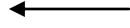


Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya
(sol yandaki gibi) olacak .



Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak



Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

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

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**PRİMER İMMÜN YETMEZLİK HASTALARINDA
TREC/ KREC ANALİZİ İLE T VE B HÜCRE GELİŞİMİ
KONTROLÜ**

GİZEM ŞENTÜRK

**DANIŞMAN
PROF.DR.MÜGE SAYITOĞLU
İKİNCİ DANIŞMAN
DOÇ.DR.ÖZDEN HATIRNAZ NG**

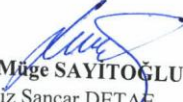
**GENETİK ANABİLİMDALI
GENETİK PROGRAMI**

İSTANBUL-2018

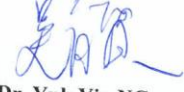
1. TEZ ONAYI

YÜKSEK LİSANS TEZİ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Genetik Anabilim Dalı, Genetik Programında Yüksek Lisans öğrencisi Gizem ŞENTÜRK tarafından Prof. Dr. Müge SAYITOĞLU'nun danışmanlığında hazırlanan "**Primer İmmün Yetmezlik Hastalarında TREC/KREC Analizi ile T ve B Hücre Gelişimi Kontrolü**" başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 14.09.2018 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.


Prof. Dr. Müge SAYITOĞLU
İ.Ü. Aziz Sancar DETAE
Genetik Anabilim Dalı


Doç. Dr. Ayşe Evrim BAYRAK
İ.Ü. Aziz Sancar DETAE
Genetik Anabilim Dalı


Doç. Dr. Yuk Yin NG
Bilgi Üni. Müh. ve Doğa Bil. Fak.
Genetik ve Biyomühendislik

2. BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Bio.GİZEM ŞENTÜRK

(İmza)



3. İTHAF

Annem,Babam ve kardeşlerime ithaf ediyorum.



4. TEŞEKKÜR

Aziz Sancar DETAE Genetik'te yüksek lisans eğitimime başladığımdan beri daima yol gösteren , sahip çıkan ve sabırlı olan sevgili çok değerli danışmanım Prof.Dr. Müge Sayitoğlu'na her türlü desteği için sonsuz teşekkür ederim.

Benim ikinci danışmanım olanneşeli, çok değerli Doç.Dr. Özden Hatırnaz NG ; zaman zaman kızsanızda defalarca çıkmayan deneylerimde sabırla hiçbir zaman yardımınızı ve desteğinizi esirgemediğiniz için size sonsuz teşekkür ederim.

Dear Doç.Dr. Yuk Yin Ng ; thank you for all support and sharing your information. You are very understanding and you have always helped me for my experiments.. I appreciate you for your labor.

Sevgili Dr. Sinem Fırtına ve Dr.Yücel Erbilgin ; Tez projeme başlarken deneyimlerinizi, bilgilerinizi benimle paylaştığınız ve mesleki anlamda kattıklarınız için çok teşekkür ederim.

Burada tanıştığım canım arkadaşım Genetik ve Biyomühendis Tuğçe Sudutan ; Yıllardır tanışıyormuşuz gibi hissettiğimin ve buradaki geçirdiğimiz zaman boyunca hep yanımda olduğun için sana çok teşekkür ederim. Zaman zaman ilginç deney sonuçlarıyla karşılaştığımızda ki surat ifadelerimizi ve bilgi alışverişlerimizi çok özleyeceğim. Güzel bir ikili olduk seninle umarım hayat boyu hep böyle devam eder.

Sevgili arkadaşım doktora öğrencisi Khusan Khodzhaev; Sende zaman zaman hazır cevap yapınla bizi kızdırsanda bizi desteklediğin ve her başımız sıkıştığında işini bırakıp yardım ettiğin için çok teşekkür ederim. Aziz Sancar DETAE 'nin bana kattığı güzel insanlardan birisin.

Hilal Şentürk ve Aslıhan Kaygusuz liseden beri ayrılmadık ve burdada yollarımız kesişti sizinle. Sizlerde manevi desteklerinizi esirgemediğiniz için çok teşekkür ederim. Her zaman yanımda olan değerli Lab3 arkadaşlarım Selin Demirer, Pınar Köseoğlu, Esra Kaynak, İrem Yağmur Diker, Aybike Özuynuk, Muhammet Abdülvahid Kalkan sizleride tanıdığım için kendimi çok şanslı hissediyorum. Sizlerinde destekleri için ayrı ayrı hepinize teşekkür ediyorum.

Beni her konuda her zaman destekleyen ve en büyük motivasyon kaynağım olan Can Önder, iyiki varsın ve hayatımdasın. Desteğin için çok teşekkür ederim.

Sevgili Uzm.Yeşim Kesim ve Uzm.Didem Altındirek ; neşeli ve anlayışlı hallerinizle sizin gibi insanları tanıdığım için çok mutluyum. Yüksek lisansım boyunca yardımlarınızı esirgemediğiniz için teşekkür ederim.

Bana hastalarımın toplanmasında ve bilgilerini almamda yardımcı olan, Doç.Dr. Ahmet Özen, Doç.Dr. Safa Barış, Doç.Dr.Elif Aydınır, Dr.Sevgi Bilgiç Ertan ve Uzm.Dr. Ayça Kıykım 'a teşekkürler.

Son olarak her zaman yanımda olan sevgili annem Sultan Şentürk, babam Hüseyin Şentürk ve canım kardeşlerim hayat boyu her konuda destek olduğunuz , bana güvendiğiniz ve stresli zamanlarımda bana katlandığınız için sizlere çok teşekkür ederim. Bana verdiğiniz bütün emekler için sizlere minnettarım.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No:30607

5. İÇİNDEKİLER

1. TEZ ONAYI	İİ
2. BEYAN.....	İİİ
3. İTHAF	İV
4. TEŞEKKÜR.....	V
5. İÇİNDEKİLER	Vİİ
6. TABLOLAR LİSTESİ.....	İX
7. ŞEKİLLER LİSTESİ	X
8. SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİİ
9. ÖZET	Xİİİ
10. ABSTRACT.....	XİV
11. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
12. GENEL BİLGİLER	2
12.1. İMMÜN SİSTEM VE LENFOSİT GELİŞİMİ	2
12.1.1. İmmün sistem ve elemanları	2
12.1.2. T Lenfosit Gelişimi	4
12.1.3. B Lenfosit Gelişimi	7
12.1.4. <i>TREC (T Cell ReceptörExcision Circle) - KREC (Kappa-Deleting Recombination Excision Circle)</i> OLUŞUMU.....	8
12.1.5. <i>TREC/KREC İLE İLGİLİ TARAMA TESTLERİ</i>	12
12.2. PRİMER İMMÜN YETMEZLİKLER (PİY).....	14
12.2.1. Primer Antikor Yetersizlikleri (PAY).....	16
12.2.2. Yaygın-Değişken İmmün Yetersizlikleri (YDİY)	17
12.2.3. Somatik Hipermutasyon ve Bozukluğu	18
12.2.4. Ağır Kombine İmmün Yetersizlikler (AKİY)	19
12.2.5. Primer İmmün Yetmezlik Hastalarında Tedavi Seçenekleri.....	20
13. GEREÇ VE YÖNTEM.....	22
13.1. GEREÇ	22
13.1.1. Hasta ve Kontrol Seçimi	22
13.1.2. PZR materyali	28
13.1.3. Kullanılan Cihazlar	28

13.1.4. Kullanılan Kitler	29
13.1.5. Kullanılan Kimyasallar	29
13.1.6. Tampon çözeltiler	29
13.2. YÖNTEM	30
13.2.1. DNA izolasyonu ve miktar tayini	30
13.2.2. PLAZMİD ÜRETİMİ	31
13.2.2.1. Transformasyon.....	31
13.2.2.2. Plazmiden DNA izolasyonu	32
13.2.2.3. Polimeraz zincir reaksiyonu	32
13.2.2.4. Agoroz jel Hazırlama	34
13.2.3. PLAZMİD KOPYA SAYISI HESABI.....	35
13.2.4. RT-PZR <i>TRAC/TREC/KREC</i>	36
13.2.5. <i>TRAC-TREC-KREC</i> KOPYA SAYISI HESABI	39
13.2.6. İstatistiksel Analiz.....	40
14. BULGULAR.....	41
14.1. Yetişkin ve Pediatrik Hastalarda <i>TREC/KREC</i> Kopya Sayıları	41
14.2. Hastalık altı gruplarına göre (PAY, YDİY ve AKİY) <i>TREC/KREC</i> kopya sayılarının değerlendirilmesi.....	43
14.3. Yaş aralıklarına göre sağlıklı kontrollerde <i>TREC/KREC</i> kopya sayısı analizi	47
14.4. Yaş aralıklarına göre immün yetmezlik hastalarında <i>TREC/KREC</i> kopya sayısı analizi	48
14.5. Mutasyona sahip olan hastalarda <i>TREC/KREC</i> kopya sayıları.....	52
15. TARTIŞMA	53
16. KAYNAKLAR	59
17. HAM VERİLER	63
18. FORMLAR	64
19. ETİK KURUL KARARI	65
20. PATENT HAKKI İZNİ	68
21. İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	69
22. ÖZGEÇMİŞ	70

6. TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1:İmmün sistem ve elemanları.....	2
Tablo 2:Primer İmmün Yetersizliklerin sınıflandırması (24)	15
Tablo 3: Pediatrik Hasta Klinik Bilgileri	24
Tablo 4: Yetişkin hasta klinik bilgileri	27
Tablo 5: PZR da kullanılan malzemeler ve konsantrasyonları	34
Tablo 6: Konsantrasyona göre plasmid dilüsyon hesabı	35
Tablo 7:Standart Konsantrasyonları	36
Tablo 8: <i>TRAC</i> , <i>TREC</i> ve <i>KREC</i> primer/prob dizileri	36
Tablo 9: RT-PCR Karışımı	37
Tablo10: LIGHTCYCLER 480 çalışma şeması	37
Tablo 11: Standartlarda hedeflenen kopya sayısı ve RT-PCR da elde edilen konsantrasyonlar	38
Tablo12:Örnek kopya sayısı hesabı	40
Tablo13: Yetişkin hasta grubu ve kontrol grubundaki <i>TREC/KREC</i> sayıları	43
Tablo 14: Pediatrik hastalar ve yaş uyumlu kontrollerde saptanan <i>TREC/KREC</i> kopya sayıları.....	45
Tablo 15: Mutasyon sahibi hastalarda <i>TREC/KREC</i> kopya sayıları.....	52

7. ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1:Doğal ve edinsel bağışıklık sistem elemanları (2).....	3
Şekil 2: Kan kök hücrelerinin gelişimi ve oluşturduğu hücreler (http://www.cancer.gov/).	4
Şekil 3: T lenfosit gelişimi (7)	6
Şekil 4: B lenfosit gelişimi aşamaları (11).....	7
Şekil 5: T ve B hücre reseptör yapısı	9
Şekil 6: Değişken Bölgede V(D)J Gen Düzenlenmesi ile Halkasal DNA Oluşumu.....	10
Şekil 7: <i>TREC</i> oluşumu (18).....	11
Şekil 8: <i>KREC</i> oluşumu (18)	12
Şekil 9: <i>TRAC</i> geninin 14.kromozom üzerindeki lokalizasyonu.....	13
Şekil 10: YDİY hastalığına sebep olan genler ve görülme sıklıkları (35).....	18
Şekil 11:AKİY sınıflandırması ve sık görülen gen mutasyonları.....	20
Şekil 12:Pediyatrik Hasta Sağlayan Kurumlar	22
Şekil13:Yetişkin Hasta Sağlayan Kurumlar	23
Şekil 14: Pediyatrik ve Yetişkin Hasta Grubu Dağılımları.....	23
Şekil 15: DNA izolasyon aşamaları.....	31
Şekil 16: QIAGEN kit protokolü ile plazmid DNA eldesi	32
Şekil 17: 3 bölge içeren plazmid haritası (20).....	33
Şekil 18: Plazmidten yapılan PZR jel görüntüsü	34
Şekil 19: <i>TRAC</i> gen bölgesi için elde edilen plazmid standart eğrisi	38
Şekil 20: <i>TREC</i> gen bölgesi için elde edilen plazmid standart eğrisi	39
Şekil 21: <i>KREC</i> gen bölgesi için elde edilen plazmid standart eğrisi.....	39
Şekil 22:Yetişkin immün yetmezlik hastalarında ve kontrollerde a) <i>TREC</i> kopya sayıları b) <i>KREC</i> kopya sayıları. Kırmızı çizgi kontrol grubunun en alt sınırını (en düşük kopya sayısını) temsil etmektedir.	41
Şekil 23: Pediyatrik immün yetmezlik hastalarında ve kontrollerde a) <i>TREC</i> kopya sayıları b) <i>KREC</i> kopya sayıları. Kırmızı çizgi kontrol grubunun en alt sınırını (en düşük kopya sayısını) temsil etmektedir.	42
Şekil 24: Yetişkin PAY grubu hastalarının a) <i>TREC</i> kopya b) <i>KREC</i> sayısı bakımından control grubuyla karşılaştırılması.	44

Şekil 25: Pediatrik AKİY grubu hastaların kontrol grubuyla a) <i>TREC</i> kopya sayısı b) <i>KREC</i> kopya sayısı (Kırmızı nokta: PEDİY53, Mavi nokta: PEDİY54 no'lu hasta).....	45
Şekil 26: PAY hasta grubunun kontrol ile <i>TREC/KREC</i> kopya sayısı bakımından karşılaştırılması.....	46
Şekil 27: Yetişkin kontrol grubu yaş aralıklarına göre <i>TREC/KREC</i> kopya sayısı	47
Şekil 28: Pediatrik kontrollerin yaş aralıklarına göre <i>TREC/KREC</i> kopya sayıları	48
Şekil 29: Yetişkin hastaların ve kontrollerin yaş aralıklarına göre <i>TREC/KREC</i> kopya sayıları.....	49
Şekil 30: Pediatrik hastalarda yaş aralıklarına göre a) <i>TREC</i> kopya sayısı b) <i>KREC</i> kopya sayısı.....	50
Şekil 31: Cinsiyete göre a) <i>TREC</i> kopya sayısı b) <i>KREC</i> kopya sayısı (PEDİY E: Pediatrik erkek, PEDİY K= Pediatrik kadın).....	51
Şekil 32: Yetişkin hastalarda cinsiyete göre <i>TREC/KREC</i> kopya sayıları	51



8. SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

- *KREC*: “Kappa-deleting recombination excision circle”- B hücre dairesel DNA artığı
- *TREC*: “T-cell receptor excision circle”- T hücre dairesel DNA artığı
- *TRAC*: “T-cell receptor alfa constant gene” T hücre reseptör alfa sabit geni
- Ig: Immunoglobulin
- PZR: Polimeraz zincir reaksiyonu
- RT-PZR: ‘Real Time’ polimeraz zincir reaksiyonu- Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
- AMP: Ampisilin
- E.coli: Esheria coli
- THR: T hücre reseptör
- S1P: Sfingosit fosfat
- RAG1/2: Rekombinasyon aktive edici genler 1 ve 2
- BHR: B hücre reseptör
- PİY: Primer immün yetersizlik
- AKİY: Ağır kombine immün yetersizlik
- YDİY: Yaygın değişken immün yetersizlik
- PAY: Primer antikor yetersizlik
- NK hücreleri: ‘Natural Killer’ Doğal Öldürücü Hücreler

9. ÖZET

Şentürk, G.(2018). Primer İmmün Yetmezlik Hastalarında *TREC/KREC* Analizi ile T ve B Hücre Gelişimi Kontrolü. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik A.D.Yüksek Lisans Tezi, İstanbul

Primer immün yetmezlik (PİY); bağışıklık sisteminin işlevini bozan nadir genetik bir hastalık grubudur. Ülkemizde akraba evlilikleri oranının yüksek olması nedeni ile Avrupa ülkelerine oranla beklenenden daha sık karşılaşılan klinik bir durumdur. T ve B hücre gelişiminin PİY tanısı açısından incelenmesi önem teşkil etmektedir. T ve B hücre gelişimi somatik rekombinasyonları esnasında oluşan '*TREC*' (*T cell reseptör excision circle*) ve '*KREC*' (*kappa-deleting excision circle*) T ve B hücrelerinin halkasal DNA parçalarıdır. Bu yüzden PİY için T ve B hücre gelişimini anlamada biyobelirteç olarak kullanabilirler. Bu tez çalışmasında 57 pediatik, 29 yetişkin PİY hastalarında T ve B hücre gelişiminin incelenmesi için hastalardan alınan kandan gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PZR) ile yaşa bağlı olarak *TREC/KREC* analizi yapılması amaçlanmıştır. Önceden mutasyon saptanmış ve/veya farklı genetik sendromlara sahip hastalarda da *TREC/KREC* seviyeleri belirlenmiştir. Kontrol grubu olarak immün yetersizlik ve hematolojik hastalıklar dışındaki sebeplerle biyokimya birimine başvuran hastalar ise sağlıklı referans değerini belirlenmesi için kullanılmıştır. Çalışmaya göre yetişkin PİY hastalarının kontrol grubuna göre *TREC* kopya sayısı bakımından anlamlı derecede daha az seviyelerde olduğu görülmüştür (t-test $p<0.0001$). Buna karşın *KREC* kopya sayısında anlamlı olmamakla beraber kontrol grubuna göre daha az seviyelerde olduğu görülmüştür (t test $p=0.1461$). Pediatik PİY hastalarında *TREC/KREC* kopya sayılarının ise anlamlı derecede düşük kopya sayısına sahip olduğu gözlenmiştir (t test $p<0.0001$). Yaş gruplarına ayrıldığında yetişkin hastaların *TREC* kopya sayısının anlamlı derecede zamanla azaldığı, *KREC* kopya sayısının anlamlı olmamakla beraber yaşa bağlı değişmediği belirlenmiştir. Pediatik hastalarda *TREC/KREC* kopya sayısının yaşa bağlı olarak değişimi gözlenmemiştir. Mutasyon sahibi hastalarda *TREC/KREC* seviyeleri belirlenerek mutasyonun fonksiyonel etkileri ortaya konulmuştur. İmmün yetmezlik ve mutasyonlu bireylerde T ve B hücrelerinin fonksiyonel olamaması veya olgunlaşamamasından dolayı *TREC/KREC* kopya sayılarının kontrollere göre daha az kopya sayısı içerdiği tespit edilmiştir. Yaşla bağlı değişimlerde timik aktivitenin zamanla azalması *TREC* kopya sayısının azalmasına sebep olmuştur. *KREC* kopya sayılarının ise kemik iliği kökenli olduklarından yaşla bağlı değişmediği ortaya konulmuştur.

Anahtar Kelimeler: Primer İmmün Yetersizlikler, *TREC*, *KREC*, T hücre gelişimi, B hücre gelişimi

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TYL-2018-30607

10. ABSTRACT

Şentürk Gizem, A.B. (2018). Control Of T And B Cell Development by *TREC/KREC* Analysis in Primer immunodeficiency Patients. Istanbul University, Institute of Health Science, Department of Genetics. Master thesis Istanbul. 2018

Primer immunodeficiency (PID); is a rare genetic disorder that disrupts the function of the immune system. It is important to examine T and B cell development in terms of PID diagnosis. The *TREC* (*T cell reseptor excision circle*) and *KREC* (*kappa-deleting excision circle*) are formed during somatic recombination of T and B cell development that are the circular DNA fragments of T and B cells. Therefore, they can use T and B cell development for PID as a biomarker. In this thesis *TREC/KREC* analysis were performed with real time quantitative polymerase chain reaction (RT-PCR) from patients and age related controls in order to examine T and B cell development in PID patients. *TREC/KREC* levels were also determined in patients with pre-mutations and/or different genetic syndromes. As a control group, patients who applied to biochemical unit, exculuding immunodeficiency and hematologic diseases, were used to determine healty reference value. According to the study, adult PID patients were found to have significantly lower levels of *TREC* copy number than control group (t test $p < 0.0001$). In contrast, *KREC* was not significant in the number of copies, but was founda to be less than control group (t test $p = 0.1461$) In pediatric PID patients, *TREC/KREC* copy numbers were found to have a significantly lower number of copies (t test $p < 0.0001$). It was determined that the number of *TREC* copies of adult patients decreased significantly over time when separated into age groups, while the number of *KREC* copies did not change as age related. Age- related changes in the number of *TREC/KREC* levels were determined in patients with mutations related to immunodeficiency reveal the functional effects of the mutations. It has been found that *TREC / KREC* copy numbers in immunodeficient and mutated individuals are lower than controls because of T and B cells can not be functional or mature. Decreased thymic activity with time in age-related changes led to a reduction in the number of copies of *TREC*. Since *KREC* copy numbers are bone marrow origin, it has been shown that they do not change with age.

KeyWords: Primer immunodeficiency, *TREC*, *KREC*, T cell development, B cell development

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. TYL-2018-30607

11. GİRİŞ VE AMAÇ

Primer immün yetersizlik (PİY); Bağışıklık sisteminin gelişim ve işlevini bozan heterojen nadir görülen bir hastalık grubudur. Ülkemizde akraba evliliklerinin olması sebebiyle görülme sıklığının daha fazla olduğu düşünülmektedir. Fakat tam olarak prevalansı bilinmemektedir. PİY bağışıklık sisteminin bileşenine göre sınıflandırılmaktadır. Primer immün yetmezlik hastalığının büyük bir kısmını hümmoral immün sistem bozukluğu kapsamaktadır. Bunun yanı sıra T hücre defektleri, ağır kombine yetmezlikler, kompleman sistem bozuklukları oluşturmaktadır. PİY hastalığının erken teşhis ve tedavilerin yapılabilmesi için T ve B hücre gelişimlerini incelemek ve gelişimleri sırasında meydana gelen değişiklikleri gözlemlemek PİY tanısı için önem teşkil etmektedir. Çünkü hümmoral ve hücreyel yanıtta sorumlu olan bu hücrelerin olgunlaşma aşamalarını anlamak, somatik rekombinasyonları esnasında meydana gelen durumları incelemek ve yorumlamak hastalığın olası tedavilerinin yapılabilmesini sağlar. *TREC* (T cell excision circle) ve *KREC* (kappa- deleting recombination excision circle) T ve B hücrelerinin rekombinasyonları esnasında ortaya çıkan“halkasal DNA parçalarıdır. T ve B hücre belirteçleri olarak *TREC/KREC* analizinin yapılması PİY hastalığının erken teşhisi için avantaj sağlar. Bu tez projesinde primer immün yetmezlik (PİY) tanısı almış yetişkin ve pediatrik hastalarda, yaşa bağılı olarak *TREC/KREC* analizi ile T ve B hücre gelişimini kontrol etmeyi amaçladık. Aynı zamanda gen mutasyonu analizi ile moleküler karakterizasyonu yapılmış hastalarda mutasyonun T ve B hücre gelişimine etkilerini belirlemek amacıyla *TREC/KREC* seviyeleri çalışılmıştır. Hastalardan alınan periferik kan örneklerinde kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) ile *TREC* ve *KREC* seviyeleri belirlenmiştir. Böylelikle PIY hastalarında T ve B hücre gelişimi kontrol edilerek, olası tedavilerin erkenden başlaması sağlanabilecektir.

12. GENEL BİLGİLER

12.1. İMMÜN SİSTEM VE LENFOSİT GELİŞİMİ

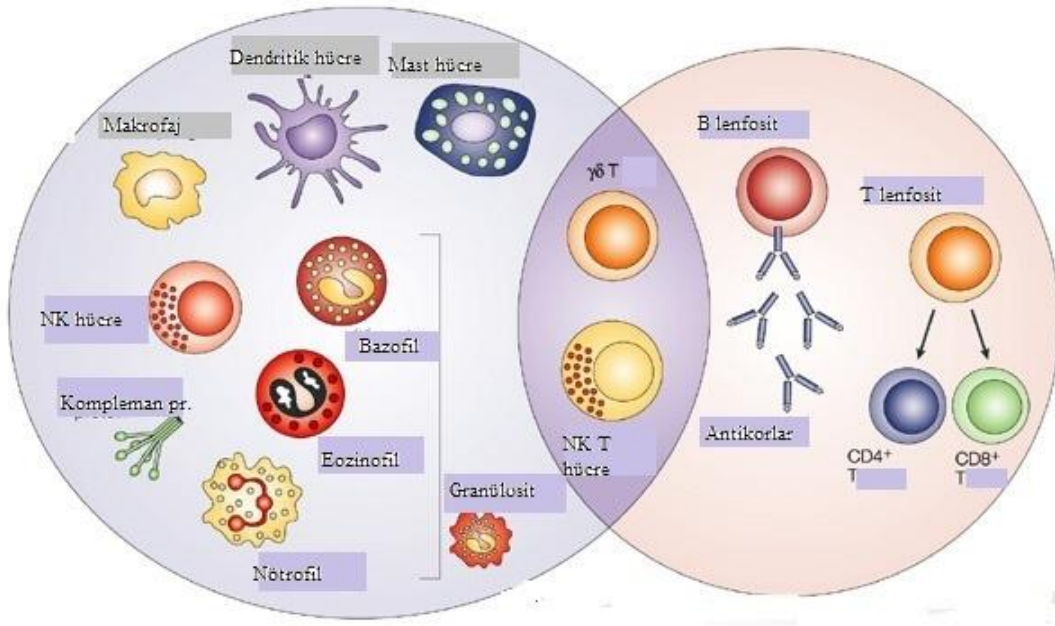
12.1.1. İmmün sistem ve elemanları

İmmün sistem (immünite), vücudumuzda spesifik ve non-spesifik patojenlere karşı savunma yapan bir mekanizmadır. İmmün sistemin amacı yabancı maddeleri tanıyarak onlara karşı bir yanıt oluşturmaktır. Vücuda giren yabancı maddelere karşı hümmoral ve hüccresel mekanizmalarla savunma gösteren bu sistemde birçok organ, doku ve hücreler görev almaktadır. İmmün sistemde görevli primer ve sekonder olmak üzere 2 lenfoid organ bulunmaktadır. Primer lenfoid organlar T ve B hücrelerinin olgunlaşma süreçlerini tamamladıkları organlardır. Sekonder lenfoid organlar; lenf nodülleri, dalak, apendiks gibi organlardır ve yanıt oluşması için uygun ortam sağlarlar. Bağışıklık sistemi elemanları doğal bağışıklık ve sonradan kazanılan (edinsel) bağışıklık olmak üzere 2 kısma ayrılır (Tablo 1).

