminin *in siliko* analiz sonucu

VARYANT	ÖZELLİKLERİ
Genotip	Homozigot
cDNA	c.6108T>A
Protein	p.Y2036*
Değişim	Anlamsız/NMD
dbSNP	rs3092826
Mutation taster	Hastalık yapıcı
Varsome/ACMG	Patojenik
Clinvar	Patojenik
CADD	35



Şekil 35: Hasta #6'ya ait aile ağacı

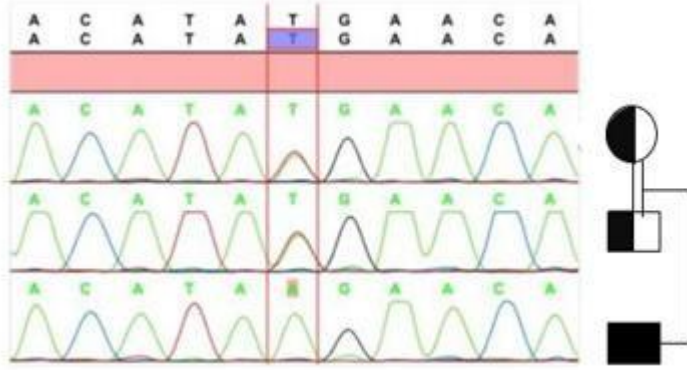


Şekil 36: *ATM* geninde bulunan p.Y2036* varyantının değişime uğrayan aminoasidin domainleri üzerinde gösterimi

4.6.2. Sanger dizileme ile doğrulama ve ailesel segregasyon

ATM geninin 42. ekzonunda anlamsız değişime sebep olan NM_000051: c.6108T>A varyantı (p.Y2036*) tespit edilmiştir. İndeks olguda homozigot olarak **doğrulanmıştır**

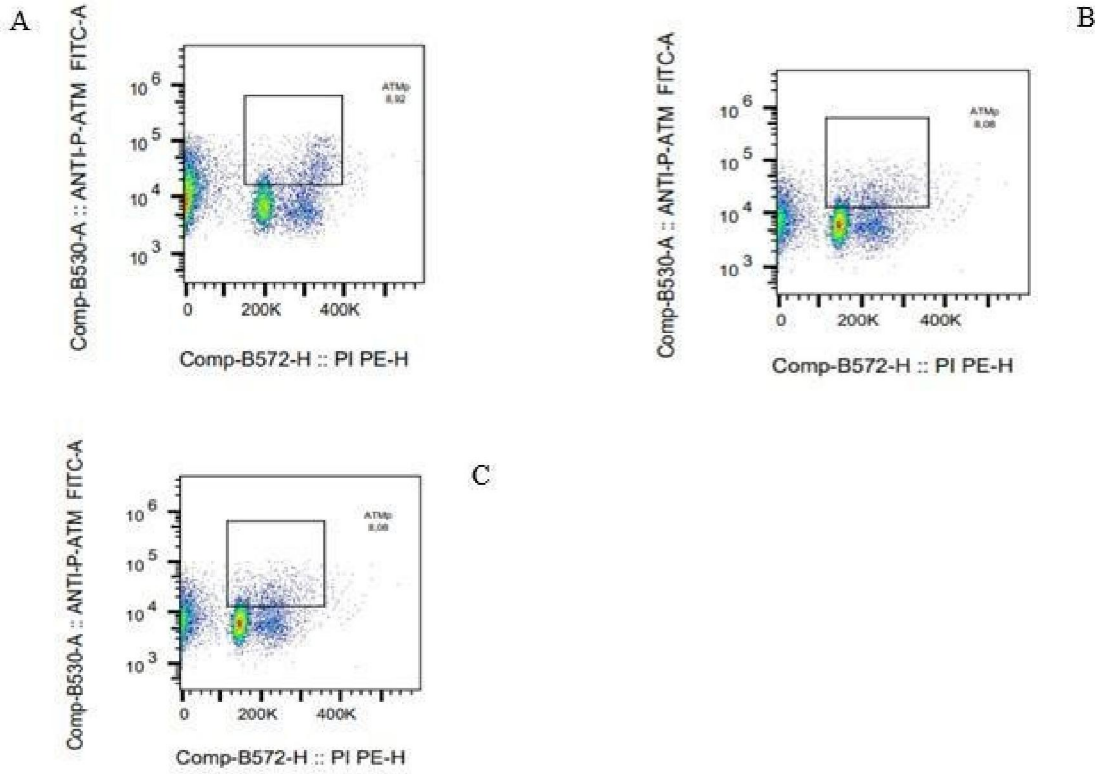
ve ebeveynlerde heterozigot olarak ailevi segregasyonu göstermiştir. Şekil 37 ailesel segregasyonu göstermektedir.



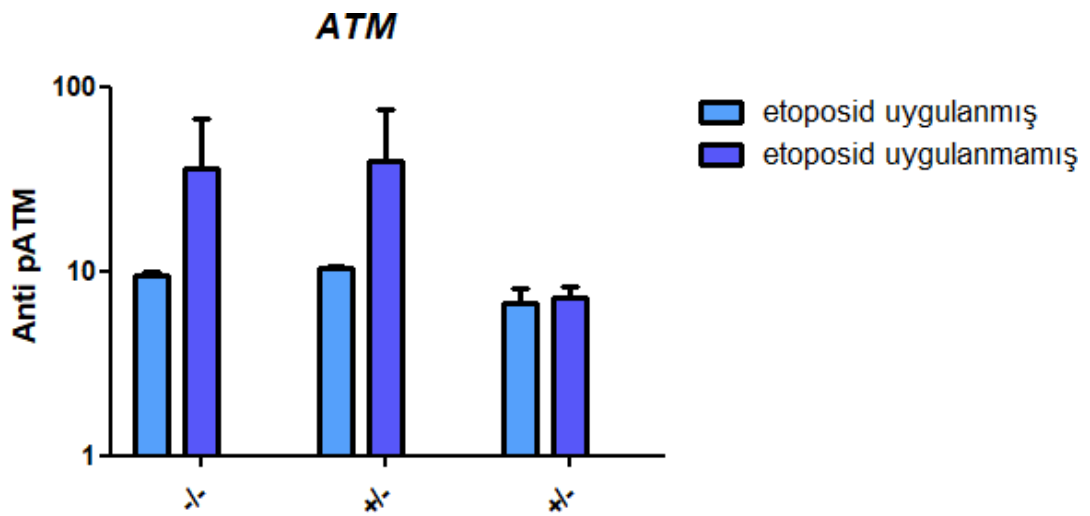
Şekil 37: *ATM* varyantının ailesel segregasyonu

4.6.3. Akan hücre ölçer ile *ATM* fonksiyon analizi

DNA hasar onarımında görevli olan *ATM* genindeki varyasyonun genin fonksiyonuna olan etkisini analiz etmek amacıyla Millipore's FlowCollect *ATM* DNA Hasarı ve Hücre Döngüsü Analiz Kit protokolü uygulanarak işlem sonucu ölçüm akan hücre ölçer cihazında yapılmıştır. Kit prosedürü uygulanmadan önce hücrelere topoizomerez II inhibitörü olan etoposid maddesi uygulanmıştır. Deney sonuçlarının analizi için FlowJo analiz programı kullanılmıştır. Analiz sonuçları aşağıdaki şekil 38'de ve şekil 39'da gösterilmiştir. Sonuçların two-way Anova analizi sonucunda p değeri 0.7269 olarak bulunmuştur.



Şekil 38: A) varyantı homozigot olarak taşıyan B, C) varyantı heterozigot olarak taşıyan ebeveynlerin akan hücre ölçer cihazı ile yapılan ölçümlerin analiz sonuçları



Şekil 39: *ATM* varyantının akım sitometrisi sonuç grafiği örnekler -/-: homozigot (index), +/-: heterozigot (anne), +/-: heterozigot (baba)

5. TARTIŞMA

Primer immün yetersizlik (PİY) immün sistem elemanlarının oluşumu veya gelişiminde görevli genlerden herhangi biri ya da birden fazlasında meydana gelen varyasyonlardan kaynaklanan hasarlar sonucunda gelişir. Bu patojenik varyasyonlar genin işlev kaybı, fonksiyon kazanması ya da yetersiz gen ürünü üretimi gibi hasarlara neden olur. Nadir hastalıklar içinde yer alan PİY'ler 344'ten fazla alt grubu olan heterojen bir hastalık grubudur [5, 6]. Klinik ve genetik heterojeniteden dolayı hastaların tanı alma süreci uzamaktadır. Yeni nesil dizileme tekniklerin gelişmesiyle sorumlu genetik varyasyonlar hızla ortaya çıkarılmaya başlanmıştır. Bu tez çalışmasının amacı, ekzom ve panel analizleri sonucunda saptanan yeni aday varyant ve/veya genlerin validasyonu yapmaktır. Bu kapsamında 6 aileden indeks olgular ile birlikte ebeveynler ve etkilenmiş kardeşlerde bilinen genlerdeki yeni varyasyonların ve yeni aday genlerdeki varyasyonların Sanger dizi analizi ile doğrulanması, ailesel segregasyonşarı, in siliko tahmin araçları ile patojenite tahmininin yapılması ve hastalıkla fonsiyonel ilişkinin ortaya koyulması amaçlanmıştır. Bu bölümde, ailelerde saptanan aday gen/varyasyonlar ayrı ayrı tartışılacaktır.

Aile 1

Immunfenotip sonuçlarına göre B lenfosit bulunmayan ve agammaglobulinemi ön tanısı alan Hasta #1'in dahil edildiği YND panel analizleri sonucunda *TCF3* (*E2A*) geninde c.1064C>T/ p.(T355I) değişimi tespit edilmiştir [69]. *TCF3* geni B hücre gelişimi için çok önemli ve gerekli bir transkripsiyon faktörüdür. Bu gen ürününün eksikliğinde kemik iliğinde dahi B hücre öncüllerinin bulunmadığı bildirilmiştir [70, 71]. Ayrıca, agammaglobulinemi tanısı almış hastalarda yapılan çalışmalarda *TCF3* geninde varyantlar tespit edilmiştir ve otozomal dominant olarak kalıtılan agammaglobulinemi ile genin ilişkisinden net olarak bahsetmek mümkündür [72]. Bu bilgilere dayanarak *TCF3* geni indeks olgu için aday gen olarak seçilmiştir. Yeni nesil dizileme yönteminde kısa parçaların okunması yapılarak bunların genoma doğru bir şekilde hizalanması gerekir ve yüksek guanin-sitozin içeren bölgelerde hatalı hizalama ve cihazın yanlış okuması gibi durumlar gözlenmektedir [73]. YND'nin ürettiği ham verinin yaklaşık %1,3'ünün yalancı negatiflikler olduğu bilinmektedir [74]. Bu sebeple bu yöntemle bulunan bir varyantın daha geleneksel ve güvenilir olan Sanger dizileme

yöntemi ile de doğrulanması gerekmektedir. Varyantı doğrulamak amacıyla indeks olguya Sanger dizileme analizi yapılmıştı ve *TCF3* geninde tespit edilen c.1064C>T değişimi doğrulanmamıştır.

Aile 2

Immunfenotip bulguları sonucunda B lenfosit sayısının düşük olduğu tespit edilen ve hiper-IgM (HIGM) sendromu ön tanısı alan hasta #2'in dahil edildiği YND panel analizleri sonucunda *AICDA* geninde c.427+91G>A değişimi tespit edilmiştir [69]. Hiper-IgM sendromu B hücrelerinin sınıf değiştirme rekombinasyonunu yapamayarak çok az ya da hiç serum IgA, IgD, IgE ile bağlantılı normal veya yüksek serum IgM üretimi bulunan bir sendromdur. Bu sendrom aynı zamanda immünoglobulin sınıfı geçiş rekombinasyon (Ig-CSR) eksiklikleri olarak da bilinir [33]. Hiper-IgM sendromu ilk olarak Rosen ve ark tarafından 1961 yılında [75] ve moleküler olarak 1992'de *CD40 ligand (CD40L)* geninde [76] bir mutasyon raporuyla tanımlanmıştır. *AICDA* genindeki hastalık yapıcı etkiye sahip olan mutasyonların da bu sendroma sebep olabileceği bilinmektedir [33]. Çünkü bu gen B hücrelerinin Ig repertuarının genişletilmesi, izotip dönüşümü (CSR) yapabilmesi, somatik hipermutasyon (SHM) için gerekli olan bir gendir. Bugüne kadar çoğunlukla ekzon 3'teki amino asit değişimleri, erken durdurma kodonları ve delesyonlar hem CSR hem de SHM'yi etkileyen otozomal resesif HIGM'den sorumlu *AICDA*'nın homozigot mutasyonları olarak bildirilmiştir [46, 77]. Bu gende heterozigot olarak otozomal dominant kalıtılan HIGM ile ilişkilendirilmiş varyant da bildirilmiştir [78]. Bu bilgilere dayanarak panel analizleri sonucunda *AICDA* geni aday gen olabileceği düşünülmüştür. Gende tespit edilen homozigot c.427+91G>A değişimin çevrim içi tahmin araçları ile yapılan analizler doğrultusunda split site bölgesinde bir değişime neden olabileceği tahmin edilmiş ve varyantın gene olan etkisi incelenmiştir. Varyant daha önce literatürde bildirilmemiş yeni bir değişimdir. Varsome verilerine göre VUS olarak sınıflandırılmıştır. YND sonucunda elde edilen ham verinin yaklaşık %1,3'ünün yalancı negatiflikler olduğu bilindiğinden [74] dolayı varyantın Sanger dizileme ile doğrulanması ihtiyacı doğmaktadır. Varyantı doğrulamak amacıyla indeks olguya Sanger dizileme analizi yapılmıştır ve *AICDA* geninde tespit edilen c.427+91G>A değişimi indeks olguda doğrulanmamıştır.

Aile 3

Panel taramalarında negatif bulunan olgu daha sonra ekzom dizilemeye gönderilmiş olup analiz sonucunda düşük B (%1) lenfosit bulunan ve agammaglobulinemi tanısı almış olan hasta #3'ün *TM4SF4* geninde homozigot c.439C>T/p.Arg147* (rs374686102) varyantı tespit edilmiştir. Bir transmembran proteini olan ve immün sistem hücre-hücre etkileşimlerinden merkezi sinir sisteme kadar uzanan geniş bir görev alanı olan tetraspanin ailesine ait bu genin PİY ile ilişkili yeni bir aday gen olabileceği düşünülmüştür. Bu gen daha evvel PİY ile ilişkilendirilmiş genler arasında yer almamaktadır. Ailevi segregasyon analizlerinde kardeşin homozigot ve annenin de heterozigot olarak aynı varyantı taşıdığı tespit edilmiştir. Hastanın kardeşi de benzer immünofenotip göstermekle birlikte gelişim geriliği daha ağır bir formdadır. Ancak erkek kardeşin dış merkezde gerçekleştirilmiş ekzom analizi sonunda ağır kliniğini açıklayan farklı bir gen mutasyonuna daha sahip olduğu görülmüştür. Akraba evliliklerinin sık olduğu ailelerde farklı genlerdeki mutasyonların birlikte görülme olasılıkları yükselir.