Tablo 1: İmmün sistem ve elemanları

İMMÜN SİSTEM ELEMANLARI	
DOĞAL BAĞIŞIKLIK	EDİNSEL BAĞIŞIKLIK
Fagositik hücreler Kompleman sistemleri Akut-faz proteinleri NK hücreleri Sitokinler Kemokinler	T Lenfositleri B lenfositleri

Doğal bağışıklık sistemi doğuştan kazanılan bağışıklık sistemidir ve vücudumuz yabancı bir maddeyle karşılaştığında ilk olarak görev alan ve hızlı cevap veren sistemimizdir. Sınırlı sayıda antijeni tanıyabilme kapasitesi vardır. Bu sistemde cilt, mukoza membranları, gastrik pH, mukus salgıları ve fagositik hücreler olan makrofaj, eozonofiller, monosit, nötrofiller, doğal öldürücü (natural killer) hücreleri, akut-faz proteinleri, interferonlar yer alır (1) (Şekil 1).

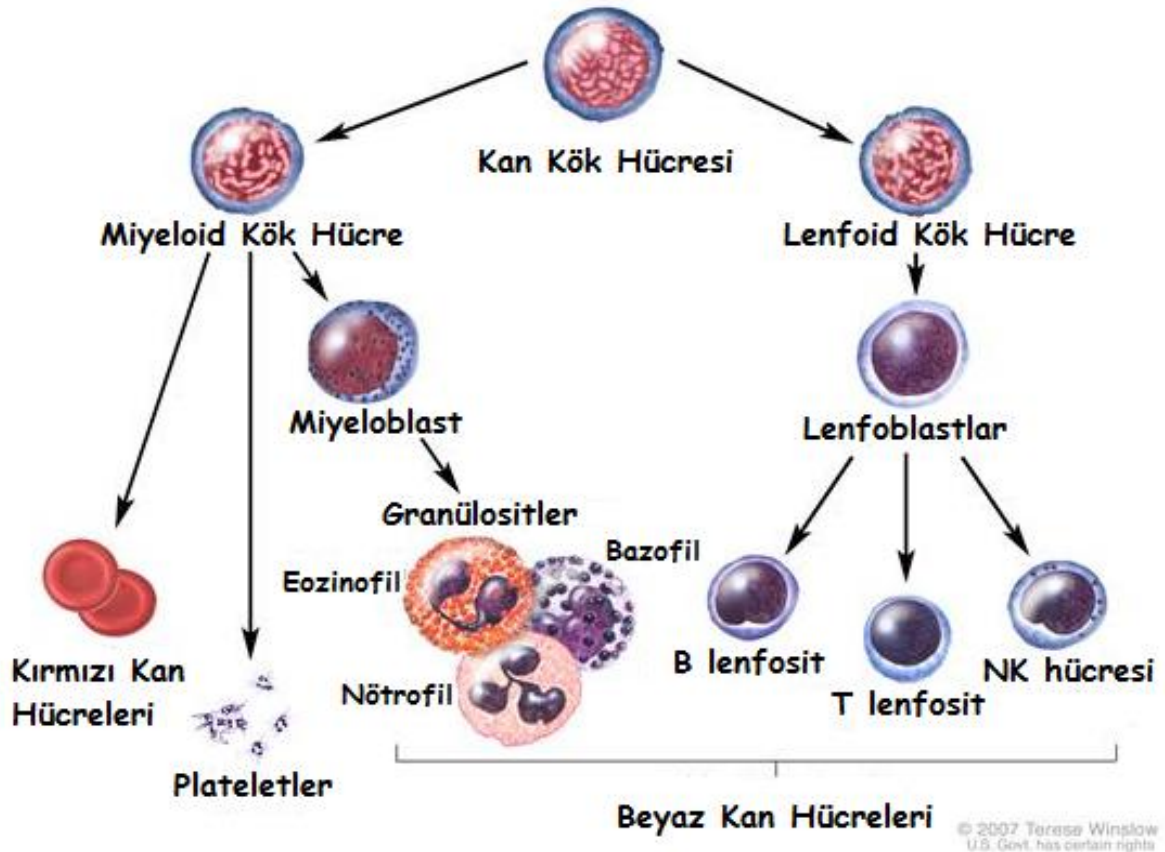


Şekil 1: Doğal ve edinsel bağışıklık sistem elemanları (2)

Sonradan kazanılan (edinsel) bağışıklık sistemi doğuştan gelen bağışıklık sistemimiz ile vücut savunmada bulunamayıp cevap oluşturamazsa aktifleşir. Eğer kişi daha önce bir patojenle karşılaştıysa aynı patojenle tekrar karşılaştığında daha kuvvetli bir yanıt oluşur. Çünkü bu sistemde bellek özelliği vardır. Bu yanıt günler ve haftalar arasında değişiklik gösterir. Bu bağışıklık sisteminde T ve B lenfositleri yer almaktadır ve bu elemanları diğer sistem elemanlarından ayıran en önemli özellikler reseptör oluşturmaları ve farklılaşabilmeleridir. Bu sayede geniş bir immün repertuar oluşturulur. Edinsel immün yanıtta 2 şekilde yanıt gerçekleşir. Birincisi, B lenfositleri ile oluşan hümaral yanıttır. Hümaral yanıtta uyarıcı hücreler hücre dışı antijenik moleküller ve mikroorganizmalardır. Elemanları ise antikorlar ve komplemanlardır. Bu antikorlara immünglobulin de denilir. Bu antikorlar belleğe daha önceden karşılaşılmış olan ajanı kaydeder ve bir sonrakinde daha hızlı ve güçlü yanıt oluşmasında etkili olur. B lenfositlerinin antijen ile karşılaştığında klonal çoğalmasıyla antijene özgü olan immünglobulin üretimi başlar. B lenfositleri antikorlar aracılığıyla hümaral yanıtı gerçekleştirir. Diğer yanıt sistemi ise T lenfositleri ile gerçekleşen hücresel yanıttır. T hücre reseptörünün (TCR) spesifik hale gelmesi için yeniden düzenlenmesi antijenlere karşı bağışıklık kazandırır. Hücresel yanıtta görev alan elemanlar sitotoksik T lenfositleri, aktive makrofajlar ve NK hücreleridir (1).

12.1.2. T Lenfosit Gelişimi

Hematopoetik öncül hücreler (progenitörler) T ve B lenfositlerinin köken aldıkları hücrelerdir. Kan kök hücreleri miyeloid ve lenfoid kök hücre olmak üzere farklılaşırlar ve lenfoid kök hücrelerden B ve T lenfositleri oluşur.



Şekil 2: Kan kök hücrelerinin gelişimi ve oluşturduğu hücreler (<http://www.cancer.gov/>).

T lenfositlerinin gelişimi organizma için son derece dinamik bir süreçtir. Kemik iliği tarafından üretilen T lenfositleri, diğer hematopoetik hücre kökenli olan hücrelerden farklı olarak gelişimini kemik iliğinde tamamlamazlar. Kemik iliği kaynaklı olan T lenfositleri primer lenfoid organlardan biri olan timusagöç ederler ve gelişimlerini burada tamamlarlar (3). Timus göğüs kafesinin arkasında kalbin üzerinde bulunan bilateral organdır. Kemik iliği progenitörleri dolaşıma girerek timusa göç ederler ve burada T hücre soyuna girerek T lenfositlerine olgunlaşırlar. Timik progenitörlerin kendi kendini yenileme özellikleri olmadığı için progenitörlerin sürekli olarak kemik iliğinden ithal edilmesi gerekir. Böylelikle timus T hücre gelişimini devam ettirebilir (4).

T hücre gelişimi, CD4 ve CD8 gibi önemli yüzey/ membran moleküllerinin ekspresyonu ile karakterize edilebilen bir dizi ayrı fenotipik aşamadan geçmektedir (Şekil2). İnsanlarda ve farelerde timosit gelişimi, ardışık ;

CD4-CD8- (çift negatif, ÇN),

CD4 + CD8 + (çift pozitif, ÇP),

CD4 + CD8 + veya CD8 + CD4- (tek pozitif TP)

şeklinde T lenfosit öncülleri 3 ayrı grupta toplanır(5).

ÇN hücrelerinin fenotiplerine göre 4 ayrı populasyona ayrılmaktadır;

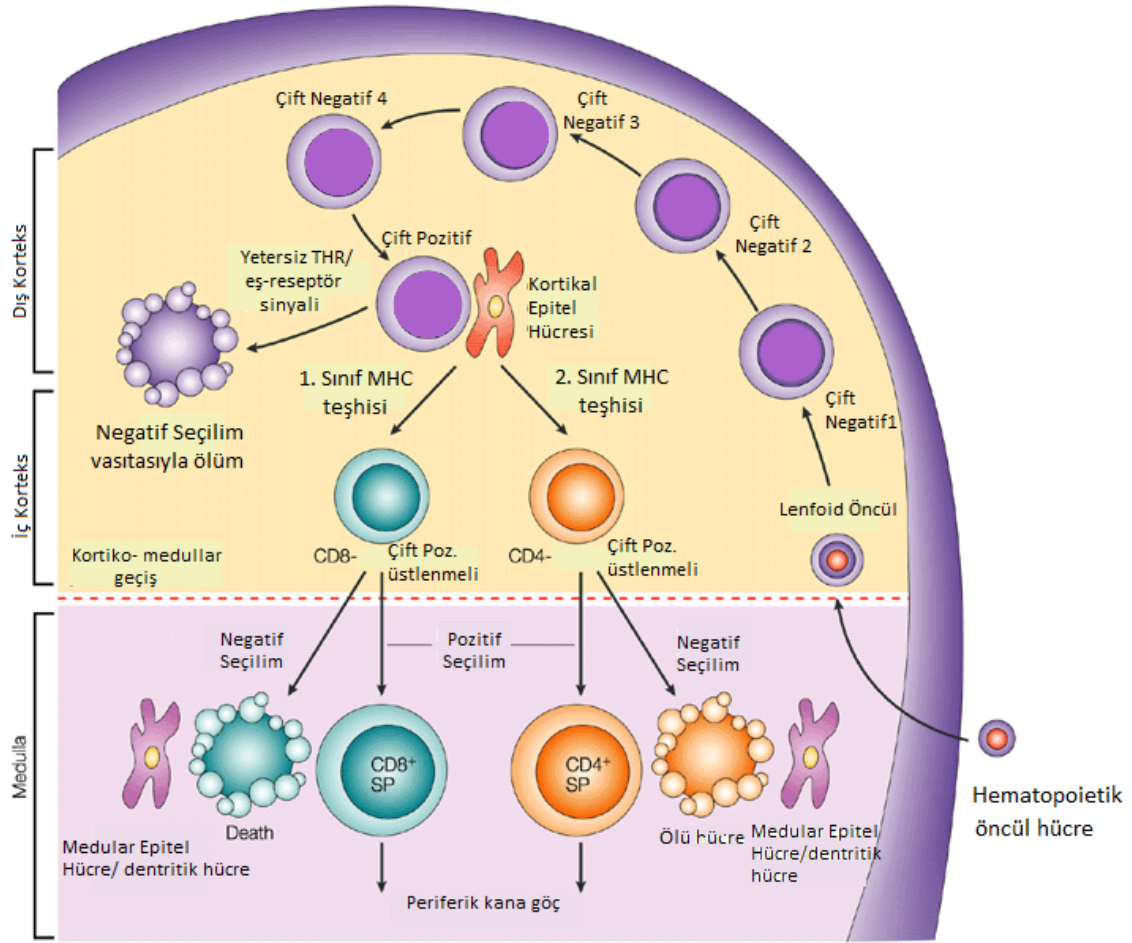
ÇN1(CD44+CD25-),

ÇN2(CD44+CD25+),

ÇN3(CD44-CD25+) ,

ÇN(CD44-CD25-)

ÇN3(CD44-CD25+) timosit grubu, CD27 yüzey markerının ekspresyon seviyesine göre ÇNa (CD27 düşük) ve ÇNb (CD27yüksek) olmak üzere iki alt gruba ayrılmaktadır. ÇNa timositleri ÇNb hücrelerine göre daha küçük hücrelerdir. Bu hücreler T lenfositlerine farklılaşma yeteneğine sahiptirler. ÇN2 ve ÇN3 hücreleri varolan T hücre reseptörlerinin (*THR*) öncülleridir. Bu reseptörler *THRaβ* ve *THRγδ* reseptörleridir. ÇP timositler *THRaβ* kompleksini çok az içermektedirler. Timositlerin *THRaβ* kompleksi MHC molekülünü bulunduran stromal hücrelerle iletişime girerek bu iletişim sonucu düşük ilgi gösteren timositler indüklenmiş olurlar. Bu olaya pozitif seleksiyon denir ve timusun korteksinde gerçekleşmektedir (6).



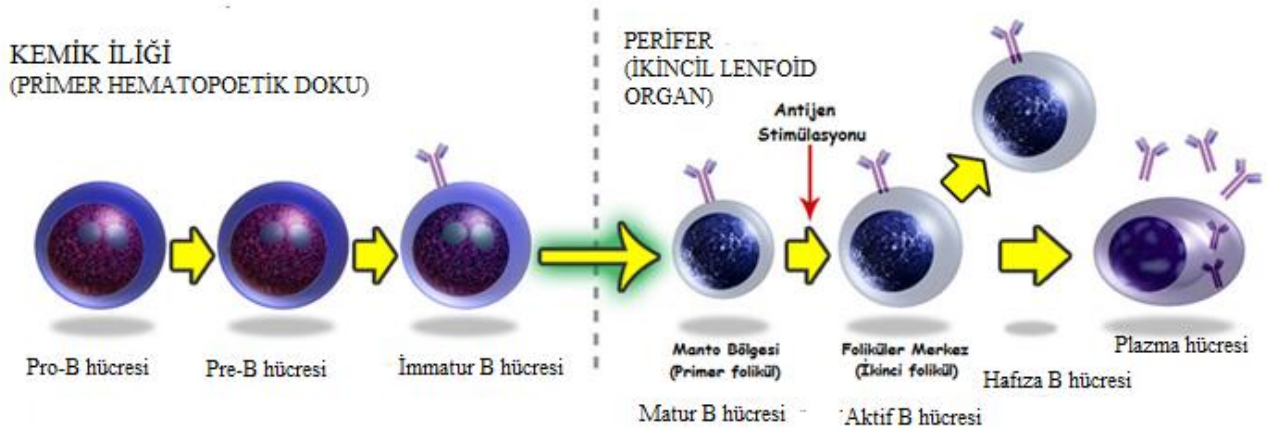
Nature Reviews | Immunology

Şekil 3: T lenfosit gelişimi (7)

Pozitif seleksiyonu kortekste gerçekleşen T lenfosit öncülleri sinyallerle medullaya geçerek burada MHC moleküllü stromal hücrelerle büyük derecede etkileşim sağlayarak ölüme giderler. Bu durum negatif seleksiyon olarak adlandırılır. Negatif seleksiyonda medulla kısmında bulunan bir çok dentrik hücre ve epitelyal hücre görev almaktadır. Bu seleksiyon sayesinde olgunlaşmamış olan timositler dışlanmış olur. Primer lenfoid organlarda timositlerin bu seleksiyonla dışlanması ‘sentral tolerans’ olarak adlandırılmaktadır (8). T lenfositleri gelişimini timusta sağladıktan sonra buradan çıkışı S1P (Sfingosin-fosfat1) sinyaliyle gerçekleşmektedir. Son zamanlardaki çalışmalar lenfoid ve non-lenfoid organlardan T hücre çıkışının anahtar düzenleyicisinin S1P sinyalinin olduğunu göstermektedir (9).

12.1.3. B Lenfosit Gelişimi

B hücreleri bağışıklığın merkezi unsurlarıdır ve neredeyse sınırsız sayıda patojene karşı savunma sağlayan antikör oluşmasını sağlayabilen hücrelerdir. B hücre gelişiminde meydana gelen bozukluklar otoimmün bozukluklara, malignatilere, bağışıklık yetersizliklerine ve alerjilere yol açmaktadır. B hücreleri ve gelişimi hemotopoetik progenitörlerden köken almaktadırlar. Pluripotent hücreler, myeloid ve lenfoid olarak farklılaşır ve lenfoid öncül hücrelerde B lenfosit ile birlikte T ve NK hücrelerine farklılaşmaktadırlar. B hücreleri kemik iliğinden köken alarak T hücrelerinin aksine gelişiminide burada sürdürürler (10) (Şekil 4).



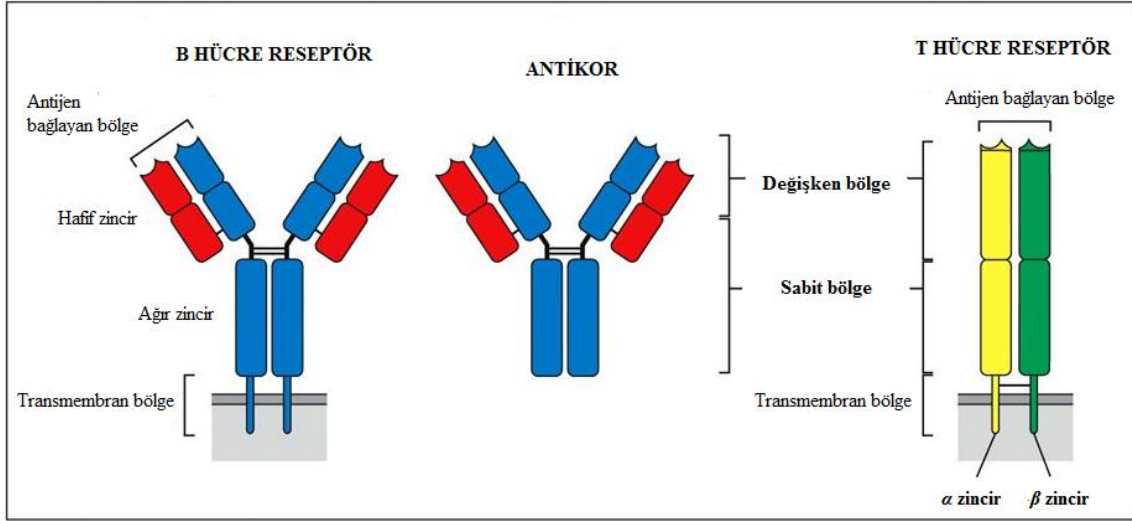
Şekil 4: B lenfosit gelişimi aşamaları (11).

Farklılaşma sırasında yüzey belirteçleri dışında B ve T hücre reseptörlerin düzenlemeleride gerçekleşir. Lenfoid progenitör hücreler, B lenfosit olmak amacıyla koşullanırlar ve bu progenitörler erken B hücresi (pro-B) adını alır. Transkripsiyon faktörü olan IL-7 erken B hücrelerine bağlanarak V(variable)- D(diversity)- j(joining) rekombinasyonunun gerçekleşmesini sağlayan genleri aktive eder ve antijen reseptörleri oluşturur. Öncü B hücresi adını (pre-B) alırlar. Antikör genlerini rekombinasyonla başarılı şekilde birleştiren hücreler kemik iliğini terk ederler. Ancak hala tam olarak olgunlaşmamıştır ve geçiş B hücreleri adını alırlar. Sonunda hücre yüzeyinde B hücre reseptörleri (BHR) olarak bulunan antikörler tarafından tanınan ve antijen tarafından aktive edilebilen olgunlaşmamış naif hücrelere dönüşürler. Olgunlaşma süreci boyunca kendiliğinden reaktif B hücre reseptörleri taşıyan çoğu B hücresi silinir. Bu bağışıklık ve geçiş

aşamaları esnasında çoğunlukla oto-antijenler ile B hücre reseptörleri (BHR) arasındaki etkileşime bağlıdır. Olgun naif B hücrelerinin yalnızca küçük bir kısmı antijen tarafından aktive edilir. Buda klonal gelişme ve farklılaşmaya yol açar. B hücre reseptörüne antijen bağlanması foliküldeki B hücrelerini aktive eder ve ayrılmasını sağlar. Antijenle aktive olan B hücreleri aynı antijendeki peptidleri tanıyan $CD4^+$ T folikül yardımcı hücrelerle aynı kökenli MHC-THR etkileşimini gerçekleştirirse hücre sinyal değişimi yapar ve bazı B hücreleri çoğaldığında B hücresi lenfoid foliküllerine yeniden girer ve germline merkez oluşturur. B hücreleri gelişimini ikincil lenfoid organlarında devam ettirerek hafıza veya plazma hücrelerine dönüşürler (12).

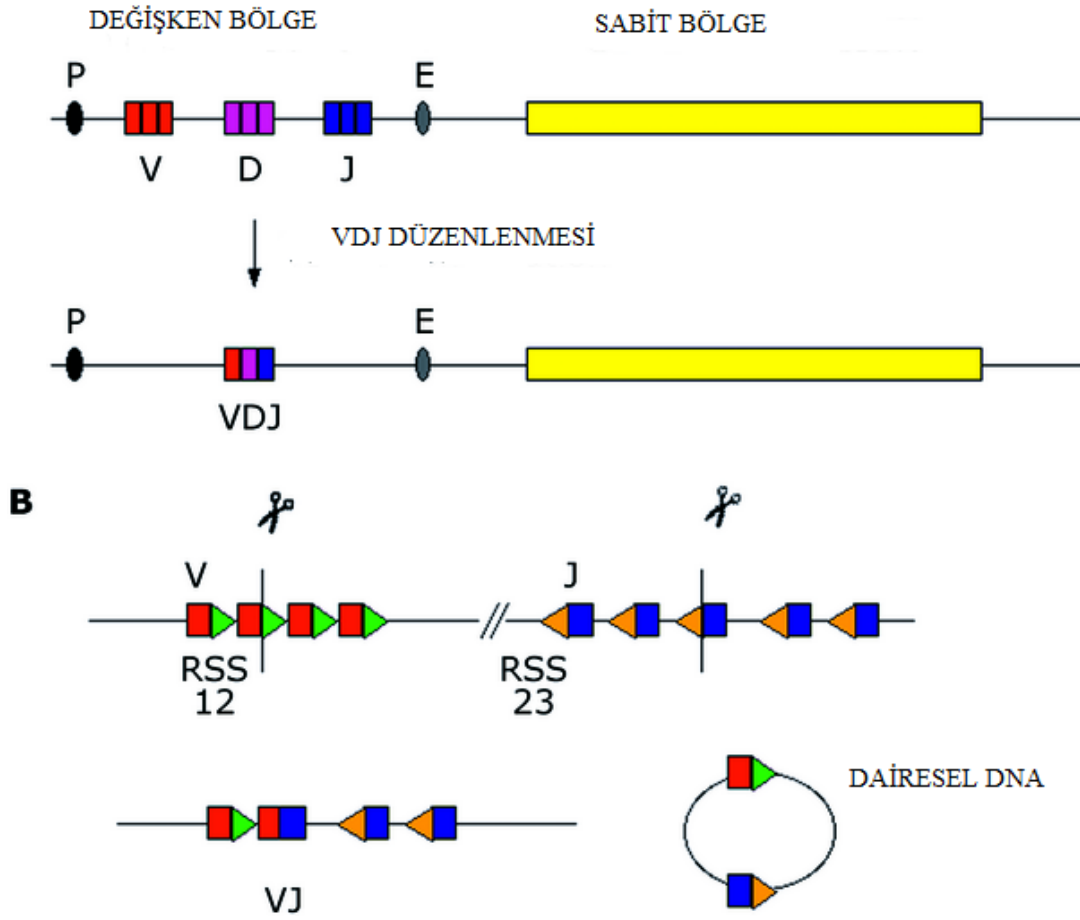
12.1.4. TREC (T Cell Receptor Excision Circle) - KREC (Kappa-Deleting Recombination Excision Circle) OLUŞUMU

Timus ve kemik iliği farklılaşmamış hemotopoetik hücrelerden yeni T ve B hücresi oluşumunu sağlayan önemli anatomik bölgelerdir. T ve B hücre olgunlaşırken son aşamaya gelmeden önce programlanmış ve sıralı gen düzenlemelerine bağlı olarak farklı olgunlaşma adımlarına girerler (13). Olgunlaşabilmeleri için uygun bir VDJ rekombinasyonu yapmak zorundadırlar. Rekombinasyona (yeniden düzenleme) *RAG1* ve *RAG2*'den (rekombinasyon aktive edici genler 1 ve 2) oluşan spesifik lenfoid rekombinazlar aracılık eder. *RAG1* proteini 12 veya 23 baz çifti boşluklar ile ayrılmış olan heptomerlerden ve nanomerden oluşan yüksek derecede korunmuş RSS (rekombinasyon sinyal sekansları) ile spesifik olarak ayrılır. *RAG1/2* kompleksi V(D)J düzenlemeleri için gerekli gen parçalarındaki RSS lerin tanınıp DNA' nın kırılma işlemini gerçekleştiren genlerdir. Tek tek V(D)J gen segmentlerini çevreleyen RSS'ler her bir antijen reseptör lokusu boyunca dağılır(14). Toplamda 7 antijen reseptör lokusu vardır ve bunlardan 4 tanesi T hücre reseptör (THR) lokusu olan *THRG* (T hücre reseptörü γ), *THRA* (T hücre reseptörü α), *THRD* (T hücre reseptörü δ) ve *THRB* (T hücre reseptörü β) lokuslarıdır. 3 tanesi ise B hücresi spesifik immünoglobün geni *Igh* (İmmünoglobün ağır lokus), *Igk* (İmmünoglobün kappa lokus), *IgL* (İmmünoglobün lambda lokus) lokuslarıdır. Ig yapısal olarak değişken ve sabit bölgelerden oluşmaktadır. B hücre reseptörü ağır ve hafif zincirlerden oluşmaktadır ve hafif zincir kısmı antijenleri bağlayan bölgedir. T hücre reseptöründe yapısal olarak farklı yapıya sahiptir. T hücre reseptörleride α ve β zincirlerinden oluşurlar (Şekil 5).