Sonraki aşamada, varyantın gene olan etkisi, genin fonksiyonunu anlamak üzere çevrim içi araçlar ve çeşitli veritabanları kullanılarak çalışmalarda; genin 4. Ekzonunda bulunan homozigot c.439C>T/ p.Arg147* değişimi erken durdurma kodunu oluşumuna neden olmaktadır. Değişim daha önce ExAC veritabanında heterozigot olarak bildirilmiş olup MAF değeri yüzde 0.01'den daha düşüktür. Homozigot olarak bildirilen bir durum şu ana kadar yoktur. Varyant mutation taster ve Provean tahmin araçlarına göre hastalık yapıcı etkiye sahiptir. CADD skoru 26.4 olan varyant genin tüm hücre ve protein etkileşimlerinde sorumlu olan EC2 alanında bulunduğu tespit edilmiştir. Tespit edilen varyantın genin fonksiyonel olarak etkileyebileceği düşünülmüştür. Hasta da düşük B hücre sayısının olması ve agammaglobulemi tanısının bulunması B hücre proliferasyonunu etkileyebilen bir bozukluk olabileceğini göstermektedir. *TM4SF4* geninin B hücre reseptörü olan CD79a ile ilişkili olduğu iki hibrid deneyi ile valide edilerek IntAct veritabanında bildirilmiştir. *CD79a* geni, B hücre reseptörünün (BCR) Igα bileşenini kodlar. BCR, membran Ig ve sinyal iletili zincirler Ig-a ve Ig-b'den oluşan bir multiprotein kompleksidir. Önemli olarak, BCR yoluyla sinyal iletimi, yardımcı uyarıcı (CD19 gibi) ve düzenleyici moleküller (CD22 ve CD32b) tarafından düzenlenir. CD19/CD21 kompleksi, B hücresi aktivasyonu için sinyal eşikliğini düşürerek BCR sinyalini artırır [79].

Tetraspanin aile üyelerinden biri olan CD81 ile yapılan çalışmalarda gösterilmiştir ki, B hücrelerinin hücre yüzeyindeki CD81, doğrudan bir sinyal molekülü olan CD19 ile birleşir [2,40]. CD81'in olmadığı (Cd81^{-/-}) farelerde CD81 eksikliği olan B hücreleri, CD19'un ekspresyonunu azaltmıştır ve bu da BCR sinyalinin bozulmasına neden olur [79]. Ayrıca yapılan çalışmada CD81 yokluğunda B hücresi proliferasyonunda ciddi şekilde azalma görülmüştür ve CD19 ligasyonunu takiben bozulmuş bir Ca²⁺ akışı gösterilmiştir [80], bu da CD81'in CD19 ekspresyonunu ve dolayısıyla CD19 sinyallerini stabilize etmek için kritik olduğunu gösterir [79]. Literatürde direk olarak TM4SF4 proteinin B hücre reseptörleriyle ilgili bir çalışma bulunmamaktadır. Fakat B hücre sinyalizasyonu ile ilgili olarak en çok çalışılan tetraspanin olan CD81 ile aynı aileden olmaları ve ortak yapıları içermeleri ve BCR bileşenlerinden *CD79a* geni ile ilişkili olduğunun gösterilmesi aday genin kuvvetli bir aday haline getirmektedir.

CD79a geni ile ilişkili olduğu bilinen *TM4SF4* genindeki bu varyantın BCR sinyalizasyonunu bozabileceği ve CD19 stabilizasyonunu etkiyebileceği tahmini ile B hücre proliferasyonunun etkilenmesi de muhtemeldir ve bu durum hastada gözlenen klinik bulguların altındaki genetik neden olabileceği düşünülmektedir. İndeks olgumuzda IgG:132 (düşük), IgM:6 (düşük), IgA:15 (düşük) ve IgE:23 dür. İlgili varyasyonun gen anlatımına etkisini incelemek için homozigot mutant indeks olgu ve heterozigot annede gen anlatımı bakımından anlamlı bir farklılık görülmezken *TM4SF4* gen anlatımı için benzer bir durum gösterirken varyasyonu homozigot olarak taşıyan ancak çok ağır klinik bulguları olan hasta kardeşte düşük anlatım gözlenmiştir. Kardeşin dış merkezde gerçekleştirilen ekzom analizinde sendromik bulgularını da açıklayan *ATP8A2* geninde ikinci bir varyasyon saptanmıştır. Serebellar ataksi, zeka geriliği ve dengesizlik sendromu (CAMRQ), otozomal resesif geçişli heterojen bir genetik bozukluk grubudur [81]. CAMRQ hastalarında *ATP8A2* geninde hastalık yapıcı etkiye sebep olan mutasyonlar bulunduğu daha önceki yapılan çalışmalarda gösterilmiştir [82] ve buna bilgiye ek olarak çok yakın zamanda hafif serebral ataksi ile karakterize olan yeni bir *ATP8A2* gen fenotipi de bildirilmiştir [81]. Bu gen kardeşteki serebellar ataksi benzeri bulguları açıklamakla beraber, söz konusu gen iki kardeşte birden görülen immün yetersizlik bulgularını açıklamaktan uzaktır. İndeks olgumuz *ATP8A2* geninde kardeşi ile aynı varyasyonu taşımamaktadır. Etkinin gen anlatımını değiştirmekten çok

fonksiyonel etkileşimleri bozarak gerçekleştiği ancak bunu ispatlamak için ileri fonksiyonel çalışmalara ihtiyaç olduğu düşünülmektedir.

Ayrıca bu çalışma kapsamında, EC2 alanındaki varyantının TM4SF4 proteininin CD19 ile etkileşiminin ve BCR sinyalinin bozulabileceği düşünülerek bu aile de sağlıklı kontrollerle birlikte akış sitometri cihazıyla hem Ca^{2+} akış deneyi hem de TM4SF4 protein ekspresyonu incelemek amacıyla bir çalışma yapılmıştır. Fakat teknik aksaklıklardan dolayı sonuç alınamamıştır. Primer örnek sorunu nedeni ile hücre modellemeleri ile çalışmanın devam etmesi planlanmıştır.

Aile 4

Lenfoma ile birlikte seyreden immün yetmezliğe sahip indeks olgunun bulunduğu Aile 4'de *RAG2* geninde homozigot c.104G>C varyasyonu (rs148508754) saptanmıştır. Ailevi segregasyon analizleri indeks olgu, immünyetersizlik bulguları gösteren etkilenmiş kardeşte homozigot ve ebeveynlerde heterozigot olarak varyasyonu göstermiştir. *RAG2* proteini üzerindeki değişimi Provean, Polyphen2, mutation taster, SIFT tahmin araçları sonucuna göre hastalık yapıcı etkisinin olduğu tespit edilmiştir. REVEL veritabanına göre ise patojenik bir etkiye sahiptir.

RAG2 genindeki c.104G>C (p.G35A) (rs148508754) değişimine neden olan bir yanlış anlamlı varyanttır. MAF değeri <0.01 olan varyant daha önce heterozigot olarak *RAG1/2* eksikliğinden kaynaklanan atipik ağır kombine immün yetersizlik ile ilişkilendirilerek ClinVar veritabanında bildirilmiştir. T-B-NK+ AKİY fenotipi olan tüm hastaların yaklaşık %50'sini *RAG1/2* eksikliğinin oluşturduğu tahmin edilmektedir [83]. p.G35A değişimi CID -G/AI, HIGM ile ilişkilendirilerek bildirilmiştir [84]. *RAG2* geninde aynı yerde bulunan başka bir aminoasit oluşumuna neden olan p.G35V değişimi homozigot olarak T-B- SCID ile ilişkilendirilmiş olarak rapor edilmiştir [85]. Bir çekirdek alan ve bitki homodomain (PHD) alanından oluşan *RAG2* proteininde [56] p.G35A değişimi çekirdek alanı içerisindedir. Çekirdek alanı, DNA parçalama (rekombinaz) aktivitesi için esastır ve RSS bağlanmasını ve *RAG1* ile etkileşimi geliştirir [86]. İndeks olgumuz (hasta #4); sık enfeksiyon, alerji, pnömoni, zatürre şikayeti bulunan ve otoimmün hemolitik anemi tanısı aldıktan sonra diffüz büyük B hücreli lenfoma (DBBHL) tanısı almış olup takip sırasında immün yetersizlik olanileceği de düşünülen bir hastadır. *RAG2* geni, 527 amino asitten oluşan *RAG2* proteinini kodlar. Bu protein

T ve B lenfositlerinin VDJ rekombinasyonunda RAG1 proteini ile birlikte kompleks halinde görev alır. V(D)J rekombinasyonu, V, D ve J olarak adlandırılan bileşen gen segmentlerinin havuzlarından uygun hücre soyunda fonksiyonel antijen reseptör genlerini birleştirir [87, 88]. V(D)J rekombinasyonu için uygun gen bölümleri, korunmuş bir rekombinasyon sinyal dizisi (RSS) ile çevrilidir. RAG1 ve RAG2'den oluşan V (D)J rekombinaz, seçilen gen segmentlerinin sınırında ve yanlarındaki RSS'lerinde ilk DNA çift zincir kırıklarını (DSB'ler) katalize eder [89]. V(D)J rekombinasyonunda programlanmış RAG aracılı DNA DSB'leri, devam eden B ve T hücresi gelişimi için gereklidir, çünkü RAG ekspresyonu veya aktivitesindeki kusurlar immün yetersizlik hastalıklarına neden olur [86]. RAG işlevini (<%1) neredeyse tamamen ortadan kaldıran mutasyonların, V(D)J rekombinasyonu tamamen bloke olduğu için T-B-SCID ile sonuçlandığı öne sürülmüştür. Buna karşılık, kısmi RAG aktivitesine izin veren mutasyonlar Omenn Sendromu'ndan sorumludur [90]. Hipomorfik RAG mutasyonları ağır kombine immün yetmezliğe sebep olur [83], prevalansı 1-9/100 000'dur.

Ailede segregasyonu gösterilen *RAG2* geni, hastayı takip eden klinik immunoloji hekimi tarafından iki kardeşin fenotipi bu varyant açısından tam uyumlu bulunmadığı için analizlere geri dönüldü ve lenfomalı olguda *NBN* geninde heterozigot c.1691A>G (rs1554558323) değişimi tespit edilmiştir. Bu genle ilgili fonksiyonel çalışmalar oluşturulan hücre modelinde devam etmektedir.

RAG2 geninde bulunan varyasyonun gen anlatımına etkisini görmek amacıyla indeks olgu (homozigot mutant), ebeveynler (heterozigot) ve yabanıl(wt) örneklerde gen anlatım çalışmaları yapılmıştır. *RAG2* gen anlatımı açısından belirgin bir fark gözlenmemiştir. Ancak yapılan önceki çalışmalarda varyantın rekombinaz aktivitesi üzerinde etkili olarak değerlerin şu şekilde p.G35A değişiminin rekombinaz aktivitesinin %10-30, p.G35V değişiminin rekombinaz aktivitesi ise % 0-10 olduğu bildirilmiştir [84]. Bu iki varyant ile bildirilen fenotipler ve rekombinaz aktiviteleri karşılaştırıldığında doğru bir korelasyon gözlenmektedir. Rekombinaz aktivitesinin daha az olduğu p.G35V değişimi daha ağır fenotip olan T-B-SCID ile ilişkilendirilmiştir [84]. *RAG2* nin alt yollarında görev yapan (*TP53* ve *NBN*) genlerin anlatımlarına da bakıldığında homozigot ve heterozigot olgularda *TP53* ve *NBN* gen yabanıl tipe göre azalmış gen anlatımları saptanmıştır. *NBN* geni, DNA hasarına hücresel yanıtta ve kromozom bütünlüğünün korunmasında kritik bir rol oynayan MRN (MRE11-RAD50-

NBN) kompleksinde görevlidir. DNA çift iplikli kırık onarımı sırasında NBN proteini hasar sinyalinin algılanması ve hücre döngüsü kontrolünde görevli olan, MRN kompleksini aşağı akışındaki ATM, TP53, CDC25, Chk2, BRCA1 gibi proteinlerin yer aldığı bir onarım kompleksini başlatarak DNA hasar onarımına yardımcı olur [49]. Bu bilgiler göz önünde bulundurulduğunda, *TP53* ve *NBN* gen ekspresyonlarının sağlıklı kontrole göre azalmış olması *RAG2* gen işlevi sonucunda meydana gelen DNA hasarını onarımında görevli olan bu genlerin gendeki hasatlık yapıcı etkiye sahip olduğu düşünülen varyantın sağlıklı kontrole göre *RAG2* gen ekspresyonunda azalmaya sebep olmasından yola çıkarak anlamlı bir sonuç olduğu söylenebilmektedir.

Bu çalışma kapsamında ailenin NBN ve RAG2 protein seviyelerinin araştırılması amacıyla western blot yöntemi uygulanması düşünülmüş olup antikor ve protein konsantrasyonları optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Ancak primer örnek sorunu nedeni ile hücre modellemeleri ile çalışmanın devam etmesi planlanmıştır.

Aile 5

Daha önceki çalışmalarda gerçekleştirilen ekzom analizleri sonucunda Hasta #5'te *MASP2* geninin 11. ekzonunda heterozigot c.1853G>A: p.(C618Y) (rs764932450) varyasyonu tespit edilmiştir. Varyasyon Sanger dizileme ile anne ve indeks olguda heterozigot formda doğrulanmıştır. SIFT, Provean, mutation taster, PolyPhen2, MetalR in siliko tahmin araçlarına göre, MASP2 proteinin 618. pozisyonunda sisteinin, tirozine değişiminin (p.C618Y) değişiminin hastalık yapıcı bir etkisinin olabileceği sonucuna ulaşılmıştır. MAF değeri <%0.01 olan bu nadir bir varyant korunmuş bir bölgede yer almaktadır.