Şekil 5: T ve B hücre reseptör yapısı

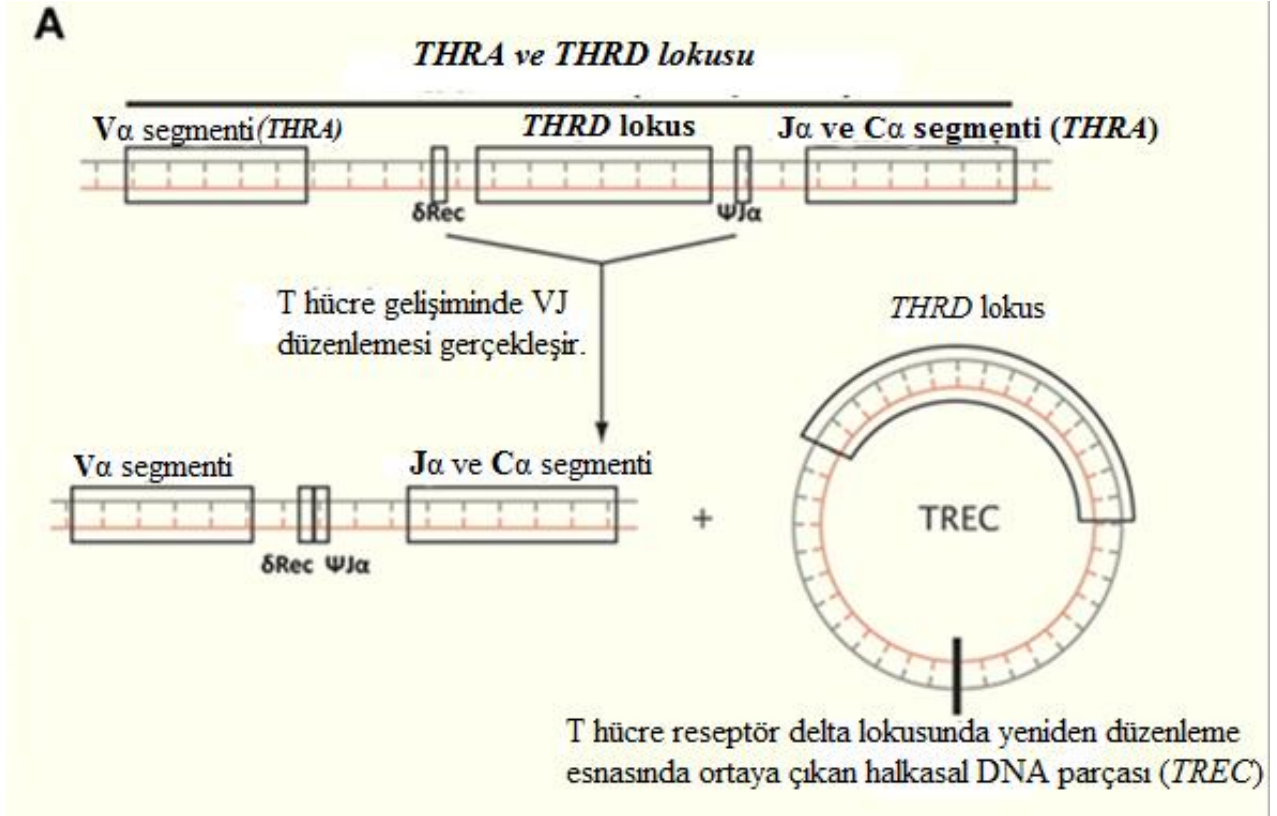
THRA ve *THRB* zincirleri ve B hücre reseptör ağır ve hafif zincirleri olgunlaşma aşamalarında antijen reseptör genlerinin yeniden düzenlenmesi için reseptörler üretir. T hücre reseptörleri ve B hücre reseptörleri birden fazla V(D)J genlerini içerir. Fakat *THRA* ve *THRD* gen bölgelerinde D segmenti bulunmadığından sadece VJ düzenlemesi gerçekleştirir. B hücre reseptör ağır zincirini pre-B hücresi oluşturur ve DJ segmentine V eklenmesiyle kappa hafif zincirinde oluşmasını sağlayarak B hücre reseptörü oluşturulur. Eğer hücrelerde kappa hafif oluşmazsa hücreler lambda zinciri üreterek çeşitlilik sağlamış olurlar ve B hücreleri kana karışır (15).



Şekil 6: Değişken Bölgede V(D)J Gen Düzenlenmesi ile Halkasal DNA Oluşumu

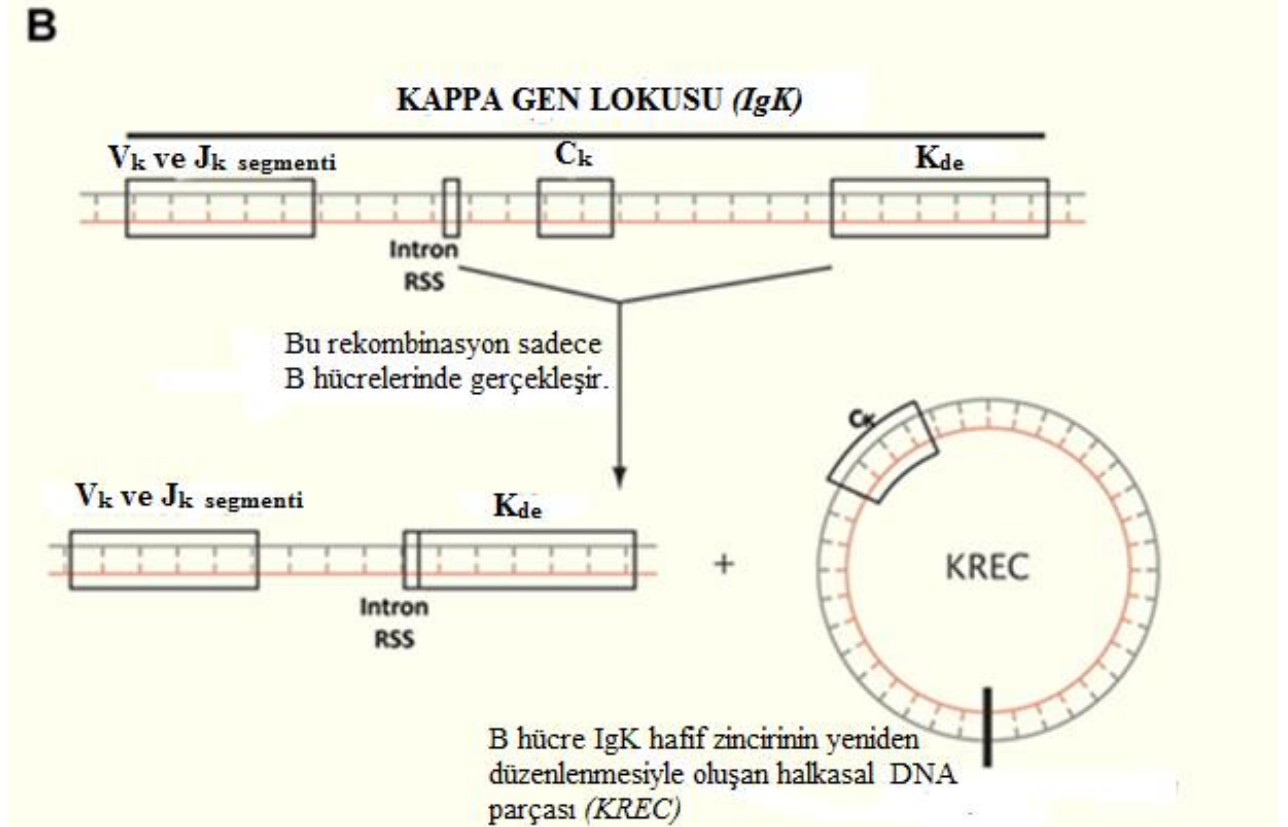
RAG1/2 kompleksi DNA'nın kırılma işleminin gerçekleştirerek saç tokası şeklinin almasına neden olur(16). Fakat endonükleaz aktivitesi ile bu saç tokası şekli açılarak *non homolog and joining* ile DNA tamir mekanizmasıyla kırık uçlar birleştirilir. Birleştirilmiş olan olan bu kısımdan artık bir gen parçası elde edilmiş olur (17) (Şekil 6).

T hücrelerinin *THRD* zincirinin bölünmesinde ortaya çıkan dairesel DNA parçalarına *T-cell reseptor excision circle (TREC)* denir (Şekil 7).



Şekil 7: *TREC* oluşumu (18).

T hücrelerinde yaklaşık %70 oranında *TREC* oluşumu görülür (15). B hücre olgunlaşmasında ağır zincirlerin yeniden düzenlenmesinin ardından hafif zincirlerin düzenlemeleri gerçekleşir. *Ig kappa* (*IGK*) hafif zincirinin VJ yeniden düzenlenmesiyle *K-deleting recombination excision circles* (*KREC*) denilen DNA kalıntıları oluşur. *Ig kappa* deleting (*IGK_{DEL}*) ve RSS ile *Ig kappa* zincirinden gen segmenti oluşur. Bu halkasal ve fonksiyonel olmayan bir DNA parçasıdır ve *KREC* adını alır (13). *KREC* B hücreleri için belirteç özelliği taşır. B hücrelerinde yaklaşık olarak %50 sinde *KREC* oluşumu gözlenir (15).



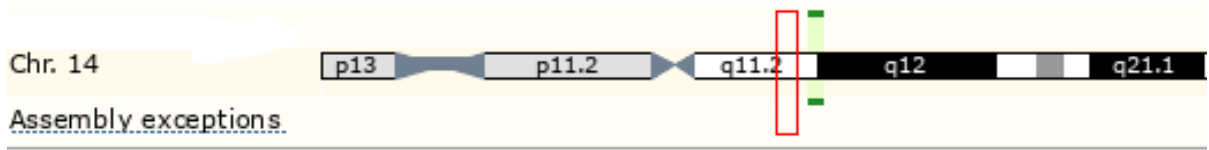
Şekil 8: *KREC* oluşumu (18)

T ve B hücresi belirteçleri olarak gösterilen *TREC* ve *KREC* replikasyon yapamazlar ve hücrelerde kalıcıdırlar. Yenidoğan taramaları için aday gösterilen çalışmalardandır. *TREC/KREC* analizleri yapılarak PİY hastalıklarının erken teşhis ve tedavisi için T ve B hücre gelişimi kontrolü sağlanması hastalar için umut vaad edici olacaktır (19).

12.1.5. *TREC/KREC* İLE İLGİLİ TARAMA TESTLERİ

TREC/KREC T ve B hücrelerinin belirteçleri olan ve replikasyon yapamayan halkasal DNA parçalarıdır. Oluşan hücrelerin sadece birinde bulunurlar bu yüzden hücrede kalıcıdırlar. Periferik kandaki seviyeleri timik ve kemik iliğinde oluşumuna göre tahmini olarak hesaplanmaktadır. T ve B hücre defektlerine bağlı olarak gelişen immün yetersizliklerde *TREC/KREC* seviyesi belirlenerek çocuk ve yetişkinlerde bu hücrelerin gelişiminin incelenmesi yararlı olabilir. Bunun için yapılan tarama çalışmaları çok kısıtlı olmasına rağmen birkaç örneği literatürde mevcuttur. Hastadan damardan veya guthrie kartlarından alınan kan örneğinden DNA izolasyonu yapılarak kantitatif

gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ile analizi yapılabilmektedir. *TREC/KREC* ve referans gen olarak görev yapan *TRAC* (*T reseptör alfa sabit geni*) kullanılarak bir bakteri plazmidi içersine klonlanmasıyla standart eğrileri kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu ile elde edilmiştir. *TRAC*, T reseptör alfa sabit geninde bulunmaktadır. 14q11.2 kromozom üzerinde ve her bir kromozom çiftinde 2 kopya olarak bulunmaktadır. *TRAC* 'ın kopya sayısı hesaplamalarında 2'ye bölünerek alınması gerekmektedir (Şekil 9).



Şekil 9: *TRAC* geninin 14.kromozom üzerindeki lokalizasyonu

Hesaplamalarda 10^6 lenfosit başına düşen kopya sayısı hesaplanmaktadır. Bu kopya sayılarının belirlenmesi ile T ve B hücre gelişimi kontrol edilmiş olacak ve hem çocuklar hemde yetişkinler için erken bir evrede hastalık şüphesi düşünülecektir. İmmünolojik ve genetik testlerle kesin tanı konulmuş bireyler de uygun tedavilere (kemik iliği transplantasyonu gibi) yönlendirilebilecektir. Bir çalışmada sağlıklı çocuk (0-17 yaş) ve yetişkinlerde (24-40 yaş) bu seviyelerin cinsiyete bağlı olup olmadığı çalışılmış ve *TREC* seviyesinin yaşla ters orantılı olduğu gözlenmiştir. Yaş seviyesi arttıkça *TREC* seviyesinin azaldığı görülmüştür. Fakat bu değişimin kadın ve erkeklerde farklı oranda azaldığı gözlenmiştir. Kadınlarda ki azalmanın erkeklere oranla daha yavaş olduğu görülmüştür.

Aynı çalışma *KREC* seviyesi içinde logaritmik hesaplamayla yapılmış ve *KREC* seviyesinin çocuklarda *TREC* gibi yaşa bağlı olarak azaldığı gözlenmiştir cinsiyete bağlı olarak bir farklılık gözlenmemiştir. Yetişkinlerde kemik iliği çıktıları sabit olduğundan *KREC* seviyesinin sabit olduğu gözlenmiştir. Bu çalışma sonuçlarına göre *TREC* ve *KREC* seviyesinin kendi aralarında farklılıklarının olduğu ve aynı zamanda yaşa ve cinsiyete bağlı farklılıklarının olduğu gözlenmiştir (20).

İsrail'de yapılan başka bir çalışmada ise ağır kombine immün yetmezlik (AKİY)'li bebekler için yenidoğan taraması yapılarak sadece *TREC* kopya sayısı incelenmiştir. Yenidoğan taramasıyla topuk kanından Guthrie kartlarıyla alınan örneklerden DNA izole edilerek *TREC*

analizi yapılmıştır. Doğum ağırlığının ve gebelik haftası ile *TREC* kopya sayısındaki değişiklikleri incelenmiştir. Yapılan tarama çalışmalarına göre erken doğumlarda, geç doğanlara göre *TREC* kopya sayısının daha az sayıda olduğu görülmüştür. Ayrıca *TREC* kopya sayısının doğum ağırlığına bağlı olan ilişkisi ortaya konulmuştur. Ortalama 1500 g altında doğan bebeklerin daha az sayıda *TREC* kopya sayısına sahip olduğu gözlenmiştir. Bu çalışmayla AKİY hastası yenidoğan bebeklerde tarama yapılması onların tedavilerinin erkenden başlaması açısından katkı sağlamış ve sekiz bebekten yedisine erken teşhis konularak yaşama devam etmesi sağlanmıştır (21).

Bir başka çalışmada ise *TREC* kopya sayısının ikizlerdeki düzeyleri incelenmiş ve ikiz bireylerdeki seviyelerin hemen hemen aynı oranda olduğu gözlenmiştir (21). Günümüzde PİY teşhisi zaman almaktave akraba evliliklerinin sık olması nedeniyle immün yetmezliğe bağlı ölümler artmaktadır. Bu yüzden *TREC/KREC* düzeylerinin erken teşhiste kullanılması umut vaad eden çalışmalar arasında bulunmaktadır.

12.2. PRİMER İMMÜN YETMEZLİKLER (PİY)

Primer immün yetmezlikler (PİY); immün sistemi etkileyen T ve B hücre fonksiyon bozukluğu/yokluğu ile karakterize heterojen bir hastalık grubudur (22). Çoğu PİY hastalıkları monogenik özellikte olmasına rağmen karmaşık poligenik özellik gösterenleride mevcuttur. Penetrans, ekspresivite değişkenliğiyle birlikte çevresel faktörler, PİY hastalığının poligenik özellik göstermesinde etkilidir. PİY'ler etkilenen immün bileşenlerine göre sınıflandırılmaktadırlar. Sonradan kazanılan bağışıklık sistemi etkilenmesiyle primer antikör yetersizliği (PAY) ve ağır kombine immün yetmezlikler (AKİY) görülmektedir. Doğal immün sistem etkilenmesiyle fagositlerde bozukluklar, Toll benzeri reseptör (TLR) aracılı sinyal vermeme/tamamlayamama ile karakterize olan tekrarlayan enfeksiyonlara duyarlılığın artması, bağışıklık bozulmasına bağlı patojen gelişmesi durumları görülür (23).

Uluslararası İmmünoloji Birliği Primer İmmün Yetmezlik Komitesi, 2018 yılında aşağıdaki şekilde PİY sınıflandırmasını güncellemiştir (24) (Tablo 2).

Tablo 2:Primer İmmün Yetersizliklerin sınıflandırması (24)

✓ Primer Antikor Yetmezlikleri (PAY)
✓ Ağır Kombine İmmün Yetmezlik (AKİY)
✓ Sendromlara Eşlik Eden Kombine İmmün Yetmezlikler
✓ İmmün Disregülasyon Bozuklukları
✓ Fagositer Bozukluklar
✓ Doğal İmmün Sistem Bozuklukları
✓ Kompleman Eksiklikler
✓ Otoinflamatuar Bozukluklar
✓ Fenokopiler

PİY hastalarının büyük çoğunluğunda bağışıklık sistemini bozulmasına neden olan etmen T ve B hücre işlevlerindeki yetersizliklerdir. B hücre defektleri antikor yetersizliğine sebebiyet verir. Kemik iliğinde B hücre farklılaşmasının durması veya gerçekleşmemesi sonucunda olgun B hücreleri serum immunoglobülinleri (Ig) bulunmaması nedeniyle X'e bağlı agammagobülinemi (XLA) oluşabilmektedir. Bu hastaların çocuk veya yetişkin olanlarda başta akciğer olmak üzere geri döndürülemez organ hasarı gelişebilmektedir. Bazı gen mutasyonlarının etkisiyle de azalmış B hücre sayısı gözlenmektedir. *BTK (bruton tirozin kinaz)* gen mutasyonunda %2 den az olgun B hücresi ile karakterize hipo-gammaglobülinemi görülebilmektedir. XLA hastalığına neden olduğu bilinen *BTK* genindeki mutasyondur. Bu hastalarda B lenfositleri gelişmemekte ve kanda B hücre yoksunluğu görülmektedir. XLA ve non-XLA hastalarında tekrarlayan enfeksiyonlar 3-18 ay arasında görülürken ortalama tanısı 3 yıldır. Bu gecikmiş teşhis hastada pnömani, sepsis, menenjit ve ölümcül olabilen diğer bakteriyel enfeksiyonlara yol açmakta ve hastaların bu nedenlerle sık sık hastaneye başvurmalarına sebep olmaktadır (15).

T hücre defekti, hücresel ve bağışıklık sistemini etkileyen AKİY'e sebep olmaktadır. Bu PİY içerisinde en ağır ve ölümcül olanıdır. Daha nadir olan 'Leakly' ve 'nude' varyantları da

mevcuttur. PİY hastalığının tanı ve tedavi yollarının araştırılması için T ve B hücre gelişiminin incelenmesi hastalar için önem taşımaktadır (15).

12.2.1. Primer Antikor Yetersizlikleri (PAY)

Primer antikor yetersizlikler (PAY); primer immün yetersizlik hastalıklarının en sık görülen sınıfıdır(25). PAY hastalığının en belirgin özelliği spesifik antikor üretiminde eksiklik meydana gelmesidir. Bu spesifik antikorlar veya immünglobülinler çok sayıda patojene karşı görev alan bağışıklık sistemi için önemli olan antikorlardır. Antikorların eksikliği ciddi oranda tekrarlayan enfeksiyonlara sebep olmaktadır. Periferik kanda B lenfositleri, serum Ig düzeyler ve B hücre defektine dayalı 3 ayrı katagoriye ayrılabilir (26). Öncü B hücre farklılaşmasında agamaglobulinemi kusurları, Ig rekombinasyon eksiklikleri ve idiopatik hipogamaglobülinemi şeklinde katagoriye ayrılmaktadır (27). Aslında hepsi B hücresi farklılaşması ve olgunlaşmasından etkilenir. B hücre genlerinde birkaç genetik defekt saptanırken T hücrelerinde ekspresse edilen reseptörleri ve ligandları kodlayan genlerde de tespit edilmiştir. Genetik kusurlar çoğu PAY hastalığının altında yatan immünopatolojik hastalık mekanizmalarına dair fikir sağlamaktadır. Ancak idiopatik hipogamaglobülinemi kategorisinde altta yatan mekanizma henüz bilinmemektedir. Yakın zamanda yapılan çalışmalar genetik faktörlerin, hasta yaşının, çevresel maruziyetlerin değişmesinde PAY hastalığının klinik değişkenliğini etkilediğini göstermiştir(28). PAY hastalarına ait klinik bulgular, otitis, sinüzit, bronşit, üriner sistem enfeksiyonları, deri ve akciğer absesi, artrit, lenfoproliferasyondur.

PAY hastaları ya çocukluk çağında ya da yetişkin dönemde üst ve alt solunum yollarına sebep olan bakterilere karşı duyarlılıkları artabilir. Aynı zamanda agamaglobülinemi bulunan hastalar enteroviral enfeksiyonlara duyarlıdırlar. Ig replasman tedavisi (İntravenöz Ig (IVIG) veya sübketanöz Ig (SCIG)) PAY hastaları için şarttır. Sıklıkla antibiyotik tedavisi ve profilaksisi enfeksiyonların ciddiyetini kontrol etmek için gereklidir. Bazı PAY hastalarında granülomatöz inflamasyon, otoimmünite, lenfoproliferasyon ve maligniteler gibi ciddi komplikasyonlar görülebilmektedir (28). PAY hastalarının tanı gecikmesi klinik bulguların ve laboratuvar bulguların değişkenliği değil aynı zamanda farkındalığın sınırlı olması nedeniyle hala sorun olmaya devam etmesidir. Avrupa İmmün Yetmezlik Derneği (AİYD) primer immün yetmezlik için çok aşamalı protokoller tasarlamıştır. PAY için tanısal protokol periferik B hücresi alt gruplarındaki anormallikleri dahada optimize etmektir (29). Tanısal gecikme durumunda PAY ciddi morbiditeye ve erken mortaliteye sebep olmaktadır. Bunun için daha ileri araştırmalarla yeni

genetik kusurların bulunması hastalar için önem teşkil etmektedir (28). PAY agammaglobülinemi, yaygın değişken immün yetersizlikler (YDİY) ve somatik hipermutasyon olmak üzere sınıflandırılmaktadır (30).

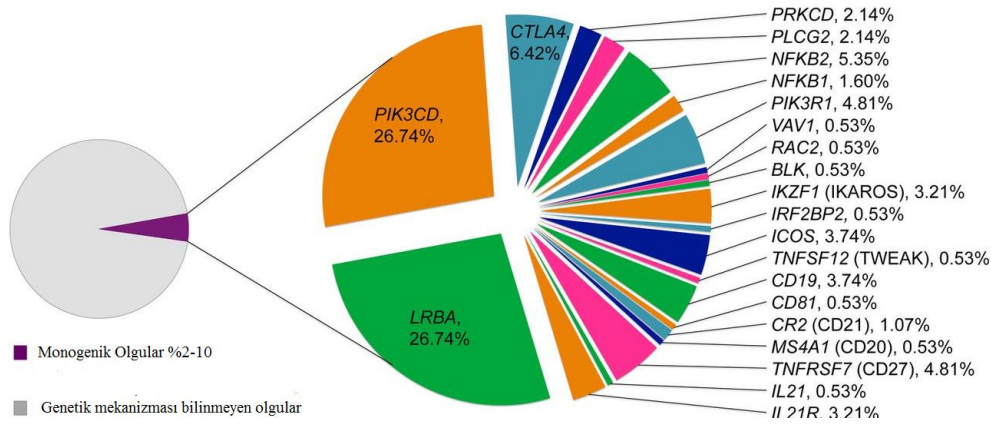
12.2.2. Yaygın-Değişken İmmün Yetersizlikleri (YDİY)

Yaygın-Değişken immün yetersizlikler (YDİY); edinsel hipogamaglobülinemi, yetişkin başlangıçlı hipogamaglobülinemi ve disgammaglobülinemi olarak bilinen primer antikor eksikliği grubudur. Heterojen hastalık grubu olan bu yetersizlikte baskın olarak görülen durum hipogamaglobülinemidir. YDİY, alt ve üst solunum yollarında tekrarlayan bakteriyel enfeksiyonlarla karakterize olan hastalık grubudur. Tekrarlayan sinüzit, bronşit, pnömoni klinik bulgular arasındadır. Bazı hastalarda kronik akciğer hastalığı klinik bulguları daha kötüleyen staphylococcus aureus ve pseudomonas aeruginosa gibi patojenik bakterilerin spektrumunu değiştirebilir (27).