MASP2 proteini doğal bağışıklığın kompleman sisteminin lektin yolunda görev yapan bir serin proteazdır. Kompleman sistemini başlatan 3 yoldan biri olan lektin yolu, mannoz bağlayıcı lektin (MBL) ile ilişkili serin proteaz (MASP'ler) aracılığıyla kompleman sistemini aktive eder. MASP'ler (MASP1,2,3), tamamlayıcı sistemin lektin yolunun enzimatik bileşenleridir. MASP2 proteini sentezlendiğinde enzimatik olarak inaktif formdadır. Yabancı maddelerin MBL molekülü tarafından tanınmasından sonra MASP2 serin proteazı CCP2 ve SP alanı arasındaki bir korunmuş Arg-II bölgesinden kesilerek bir disülfid bağı ile birbirine bağlanan iki polipeptid zincirine ayrılır. Böylece MASP2 proteazı aktif hale gelmiş olur. Aktif MASP2 proteazı lektin yolunda görevli olan C4 ve C2 moleküllerini enzimatik olarak keserek kompleman sisteminin ortak

bileşeni olan C3 molekülünü kesecek olan C3 konvertaz (C4bC2a) oluşumunu sağlayarak sistemin işlemesine yardımcı olmaktadır.

MASP-2 eksikliği ilk olarak 2003'te otoimmün ve inflamatuvar bozukluklarıyla birlikte şiddetli ve tekrarlayan pnömokok enfeksiyonlarından muzdarip olan yetişkin bir bireyde rapor edilmiştir [62]. LP aktivitesi tamamen eksik olan bu hastanın MASP2 geninin 3.ekzonunda homozigot c.359A>G/ p.D120G değişimi tespit edildi. Bu mutasyon, homozigot bireylerde çok düşük seviyelere ulaşan proteinin serum seviyelerinde önemli bir azalma ile sonuçlanır [62, 91]. 2004'ten beri MASP-2 eksikliği, piyojenik enfeksiyonlar, inflamatuvar akciğer hastalığı ve otoimmünite ile ilişkili bir kompleman eksikliği olarak primer immün yetersizliklerin (PİY) sınıflandırmasına dahil edilmiştir [6, 92]. MASP2 eksikliği epidemiyolojik ve etnik gruplar arasında çok değişkenlik göstermesinden dolayı penetransı tartışmalıdır ve *MASP2* genindeki varyantlarla yapılan çalışmalar sonucunda MASP2 eksikliğin klinik penetransının düşük olduğu söylenmiştir [91], prevalansının 1/1000000'dan daha düşük olduğu bilinmektedir.

Çevrim içi tahmin araçlarından çıkan sonuçlar doğrultusunda bu tez çalışması kapsamında hasta ve sağlıklı kontrollerde plazma MASP2 protein seviyeleri ELİSA yöntemi ile incelenmiştir. Sağlıklı plazma örneklerinde belirlenen ortalama MASP2 düzeyine kıyasla, indeks olgu ve annenin plazmasındaki MASP2 seviyesinin çok bir fark olmadığı tespit edilmiştir. Stengaard-Pedersen ve ark. (2003), plazmadaki MASP-2 konsantrasyonunun *MASP2* geninin polimorfizmleri ile ilgili olduğunu göstermektedir. Ayrıca, bu gen ile yapılan daha önceki çalışmalarda, gendeki birçok farklı polimorfizimlerden kaynaklı olarak azalmış MASP2 konsantrasyonu tespit edildiği bildirilmiştir [93-95]. Fakat MASP2 serum/plazma konsantrasyonunu epidemiyolojik olarak çok değişken olduğu da bir standart değer verilemediği de bilinmektedir [60]. Bu ailede saptanan p.C618Y değişiminin proteinin serin proteaz alanına denk gelmektedir ve böylece proteazın fonksiyonu etkileyebileceği düşünüldüğünden dolayı ileri fonksiyonel çalışmalar yapılacaktır.

Aile 6

Önceki çalışmalarımızda gerçekleştirdiğimiz ekzom analizleri sonucunda *ATM* genindeki c.6108T>A değişimi tespit edilmiştir [69]. Tek nükleotidlik değişim sonucunda protein üzerindeki 2036.konumda bulunan tirozin aminoasiti bir durdurma kodonuna (p.Y2036*) dönüşmüştür. Varyantı doğrulamak amacıyla yapılan Sanger dizileme analizinde *ATM* genindeki varyasyon indeks olguda homozigot ve ebeveynlerde heterozigot formda gösterilmiştir. Varyant daha önce ataksi telanjiektazi hastalığı ilişkilendirilerek ClinVar veritabanında rapor edilmiştir ve hastalığın prevalansı 1-9/1 000 000, çocuklardaki prevalansı ise 1/100000'dir. Ataksi telanjiektazi (A-T), *ATM* genindeki mutasyonlardan kaynaklanan (2) serebellar ataksi, okulokutanöz telanjiektazi, immün yetersizlik, ilerleyici solunum yetmezliği ve artmış malignite riski ile karakterize, nadir görülen, nörodejeneratif ve multisistem bir hastalıktır [96]. Varyant *ATM* proteininde erken durdurma kodunu oluşturmasından dolayı Variant effector predictor (VEP) aracına göre anlamsız aracılı mRNA bozunması (NMD) mekanizmasına uğradığını göstermektedir. NMD, tüm ökaryotlarda bulunan bir gözetim yoludur. Ana işlevi, erken durdurma kodonları içeren mRNA transkriptlerini ortadan kaldırarak gen ifadesindeki hataları azaltmaktır [97]. Kesilmiş mRNA'dan çevrilen kesilmiş proteinler çevrilmeyen şeyin ciddiyetine bağlı olarak işlevsel olabilir veya olmayabilir.

ATM proteini, ataksi-telanjiektazi mutasyona uğramış (*ATM*) geni tarafından kodlanan 3.050 amino asitli bir protein kinazdır ve fosfoinositid 3-kinazla ilişkili protein kinaz süper ailesine aittir. Çok işlevli bir protein kinaz olarak *ATM*, otofosforilasyonu üzerine, çoklu substratların fosforilasyonunu düzenleyerek hücre döngüsü kontrolünün, DNA hasarının ve onarımının ve hücre hayatta kalması ve ölümünün düzenlenmesinde kritik bir rol oynar [98].

Varyantı homozigot olarak taşıyan indeks olgu ve heterozigot olarak taşıyan aile bireylerinde akım sitometrisi ile yapılan deneylerde *ATM* protein fonksiyonu açısından anlamlı bir fark bulunmayışı deneyde yeterli hücre sayısının yokluğu ve daha doğru bir karşılaştırma yapılabilmesini sağlayacak pozitif kontrol eksiliği ile bağlantılı olduğundan bu deneyin tekrarlanması düşünülmüştür.

Bu tez çalışmasındaki en büyük kısıtlılık;

- İmmün yetersizlik sendromundan mustarip olan hasta bireylerde yetersiz ya da sıfır lenfosit sayısının bulunmaması dolayısıyla primer örneklerde fonksiyonel çalışmalara devam edebilecek materyal bulunmaması ve hücre modelleri oluşturularak çalışmaların bu modeller üzerinde sürüdülmeye gerektirmektedir.