T hücresi bağışıklığının bozulmasından kaynaklanıp kaynaklanmadığı henüz kesin değildir. Bazen normal T hücre sayısı ve çoğalması olan hastalarda gelişir. Kadın ve erkeklerdeki prevalansı 1.200.000 - 1:10 000 arasında değişkenlik göstermektedir. Yaş arttıkça daha da zor bir hal almaktadır. Semptomları çocukluk çağında da yetişkin dönemde de kendisini gösterebilir. Semptomların kendisini göstermesi ve tanısı ortalama 3-4 yıl kadar sürmektedir. Hastalığın gecikmeli olarak tanımlanması prognozu etkileyebilmektedir. Teşhis sonrası sağkalımın erkeklerde % 64, kadınlarda % 67 olduğu görülmüştür (27).

Otozomal dominant ve otozomal resesif kalıtım gösteren YDİY genellikle seyrek ve çok vakalı ailelerde genellikle IgM ve IgA eksikliğinin eşlik ettiği görülmektedir (31). Bazı aile üyelerinde ise eksikliğinden ziyade fazlalığı olduğu gözlenmiştir. YDİY hastalığında genetik faktörleri tanımlamaya yönelik bir çok çalışmalar yapılmıştır. Haplotip analizi ile HLA lokusunun önemli rol oynadığı görülmüştür (32). HLA lokusu kompleksleri (kompleman faktörleri C2-C4 ve TNF- α ve mismatch tamir genleri ile birlikte histokompatibilite antijenlerine yönelik genler dahil olmak üzere) olduğundan spesifik gen defektlerini saptamak zordur. Yakın tarihli araştırmalar MHC sınıf 2 bölgesinde kodlanan mismatch tamir geninde polimorfik varyantlar olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte bu polimorfik varyantlar YDİY hastalarında kontrollerle karşılaştırıldığında patojenisi için yeterli değildir (27). TNF reseptör ailesinin üyesi olan *TACI* (transmembran aktivatörü ve kalsiyum modülasyonlu siklofilin ligand etkileşimi) geni içindeki mutasyonların YDİY hastalarının %10'unda görüldüğü tespit edilmiştir (33). YDİY hastalarında

TACI bölgesindeki heterozigot değişikliklerin amino asit yerdeğiştirmeleri olduğu görölmüş ve bu bireylerde erken stop kodonları ve çerçece kayması mutasyonları tespit edilmiştir. Bazı klinik çalışmalardaki YDİY hastalarında *ICOS* gen mutasyonları görölmüş ve *CD19* molekölü ile ilişkili gen mutasyonlarının olduğu tanımlanmıştır (34) (Şekil10).



Şekil 10: YDİY hastalığına sebep olan genler ve görölme sıklıkları (35)

YDİY hastalığında genetik mekanizması bilinmeyen genlerin etkisinin daha fazla olmasının yanı sıra bilinenlerden en fazla *PIK3CD*, *CTLA4*, *LRBA* gen mutasyonlarının etkisi görölmektedir. Bu hastalarda gen mutasyonlarının T ve B hücre gelişimindeki etkilerini gözlemlemek önem teşkil etmektedir.

12.2.3. Somatik Hipermutasyon ve Bozukluğu

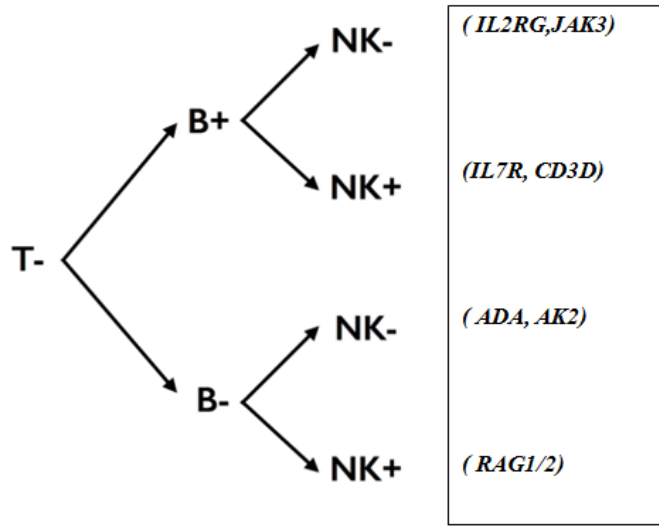
Somatik hipermutasyonlar gen segmentlerinde meydana gelen rastgele düzenlemelerdir. Böylece çok sayıda gen segmentinde yeniden düzenlemeler gerçekleşir ve çeşitlilik oluşur. B hücre intrinsik immünoglobülin class switch rekombinasyon (Ig-CSR) defektleri yüksek IgM seviyeleri ve çok düşük IgG, IgA ve IgE seviyeleri ile karakterize edilen genetik olarak belirlenmiş bir durumdur. Moleküler mekanizmanın bir fonksiyonu olarak CSR'da, Ig 'nin değışken bölgesindeki somatik hipermutasyonlar gösterilmektedir. Ig-CSR defektlerinin araştırılması, antikor olgunlaşması olayında görev alan CSR'nun somatik hipermutasyonun anlaşılmasında katkıda bulunduğu görölmüştür. Şuana kadar 4 Ig-CSR defekti belirtilmiştir. Bunlardan biri aktivasyonun indüklediğı *AID* (*sitidin deaminaz*) somatik hipermutasyonun altında yatan

etkilerdendir ve Ig geni yeniden düzenlenmelerinin indüksiyonundada rolünü ortaya koymuştur. *AID*'nin CSR'ye özgü fonksiyonu *AID*'nin C-ucunu etkileyen mutasyonların CSR'de defekte neden olduğu tespit edilmiştir. Buna bağlı olarakta kusurlu somatik hipermutasyonlar ortaya çıkmaktadır. Aynı zamanda *UNG* (*uracil-N-glikozilaz*) eksikliğininide CSR'de defekte yol açtığı görülmüştür (36).

12.2.4. Ağır Kombine İmmün Yetersizlikler (AKİY)

Ağır kombine immün yetmezlik (AKİY), T hücre defektiyle hücrel ve humoral bağışıklığı etkileyen bir hastalık grubudur. AKİY'ler ilk kez 60 yıl önce tanımlanmış ve T ve B hücrelerinin işlevlerinin aynı zamanda doğal öldürücü hücrelerin eksikleriyle karakterize olan heterojen bir hastalık grubudur. AKİY genel sıklığının 1/50.000 ile 1/100.000 canlı doğumda bir görülmektedir. İmmün yetmezlik grubunda en ağır ve ölümcül olanı AKİY grubudur. Bu bebekler doğumundan sonra ilk aylarında kronik ishal ve enfeksiyonlarından dolayı gelişemezler. Bunun yanı sıra görülen birçok klinik bulguları mevcuttur (15). Bunlar, pnömoni, deri döküntüleri, organomegali, patojenik enfeksiyonlar, graft-versus-host, kronik ishaldir.

AKİY'in otozomal reseif geçişli olduğu ve sitokin reseptör genleri, antijen reseptör genleri gibi bir çok gende mutasyona neden olduğu bilinmektedir. AKİY'in güncel sınıflandırılması bozulmuş sitokin aracılı sinyalizasyon, somatik rekombinasyondaki değişiklikler, öncü T hücre reseptörü (THR) yoluyla bozulmuş sinyalleme, artan lenfosit apoptozu, timus yokluğu, timus embriyogenezindeki değişiklikler içeren temel genetik ve patogenetik mekanizmalara dayanır ve belirgin lenfosit fenotiplerini gösterir. Derin bir eksikliği vardır ve mevcut olan bu T hücreleri plasentadan geçip genellikle maternal kökenlidir. B hücreleri AKİY türüne bağlı olarak normal sayıda veya yok olabilir. Fakat Doğal Öldürücü (NK) hücre sayısı değişiklik gösterir (15). Bu nedenle AKİY T ve B hücre varlığına göre fenotipik olarak 4 grupta sınıflandırılmış ve neden olduğu genlerdeki mutasyonlar Şekil 11'de verilmiştir. Fenotipik olarak sınıflandırılması hastalığın derecesinide ortaya koymaktadır. T lenfosit eksikliğiyle karakterize olan bu hastalıkta B ve NK hücrelerinin varlığı veya yokluğuna göre bulguların seyri değişiklik göstermektedir.



Şekil 11: AKİY sınıflandırması ve sık görülen gen mutasyonları

AKİY vakalarının %50 sini oluşturan $T^-B^+NK^-$ fenotip sınıfıdır ve ağırlıklı olarak X bağlantılıdır. Interlökin 2 reseptör gamma zincirini kodlayan *IL2RG* genindeki mutasyondan kaynaklanmaktadır. Daha az sıklıkta görülen ise *JAK3* mutasyonudur (15).

AKİY'in erken tanımlanması pediatrik olarak önem teşkil etmektedir. Erken teşhis edildiğinde fenotip sınıflandırmasına göre tedavi seçenekleri mümkündür. Tanımlanma yapılabilmesi için T ve B hücre gelişiminin analiz edilmesi erken ölümlerin önüne geçilebilmesini sağlar. Aksi halde bebekler klinik bulgular sebebiyle hayati tehlike taşımaktadırlar. Doğumla birlikte belli olmayan AKİY yenidoğan taramaları için aday gösterilmektedir.

12.2.5. Primer İmmün Yetmezlik Hastalarında Tedavi Seçenekleri

Primer immün yetmezlik tedavileri için yapılan bir çok uygulama bulunmaktadır. Teşhisi zor olan primer immün yetmezlikte tedavi seçeneklerinin arasında ilk olarak antibiyotik kullanımı vardır. Bu fırsatçı konakçılar için uygulanan ilk tedavi seçeneğidir. DiGeorge sendromlu hastalarda T lenfosit eksikliği belirlendikten sonra timus nakli yapılan DiGeorge sendromlu hastalarda T hücre repertuarları ve iyi derecede proliferatif T hücre fonksiyonuyla sonuçlanmıştır. Hastaların %75'inde transplantasyondan sonra sağ kalım olduğu görülmüştür (37).

Wiskott-Aldrich Sendromlu hastalarda X'e bağlı primer immün yetmezliği tedavisi için genetik olarak modifiye edilmiş hematopoetik kök hücre transfüzyonu ile tedavi edilmiştir.

Tedaviden sonra hastalarda T ve B hücreleri, doğal öldürücü hücrelerde ve monosit sayısında fonksiyonel olarak düzenlemeler gözlenmiştir (38).

Adenosin deaminaz eksikliği (ADA), AKİY'e sebep olan bir bozukluktur. Bunun tedavisi için gen terapi, enzim replasman ve hemotopoetik kök hücre transplantasyonu gibi tedavi seçenekleri mevcuttur. Çoğu hastanın hücresel immün fonksiyonun düzeldiği gözlenmiş bazı hastalarda ise immüno replasman tedavisi almaya devam ettiği görülmüştür (39). Sonuç olarak PİY hastalığı için mevcut olan tedavi seçenekleri enzim replasman tedavisi, gen terapi, hematopoetik kök hücre transplantasyonu, immüno replasman tedavileridir. Her hastanın tedaviye yanıt süreci değişkenlik göstermektedir. PİY tanısının erken konulması tedavilerin en kısa sürede başlamasına olanak sağlar ve erken ölümlerin önününe geçilmesini sağlamaktadır.

Bu tez projesindeki amaç hastaları primer immün yetmezlik alt sınıflarına ayrılarak T ve B hücre gelişimi kontrolü için *TREC/KREC* analizi yapılarak kantitatif olarak incelemektir. Hastaları yaş uyumlu kontrollerle kıyaslamak ve mutasyona sahip hastalarda mutasyonun fonksiyonel etkilerini ortaya koymaktır.



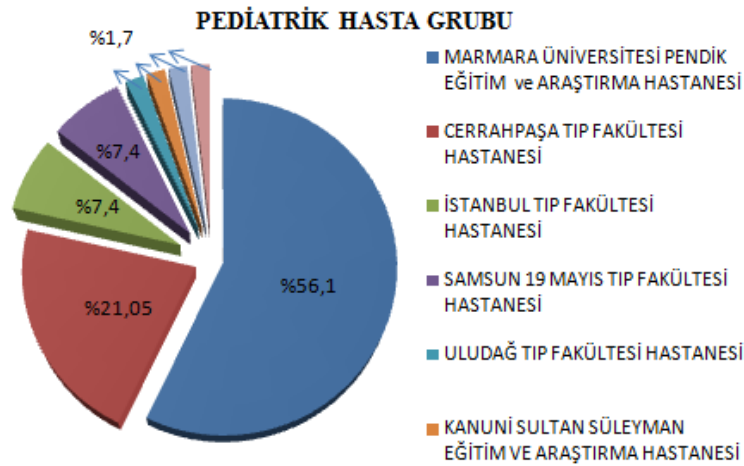
13. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü (DETAE) Genetik Anabilim Dalı ve İstanbul Bilgi Üniversitesi, Genetik ve Biyomühendislik Bölümü araştırma laboratuvarlarında gerekli izinler alınarak yapılmıştır. Çalışma kapsamında PİY tanısı alan hastalarda ve kontrol grubunda gerçek zamanlı kantitatif PZR ile *TREC/KREC* analizleri yapılmıştır.

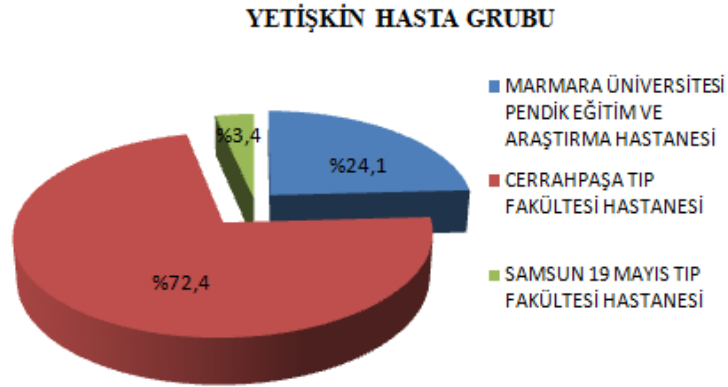
13.1. GEREÇ

13.1.1. Hasta ve Kontrol Seçimi

Bu çalışma, İstanbul Tıp Fakültesi (n=6), Marmara Üniversitesi Pendik Eğitim ve Araştırma Hastanesi (n=31), Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Hastanesi (n=12), Kocaeli Tıp Fakültesi Hastanesi Çocuk Sağlığı ve hastalıkları (n=1), Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Çocuk Sağlığı ve Anabilim Dalı (n=1), Kanuni Sultan Süleyman Eğitim ve Araştırma Hastanesi (n=1), Konya Necmettin Erbakan Üniversitesi Tıp Fakültesi hastanesi (n=1), Samsun 19 Mayıs Üniversitesi Çocuk Sağlığı ve Anabilim Dalları'ndan (n=4) toplam n=57 hasta kanı alınarak oluşturulmuştur (Şekil 12-13).

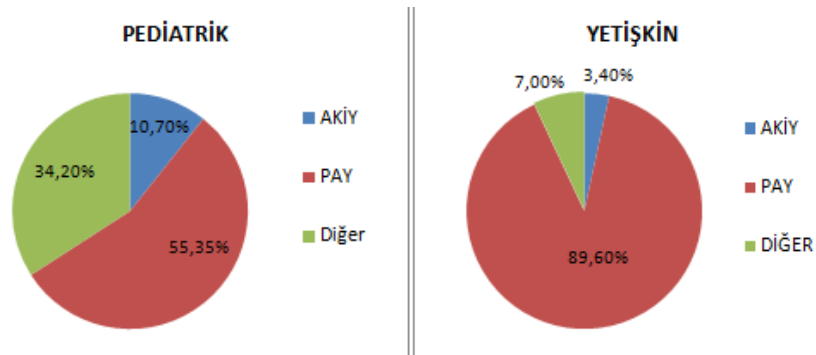


Şekil 12: Pediatrik Hasta Sağlayan Kurumlar



Şekil13:Yetişkin Hasta Sağlayan Kurumlar

Yetişkin grubu, Marmara Pendik Eğitim Araştırma Hastanesi (n=8), Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Hastanesi (n=20), Samsun 19 Mayıs Tıp Fakültesi Hastanesi (n=1) ‘den toplamda n=29 hastanın kanları alınarak oluşturulmuştur. Çalışma, PİY tanısı almış yetişkin (n=29) , pediatrik hasta grubu (n=57) ve immün yetmezlik harici sebeplerle biyokimyaya başvuran yetişkin (n=29) ve pediatrik (n=16) kontrol grubuyla gerçekleşmiştir. Kontrol grubu bireyler öksürük, cilt kaşıntısı vb.. sebeplerle biyokimyaya başvuran ve yaş aralıkları dikkate alınarak seçilen bireylerdir. Alt gruplara sınıflandırılarak pediatrik hastalarda AKİY tanısı alan (n=9) , PAY tanısı alan (n=31), diğer (n= 17) hasta ile yetişkin hasta grubundan AKİY tanısı alan (n=1) , PAY tanısı alan (n=25) , diğer (n=3) hasta ile çalışılmıştır. Hasta grupları Şekil 14’teki gibidir..



Şekil 14: Pediatrik ve Yetişkin Hasta Grubu Dağılımları

Çalışma İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Yerel Etik Kurul’u tarafınca onaylanmış (2017/635) ve kan örnekleri alınan tüm hastalara, çalışmanın içeriğinin detayları ile anlatan gönüllü onam formu imzalatılmıştır. Çalışmaya dahil edilen hastaların klinik özellikleri ise Tablo 3’de gösterilmiştir.

Tablo 3: Pediatrik Hasta Klinik Bilgileri

Hasta No	Hastalık	Mutasyon	Yaş	Cinsiyet	WBC	Lenfosit Sayısı	IgG mg/dl	IgA mg/dl	IgM mg/dl	IgE mg/dl
PEDIY 1	AKİY	ADA	4	E	4600	500	-	-	-	-
PEDIY 2	-	STAT1/GOF	4	K	15800	8400	616	20	55	9,8
PEDIY 3	YDİY	-	9	K	-	4000	236	6	19	16
PEDIY 4	Leaky AKİY	Het Artemis	-	E	-	-	-	-	-	-
PEDIY 5	PAY		13	E	6200	3200	842	116	60	6,3
PEDIY 6	-	STAT3	6	K	7800	4300	1475	57	97	36242
PEDIY 7	-	STAT1	9	K	7400	-	562	22	91	17
PEDIY 8	-	DOCK8	14	K	1600	1400	2570	6	62	183
PEDIY 9	Sendromik bulgular	-	11	E	6,8	-	2110	165	<6	<1
PEDIY 10	YDİY	-	17	K	2300	-	114	12	21	17
PEDIY 11	YDİY	-	13	E	3900	1800	248	13	20	1
PEDIY12	-	-	13	E		-	-	-		
PEDIY13	YDİY	-		K	9600	4000	1100	227	123	40,5
PEDIY14	YDİY	-	15	E	-	1300	336	6	25	17
PEDIY15	PAY	-	17	E	-	-	-	-	-	-
PEDIY16	YDİY	-		E	8500	3300	2150	58	126	73
PEDIY17	Leaky AKİY	-	9	K						
PEDIY18	YDİY	-	16	E	-	2600	151	4	10	2
PEDIY19	PAY	-	5	E	6000	2009	872	<6	31	1,3
PEDIY20	PAY	-	5	E	-	-	-	-	-	-
PEDIY21	Sendromik bulgular	-	17	E	7,0	-	467	1005	13	-
PEDIY22	AKİY	-		E	440	1100	553	55	59	86
PEDIY23	Sendromik Bulgular	TACI	12	K		2000	295	15	65	16
PEDIY24	Sendromik Bulgular	ATM gen homozigot p.leu762valfs	7	K	6200	1200	664	2	416	<1
PEDIY25	Sendromik Bulgular	-	13	E	8,0		851	<17	60	5

PEDIY26	YDİY	-	18	K		700	405	16	15	17
PEDIY27	-	STAT3		K	9450	3000	1618	76	84	25853
PEDIY28	PAY	-	14	E	4600	-	200	27	48	2
PEDIY29	PAY	-	9	K	4900	-	<145	6	355	<17
PEDIY30	PAY	-	9	E	14000	-	89	2	82	12
PEDIY31	PAY	-	18	K	13600	-	309	17	119	<17
PEDIY32	PAY	-	13	E	3900	-	336	6	25	17
PEDIY33	PAY	-	5	E	5200	-	482	44	105	19
PEDIY34	PAY	-	15	E	6300	-	320	5	1444	-
PEDIY35	PAY	-	1	K	3610	-	129	5,8	16,8	2
PEDIY36	PAY	-	5	E	6740	-	1540	0	94	5
PEDIY37	PAY	-	7	K	3420	-	434	0	44	0
PEDIY38	PAY	-	7	K	10990	-	-	-	-	-
PEDIY39	Sendromik Bulgular	-	13	K	2500	600	1060	18	175	3
PEDIY40		STAT3	-	E	-	-	-	-	-	-
PEDIY41	AKİY	-	-	E	-	-	-	-	-	-
PEDIY42	PAY	-	4	K	6600	-	186	25	63	12
PEDIY43	PAY	NFKB	5	E	5700	-	190	14	18	57
PEDIY44	PAY	-	16	E	8000	-	1918	369	76	0
PEDIY45	PAY	-	9	K	5600	-	923	61	67	<
PEDIY46	PAY	-	16	E	8300	-	73	4	12	<2
PEDIY47	PAY	-	7	K	10000	-	345	7	48	<2
PEDIY48	PAY	-	6	K	13300	-	180	81	68	8
PEDIY49	PAY	-	9	E	20300	-	769	157	127	372
PEDIY50	Sendromik Bulgular	-	5	K	2200	1300	-	-	-	-
PEDIY51	-	DI GEORGE	-	E	-	-	-	-	-	-
PEDIY52	-	DI GEORGE	-	E	-	-	-	-	-	-
PEDIY53	AKİY	-	-	E	-	-	-	-	-	-
PEDIY54	AKİY	-	-	K	-	-	-	-	-	-
PEDIY55	-	Monozomi 7	13	E	-	1400	455	7	21	17
PEDIY56	AKİY	-	13	K	-	1100	421	60	11	164
PEDIY57	AKİY	-		K						

(PEDİY: Pediatrik immün yetmezlik hasta, YDİY: Yaygın-değişken immün yetmezlik, AKİY: Ağır kombine immün yetmezlik, *NFKB*: Nuclear factor kappa B, *STAT1*:Signal transducer and activator of transcription 1. *STAT3*: Signal transducer and activator of transcription 3). Hastalık grubunda boş olan sütunlarda mutasyon sahibi ve diğer ( ks r k, ateş, kusma vb..) hastalar yer almaktadır.



Tablo 4: Yetişkin hasta klinik bilgileri

Hasta No	Hastalık	Mutasyon	Yaş	Cinsiyet	Wbc	Lenfosit Sayısı	IgG mg/dl	IgA mg/dl	IgM mg/dl	IgE mg/dl
YETİY 1	YDİY	-	30	E	-	1000	350	0	2,9	16
YETİY 2	YDİY	-	26	K	11500	2500	557	68	16	16
YETİY 3	-	CD19	25	E	-	11800	-	-	-	-
YETİY 4	YDİY	-	22	K	-	3300	145	6	47	
YETİY 5	Send.Bulgular	-	34	K	7.4	-	-	-	-	-
YETİY 6	PAY	-	36	K	1700	-	141	18	20	<
YETİY 7	AKİY	-	22	K	-	1100	421	60	11	164
YETİY 8	YDİY	-	23	K	-	2300	425	7	21	16
YETİY 9	PAY	-	21	E	-	-	-	-	-	-
YETİY 10	PAY	-	19	E	-	-	-	-	-	-
YETİY 11	Leaky AKİY	-	23	E	-	-	-	-	-	-
YETİY 12	PAY	-	21	E	-	-	-	-	-	-
YETİY 13	PIK3CD Eksikliği	PIK3CD	26	K	15100	-	830	48	603	1
YETİY 14	YDİY	-	46	K	-	-	-			
YETİY 15	YDİY	-	42	K						
YETİY 16	YDİY	-	38	E						
YETİY 17	YDİY	-	36	K						
YETİY 18	YDİY	-	34	K						
YETİY 19	YDİY	-	63	E						
YETİY 20	YDİY	-	33	E						
YETİY 21	YDİY	-	28	K						

YETİY 22	YDİY	-	37	K						
YETİY 23	YDİY	-	42	K						
YETİY 24	YDİY	-	60	E						
YETİY 25	YDİY	-	45	E						
YETİY 26	YDİY	-	37	E						
YETİY 27	YDİY	-		K						
YETİY 28	YDİY	-		K						
YETİY 29	YDİY	-		E						

(YETİY: Yetişkin immün etmezlik hastası, YDİY: Yaygın-değişken immün yetmezlik, AKİY: Ağır kombine immün yetmezlik, *PIK3CD*: Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Delta)

Pediyatrik hastaların yaşlarının ortanca değeri 11, minimum ve maksimum değeri (1-18) cinsiyet dağılımı ise E:32/K:25 dir. Yetişkin hastaların yaşlarının ortanca değeri 33, minimum ve maksimum değeri (19-63), cinsiyet dağılımı ise E:14/K:15 dir.

13.1.2. PZR materyali

- LC480 probes master (2x)
- 96 kuyucuklu plaklar
- 10X R buffer

13.1.3. Kullanılan Cihazlar

- Otomatik pipetler (Eppendorf)
- Çeker ocak (Kermanlar)
- Buzdolabı ve derin dondurucu (+4°C, -20°C, -80°C) (Arçelik, Sanyo, Bosch,)
- Masaüstü mini santrifüj (Hettich, Eppendorf)
- Elektroforez aleti (Stratagene)

- PZR cihazı (Lightcycler480)
- PZR cihazı (Techne)
- Vorteks (Kermanlar)
- Spektrofotometre (Nanodrop)
- Eppendorf thermomixer cihazı
- Hassas Terazı Shimadzu
- Soğutmalı Santrifüj
- Çalkalamalı inkübatör
- İnkübatör

13.1.4. Kullanılan Kitler

- LC480Probe Master Kit, Roche
- High Pure PCR Template Preparation Kit For Genomic DNA Kit, ROCHE
- AllPrep Plazmid DNA Mini Kit, QIAGEN

13.1.5. Kullanılan Kimyasallar

- Etidyum Bromür Sigma, Almanya
- EDTA Sigma, Almanya
- Agaroz, İnvitrogen, İsviçre

13.1.6. Tampon çözeltiler

1-Agoroz jel yükleme tamponu (50X)

ddH₂O(20ml) içerisinde %0,5 Bromfenol mavisi, %60 gliserol olacak şekilde hazırlandı.

2-50X 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 20-25 dakika otoklavda sterilize edildi.

3-Ampisilin(100g/L)

2 gram ampisilin sodyum tuzu 20 ml'e tamamlandı. 0,2 mikrometrelik (μm) filtreden geçirildi ve 1 ml'lik stoklar halinde $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı.

4-LB medyum agar katı besiyeri

NZY broth 7 gr,

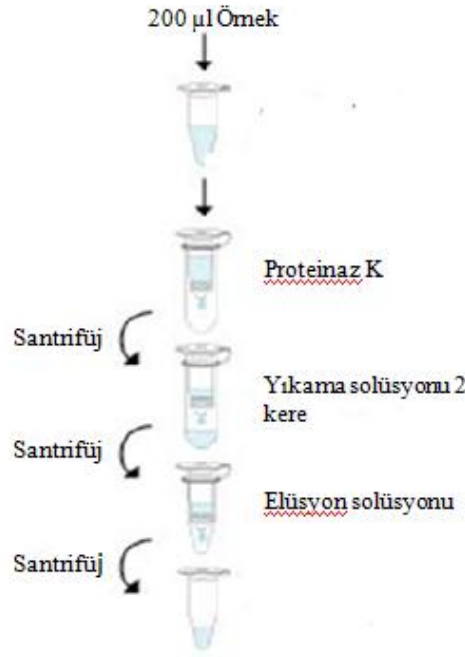
Agar 5 gr,

200 ml distile su ile tamamlanarak 20 dakika otoklavlandı. Belirli uygun sıcaklıkta üzerine 400 μl ampisilin antibiyotik eklenerek 5 ayrı petri kaplarına döküldü. Soğuması beklenerek $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı.

13.2. YÖNTEM

13.2.1. DNA izolasyonu ve miktar tayini

Hastalardan EDTA'lı tüplere alınan kan örnekleri kit protokolü (High Pure PCR Template Preparation Kit For Genomic DNA Kit, ROCHE) uygulanarak izole edildi. DNA ölçümleri miktar tayini Spektrofotometre cihazı (Nanodrop) ile ölçüldü (Şekil 15).



Şekil 15: DNA izolasyon aşamaları

Kullanılan DNA'ların hepsi 10 ng a sulandırılarak çalışmalara devam edildi.

13.2.2. PLAZMİD ÜRETİMİ

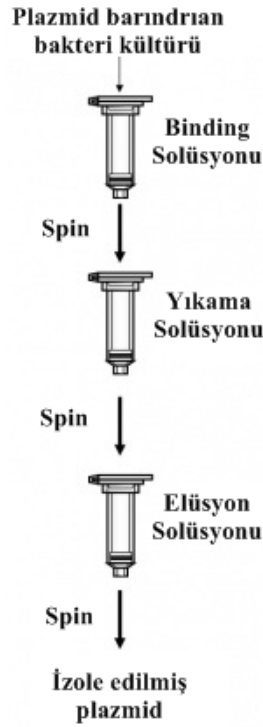
13.2.2.1. Transformasyon

- *TREC/KREC* ve *TRAC* kopya sayılarının pozitif kontrolü ve hastalardaki kopya sayılarının belirlenmesi amacıyla üç DNA kalıntılarının da bulunduğu plazmid kullanıldı. Plazmidler İtalya'dan alındı.
- 100 µl *DH5α* ve *Top10* içerisine vektör aktarıldı. 5 µl E.coli plazmid DNA sı ile birlikte tüpe konularak 30 dk buzda bekletildi.
- Isı şoku cihazında (Eppendorf thermomixer) 45-50 sn 42 °C'de bekletilerek sonra 3 dk buza alındı.
- Ampfisilin içermeyen besi yerinden 500 µl alınarak DNA içeren tüpe alınarak falkona aktarıldı.
- 37 °C'de çalkalamalı inkübatörde 1 saat bekletildi. 3 ayrı petri kabına ateş yanında eşit olarak cam çubukla dağıtıldı.
- 37 °C'de inkübasyona bırakılarak 1 gece beklendi.

- Platelardaki koloniler pipet ucu yardımıyla toplanarak 4 ayrı falkon içersine bırakıldı. Üzerlerine 3 ml LB sıvı besiyeri ve 3 µl ampisilin konuldu.
- 37 °C’de çalkalamalı inkübatörde 1 gece beklendi. Plazmidlerin çoğalması amacıyla beklendikten sonra DNA izolasyonu aşamasına geçildi.

13.2.2.2. Plazmiden DNA izolasyonu

Plazmiden DNA izolasyonu için ‘AllPrep plazmid DNA Mini Kit, QIAGEN’ kit protokolü uygulandı. DNAmiktar tayini için Spektrofotometre (Nanodrop) ile ölçüldü (Şekil 16).



Şekil 16: QIAGEN kit protokolü ile plazmid DNA eldesi

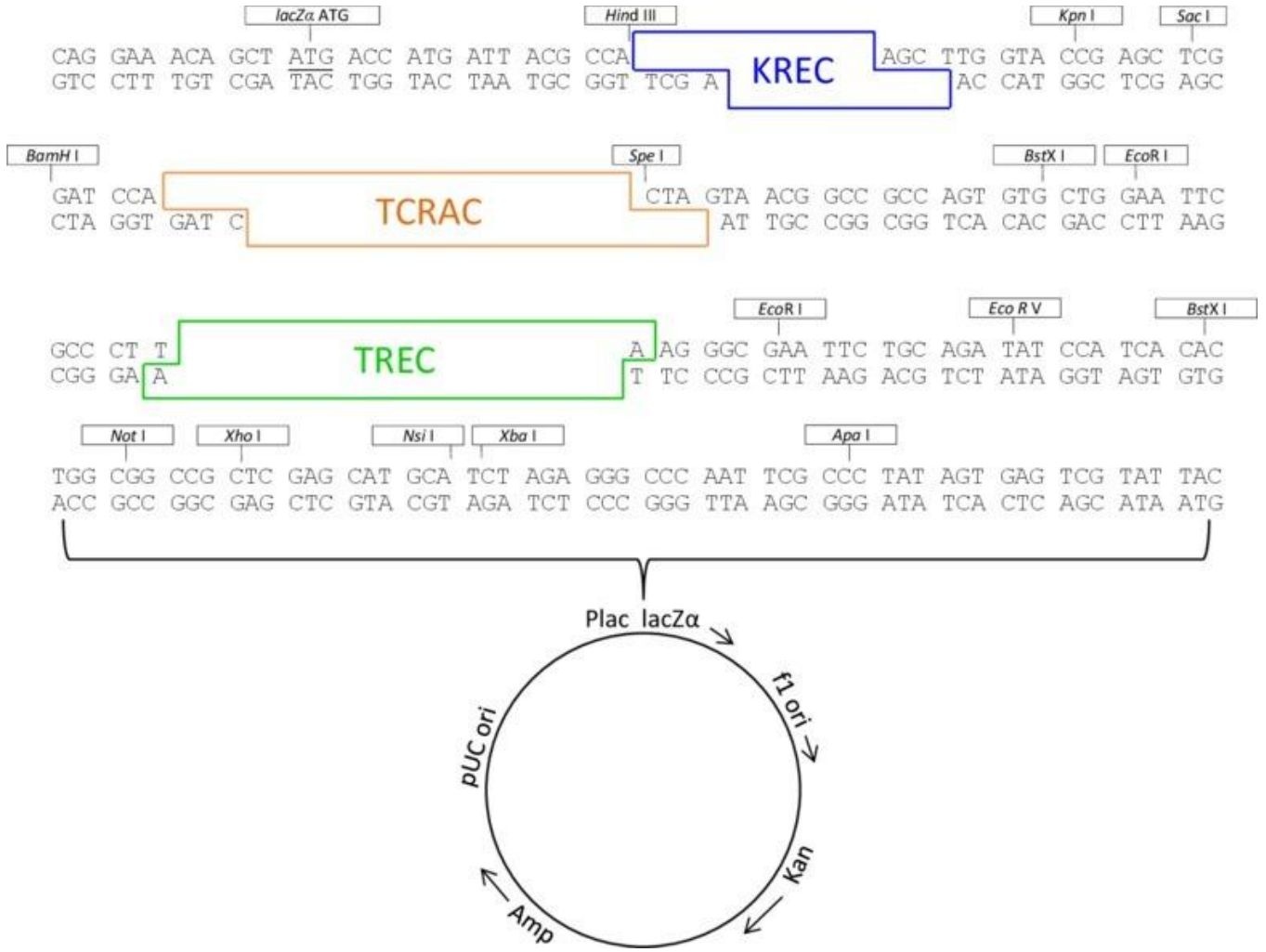
13.2.2.3. Polimeraz zincir reaksiyonu

TRAC-TREC-KREC gen bölgelerini çıkarabilmek amacıyla PZR yapıldı.

TRAC, *SPEI* bölgesinde (367 bp)

TREC, *HindIII* bölgesinde (168 bp)

KREC, PCR site bölgesinde (380 bp) (Şekil 17)



Şekil 17:3 bölge içeren plazmid haritası (20).

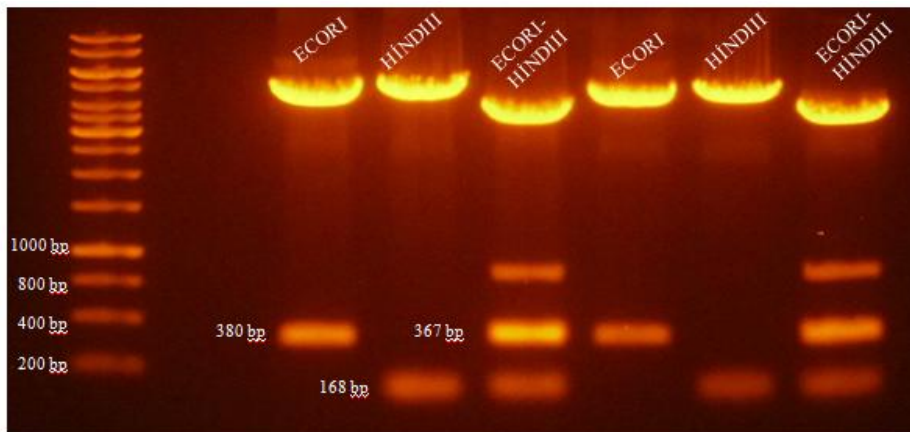
Total 20 µl olacak şekilde 3 ayrı karışım hazırlandı (Tablo 5). Eppendorf thermomixer cihazında koşulları, 1 saat 37 °C olacak şekilde hazırlandı.

Tablo 5: PZR da kullanılan malzemeler ve konsantrasyonları

İÇERİK	KONSANTRASYON	MİKTAR
R Buffer	10X	2µl
Enzim	10u/µl	0,5 µl
dH ₂ O	-	7,5 µl
DNA	10 ng	10 µl
TOPLAM	-	20 µl

13.2.2.4. Agoroz jel Hazırlama

PZR ürünlerinin bant boylarını gözlemlemek amacıyla %2'lik agoroz jel hazırlandı. 1 g agaroz 50 ml 1X'lik TAE tampounda çözüldü ve 2,5 µl (%10'luk) etidyumbromür eklendi. 20 dk donması beklendikten sonra 200 bp lik marker kullanılarak örnekler yüklendi. 80 V tampon çözelti içerisinde 20-25 dk yürütüldü. Yürütüldükten sonra jel görüntüsü alındı (Şekil 18).

**Şekil 18:** Plazmiden yapılan PZR jel görüntüsü

13.2.3. PLAZMİD KOPYA SAYISI HESABI

Plazmid büyüklüğünün 4,846 bp olduğu ve bp başına ortalama kütlenin 1.096×10^{-21} g / bp olduğu düşünülerek kopya sayısı hesabı yapılmıştır.

$$m_p = (4,846 \text{ bp}) \times (1.096 \times 10^{-21} \text{ g/bp}) = 5,311.216 \times 10^{-21} \text{ g} = 5.311 \times 10^{-18} \text{ g (20)}.$$

Total Ağırlığı (Dalton) = $3,19 \times 10^6$ 'dir.

Avagadro sayısı = $6,02 \times 10^{23}$ 'dir.

$$0,000000001 \times 6,02 \times 10^{23} / 3,19 \times 10^6 = 1,89 \times 10^8 \text{ ng/}\mu\text{l}$$

Buna göre 1 ng 'da ki kopya sayısı $1,89 \times 10^8$ dir. Bizim ürettiğimiz plazmidlerin spektrofotometredeki DNA konsantrasyonları ise; 140,3 ng ve 70 ng dır.

Buna göre aşağıdaki tabloda (Tablo 6) dilüsyon oranları oluşturulmuştur.

Tablo 6: Konsantrasyona göre plazmid dilüsyon hesabı

Moleküler ağırlık (g)	Total Ağırlık(dalton)						
$5,31 \times 10^{-18}$	$3,19 \times 10^6$						
Kopya sayısı	$1,89 \times 10^8$						
nanogram/ μl	Kopya sayısı	Hedef kopya sayısı	Dilüsyon	total	plazmid (μl)	H ₂ O (μl)	
1	$1,89 \times 10^8$						
140,3	$2,65 \times 10^{10}$	$2,00 \times 10^8$	132,58	265,167	2	263,17	st9
70	$1,32 \times 10^{10}$	$2,00 \times 10^8$	66,00	132	2	130,00	std9
		$2,00 \times 10^7$		100	10 (st9)	90	st8
		$2,00 \times 10^6$		100	10 (st8)	90	st7
		$1,00 \times 10^6$		100	50 (st7)	50	st6
		$1,00 \times 10^5$		100	10 (st6)	90	st5
		$1,00 \times 10^4$		100	10 (st5)	90	st4
		$1,00 \times 10^3$		100	10 (st4)	90	st3
		$1,00 \times 10^2$		100	10 (st3)	90	st2
		10		100	10 (st2)	90	st1

Gerekli olan seyreltmeler yapılarak hedeflenen konsantrasyonlar elde edildi (Tablo 7).

Buna göre;

$1 \times 10^6 - 1 \times 10^5 - 1 \times 10^4 - 1 \times 10^3 - 1 \times 10^2 - 1 \times 10^1$ şeklinde seyreltme yapılarak son konsantrasyonlar oluşturuldu. Kullandığımız standartlar 1×10^6 dan itibaren kullanılacağı için o değerler kullanılmıştır. RT-PCR yaparken totalde 5 μ l plazmid DNA sı kullanıldığı için konsantrasyonları 5 ile çarpılarak hesaplanmıştır.

Tablo 7:Standart Konsantrasyonları

KONSANTRASYONx 5 μ l	SON KONSANTRASYON
$1 \times 10^6 \times 5$	5×10^6
$1 \times 10^5 \times 5$	5×10^5
$1 \times 10^4 \times 5$	5×10^4
$1 \times 10^3 \times 5$	5×10^3
$1 \times 10^2 \times 5$	5×10^2
$1 \times 10^1 \times 5$	5×10^1

13.2.4. RT-PZR *TRAC/TREC/KREC*

TREC/KREC kopya sayılarının hastalarda ve kontrollerde belirlenmesi amacıyla Lightcycler480 cihazı kullanılmıştır. Referans gen olarak *TRAC* (*T hücre reseptör alfa sabit geni*) kullanılmıştır. Gen bölgelerine ait prob ve primer dizileri aşağıdaki gibidir (Tablo 8).

Tablo 8: *TRAC*, *TREC* ve *KREC* primer/prob dizileri

Primer	
TREC ileri	5'-CAC ATC CCT TTC AAC CAT GCT-3'
TREC geri	5'-TGC AGG TGC CTA TGC ATC A-3'
KREC ileri	5'-TCC CTT AGT GGC ATT ATT TGT ATC ACT-3'
KREC geri	5'-AGG AGC CAG CTC TTA CCC TAG AGT-3'
TRAC ileri	5'-TGG CCT AAC CCT GAT CCT CTT-3
TRAC geri	5'-GGA TTT AGA GTC TCT CAG CTG GTA CAC-3'
Prob	
TREC prob	5'-FAM-ACA CCT CTG GTT TTT GTA AAG GTG CCC ACT-TAMRA-3'
KREC prob	5'-HEX-TCT GCA CGG GCA GCA GGT TGG-TAMRA-3'
TRAC prob	5'-FAM-TCC CAC AGA TAT CCA GAA CCC TGA CCC-TAMRA-3'

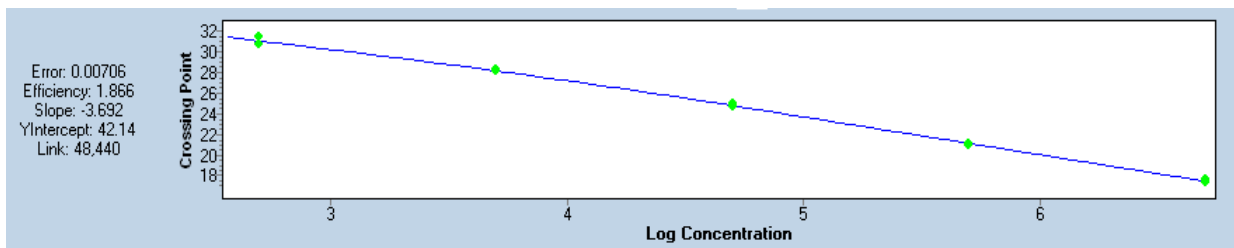
A ve B kuyucukları *TRAC* gen bölgesini,
 C ve D kuyucukları *TREC* gen bölgesini,
 E ve F kuyucukları *KREC* gen bölgesini içermektedir.
 G kuyucuklarına negatif kontroller yerleştirilmiştir.

Standartlarda oluşan konsantrasyonlar ise tablodaki gibi elde edilmiştir (Tablo 11).

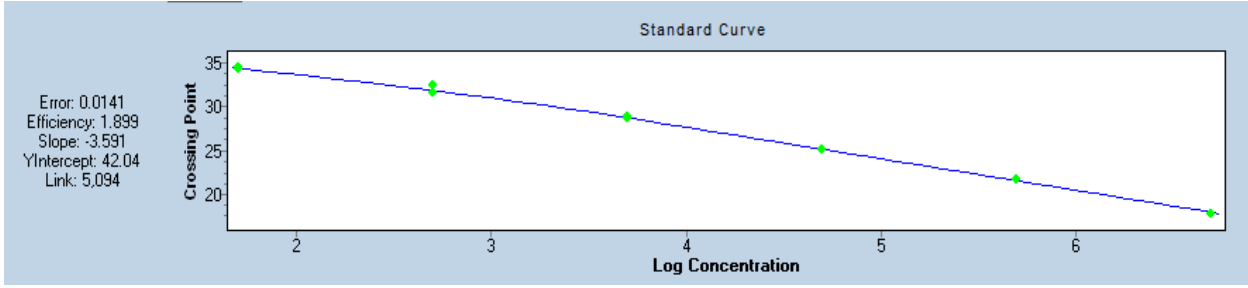
Tablo 11: Standartlarda hedeflenen kopya sayısı ve RT-PCR da elde edilen konsantrasyonlar

Inc	Pos	Name	Type	CP	Concentration	Standard
☒	E1	std8	Standard	17.46	4.89E6	5.00E6
☒	E2	std8	Standard	17.46	4.89E6	5.00E6
☒	E3	std5	Standard	20.77	5.24E5	5.00E5
☒	E4	std5	Standard	20.78	5.21E5	5.00E5
☒	E5	std4	Standard	24.27	4.97E4	5.00E4
☒	E6	std4	Standard	24.31	4.82E4	5.00E4
☒	E7	std3	Standard	27.43	6.11E3	5.00E3
☒	E8	std3	Standard	27.62	5.42E3	5.00E3
☒	E9	std2	Standard	31.50	4.55E2	5.00E2
☒	E10	std2	Standard	31.75	3.89E2	5.00E2
☒	E11	std1	Standard	35.00	5.35E1	5.00E1
☒	E12	std1	Standard	35.00	5.35E1	5.00E1

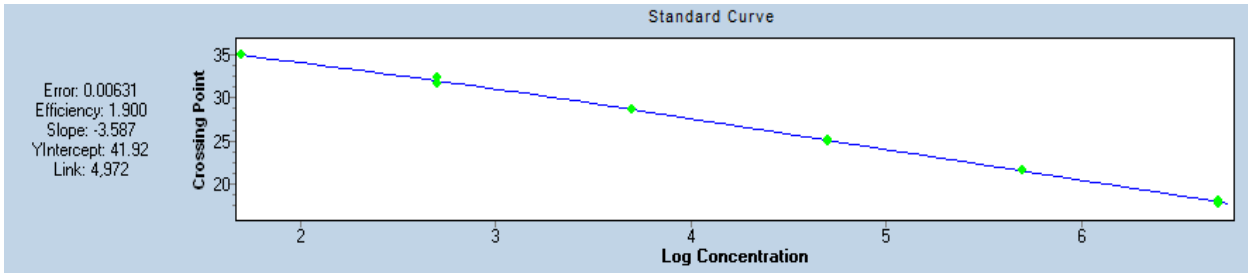
Standartlarda hedeflenen Cp değerlerine ve konsantrasyonlarına şekildeki gibi ulaşılmıştır. Her standarttan 5 µl kullanıldığı için 5 ile çarpılarak konsantrasyonları girilmiştir. Her bir standart 3 ayrı gen bölgesi için duplike olarak kullanılmıştır.



Şekil 19: *TRAC* gen bölgesi için elde edilen plazmid standart eğrisi



Şekil 20: *TREC* gen bölgesi için elde edilen plazmid standart eğrisi



Şekil 21: *KREC* gen bölgesi için elde edilen plazmid standart eğrisi

13.2.5. *TRAC-TREC-KREC* KOPYA SAYISI HESABI

RT-PZR da elde edilen sonuçlara göre *TRAC-TREC* ve *KREC* bölgeleri duplike çalışıldığı için 2 konsantrasyon değeri içermektedir. Bu sebeple değerlerinin ortalamaları alınarak excelde kopya sayısı hesabı yapılmıştır. Kopya sayısı absolute quantifikasyon ile değerlendirilip ve hesaplamalar aşağıdaki gibi yapılmıştır. *TRAC*/2 olmasının sebebi her bir kromozomda 2 kopya sayısına sahip olmasıdır. Bu nedenle 2'ye bölünerek hesaplamalara katılmıştır. 10^6 çarpımı 1 ml periferik kandaki ortalama lenfosit sayısını temsil etmektedir.

$$\frac{TREC}{TRAC/2} \times 10^6 \text{ ve } \frac{KREC}{TRAC/2} \times 10^6 \text{ şeklinde yapılmıştır.}$$

Bu hesaplamalara göre hasta örnekleri için excel hazırlanarak ortalama *TREC/KREC* kopya sayısı hesaplamaları yapılmıştır. Her örnek duplike çalışıldığı için öncelikle ortalamaları alınarak işleme devam edilmiştir (Tablo 12).