Sonuç olarak;

- Yeni nesil dizileme yaklaşımları ile saptanan varyasyonların yanlış pozitif olabilme ihtimalinden dolayı Sanger dizileme ile doğrulanması gerekmektedir. Teknolojiye bağlı üretilen hatalı bulguların hastaların genomlarında gerçekten var olan ve kliniği açıklayan varyasyonlar olduğunun tespiti önemlidir. *TCF3* ve *AICDA* genlerindeki varyantlar doğrulanamamıştır.
- Ailelerde saptanan genetik varyasyonların segregasyon analizinin gösterilmesi klinik fenotiple ilişkili genlerin ortaya çıkartılmasında önemli bir basamaktır. Fenotip-genotip korelasyonu gösterilemediğinde bu varyantın tek başına hastalıkla ilişkili olduğu sonucuna varılamamaktadır. Dolayısıyla ailevi segregasyonun gösterilmesiyle ailedeki tüm taşıyıcı ve/veya hasta (ya da hastalık potansilyesine sahip) bireyler tanımlanmış olacak ve bu aileler için genetik danışma mümkün olacaktır.
- Genetik verinin değerlendirilmesi ve doğrulanması süreçlerinde klinik ekiple sıkı iş birliği önemlidir. Aile 3' de PİY için aday gen olarak saptanan ve segregasyonu gösterilen *RAG2* geni tam olarak kliniği açıklamadığı için analizler tekrarlanmış ve ailede PİY+lenfomadan sorumlu olduğu düşünülen ikinci bir aday gene ulaşılmıştır.
- Ekzom analizleri sonucunda saptanan ve daha evvel PİY ile ilişkilendirilmemiş yeni genlerin doğrulama çalışmaları uzun yıllar sürebilmektedir. Bu yüksek lisans tez çalışması kapsamında yeni bir aday gen olan *TM4SF4* in siliko tahmin yanısıra, ailesel segregasyon, gen ve protein anlatımı gibi ilk aşamada bakılması gereken parametreler değerlendirilmiştir. İleri projeler ile çalışmalara devam edilecektir.

- PİY hastalıkları içinde daha nadir görülen ve genotip-fenotip ilişkisi zor belirlenen hastalıklar bakımından genetik çalışmalar önem taşımaktadır. Rutin testlerle kesin bir karar verilemeyen ve *MASP2* varyasyonu saptanan ailede bu tez çalışması kapsamında genotip-fenotip ilişkisi kurulmaya çalışılmıştır.



6. KAYNAKLAR

1. Al-Herz, W., et al., *Primary immunodeficiency diseases: an update on the classification from the international union of immunological societies expert committee for primary immunodeficiency*. Frontiers in immunology, 2011. **2**: p. 54.
2. Notarangelo, L.D., et al., *Primary immunodeficiencies: 2009 update*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2009. **124**(6): p. 1161-1178.
3. Notarangelo, L.D., *Primary immunodeficiencies*. J Allergy Clin Immunol, 2010. **125**(2 Suppl 2): p. S182-94.
4. Sanal, O. and I. Tezcan, *Thirty years of primary immunodeficiencies in Turkey*. Annals of the New York Academy of Sciences, 2011. **1238**(1): p. 15-23.
5. Tangye, S.G., et al., *Human inborn errors of immunity: 2019 update on the classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee*. Journal of clinical immunology, 2020. **40**(1): p. 24-64.
6. Picard, C., et al., *International Union of Immunological Societies: 2017 Primary Immunodeficiency Diseases Committee Report on Inborn Errors of Immunity*. J Clin Immunol, 2018. **38**(1): p. 96-128.
7. Seleman, M., et al., *Uses of next-generation sequencing technologies for the diagnosis of primary immunodeficiencies*. Frontiers in immunology, 2017. **8**: p. 847.
8. Richards, S., et al., *Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology*. Genetics in medicine, 2015. **17**(5): p. 405-423.
9. Chaplin, D.D., *Overview of the immune response*. J Allergy Clin Immunol, 2010. **125**(2 Suppl 2): p. S3-23.
10. Arneth, B., *Trained innate immunity*. Immunol Res, 2021. **69**(1): p. 1-7.
11. Abbas, A.K., A.H. Lichtman, and S. Pillai, *Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System, 6e: Sae-E-Book*. 2019: Elsevier India.
12. Merle, N.S., et al., *Complement System Part I - Molecular Mechanisms of Activation and Regulation*. Front Immunol, 2015. **6**: p. 262.
13. Stover, C., et al., *The human gene for mannan-binding lectin-associated serine protease-2 (MASP-2), the effector component of the lectin route of complement activation, is part of a tightly linked gene cluster on chromosome 1p36*. 2–3. Genes & Immunity, 2001. **2**(3): p. 119-127.
14. Gal, P. and G. Ambrus, *Structure and function of complement activating enzyme complexes C1 and MBL-MASPs*. Current Protein and Peptide Science, 2001. **2**(1): p. 43-59.
15. Beltrame, M.H., et al., *The lectin pathway of complement and rheumatic heart disease*. Front Pediatr, 2014. **2**: p. 148.
16. Chi, X., Y. Li, and X. Qiu, *V(D)J recombination, somatic hypermutation and class switch recombination of immunoglobulins: mechanism and regulation*. Immunology, 2020. **160**(3): p. 233-247.
17. Shimazaki, N. and M.R. Lieber, *Histone methylation and V (D) J recombination*. International journal of hematology, 2014. **100**(3): p. 230-237.

18. Bonilla, F.A. and H.C. Oettgen, *Adaptive immunity*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2010. **125**(2): p. S33-S40.
19. Almejun, M.B. and M. Borge, *Somatic hypermutation defects in common variable immune deficiency*. Current allergy and asthma reports, 2017. **17**(11): p. 1-7.
20. Nicholson, L.B., *The immune system*. Essays Biochem, 2016. **60**(3): p. 275-301.
21. Rai, R., A.J. Thrasher, and A. Cavazza, *Gene Editing for the Treatment of Primary Immunodeficiency Diseases*. Hum Gene Ther, 2021. **32**(1-2): p. 43-51.
22. van Zelm, M.C., et al., *PID comes full circle: applications of V(D)J recombination excision circles in research, diagnostics and newborn screening of primary immunodeficiency disorders*. Front Immunol, 2011. **2**: p. 12.
23. Amaya-Urbe, L., et al., *Primary immunodeficiency and autoimmunity: A comprehensive review*. J Autoimmun, 2019. **99**: p. 52-72.
24. Al-Mousa, H. and B. Al-Saud, *Primary Immunodeficiency Diseases in Highly Consanguineous Populations from Middle East and North Africa: Epidemiology, Diagnosis, and Care*. Front Immunol, 2017. **8**: p. 678.
25. Al-Herz, W. and H. Al-Mousa, *Combined immunodeficiency: the Middle East experience*. J Allergy Clin Immunol, 2013. **131**(3): p. 658-60.
26. Kumrah, R., et al., *Genetics of severe combined immunodeficiency*. Genes Dis, 2020. **7**(1): p. 52-61.
27. Chinn, I.K. and W.T. Shearer, *Severe Combined Immunodeficiency Disorders*. Immunol Allergy Clin North Am, 2015. **35**(4): p. 671-94.
28. Durandy, A., S. Kracker, and A. Fischer, *Primary antibody deficiencies*. Nature Reviews Immunology, 2013. **13**(7): p. 519-533.
29. Berglöff, A., et al., *Agammaglobulinemia: causative mutations and their implications for novel therapies*. Expert review of clinical immunology, 2013. **9**(12): p. 1205-1221.
30. Cunningham-Rundles, C., *Common variable immune deficiency: case studies*. Hematology 2014, the American Society of Hematology Education Program Book, 2019. **2019**(1): p. 449-456.
31. Gupta, S., D. Pattanaik, and G. Krishnaswamy, *Common Variable Immune Deficiency and Associated Complications*. Chest, 2019. **156**(3): p. 579-593.
32. Verma, N., B. Grimbacher, and J.R. Hurst, *Lung disease in primary antibody deficiency*. The Lancet Respiratory Medicine, 2015. **3**(8): p. 651-660.
33. Yazdani, R., et al., *The hyper IgM syndromes: Epidemiology, pathogenesis, clinical manifestations, diagnosis and management*. Clin Immunol, 2019. **198**: p. 19-30.
34. Liang, J.J., et al., *Relationship between the structure and function of the transcriptional regulator E2A*. J Biol Res (Thessalon), 2021. **28**(1): p. 15.
35. Belle, I. and Y. Zhuang, *E proteins in lymphocyte development and lymphoid diseases*. Curr Top Dev Biol, 2014. **110**: p. 153-87.
36. Wang, D., et al., *The basic helix-loop-helix transcription factor HEBAlt is expressed in pro-T cells and enhances the generation of T cell precursors*. J Immunol, 2006. **177**(1): p. 109-19.
37. Aronheim, A., et al., *The E2A gene product contains two separable and functionally distinct transcription activation domains*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1993. **90**(17): p. 8063-8067.