Tablo12:Örnek kopya sayısı hesabı

TRAC ORT.	TREC ORT.	KREC ORT.	TRAC/2	TREC/TRAC	10*6	KREC/TRAC	10*6
1,36E+05	1,44E+02	1,34E+02	6,80E+04	2,12E-03	2,12E+03	1,97E-03	1,97E+03

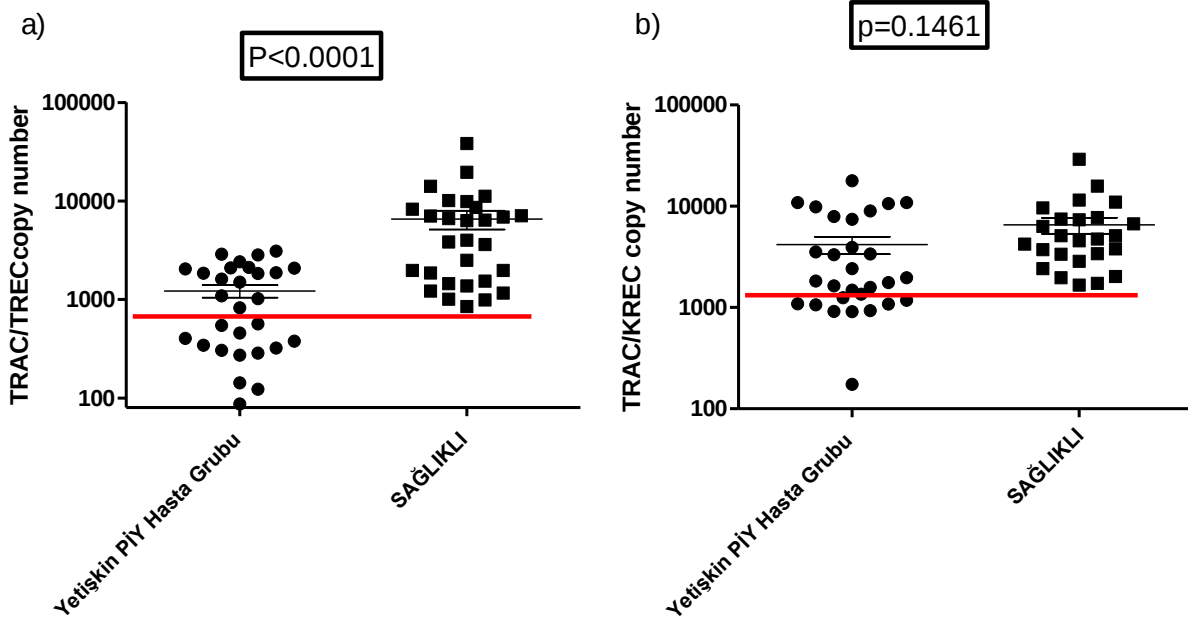
13.2.6. İstatistiksel Analiz

İki gruplar arası farklılıklar t-test kullanılarak hesaplanmıştır. Çoklu karşılaştırmalarda one-way ANOVA testi kullanılmıştır. $P < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edilmiştir. Grafikler Graphpad Prism Demo 5 (Updating Prism Windows 5.00,USA) programı yardımıyla oluşturulmuştur.

14. BULGULAR

14.1. Yetişkin ve Pediatrik Hastalarda *TREC/KREC* Kopya Sayıları

Yapılan genel değerlendirmede, immün yetmezlik hastalarının *TREC* kopya sayıları, kontrol grupları ile kıyaslandığında daha düşük seviyede olduğu görülmüştür (t-test $p<0.0001$) (Şekil 22- a). Yirmidokuz hastanın 13'ünün (%44,8'i) *TREC* kopya sayısı bakımından sağlıklı kontrol grubunun altında kaldığı gözlenmiştir.

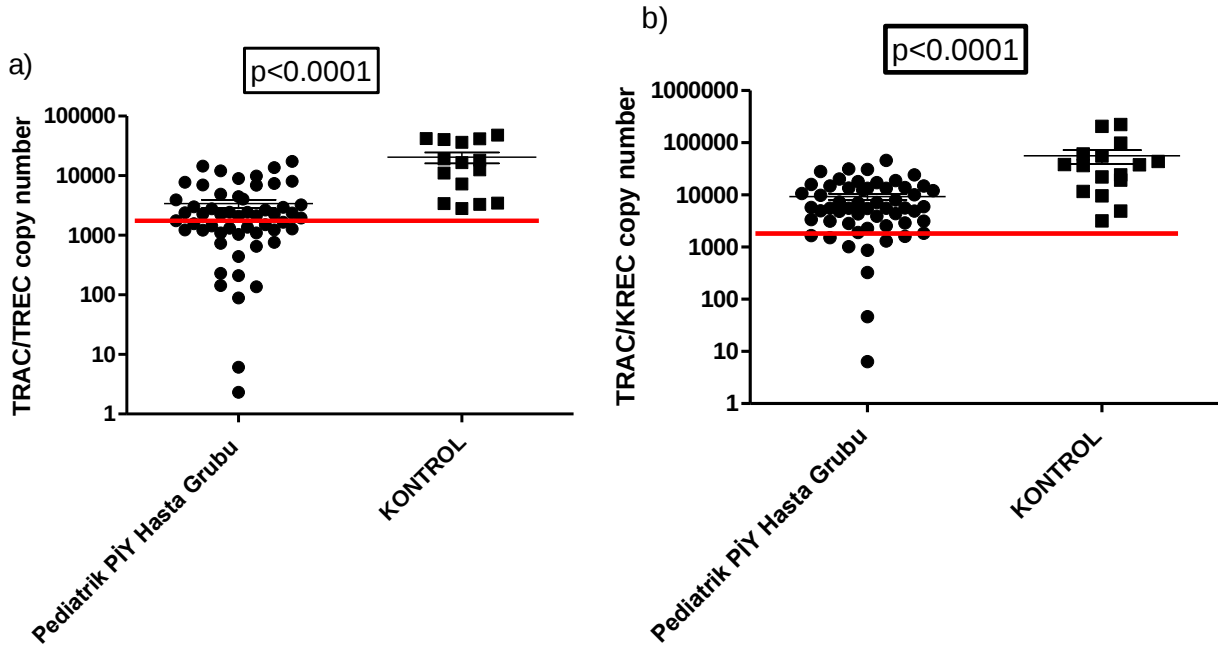


Şekil 22: Yetişkin immün yetmezlik hastalarında ve kontrollerde a) *TREC* kopya sayıları b) *KREC* kopya sayıları. Kırmızı çizgi kontrol grubunun en alt sınırını (en düşük kopya sayısını) temsil etmektedir.

KREC seviyelerine bakıldığında genel değerlendirmede istatistiksel olarak anlamlı olmamakla beraber hastaların kontrol grubuna göre daha az seviyede kopya sayısına sahip olduğu görülmüştür ($p=0.1461$) (Şekil 22-b). Yirmidokuz hastanın 9'unun (%31) kontrol grubunun alt

sınırının altında kopya sayısına sahip olduğu görülmüştür. Kopya sayısı bakımından kontrol grubunun altında kalan hastalar kırmızı çizgiyle belirtilmiştir.

Pediyatrik hastalarda *TREC* kopya sayısının kontrol grubuna göre anlamlı derecede azaldığı bulunmuştur (t test $p<0.0001$) (Şekil 23-a). Elliye di pediatrik hastanın 21 tanesinde kontrol grubunun altında *TREC* kopya sayısı gözlenmiştir.



Şekil 23: Pediyatrik immün yetmezlik hastalarında ve kontrollerde a) *TREC* kopya sayıları b) *KREC* kopya sayıları. Kırmızı çizgi kontrol grubunun en alt sınırını (en düşük kopya sayısını) temsil etmektedir.

Pediyatrik hastalarda *KREC* kopya sayısının kontrol grubuna göre anlamlı derecede azaldığı bulunmuştur (t test $p<0.0001$) (Şekil 23-b). On hastanın kontrol grubunun altında *KREC* kopya sayısı olduğu gözlenmiştir.

14.2. Hastalık altı gruplarına göre (PAY, YDİY ve AKİY) *TREC/KREC* kopya sayılarının değerlendirilmesi

Yetişkin ve pediatrik hastalar primer immün yetmezlik alt sınıflarına ayrılarak referans gen *TRAC* ve *TREC/KREC* bakımından minimum-maksimum ve ortanca değerleri belirlenmiştir (Tablo 13).

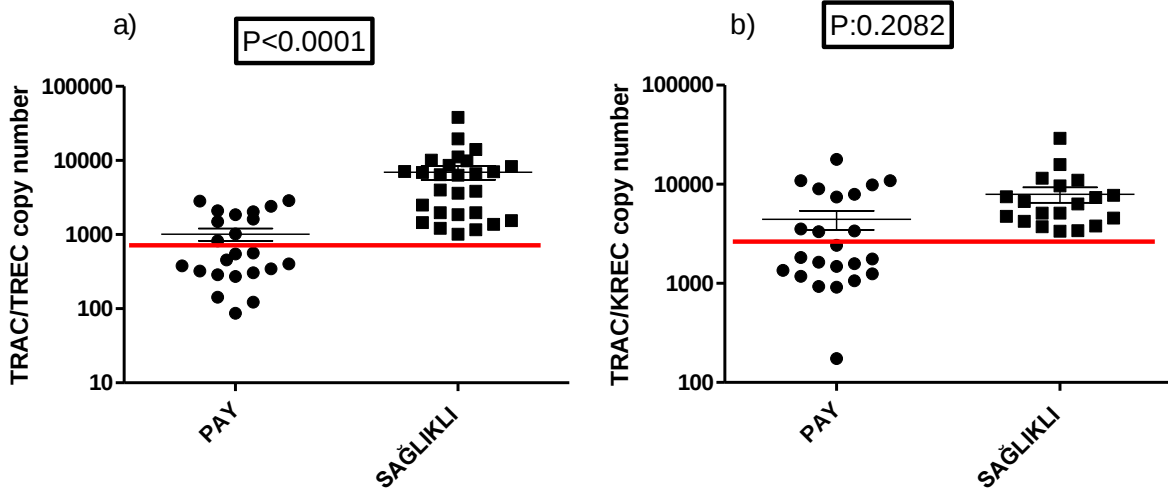
Tablo13: Yetişkin hasta grubu ve kontrol grubundaki *TREC/KREC* sayıları

	<i>TRAC Kopya sayısı</i> Ortanca (Min-Maks)	<i>TREC Kopya sayısı</i> Ortanca (Min-Maks)	<i>KREC Kopya sayısı</i> Ortanca (Min-Maks)	Hasta sayısı (n)
AKİY	49000	1870	10600	1
PAY	71300 (9650-315000)	1020 (87-3100)	1830 (174-17800)	27
TANISI KOYULMAMIŞ	8450	1090	1090	1
KONTROL	151000 (11100-1850000)	3850 (703-38300)	3800 (903-29100)	29

Bu verilere göre AKİY'e sahip olan YETİY11 kodlu hastanın *TREC* kopya sayısı 1870 iken *KREC* kopya sayısı 10600 olduğu gözlemlendi. Yaş uyumlu kontrolle kıyaslandığında kopya sayısının düşük olduğu gözlenmiştir. *KREC* kopya sayısının ise *TREC* kopya sayısına oranla daha yüksek olduğu görülmüştür. PAY hasta grubunun ise *TRAC* medyan kopya sayısı hesaplamasına göre hem *TREC* kopya sayısının hemde *KREC* kopya sayısı bakımından daha az seviyelerde olduğu görülmüştür. Diğer olarak sınıflandırılan ve tanısı konulmamış hastanın seviyelerinin referans geniyle kıyaslandığında *TREC/KREC* seviyelerinin normal seviyelerde görülmüştür.

Yetişkin kontrol grubu *TREC* kopya sayısı bakımından minimum 703, maksimum 38500 kopya sayısına sahipken, *KREC* kopya sayısı bakımından minimum 903, maksimum 29100 olduğu gözlenmiştir.

Yetişkin PAY hasta grubu ayrı olarak değerlendirildiğinde aşağıdaki şekil elde edilmiştir (Şekil 24).



Şekil 24: Yetişkin PAY grubu hastalarının a) *TREC* kopya b) *KREC* sayısı bakımından control grubuyla karşılaştırılması.

PAY hasta grubunun *TREC* bakımından kontrol grubuyla kıyaslandığında anlamlı derecede daha az kopya sayısı içerdiği gözlenmiştir (t-test $p < 0.0001$). PAY hastalarının 13'ünün kontrol grubunun alt sınırının da altında kaldığı görülmüştür. Kopya sayısı bakımından kontrol grubunun altında kalan hastalar kırmızı çizgiyle belirtilmiştir (Şekil 24-a).

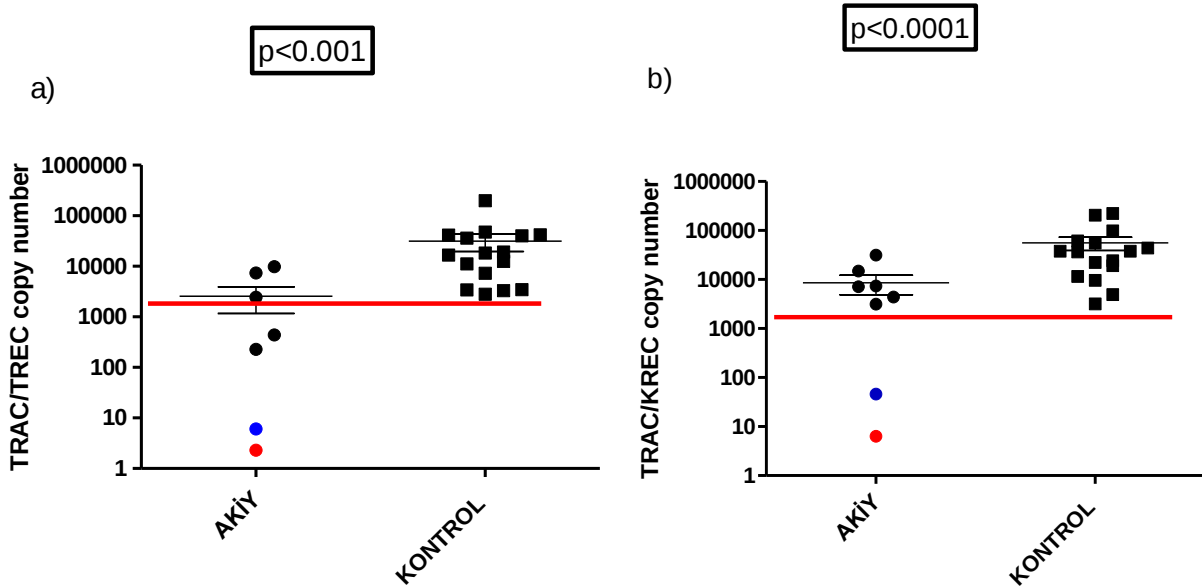
Yetişkin hastalardan PAY grubunun *KREC* kopya sayısı istatistiksel olarak anlamlı olamamakla beraber azalmış olarak gözlenmiştir ($p = 0.20$). PAY hastalarının 13 tanesinin kontrol grubunun alt sınırının daha da altında kaldığı görülmüştür. Kopya sayısı bakımından kontrol grubunun altında kalan hastalar kırmızı çizgiyle belirtilmiştir (Şekil 24-b).

Pediyatrik hastalarda da AKİY ve PAY grubu ayrı ayrı değerlendirilerek referans gen *TRAC* ve *TREC/KREC* kopya sayısı min-maks ve ortalanca değerleri hesaplanmıştır. Buna göre aşağıdaki bulgular elde edilmiştir (Tablo 14).

Tablo 14: Pediatrik hastalar ve yaş uyumlu kontrollerde saptanan *TREC/KREC* kopya sayıları

	<i>TRAC kopya sayısı</i> Ortanca (min-maks)	<i>TREC kopya sayısı</i> Ortanca (min-maks)	<i>KREC kopya sayısı</i> Ortanca (min-maks)	Hasta (n)
<u>AKİY</u>	58300 (34900-96500)	2110 (0 – 9880)	5620 (6 – 31600)	9
<u>PAY</u>	47700 (12500-408000)	2280 (211-13700)	5920 (1020-30600)	31
<u>KONTROL</u>	18900(8450-27900)	17400(2800-199000)	37200 (3190-206000)	16

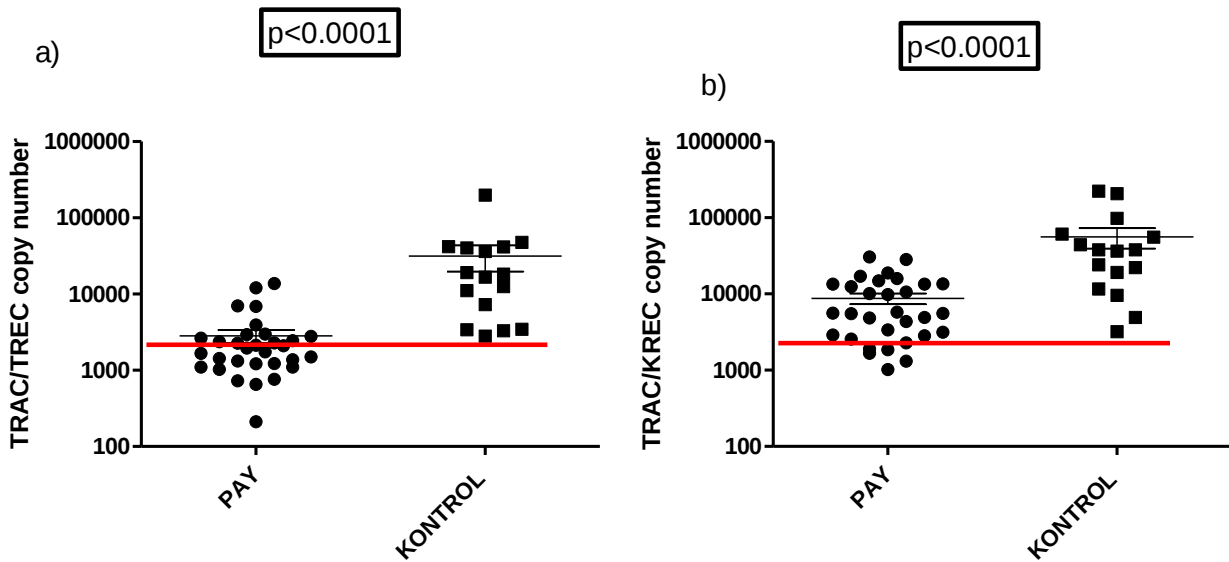
Pediatrik kontrol grubu *TREC* kopya sayısı minimum 2800-maksimum 199000 iken *KREC* kopya sayısı ise minimum 3190- maksimum 206000 olduğu gözlenmiştir. AKİY grubunda referans gen ortanca kopya sayısı 58300 iken 2110 *TREC* kopya sayısına sahip olduğu gözlemlendi. Aynı zamanda 5620 medyan *KREC* kopya sayısına sahip olan hastalara bakıldığında *TREC* kopya sayısına göre yüksek seviyelerde olduğu gözlenmiştir. Bu durumun şekil halinde gösterilmesi aşağıda verilmiştir (Şekil 25)



Şekil 25: Pediatrik AKİY grubu hastaların kontrol grubuyla a) *TREC* kopya sayısı b) *KREC* kopya sayısı (Kırmızı nokta: PEDİY53, Mavi nokta: PEDİY54 no'lu T-B-hastalar)

Pediatric AKIY hastalarının *TREC* kopya sayıları kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede az seviyelerde olduğu görülmüştür (t-test $p < 0.0001$) (Şekil 25-a). PEDIY4 numaralı hastanın *TREC* kopyasayısına hiç sahip olmadığı gözlenmiştir. PEDIY54 no'lu hastanın *TREC* kopya sayısı 6 iken PEDIY53 no'lu hastanın 23 kopya sayısının olduğu görülmüştür. Aynı zamanda PEDIY56 no'lu hastanın 229 kopya sayısına sahip olduğu dolayısıyla kontrol grubunun altında kalan hastalar olduğu belirlenmiştir. Bu hastalar AKIY grubu içerisinde en düşük kopya sayısına sahip olan hastalardır.

Pediatric AKIY hastalarının *KREC* kopya sayısı karşılaştırıldığında *TREC* seviyelerine göre daha yüksek fakat kontrol grubuna göre daha az seviyelerde olduğu istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür (t-test $p < 0.0001$) (Şekil 25-b). *TREC* kopya sayısı bakımından az olan PEDIY4 no'lu hastanın *KREC* kopya sayısının 4300 olduğu görülmüştür. PEDIY53 no'lu hastanın *KREC* kopya sayısının 6 civarında olduğu görülmüştür. PEDIY54 no'lu hastanın *KREC* kopya sayısının 46 olduğu gözlenmiştir. PEDIY56 no'lu hastanın ise *KREC* kopya sayısı 3160 civarında olduğu görüldü. *TREC* kopya sayısına oranla daha yüksek bir seviyede olduğu gözlenmiştir.



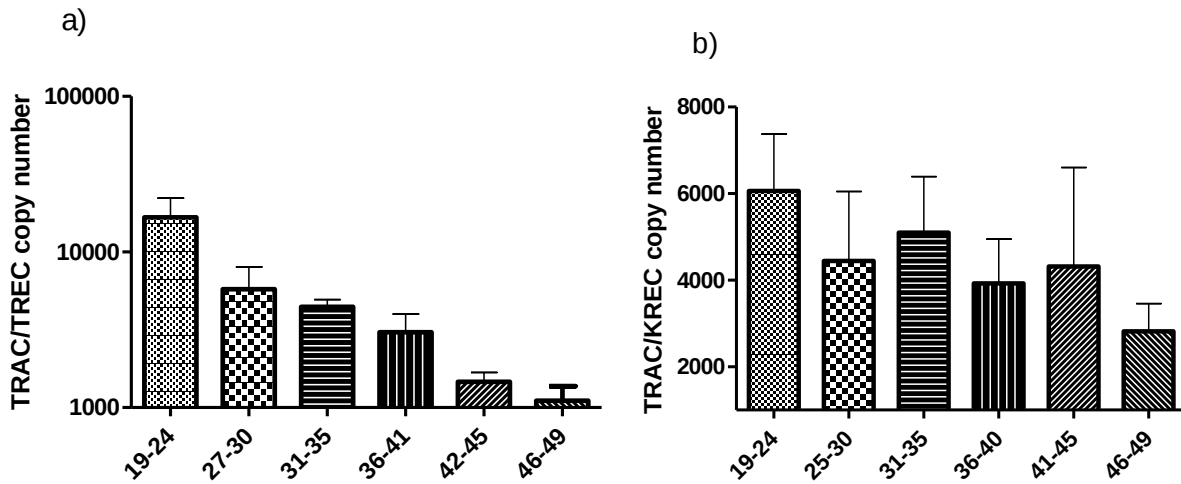
Şekil 26: PAY hasta grubunun kontrol ile *TREC/KREC* kopya sayısı bakımından karşılaştırılması

Pediatric PAY hastalarında *TREC* kopya sayısının kontrol grubundan daha düşük olduğu istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (t -test $p < 0.0001$) (Şekil 26-a). Otuz bir PAY hastasının %54,8'nin kontrol grubunun kopya sayısı bakımından altında kaldığı görülmüştür. PEDIY10 no'lu hastanın en düşük *TREC* kopya sayısına sahip olduğu gözlenmiştir. Hastanın 123000 referans gen kopya sayısı olduğu fakat 211 *TREC* kopya sayısına sahip olduğu gözlenmiştir.

Pediatric hastalar *KREC* kopya sayısı bakımından değerlendirildiğinde hastaların kontrol grubundan daha az kopya sayısına sahip olduğu istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür (t -test $p < 0.0001$) (Şekil 26-b). 31 PAY hastasının %17,2'nin ise kontrol grubunun alt sınırının da altında kaldığı görülmüştür.

14.3. Yaş aralıklarına göre sağlıklı kontrollerde *TREC/KREC* kopya sayısı analizi

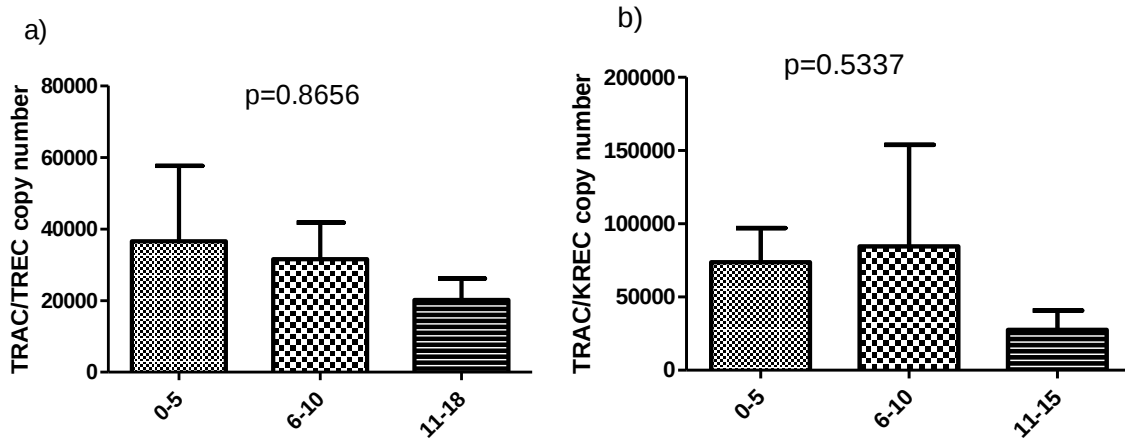
Yetişkin kontrol grubunda elde edilen *TREC/KREC* kopya sayılarını yaş aralıklarına göre de analiz edilmiştir (Şekil 27).



Şekil 27: Yetişkin kontrol grubu yaş aralıklarına göre *TREC/KREC* kopya sayısı

Elde edilen deney sonuçlarına göre *TREC* kopya sayısının yaşa bağlı olarak zamanla anlamlı derecede azalma gösterdiği görülmüştür (one-way ANOVA $p=0.0136$) (Şekil 27-a). *KREC* kopya sayısı ise *TREC* seviyelerindeki gibi yaşa bağlı olarak azalma göstermemiştir (one-way ANOVA $p=0.7534$) (Şekil 27-b).

Pediatric kontrol grubu yaş aralıklarına ayrıldığında aşağıdaki seviyeler elde edilmiştir (Şekil 28).

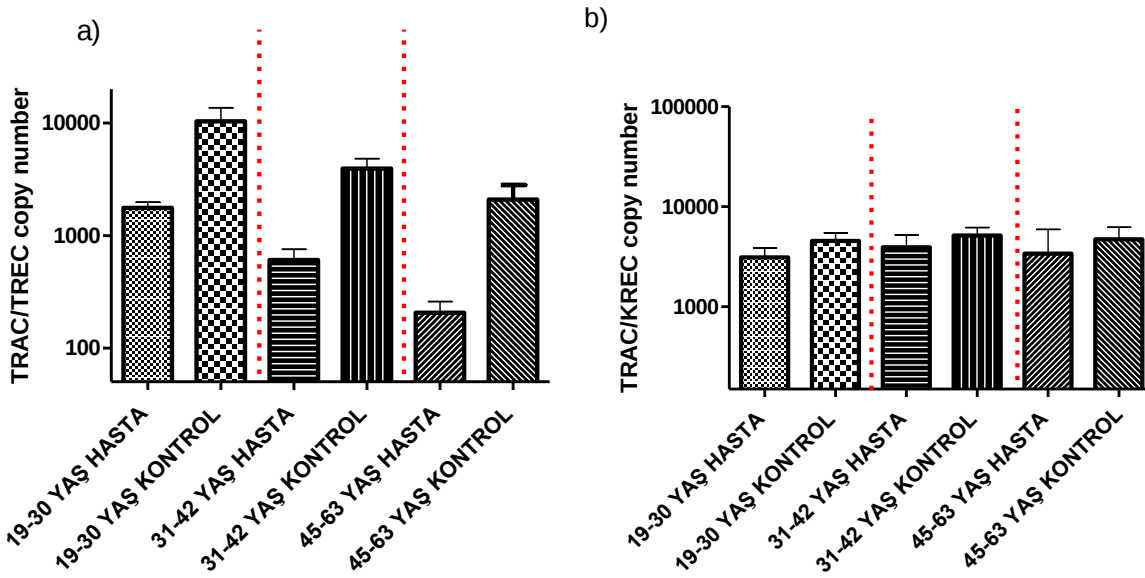


Şekil 28: Pediatrik kontrollerin yaş aralıklarına göre *TREC/KREC* kopya sayıları

Pediatrik kontrollerin yaş aralıklarına göre *TREC* kopya sayısına bakıldığında anlamlı olmamakla birlikte yaşa bağlı olarak azalma gözlenmiştir (one-way ANOVA $p=0.8654$) (Şekil 28-a). *KREC* kopya sayısına bakıldığında yine anlamlı olmamakla beraber yaşa bağlı azalma gözlenmemiştir (one-way ANOVA $p=0.5537$) (Şekil 28-b).

14.4. Yaş aralıklarına göre immün yetmezlik hastalarında *TREC/KREC* kopya sayısı analizi

Pediatrik ve yetişkin immün yetmezlik hastaları yaş gruplarına ayrılarak analiz edildi. Yetişkin hastalar yaş gruplarına ayrıldığında *TREC* kopya sayılarının gittikçe azaldığı gözlemlendi (Şekil 29).

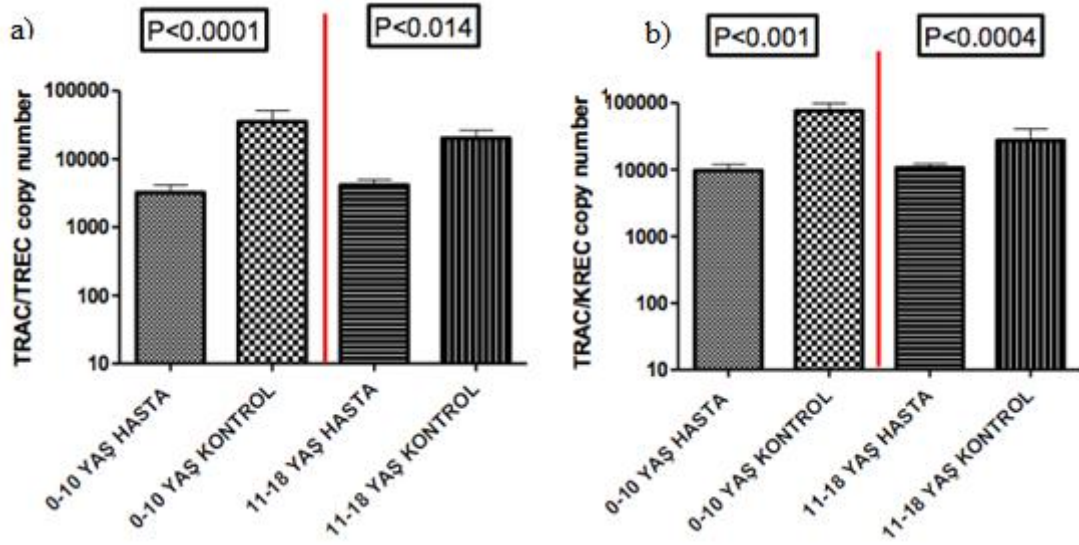


Şekil 29: Yetişkin hastaların ve kontrollerin yaş aralıklarına göre *TREC/KREC* kopya sayıları

19-30 yaş hastalar yaş uyumlu kontrol grubuyla kıyaslandığında *TREC* kopya sayılarının anlamlı derecede azaldığı olduğu gözlenmiştir (t-test $p < 0,0001$). Aynı şekilde 31-42 yaş hastalar yaş uyumlu kontrollerle kıyaslandığında seviyelerinin anlamlı derecede azaldığı görülmüştür (t-test $p < 0,0001$) 45-63 yaş hastaların kontrol grubuyla kıyaslandığında *TREC* kopya sayılarının düşük olduğu gözlenmiştir (t-test $p = 0,005$). Hastaların yaşa bağlı olarak *TREC* seviyelerinde azalma gözlenmiştir (Şekil29-a).

Yetişkin hastaların *KREC* kopya sayılarına bakıldığında yaşa bağlı olarak azalma gözlenmemiştir. Buna karşın 19-30 yaş hasta ve yaş uyumlu kontrollerle kıyaslandığında anlamlı bir azalma görülmemiştir (t-test $p = 0,1293$). 31-42 yaş hasta ve yaş uyumlu kontrollerle kıyaslandığında anlamlı bir azalma gözlenmemiştir (t-test $p = 0,5942$). 45-63 yaş hastalarda kontrollerle karşılaştırıldığında anlamlı bir azalma gözlenmemiştir (t-test $p = 0,7297$) (Şekil 29-b).

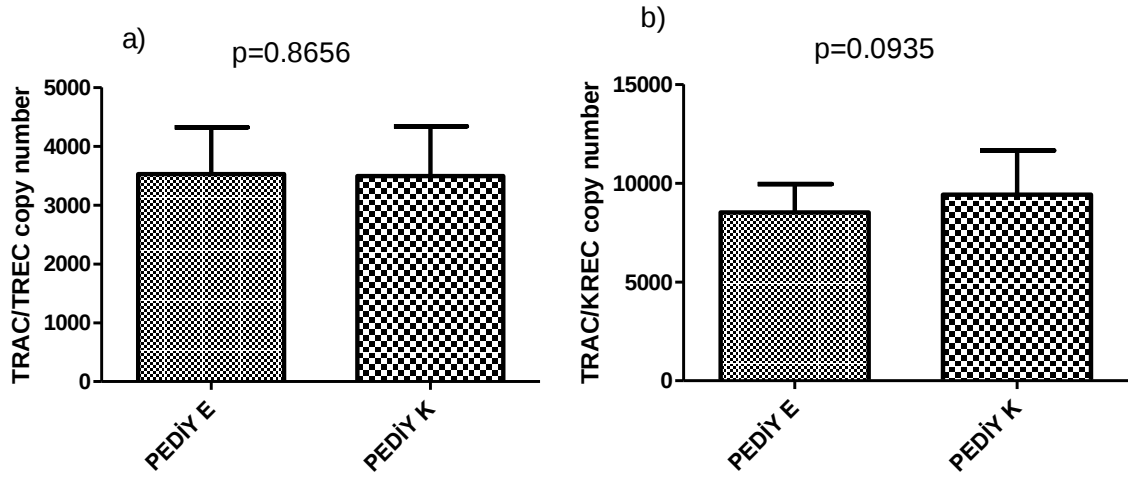
Pediyatrik hastalar yaş aralıklarına göre sınıflandırılıp analiz edilmiştir (Şekil30 a-b).



Şekil 30: Pediatrik hastalarda yaş aralıklarına göre a) *TREC* kopya sayısı b) *KREC* kopya sayısı

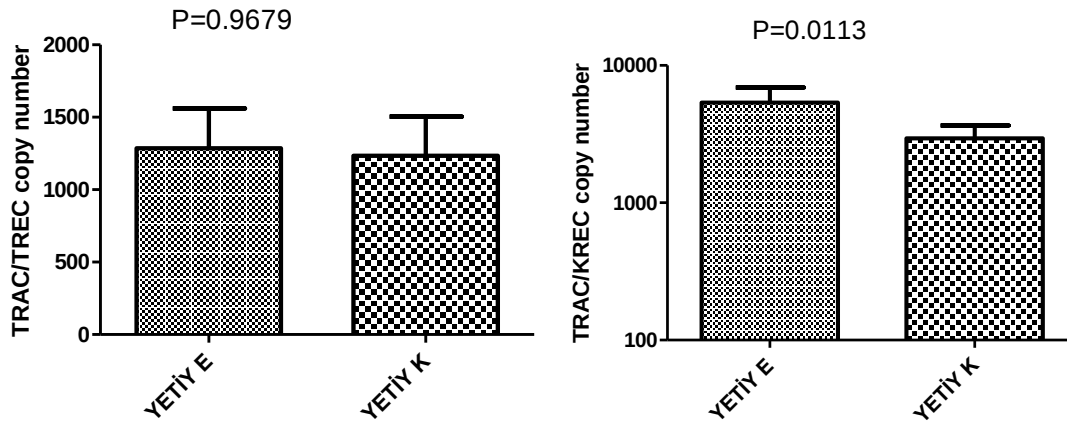
Pediatrik hastalarda, yetişkin hastaların aksine *TREC* kopya sayısının yaş grubuna bağlı olarak azalma gözlenmemiştir. Kontrol grubuyla kıyaslandığında 0-10 yaş aralığındaki hastaların *TREC* kopya sayılarının az olması anlamlı olarak bulunmuştur (t-test- $p<0.01$). *KREC* kopya sayısı ise hastalarda hemen hemen aynı değerlerde görülmüştür. Kontrol grubuyla kıyaslandığında 0-10 yaş aralığındaki hastaların *KREC* kopya sayılarının az olması anlamlı olarak bulunmuştur (t-test $p<0.014$) (Şekil 30-b).

Pediatrik ve yetişkin hastalarda cinsiyete göre *TREC/KREC* kopya sayıları aşağıda verilmiştir.



Şekil 31: Cinsiyete göre a) *TREC* kopya sayısı b) *KREC* kopya sayısı (PEDİY E: Pediatrik erkek, PEDİY K= Pediatrik kadın)

Pediatrik hastalarda cinsiyete bağlı değişimlere bakıldığında *TREC* kopya sayılarında anlamlı olmamakla beraber kopya sayıları yakın seviyelerde görülmüştür (t-test $p=0.8656$). *KREC* kopya sayısı bakımından anlamlı olmamakla beraber erkeklerin kadınlara oranla daha az seviyelerde olduğu görülmüştür (t-test $p=0.0935$).



Şekil 32: Yetişkin hastalarda cinsiyete göre *TREC/KREC* kopya sayıları

Yetişkin hastalarda cinsiyete bağlı olarak *TREC* kopya sayısı anlamlı olmamakla beraber yaklaşık benzer seviyelerde olduğu gözlenmiştir (t-test $p=0.09679$). *KREC* kopya sayısı ise erkek bireylerde anlamlı olarak daha yüksek seviyede olduğu gözlenmiştir (t-test $p=0.0113$) (Şekil 32)

14.5. Mutasyona sahip olan hastalarda *TREC/KREC* kopya sayıları

Mutasyona sahip olan hastalarda mutasyonun etkilerini ortaya çıkarmak amacıyla *TREC/KREC* seviyeleri belirlenmiştir. Pediatrik ve yetişkin grupta mutasyona sahip olan hastaların kopya sayıları aşağıda verilmiştir (Tablo 15).

Tablo 15: Mutasyon sahibi hastalarda *TREC/KREC* kopya sayıları

	Gen Mutasyonu	<i>TREC</i> Kopya Sayısı	<i>KREC</i> Kopya Sayısı	Hasta No
Kombine B ve T immüne yetmezlik	<i>ADA</i>	441	7330	PEDİY 1
	<i>Heterozigot DCLRE1C</i>	0	4380	PEDİY 4
MSMD	<i>STAT1</i>	8970	45800	PEDİY 2
		2350	7060	PEDİY 7
Yaygın Değişken immün Yetmezlik bozukluğu	<i>NFKB</i>	2990	10600	PEDIY43
	<i>PIK3CD</i>	1840	3930	YETİY3
	<i>TACI</i>	8090	8010	PEDİY23
	<i>CD19</i>	2080	907	YETİY12
HIESs	<i>STAT3</i>	7720	5550	PEDİY 6
		1230	12100	PEDİY27
		4870	20200	PEDİY40
	<i>DOCK8</i>	4440	18000	PEDIY 8
Ağırıklı Antikor Yetersizliği Agammaglobülinemi	<i>Monozomi7</i>	2270	1510	PEDIY55
DNA hasarı kusurları	<i>ATM</i>	1280	3920	PEDİY24
Sentromerik instabilite ve yüzeyel anomalilerle immün yetmezlik	<i>22q11del</i>	143	870	PEDİY51
		136	125	PEDİY52

MSMD: Mendelian susceptibility to mycobacterial diseases,

HIESs: Hyperimmunoglobulin E syndrome

15. TARTIŞMA

Primer immün yetmezlikler (PİY); insan bağışıklık sisteminin kusuru sonucu ortaya çıkan nadir ve heterojen bir hastalık grubudur. T ve B hücre hasarına veya fonksiyonel olmamasına bağlı olarak görülen PİY hastalığının ülkemizdeki sıklığı tam olarak bilinmemektedir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından 150’den fazla PİY fenotipi olduğu bildirilmiştir. Bu hastalığın gerçek insidansı ancak popülasyonlara özgü yenidoğan ve toplum taramaları ile mümkün olacaktır. İmmün yetmezlik tanısı, klinik bulgular ile destekleyici immünolojik ve moleküler genetik testler ile koyulabilmektedir (40). Bu yüzden hastaların tanı ve tedavi süreçleri gecikmektedir. Özellikle sebebi bilinmeyen ve tanı koyulamadan gerçekleşen yenidoğan ölümlerinin aydınlatılması için spesifik tarama testlerine ihtiyaç vardır. Tanı konulabilen hastalar için kemik iliği nakli vb tedavi yöntemleri hayat kurtarıcıdır. *TREC/KREC* kopya sayısı analizleri hızlı sonuç alınabilen, düşük maliyetli ve yüksek hassasiyette testler olup, toplum tarama çalışmalarına iyi bir adaydır. *TREC* ve *KREC* DNA parçaları PİY hastalığı için kullanışlı ve bilgi verici biyobelirteçlerdir ve erken teşhisinde kullanımı hızla yaygınlaşmaktadır.

Bu tez çalışmasının hedefi, PİY düşünülen hastalarda, kantitatif olarak *TREC/KREC* kopya sayılarını analiz ederek T ve B hücre gelişimi hakkında bilgi sahibi olmaktır. Bu amaçla öncelikle ülkemizde PİY düşünülen hastalarda ve sağlıklı popülasyon taramalarında kullanılabilecek bir yöntem oturtulmuştur. Bu sayede sağlıklı ve hastalardaki düzeyler karşılaştırılarak yenidoğan döneminde hızlı bir şekilde immün yetmezlik şüphesi olan bireyler kesin tanıya yönlendirilebilecektir. İkinci olarak mutasyon saptanan bireylerde *TREC/KREC* kopya sayıları belirlenmiştir. Grubumuzun önceki çalışmasında immün yetmezlik hastalarında en sık görülen genler için mutasyon panelleri oluşturulmuş ve bu hastalar olası gen mutasyonları açısından taranmıştır (41,42). Böylece hastalığa neden olan patojenik varyasyonların T ve B hücre gelişimlerinin etkileyip etkilemedikleri görülmüştür. Son olarak immün yetmezlik tanısı ya da şüphesi ile ilgili kliniklerden yönlendirilen hastaların T ve B hücre gelişimlerini görmek ve tanıyı doğrulamak ya da dışlamak amacıyla *TREC/KREC* kopya sayısı analizleri gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışmada yaş ve cinsiyet uyumlu sağlıklı kontrol örneklerinde de *TREC/KREC* kopya sayıları belirlenmiştir. Literatürde sağlıklı pediatrik ve yetişkin popülasyonlarda yapılmış kısıtlı sayıda çalışma bulunmaktadır (19,20,43). Bu çalışmalardan birinde pediatrik ve yetişkin sağlıklı kontrol grubu çalışılarak normal seviyeler belirlenmeye çalışılmıştır. Elde edilen bulgular sağlıklı

çocuk (0-17 yaş) ve yetişkinlerde (24-40 yaş) *TREC* seviyesinin yaşla ters orantılı olduğu göstermektedir. Yaş arttıkça *TREC* seviyesinin azaldığı bildirilmektedir. Oysa *KREC* kopya sayısının yaşa bağlı azalma göstermediği bildirilmiştir (20). Türkiye’de yapılmış böyle bir çalışma mevcut değildir. Bizim çalışmamızın bulguları da mevcut literatür bulgusu ile aynı yöndedir; *TREC* kopya sayısı yaşa bağlı olarak azalırken, *KREC* kopya sayılarının yaşa bağlı zamanla azalma göstermediği görülmüştür. Yetişkinlerde yaşa bağlı olarak *TREC* kopya sayılarının azalması periferik hücre bölünmesi ve yaşla ilişkili timik aktivitenin azalması nedeniyle yetişkin hastalarda yaşa bağlı azalma görülmesine sebep olduğu bir çalışmada bildirilmiştir (20). T hücreleri timusta olgunlaştığı için timik aktivitenin yaşa bağlı olarak azalması hücrelerin olgunlaşamamasına ya da fonksiyonel olmamasına sebebiyet verdiği düşünülmektedir. Timik aktivitenin azalması timusta olgulaşan T hücrelerini etkilemesi *TREC* kopya sayısının buna bağlı olarak zamanla azaldığını göstermektedir(44). Yetişkinlerde *KREC* kopya sayılarının yaşa bağlı seviyelerinde değişmelerin olmamasının sebebi timus yerine kemik iliğinde olgunlaşmalarıdır. Aynı çalışmada bu hastalarda cinsiyete bağlı *TREC/KREC* seviyeleri ortaya konulmaya çalışılmıştır. Cinsiyete göre ayırım yapıldığında pediatrik grupta *TREC* kopya sayısı bakımından kadınların kopya sayılarının erkeklerle hemen hemen aynı seviyelerde olduğu ortaya konulmuştur. Yetişkin grupta ise erkeklerde daha fazla azalma oranı olduğu saptanmıştır. *KREC* kopya sayısı bakımından incelendiğinde ise cinsiyete bağlı değişim gözlenmemiştir (20). Bizim çalışmamızda da pediatrik ve yetişkin hasta grubunda cinsiyete bağlı *TREC* kopya sayısı bakımından anlamlı bir fark bulunmamıştır. *KREC* kopya sayısı bakımından incelediğimizde yetişkin erkeklerde anlamlı derecede daha fazla olduğu, pediatrik grupta ise anlamlı olmamakla beraber kadınlarda daha yüksek seviyelerde bulunmuştur. Bu çalışmanın kısıtlılıklarından birisi ulusal referans değerlerinin bulunmaması, bu tez kapsamında çalışılan sağlıklı bireylerin sayılarının az olmasıdır ve hasta gruplarda literatürde cinsiyete bağlı bir çalışma görülmemesidir. Her ne kadar T ve B hücrelerindeki azalma immün yetmezlik olgularında son derece düşük olsa da, daha ılımlı formlara sahip riskli bireylerin (leaky SCID vb) ortaya çıkartılabilmesi için daha güvenilir referans değerlere ihtiyaç vardır. Yenidoğan taramaları dünyada bir çok ülkede yürürlüğe girmiştir. Ülkemizde de bu konuda devam eden bir çalışma bulunmaktadır ancak sonuçları henüz yayınlanmamıştır. Yenidoğan taramaları sayesinde hızlı bir şekilde immün yetmezlik şüphesi olan bireyler kesin tanıya ve tedaviye yönlendirilebilecektir. Başka ülkelerde hastalarla yapılan yenidoğan çalışmaları mevcuttur (19,43). Örneğin İran’da PİY hastalarında yenidoğan taramaları için *TREC/KREC* seviyeleri belirlenmiştir. Fakat çalışma 3.2 mm kuru kan lekesinden yapılmış ve

minimum-maksimum *TREC* kopya sayısı 12-445 iken *KREC* kopyası 6-489 olarak bulunmuştur (43). Bizim çalışmamız ise 10 ml’lik kandan gerçekleşmiştir. Dolayısıyla kopya sayılarımızın minimum-maksimum değerleri arasında farklılıklar bulunmaktadır.

Gen mutasyonlarının T ve B hücre gelişimi üzerine fonksiyonel etkilerinin değerlendirilmesi için önceki çalışmalarımızda hastalıkla ilişkili patojenik varyasyon saptanan hastalarda çalışmaya dahil edilmiştir. Klinik hastalık alt gruplarına göre incelendiğinde ;

Ağır Kombine İmmün yetersizlik (AKİY) hastalarında *ADA* ve *DCLRE1C* gen mutasyonları saptanan olguların immün fenotip bulguları T-B- AKİY olduklarını doğrulamıştır. *DCLRE1C* geni V(D)J rekombinasyonları esnasında DNA kırılma işleminden sorumlu olan proteini kodlar ve aynı zamanda AKİY hastalarında en sık mutasyona uğrayan genlerden biridir.(45). Bizim bulgularımız da bu hastalarda hem *TREC* hem de *KREC* düzeylerinin düşük olduğunu doğrulamaktadır. *ADA* ve *DCLRE1C* gen mutasyonlarına sahip hastalarda T ve B hücrelerinin olgunlaşmadığı görülmektedir. T hücrelerinin olgunlaşmamasının hastalarda *TREC* kopya sayısının olmamasına sebebiyet verdiği düşünülmektedir. AKİY hastalığına neden olan *ADA* mutasyonlarının, T ve B hücre lenfopenisinin yanı sıra hücrel ve humoral immüitenin bozulmasına sebep olduğu da önceki çalışmalarda gösterilmiştir. Bir çalışmada *ADA* mutasyonuna sahip olan hastaların düşük *TREC/KREC* kopya sayısına sahip olduğu ve iki yıl içerisinde gelişmemekten ötürü ölebildiği belirtilmiştir (46). Bu nedenle hastaların erken teşhisi için *TREC/KREC* kopya sayılarının erkenden belirlenerek enzim yerine koyma tedavilerine başlamaları önem teşkil etmektedir.

MSMD (“Mendelian susceptibility to mycobacterial diseases”) grubuna dahil bir *STAT1* mutasyonu taşıyan hastada *TREC* kopya sayılarının düşük olduğu gösterildi. *STAT1*, T hücre işlevlerinden sorumlu, çoklu immün sistemde görev alan protein üretimi için talimatlar sağlar. *STAT1/GOF* mutasyonu aktif *STAT1* proteinin defosforilasyonunu azaltır. Buda çekirdekte fosforile edilmiş *STAT1* birikmesine yol açar. Kalıcı olarak aktif olan *STAT1* sitokinler ve *STAT3* aracılığıyla T hücre reseptörlerinin oluşumunu engeller. *STAT1* etkileyen *GOF* mutasyonları interlökinlerin azaltılmış üretimi ile karakterize edilen kusurlu T hücre oluşumuna sebebiyet vermektedir (47). Bu hastada az sayıda *TREC* kopya sayısı olması mutasyonun T hücrelerini etkilediğini göstermektedir.

Yaygın değişken immün yetmezlik (YDİY); fenotipine sahip hastalarda *CD19*, *TACI*, *PIK3CD*, *NFKB* genlerinde mutasyonları saptanan hastalarda *TREC* ve *KREC* kopya sayıları incelenmiştir. Mutasyonlarla ilgili yapılan *TREC/KREC* çalışmaları literatürde mevcuttur. Bir çalışmaya göre

CD19 mutasyonuna sahip hastanın düşük *TREC/KREC* kopya sayılarına sahip olduğu bildirilmiştir. (48). Bizim çalışmamızda da *CD19* mutasyonuna sahip olan hastanın *TREC/KREC* seviyeleri incelendiğinde *KREC* düzeyinin klinik ve genetik bulgularla uyumlu olarak son derece düşük olduğu belirlenmiştir. *PIK3CD* gen mutasyonuna sahip olan hastaların *TREC/KREC* kopya sayısının düşük olması düşük B hücre fonksiyonuna sahip olduğunu göstermiştir. Bu mutasyonun T fonksiyonunda zayıflattığı ve yetersiz antijen reseptör sinyalinin olduğu daha önce başka bir çalışmada bildirilmiştir (49). Bizim çalışmamızda *KREC* kopya sayısı *TREC* kopya sayısının 3 katı olduğu tespit edilmiştir. *TACI* mutasyonu YDİY hastaları arasında görülen en sık mutasyona uğrayan gendir. *TACI* gen mutasyonuna sahip olan hastanın kontrol gen ile *TREC/KREC* kopya sayısı bakımından kıyaslandığında anlamlı bir fark görülmemiştir. Bu hastanın T ve B hücrelerinin olgunlaştığı fakat fonksiyonel olmadığı düşünülmektedir. *NFKB* mutasyonuna sahip olan hastalar genellikle hafif klinik bulgular taşımaktadırlar. *NFKB* sinyali çeşitli sayıda uyarılara karşı hem doğuştan hemde adaptif immün yanıtın düzenlenmesi için kritik, karmaşık ve korunmuş bir yoldur. *NFKB* sinyalinin immün hücre farklılaşmasını ve ikincil lenfoid organların oluşumunu düzenlediği bilinmektedir. Bu sinyal yolundaki fonksiyon kaybının immün yetmezlik bozukluklara sebebiyet verdiği görülmüştür. *KREC* kopya sayısının *TREC* kopya sayısına göre yaklaşık 3 kat daha yüksek seviyede olduğu görülmüştür. *NFKB* de meydana gelen sinyal bozukluğunun B hücre fonksiyonunda azalmaya sebep olduğu buna bağlı olarak bazı hastalarda daha fazla azalmış T hücre fonksiyonuna sebebiyet verdiği bir çalışmada belirtilmiştir (50). Bu hastanın çalışmaya göre *TREC/KREC* kopya sayısı bakımından düşük olması mutasyonun T ve B hücre gelişimi etkilediğinden ötürü anlamlı bir durumdur. Bizim çalışmamızda ise bu hastanın *KREC* kopya sayısının *TREC* kopya sayısına göre yaklaşık 3 kat daha yüksek seviyede olduğu görülmüştür.