38. Sun, X.-H. and D. Baltimore, *An inhibitory domain of E12 transcription factor prevents DNA binding in E12 homodimers but not in E12 heterodimers*. Cell, 1991. **64**(2): p. 459-470.
39. Slattery, C., M.P. Ryan, and T. McMorro, *E2A proteins: regulators of cell phenotype in normal physiology and disease*. Int J Biochem Cell Biol, 2008. **40**(8): p. 1431-6.
40. Boisson, B., et al., *A recurrent dominant negative E47 mutation causes agammaglobulinemia and BCR(-) B cells*. J Clin Invest, 2013. **123**(11): p. 4781-5.
41. Teng, G. and F.N. Papavasiliou, *Immunoglobulin somatic hypermutation*. Annu Rev Genet, 2007. **41**: p. 107-20.
42. Mahdavian, S.A., et al., *Novel mutation of the activation-induced cytidine deaminase gene in a Tajik family: special review on hyper-immunoglobulin M syndrome*. Expert review of clinical immunology, 2012. **8**(6): p. 539-546.
43. de Yebenes, V.G. and A.R. Ramiro, *Activation-induced deaminase: light and dark sides*. Trends Mol Med, 2006. **12**(9): p. 432-9.
44. Methot, S. and J. Di Noia, *Molecular mechanisms of somatic hypermutation and class switch recombination*. Advances in immunology, 2017. **133**: p. 37-87.
45. Methot, S.P. and J.M. Di Noia, *Molecular Mechanisms of Somatic Hypermutation and Class Switch Recombination*. Adv Immunol, 2017. **133**: p. 37-87.
46. Revy, P., et al., *Activation-induced cytidine deaminase (AID) deficiency causes the autosomal recessive form of the Hyper-IgM syndrome (HIGM2)*. Cell, 2000. **102**(5): p. 565-575.
47. Huang, Y., et al., *Twelve novel Atm mutations identified in Chinese ataxia telangiectasia patients*. Neuromolecular Med, 2013. **15**(3): p. 536-40.
48. Sun, Y., et al., *A role for the Tip60 histone acetyltransferase in the acetylation and activation of ATM*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2005. **102**(37): p. 13182-13187.
49. Tanaka, T., et al., *Cytometry of ATM activation and histone H2AX phosphorylation to estimate extent of DNA damage induced by exogenous agents*. Cytometry A, 2007. **71**(9): p. 648-61.
50. Paull, T.T. and J.-H. Lee, *The Mre11/Rad50/Nbs1 complex and its role as a DNA double-strand break sensor for ATM*. Cell cycle, 2005. **4**(6): p. 737-740.
51. Ahmed, M., et al., *ATM mutation and radiosensitivity: An opportunity in the therapy of mantle cell lymphoma*. Crit Rev Oncol Hematol, 2016. **107**: p. 14-19.
52. van Deventer, S.J., V.E. Dunlock, and A.B. van Spriell, *Molecular interactions shaping the tetraspanin web*. Biochem Soc Trans, 2017. **45**(3): p. 741-750.
53. Zou, F., et al., *Expression and Function of Tetraspanins and Their Interacting Partners in B Cells*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 1606.
54. Wang, L., et al., *Adenovirus-mediated delivery of siRNA targeting TM4SF4 attenuated liver cancer cell growth in vitro and in vivo*. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2013. **45**(3): p. 213-9.
55. Liu, Z., et al., *Molecular cloning of a cDNA for rat TM4SF4, a homolog of human il-TMP (TM4SF4), and enhanced expression of the corresponding gene in regenerating rat liver*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression, 2001. **1518**(1-2): p. 183-189.
56. Candotti, F., et al., *Severe combined immune deficiency*, in *Stiehm's Immune Deficiencies*. 2020. p. 153-205.

57. Corneo, B., A. Benmerah, and J.P.d. Villartay, *A short peptide at the C terminus is responsible for the nuclear localization of RAG2*. European journal of immunology, 2002. **32**(7): p. 2068-2073.
58. Arbuckle, J.L., et al., *Elucidating the domain architecture and functions of non-core RAG1: the capacity of a non-core zinc-binding domain to function in nuclear import and nucleic acid binding*. BMC biochemistry, 2011. **12**(1): p. 1-18.
59. Rodgers, W., et al., *RAG2 localization and dynamics in the pre-B cell nucleus*. PLoS One, 2019. **14**(5): p. e0216137.
60. Xu, W.D., et al., *Association of MASP2 levels and MASP2 gene polymorphisms with systemic lupus erythematosus*. J Cell Mol Med, 2020. **24**(18): p. 10432-10443.
61. Ambrus, G., et al., *Natural substrates and inhibitors of mannan-binding lectin-associated serine protease-1 and -2: a study on recombinant catalytic fragments*. J Immunol, 2003. **170**(3): p. 1374-82.
62. Stengaard-Pedersen, K., et al., *Inherited deficiency of mannan-binding lectin-associated serine protease 2*. New England Journal of Medicine, 2003. **349**(6): p. 554-560.
63. Choi, Y. and A.P. Chan, *PROVEAN web server: a tool to predict the functional effect of amino acid substitutions and indels*. Bioinformatics, 2015. **31**(16): p. 2745-2747.
64. Landrum, M.J., et al., *ClinVar: improving access to variant interpretations and supporting evidence*. Nucleic Acids Res, 2018. **46**(D1): p. D1062-D1067.
65. Kopanos, C., et al., *VarSome: the human genomic variant search engine*. Bioinformatics, 2019. **35**(11): p. 1978-1980.
66. McLaren, W., et al., *The Ensembl Variant Effect Predictor*. Genome Biol, 2016. **17**(1): p. 122.
67. Stenson, P.D., et al., *The Human Gene Mutation Database: towards a comprehensive repository of inherited mutation data for medical research, genetic diagnosis and next-generation sequencing studies*. Hum Genet, 2017. **136**(6): p. 665-677.
68. Blum, M., et al., *The InterPro protein families and domains database: 20 years on*. Nucleic Acids Res, 2021. **49**(D1): p. D344-D354.
69. FIRTINA, S., 2017.
70. Zhuang, Y., P. Soriano, and H. Weintraub, *The helix-loop-helix gene E2A is required for B cell formation*. Cell, 1994. **79**(5): p. 875-884.
71. Bain, G., et al., *E2A proteins are required for proper B cell development and initiation of immunoglobulin gene rearrangements*. Cell, 1994. **79**(5): p. 885-892.
72. Ben Ezra, R., et al., *The protein Id: a negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins*. Cell, 1990. **61**(1): p. 49-59.
73. DOĞAN, M., et al., *Yeni Nesil Dizileme (YND) Hakkında Bilinenler (Literatür Taraması)*. Duzce Medical Journal, 2017. **19**(1): p. 27-30.
74. Mu, W., et al., *Sanger confirmation is required to achieve optimal sensitivity and specificity in next-generation sequencing panel testing*. The Journal of molecular diagnostics, 2016. **18**(6): p. 923-932.
75. Rosen, F.S., et al., *Recurrent bacterial infections and dysgammaglobulinemia: deficiency of 7S gamma-globulins in the presence of elevated 19S gamma-globulins: report of two cases*. Pediatrics, 1961. **28**(2): p. 182-195.