HIESS ("Hyperimmunoglobulin E syndrome") grubunda *STAT3* ve *DOCK8* gen mutasyonuna sahip bireyler sağlıklı kontrollerle kıyaslandığında daha az dentrik hücre, doğal öldürücü hücreler ve T hücreler tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra bellek B lenfositlerinin azalmış fonksiyonlarında bağışıklık sistemindeki kusurlarını ortaya koymaktadır. Bu hastalarda hematopoetik kök hücre transplantasyonu düşünülebilir (51,52). Bizim grubumuzdaki hastalardada *TREC* kopya sayılarının *KREC* kopya sayılarına göre daha düşük olduğu dolayısıyla çalışmalarla uyumlu olarak bulunmuştur.

Ağırlıklı antikor yetersizliği agammaglobülinemi sınıfına dahil *Monozomi 7* hastalarında B hücre farklılaşmasında agammaglobulinemi kusurları görülmektedir (27). Bundan dolayı *KREC* kopya

sayılarının düşük olması beklenen bir durumdur. Bizim çalışmamızda bir *monozomi 7* hastasında *KREC* kopya sayıları düşük bulunmuştur. Literatürde başka bir çalışmaya rastlanmamıştır.

DNA hasarı kusurlarından olan *ATM* mutasyonu nörolojik defektlere ve immün yetmezliğe sebep olan bir genetik hastalıktır. Düşük immünoglobulin seviyeleri mevcuttur. Hastalarda T lenfosit yanı sıra B lenfosit eksikliği olduğu görülmektedir (53). Bizim çalışmamızdaki hastanın *TREC/KREC* kopya sayısının düşük olması hastalığın T ve B hücrelerini etkilediğini göstermektedir.

Sentromerik stabilite ve yüzeysel anomalilerle immün yetmezlik grubuna dahil 22qdel11 mutasyonu T hücre bakımından az sayıya sahip olması ve özellikle T hücre negatif AKİY durumunun oluşması literatürde mevcuttur. *TREC* kopya sayısının çok düşük olması Di George Sendromu'nun (DGS) erken teşhisine katkı sağlar (54). DGS hastalarında T hücrelerinin yanı sıra B hücrelerinde yokluğu görülen bir çalışmada belirtilmiş bir durumdur (55). Bu çalışmayla uyumlu olarak bizim çalışmamızdaki hastada düşük *TREC/KREC* kopya sayılarının olduğu belirlenmiştir. Bu hastalarda hematopoetik kök hücre transplantasyonu sonucu iyi olmamasına rağmen kardeşinden alınan kök hücre tedavi için umut olabilmektedir (56). Timus transplantasyonu bu hastalarda önerilen tedaviler arasındadır (57).

Mutasyon durumu belli olan hastaların yanı sıra, herhangi bir mutasyonu bilinmeyen ve immün yetmezlik şüphesi ile gelen hastada da bu tez çalışması kapsamında değerlendirilmiştir. Hastada referans gen kopya sayısı ile *TREC/KREC* kopya sayılarına bakıldığında immün yetmezlik ve mutasyon tanısıyla gelen hastalar kadar bir fark bulunmamıştır.

Mutasyona sahip olmayan sadece immün yetmezlik tanısıyla gelen ve kontrol grubunun en düşük seviyesinin altında kalan (kırmızı çizgi altındakiler) yetişkin hastaların *TREC* kopya sayısı bakımından yaşlarına bağlı olarak daha düşük seviyelerde olduğu görülmüştür. *KREC* kopya sayısı bakımından incelendiğinde kırmızı çizgi altında kalan hastaların hepsi YDİY hastalarıdır. Pediatrik immün yetmezlik grubu hastalarından *TREC/KREC* bakımından kontrol grubunun en alt sınırının altında kalan hastaların (kırmızı çizgi altındakiler) düşük Ig seviyelerine sahip olan hastalardır ve sonuçlarla uyumlu bir durumdur. Kırmızı çizginin altında kalan diğer hastalar ise mutasyona sahip olan hastalardır ve ayrı olarak değerlendirmeye alınmıştır.

Sonuç olarak bu tez çalışmasıyla ;

- 1- *TREC/KREC* seviyelerinin belirleyebileceğimiz, taramalara uygun, hızlı, hassas ve düşük maliyetli bir yöntem optimize edilerek oturtulmuştur.
- 2- Yetişkin ve pediatrik immün yetmezlik olguları *TREC/KREC* kopya sayıları analiz edilerek T ve B hücre gelişimleri açısından araştırılmıştır.
- 3- Mutasyona sahip hastalarda *TREC* ve *KREC* seviyelerinin tespitinin mutasyonun fonksiyonel etkilerini ortaya net bir şekilde koyabildiği gösterilmiştir.
- 4- İmmün yetmezlik şüphesi ile değerlendirilen hastaların kısa süre içerisinde T ve B hücre gelişim durumlarına dair güvenilir bir yaklaşım olduğu gösterilmiştir.
- 5- PZR'a dayalı kantitatif *TREC/KREC* analizlerinin PIY için kullanışlı bir biyobelirteç olduğu ortaya konulmuştur.

16. KAYNAKLAR

1. Cota AM, Midwinter MJ. The immune system. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine*; **16**(7): 353-355.
2. Dranoff G. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2004; **4**(1): 11-22.
3. Krueger A, Zietara N, Lyszkiewicz M. T Cell Development by the Numbers. *Trends Immunol* 2017; **38**(2): 128-139.
4. Rothenberg EV, Moore JE, Yui MA. Launching the T-cell-lineage developmental programme. *Nat Rev Immunol* 2008; **8**(1): 9-21.
5. Dik WA, Pike-Overzet K, Weerkamp F, de Ridder D, de Haas EF, Baert MR, ve ark. New insights on human T cell development by quantitative T cell receptor gene rearrangement studies and gene expression profiling. *J Exp Med* 2005; **201**(11): 1715-1723.
6. Hernandez-Munain C. Recent insights into the transcriptional control of the Tcra/Tcrd locus by distant enhancers during the development of T-lymphocytes. *Transcription* 2015; **6**(4): 65-73.
7. Germain RN. T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision. *Nat Rev Immunol* 2002; **2**(5): 309-322.
8. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Cellular and molecular immunology*. 7th ed. Philadelphia: Elsevier/Saunders; 2012.
9. Baeyens A, Fang V, Chen C, Schwab SR. Exit Strategies: S1P Signaling and T Cell Migration. *Trends Immunol* 2015; **36**(12): 778-787.
10. Pieper K, Grimbacher B, Eibel H. B-cell biology and development. *J Allergy Clin Immunol* 2013; **131**(4): 959-971.
11. Tedder TF, Engel P. CD20: a regulator of cell-cycle progression of B lymphocytes. *Immunol Today* 1994; **15**(9): 450-454.
12. Bemark M. Translating transitions - how to decipher peripheral human B cell development. *J Biomed Res* 2015; **29**(4): 264-284.
13. Serana F, Chiarini M, Zanotti C, Sottini A, Bertoli D, Bosio A, ve ark. Use of V(D)J recombination excision circles to identify T- and B-cell defects and to monitor the treatment in primary and acquired immunodeficiencies. *J Transl Med* 2013; **11**: 119.
14. Proudhon C, Hao B, Raviram R, Chaumeil J, Skok JA. Long-Range Regulation of V(D)J Recombination. *Adv Immunol* 2015; **128**: 123-182.
15. Chiarini M, Zanotti C, Serana F, Sottini A, Bertoli D, Caimi L, ve ark. T-cell Receptor and K-deleting Recombination Excision Circles in Newborn Screening of T- and B-cell Defects: Review of the Literature and Future Challenges. *J Public Health Res* 2013; **2**(1): 9-16.
16. Market E, Papavasiliou FN. V(D)J recombination and the evolution of the adaptive immune system. *PLoS Biol* 2003; **1**(1): E16.
17. Multhaup MM, Gurram S, Podetz-Pedersen KM, Karlen AD, Swanson DL, Somia NV, ve ark. Characterization of the human artemis promoter by heterologous gene expression in vitro and in vivo. *DNA Cell Biol* 2011; **30**(10): 751-761.
18. McGhee SA. Public health comes to immune deficiency. *Blood* 2012; **119**(11): 2433-2435.
19. Barbaro M, Ohlsson A, Borte S, Jonsson S, Zetterstrom RH, King J, ve ark. Newborn Screening for Severe Primary Immunodeficiency Diseases in Sweden-a 2-Year Pilot TREC and KREC Screening Study. *J Clin Immunol* 2017; **37**(1): 51-60.

20. Sottini A, Serana F, Bertoli D, Chiarini M, Valotti M, Vaglio Tessoro M, ve ark. Simultaneous quantification of T-cell receptor excision circles (TRECs) and K-deleting recombination excision circles (KRECs) by real-time PCR. *J Vis Exp* 2014; (94).
21. Rechavi E, Lev A, Simon AJ, Stauber T, Daas S, Saraf-Levy T, ve ark. First Year of Israeli Newborn Screening for Severe Combined Immunodeficiency-Clinical Achievements and Insights. *Front Immunol* 2017; **8**: 1448.
22. Olbrich P, de Felipe B, Delgado-Pecellin C, Rodero R, Rojas P, Aguayo J, ve ark. [A first pilot study on the neonatal screening of primary immunodeficiencies in Spain: TRECS and KRECS identify severe T- and B-cell lymphopenia]. *An Pediatr (Barc)* 2014; **81**(5): 310-317.
23. Notarangelo LD. Primary immunodeficiencies. *J Allergy Clin Immunol* 2010; **125**(2 Suppl 2): S182-194.
24. Al-Herz W, Bousfiha A, Casanova JL, Chatila T, Conley ME, Cunningham-Rundles C, ve ark. Primary immunodeficiency diseases: an update on the classification from the international union of immunological societies expert committee for primary immunodeficiency. *Front Immunol* 2014; **5**: 162.
25. Gathmann B, Grimbacher B, Beaute J, Dudoit Y, Mahlaoui N, Fischer A, ve ark. The European internet-based patient and research database for primary immunodeficiencies: results 2006-2008. *Clin Exp Immunol* 2009; **157** Suppl 1: 3-11.
26. International Union of Immunological Societies Expert Committee on Primary I, Notarangelo LD, Fischer A, Geha RS, Casanova JL, Chapel H, ve ark. Primary immunodeficiencies: 2009 update. *J Allergy Clin Immunol* 2009; **124**(6): 1161-1178.
27. Conley ME, Dobbs AK, Farmer DM, Kilic S, Paris K, Grigoriadou S, ve ark. Primary B cell immunodeficiencies: comparisons and contrasts. *Annu Rev Immunol* 2009; **27**: 199-227.
28. van der Burg M, van Zelm MC, Driessen GJ, van Dongen JJ. New frontiers of primary antibody deficiencies. *Cell Mol Life Sci* 2012; **69**(1): 59-73.
29. de Vries E, Clinical Working Party of the European Society for I. Patient-centred screening for primary immunodeficiency: a multi-stage diagnostic protocol designed for non-immunologists. *Clin Exp Immunol* 2006; **145**(2): 204-214.
30. Picard C, Al-Herz W, Bousfiha A, Casanova JL, Chatila T, Conley ME, ve ark. Primary Immunodeficiency Diseases: an Update on the Classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee for Primary Immunodeficiency 2015. *J Clin Immunol* 2015; **35**(8): 696-726.
31. Di Renzo M, Pasqui AL, Auteri A. Common variable immunodeficiency: a review. *Clin Exp Med* 2004; **3**(4): 211-217.
32. Wilton AN, Cobain TJ, Dawkins RL. Family studies of IgA deficiency. *Immunogenetics* 1985; **21**(4): 333-342.
33. Salzer U, Chapel HM, Webster AD, Pan-Hammarstrom Q, Schmitt-Graeff A, Schlesier M, ve ark. Mutations in TNFRSF13B encoding TACI are associated with common variable immunodeficiency in humans. *Nat Genet* 2005; **37**(8): 820-828.
34. Salzer U, Maul-Pavicic A, Cunningham-Rundles C, Urschel S, Belohradsky BH, Litzman J, ve ark. ICOS deficiency in patients with common variable immunodeficiency. *Clin Immunol* 2004; **113**(3): 234-240.
35. Bogaert DJ, Dullaers M, Lambrecht BN, Vermaelen KY, De Baere E, Haerynck F. Genes associated with common variable immunodeficiency: one diagnosis to rule them all? *J Med Genet* 2016; **53**(9): 575-590.

36. Durandy A, Taubenheim N, Peron S, Fischer A. Pathophysiology of B-cell intrinsic immunoglobulin class switch recombination deficiencies. *Adv Immunol* 2007; **94**: 275-306.
37. Markert ML, Devlin BH, Alexieff MJ, Li J, McCarthy EA, Gupton SE, ve ark. Review of 54 patients with complete DiGeorge anomaly enrolled in protocols for thymus transplantation: outcome of 44 consecutive transplants. *Blood* 2007; **109**(10): 4539-4547.
38. Boztug K, Schmidt M, Schwarzer A, Banerjee PP, Diez IA, Dewey RA, ve ark. Stem-cell gene therapy for the Wiskott-Aldrich syndrome. *N Engl J Med* 2010; **363**(20): 1918-1927.
39. Booth C, Hershfield M, Notarangelo L, Buckley R, Hoenig M, Mahlaoui N, ve ark. Management options for adenosine deaminase deficiency; proceedings of the EBMT satellite workshop (Hamburg, March 2006). *Clin Immunol* 2007; **123**(2): 139-147.
40. Boyle JM, Buckley RH. Population prevalence of diagnosed primary immunodeficiency diseases in the United States. *J Clin Immunol* 2007; **27**(5): 497-502.
41. Firtina S. Identification of Genetic Background in Primary Immunodeficiencies with Next Generation Sequencing. *İstanbul University, Institute of Health Science, Genetics Department. PhD Thesis* 2017.
42. Şişko S. YAYGIN DEĞİŞKEN İMMÜN YETERSİZLİK (CVID) HASTALARINDA CD19, ICOS, TACI, BAFF-R GEN MUTASYONLARININ ARAŞTIRILMASI. *İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik ABD. Yüksek Lisans Tezi*. 2016.
43. Nourizadeh M, Shakerian L, Borte S, Fazlollahi M, Badalzadeh M, Houshmand M, ve ark. Newborn screening using TREC/KREC assay for severe T and B cell lymphopenia in Iran. *Scand J Immunol* 2018; e12699.
44. Atschekzei F, Ahmad F, Witte T, Jacobs R, Schmidt RE. Limitation of Simultaneous Analysis of T-Cell Receptor and kappa-Deleting Recombination Excision Circles Based on Multiplex Real-Time Polymerase Chain Reaction in Common Variable Immunodeficiency Patients. *Int Arch Allergy Immunol* 2016; **171**(2): 136-140.
45. Kobayashi N, Agematsu K, Sugita K, Sako M, Nonoyama S, Yachie A, ve ark. Novel Artemis gene mutations of radiosensitive severe combined immunodeficiency in Japanese families. *Hum Genet* 2003; **112**(4): 348-352.
46. Flinn AM, Gennery AR. Adenosine deaminase deficiency: a review. *Orphanet J Rare Dis* 2018; **13**(1): 65.
47. Aldave Becerra JC, Cachay Rojas E. A 3-Year-Old Girl with Recurrent Infections and Autoimmunity due to a STAT1 Gain-of-Function Mutation: The Expanding Clinical Presentation of Primary Immunodeficiencies. *Front Pediatr* 2017; **5**: 55.
48. Lougaris V, Gallizzi R, Vitali M, Baronio M, Salpietro A, Bergbreiter A, ve ark. A novel compound heterozygous TACI mutation in an autosomal recessive common variable immunodeficiency (CVID) family. *Hum Immunol* 2012; **73**(8): 836-839.
49. Dornan GL, Siempelkamp BD, Jenkins ML, Vadas O, Lucas CL, Burke JE. Conformational disruption of PI3Kdelta regulation by immunodeficiency mutations in PIK3CD and PIK3R1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2017; **114**(8): 1982-1987.
50. Boztug H, Hirschmugl T, Holter W, Lakatos K, Kager L, Trapin D, ve ark. NF-kappaB1 Haploinsufficiency Causing Immunodeficiency and EBV-Driven Lymphoproliferation. *J Clin Immunol* 2016; **36**(6): 533-540.
51. Hillmer EJ, Zhang H, Li HS, Watowich SS. STAT3 signaling in immunity. *Cytokine Growth Factor Rev* 2016; **31**: 1-15.
52. Zhang Q, Jing H, Su HC. Recent Advances in DOCK8 Immunodeficiency Syndrome. *J Clin Immunol* 2016; **36**(5): 441-449.

53. Chopra C, Davies G, Taylor M, Anderson M, Bainbridge S, Tighe P, ve ark. Immune deficiency in Ataxia-Telangiectasia: a longitudinal study of 44 patients. *Clin Exp Immunol* 2014; **176**(2): 275-282.
54. Kwan A, Church JA, Cowan MJ, Agarwal R, Kapoor N, Kohn DB, ve ark. Newborn screening for severe combined immunodeficiency and T-cell lymphopenia in California: results of the first 2 years. *J Allergy Clin Immunol* 2013; **132**(1): 140-150.
55. Routes JM, Grossman WJ, Verbsky J, Laessig RH, Hoffman GL, Brokopp CD, ve ark. Statewide newborn screening for severe T-cell lymphopenia. *JAMA* 2009; **302**(22): 2465-2470.
56. Ip W, Zhan H, Gilmour KC, Davies EG, Qasim W. 22q11.2 deletion syndrome with life-threatening adenovirus infection. *J Pediatr* 2013; **163**(3): 908-910.
57. Davies EG. Immunodeficiency in DiGeorge Syndrome and Options for Treating Cases with Complete Athymia. *Front Immunol* 2013; **4**: 322.



17. HAM VERİLER



18. FORMLAR

19. ETİK KURUL KARARI

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	"Primer İmmün Yetmezlik Hastalarında TREC/KREC Analizi İle T ve B Hücre Gelişiminin Kontrolü"
-----------------------	---

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
		ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	03.05.2017	
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	☒		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU	☐		Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ	☐		Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	☐	Açıklama	
	TÜRKÇE ETİKET ÖRNEĞİ	☐		
	SİGORTA	☐		
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☒		
	BİYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	☐		
	HASTA KARTI/GÜNLÜKLERİ	☐		
	İLAN	☐		
	YILLIK BİLDİRİM	☐		
	SONUÇ RAPORU	☐		
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	☐		
DİĞER:	☒	Anabilim Dalı Başkanlığından Üst Yazı ve Akademik Kurul Kararı, Literatür Kaynağı, Sorumluluk Paylaşım Belgesi, Olgular Raporu Formu, İlgili Elemanların Bilgilendirildiğine Dair Belge, CV, CD		
KARAR BİLGİLERİ	Karar No:10	Tarih: 26/05/2017		
	İstanbul Üniversitesi Aziz Sançar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Genetik Anabilim Dalında görevli Prof. Dr. Müge SAYITOĞLU' nun sorumluluğunda ve Bio. Gizem ŞENTÜRK' ün yürüteceği yukarıda bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan Etik Kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.			

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU							
ÇALIŞMA ESASI		19.08.2011 tarihli, 28030 sayılı Resmi Gazetede yayınlanan Klinik Araştırmalar Hakkındaki Yönetmelik					
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:		Prof. Dr. A. Yağız ÜRESİN					
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişkisi *	Katılım **	İmza
Prof. Dr. A. Yağız ÜRESİN	Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji	İstanbul Tıp Fakültesi (Etik Kurul Başkanı)	E ☒	K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Berrin UMMAN	Kardiyoloji	İstanbul Tıp Fakültesi (Etik Kurul Başkan Yardımcısı)	E ☐	K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Ahmet GÜL	Romatoloji	İstanbul Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Oğuzhan ÇOBAN	Nöroloji	İstanbul Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Dr. Sevda ÖZEL YILDIZ	Biyoistatistik	İ.U. İstanbul Tıp Fakültesi Biyoistatistik	E ☐	K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	

* :Araştırma ile ilişkisi
** :Toplantıda Bulunma

İ.U. İstanbul Tıp Fakültesi Klinik araştırmalar Etik kurulu 13.04.2013 tarih, 28617 sayılı Resmi Gazetede yayınlanan Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik çerçevesinde kurulmuş ve T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu tarafından onaylanmıştır. İlgili yönetmelik kapsamında kalan araştırmalar Sağlık Bakanlığının izin almak zorundadır. Yönetmelik kapsamı dışında kalan araştırmalar ise Etik Kurul bünyesinde oluşturulmuş 5 kişilik alt komisyon tarafından değerlendirilmekte olup Sağlık Bakanlığı iznine tabi değildir.



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU



Sayı : 635

Konu: Prof. Dr. Müge SAYITOĞLU hk.

Tarih : 05.06.2017

Sayın Prof. Dr. Müge SAYITOĞLU
Moleküler Genetik

İlgi : Genetik Anabilim Dalının 08/05/2017 gün ve 172713 sayılı yazısı

Sorumlu araştırmacılığını üstlendiğiniz ve Bio. Gizem ŞENTÜRK' ün yürüteceği 2017/549 dosya numaralı "Primer İmmün Yetmezlik Hastalarında TREC/KREC Analizi İle T ve B Hücre Gelişiminin Kontrolü" başlıklı çalışma kurulumuzun 26/05/2017 gün ve 10 sayılı toplantısında görüşülerek etik yönden uygun bulunmuş olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi rica ederim.

Prof. Dr. A.Yağız ÜRESİN

İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar
Etik Kurul Başkanı

Eki: İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmaları Etik Kurulu Karar Formu

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU
	AÇIK ADRESİ:	İ.Ü.İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ HULUSİ BEHÇET KÜTÜPHANESİ KAT:3 FATİH/İSTANBUL
	TELEFON	0 (212) 414 21 53
	FAKS	0 (212) 414 21 53
	E-POSTA	itfetikkurul@istanbul.edu.tr.

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	"Primer İmmün Yetmezlik Hastalarında TREC/KREC Analizi İle T ve B Hücre Gelişiminin Kontrolü"			
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	---			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof. Dr. Müge SAYITOĞLU			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Moleküler Genetik			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Genetik Anabilim Dalı			
	DESTEKLEYİCİ	İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi			
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ	---			
	ARAŞTIRMANIN FAZİ	FAZ 1	☐		
		FAZ 2	☐		
		FAZ 3	☐		
		FAZ 4	☐		
	ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	Yeni Bir Endikasyon	☐		
		Yüksek Doz Araştırması	☐		
		Diğer ise belirtiniz :			
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ	☐	ÇOK MERKEZLİ	☒
				ULUSAL	☒
					ULUSLAR ARASI
					☐

20. PATENT HAKKI İZNİ



21. İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

PRİMER İMMÜN YETMEZLİK HASTALARINDA TREC/KREC ANALİZİ İLE T VE B HÜCRE GELİŞİMİ KONTROLÜ

ORIJINALLIK RAPORU

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

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	% 1
2	"Encyclopedia of Signaling Molecules", Springer Nature, 2018 Yayın	<% 1
3	ALDIRMAZ, Sonay, YÜCEL, Esra, ÇOKUĞRAŞ, Haluj, AKÇAKAYA, Necla, CAMCIOĞLU, Yıldız and KIYKIM, Ayça. "İmmünoloji polikliniğine sık enfeksiyon nedeniyle başvuran hastaların profili", TUBITAK, 2014. Yayın	<% 1
4	Sarina Levy-Mendelovich, Atar Lev, Shraga Aviner, Nurit Rosenberg et al. "Quantification of specific T and B cells immunological markers in children with chronic and transient ITP", Pediatric Blood & Cancer, 2017 Yayın	<% 1
5	"Abstracts", Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis, 2017	<% 1

22. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	GİZEM	Soyadı	ŞENTÜRK
Doğ.Yeri	GÜNGÖREN İSTANBUL	Doğ.Tar.	08.01.1994
Uyruğu	T.C.	TC Kim No	40462780584
Email	gizemmsenturkk@hotmail.com	Tel	0553-067-67-40

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez.Yılı
Yük.Lis.	İÜ,Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Genetik A.D.	2018
Lisans	İFÜ,Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü İFÜ Eğitim Fakültesi Pedagojik Formasyon	2015
Lise	Bakırköy Ataköy Anadolu Lisesi	2011

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.			-
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	orta	orta	orta		

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı			

(Diğer)	Puanı			
---------	-------	--	--	--

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanmabecerisi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Özel İlgi Alanları (Hobileri):