76. Notarangelo, L.D., M. Duse, and A.G. Ugazio, *Immunodeficiency with hyper-IgM (HIM)*. Immunodeficiency reviews, 1992. **3**(2): p. 101-121.
77. Minegishi, Y., et al., *Mutations in activation-induced cytidine deaminase in patients with hyper IgM syndrome*. Clinical immunology, 2000. **97**(3): p. 203-210.
78. Imai, K., et al., *Analysis of class switch recombination and somatic hypermutation in patients affected with autosomal dominant hyper-IgM syndrome type 2*. Clinical immunology, 2005. **115**(3): p. 277-285.
79. Wright, M.D., G.W. Moseley, and A.B. van Spriel, *Tetraspanin microdomains in immune cell signalling and malignant disease*. Tissue Antigens, 2004. **64**(5): p. 533-42.
80. Tsitsikov, E.N., J.C. Gutierrez-Ramos, and R.S. Geha, *Impaired CD19 expression and signaling, enhanced antibody response to type II T independent antigen and reduction of B-1 cells in CD81-deficient mice*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1997. **94**(20): p. 10844-10849.
81. Guissart, C., et al., *ATP8A2-related disorders as recessive cerebellar ataxia*. Journal of Neurology, 2020. **267**(1): p. 203-213.
82. Emre Onat, O., et al., *Missense mutation in the ATPase, aminophospholipid transporter protein ATP8A2 is associated with cerebellar atrophy and quadrupedal locomotion*. European Journal of Human Genetics, 2013. **21**(3): p. 281-285.
83. Niehues, T., R. Perez-Becker, and C. Schuetz, *More than just SCID--the phenotypic range of combined immunodeficiencies associated with mutations in the recombinase activating genes (RAG) 1 and 2*. Clin Immunol, 2010. **135**(2): p. 183-92.
84. Tirosh, I., Yamazaki, Y., Frugoni, F., Ververs, F. A., Allenspach, E. J., Zhang, Y., ... & Lee, Y. N. (2019). *Recombination activity of human recombination-activating gene 2 (RAG2) mutations and correlation with clinical phenotype*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 143(2), 726-735.
85. Sobacchi, C., et al., *RAG-dependent primary immunodeficiencies*. Hum Mutat, 2006. **27**(12): p. 1174-84.
86. Villa, A. and L.D. Notarangelo, *RAG gene defects at the verge of immunodeficiency and immune dysregulation*. Immunol Rev, 2019. **287**(1): p. 73-90.
87. Gellert, M., *V (D) J recombination: RAG proteins, repair factors, and regulation*. Annual review of biochemistry, 2002. **71**(1): p. 101-132.
88. Schatz, D.G. and Y. Ji, *Recombination centres and the orchestration of V (D) J recombination*. Nature reviews immunology, 2011. **11**(4): p. 251-263.
89. Schatz, D.G. and P.C. Swanson, *V (D) J recombination: mechanisms of initiation*. Annual review of genetics, 2011. **45**: p. 167-202.
90. Tabori, U., et al., *Detection of RAG mutations and prenatal diagnosis in families presenting with either T-B- severe combined immunodeficiency or Omenn's syndrome*. Clin Genet, 2004. **65**(4): p. 322-6.
91. Garcia-Laorden, M.I., et al., *Mannose-binding lectin and mannose-binding lectin-associated serine protease 2 in susceptibility, severity, and outcome of pneumonia in adults*. J Allergy Clin Immunol, 2008. **122**(2): p. 368-74, 374 e1-2.
92. Notarangelo, L., et al., *Primary immunodeficiency diseases: an update*. J Allergy Clin Immunol, 2004. **114**(3): p. 677-87.

93. Sorensen, R., S. Thiel, and J.C. Jensenius, *Mannan-binding-lectin-associated serine proteases, characteristics and disease associations*. Springer Semin Immunopathol, 2005. **27**(3): p. 299-319.
 94. Thiel, S., et al., *Polymorphisms in mannan-binding lectin (MBL)-associated serine protease 2 affect stability, binding to MBL, and enzymatic activity*. J Immunol, 2009. **182**(5): p. 2939-47.
 95. Thiel, S., et al., *Deficiency of mannan-binding lectin associated serine protease-2 due to missense polymorphisms*. Genes Immun, 2007. **8**(2): p. 154-63.
 96. van Os, N.J.H., et al., *Ataxia-telangiectasia: recommendations for multidisciplinary treatment*. Dev Med Child Neurol, 2017. **59**(7): p. 680-689.
 97. Baker, K.E. and R. Parker, *Nonsense-mediated mRNA decay: terminating erroneous gene expression*. Current opinion in cell biology, 2004. **16**(3): p. 293-299.
 98. Goodarzi, A.A., et al., *Autophosphorylation of ataxia-telangiectasia mutated is regulated by protein phosphatase 2A*. The EMBO journal, 2004. **23**(22): p. 4451-4461.
- 

HAM VERİLER

FORMLAR

PATENT HAKKI İZNİ

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

PRIMER İMMÜN YETERSİZLİK HASTALARINDA BELİRLENEN YENİ VARYANTLARIN VALIDASYONU

ORJİNALLİK RAPORU

% **11**

BENZERLİK ENDEKSİ

%10

İNTERNET KAYNAKLARI

%2

YAYINLAR

%5

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1

acikbilim.yok.gov.tr

İnternet Kaynağı

%5

2

Submitted to Istanbul University

Öğrenci Ödevi

%1

3

Submitted to The Scientific & Technological
Research Council of Turkey (TUBITAK)

Öğrenci Ödevi

<%1

4

Submitted to Haliç Üniversitesi

Öğrenci Ödevi

<%1

5

www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080

İnternet Kaynağı

<%1

6

tr.wikidea.ru

İnternet Kaynağı

<%1

7

Submitted to Marmara University

Öğrenci Ödevi

<%1

8

www.docstoc.com

İnternet Kaynağı

<%1

nek.istanbul.edu.tr:4444

