

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

**AĞIR KOMBİNE İMMÜN YETMEZLİK Lİ HASTALARDA, HASTALIĞA NEDEN OLAN
GENETİK DEFETLERİN YENİ NESİL DİZİLEME YÖNTEMİYLE ARAŞTIRILMASI**

Uzm. Bio. Baran ERMAN

**İmmünoloji Programı
DOKTORA TEZİ**

ANKARA-2015

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

**AĞIR KOMBİNE İMMÜN YETMEZLİKLİ HASTALARDA, HASTALIĞA NEDEN OLAN
GENETİK DEFEKTLERİN YENİ NESİL DİZİLEME YÖNTEMİYLE ARAŞTIRILMASI**

Uzm. Bio. Baran ERMAN






**İmmünoloji Programı
DOKTORA TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. İlhan TEZCAN**

ANKARA-2015

Anabilim Dalı : **Pediyatrik Temel Bilimler**
Program : **İmmünoloji**
Tez Başlığı : **Ağır kombine immün yetmezlikli hastalarda, hastalığa
neden olan genetik defektlerin yeni nesil dizileme
yöntemiyle araştırılması**
Öğrenci Adı-Soyadı : **Baran Erman**
Savunma Sınavı Tarihi : **02.06.2015**

Bu çalışma jürimiz tarafından yüksek lisans/doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı ve tez danışmanı: **Prof. Dr. İlhan Tezcan**
Hacettepe Üniversitesi 
Üye: **Prof. Dr. Fatma Gümrük**
Hacettepe Üniversitesi 
Üye: **Prof. Dr. Cemalettin Aybay**
Gazi Üniversitesi 
Üye: **Prof. Dr. Mualla Çetin**
Hacettepe Üniversitesi 
Üye: **Prof. Dr. Vedat Bulut**
Gazi Üniversitesi 

ONAY

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.


Prof. Dr. Ersin FADILLIOĞLU
Müdür

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın gerçekleşmesinde bilgi ve birikimleri ile bana her konuda destek olan danışmanım ve değerli hocam Prof. Dr. İlhan Tezcan'a, başlangıçtan itibaren çalıştığım süre boyunca bana desteklerini esirgemeyen Hacettepe Üniversitesi İhsan Doğramacı Çocuk Hastanesi İmmünoloji Bilim Dalı'ndaki çalışma arkadaşlarıma sevgi ve teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca çalışmanın büyük bir bölümünü beraber tamamladığım Dr. Kaan Boztuğ ve ekibine, Avusturya Bilimler Akademisi CeMM laboratuvarı çalışanlarına da ayrıca teşekkür ederim.

Araştırmacı Baran Erman Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi tarafından BAP6091 projesi kapsamında desteklenmiştir.

ÖZET

Erman, B. Ağır kombine immün yetmezlikli hastalarda, hastalığa neden olan genetik defektlerin yeni nesil dizileme yöntemiyle araştırılması. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü İmmünoloji Programı Doktora Tezi, Ankara, 2015. Ağır kombine immün yetmezlikler primer immün yetmezliklerin en ağır formudur. Hastalar yaşamın ilk yılında fatal bakteriyel, viral ve fungal enfeksiyonlarla karşılaşmaktadır. Erken tanı bu hastalar için yaşamsal önem taşımaktadır. Hastalığın tedavisinde tek küratif yöntem hematopoietik kök hücre naklidir ve genetik defektin bilinmesi tedavi şartlarının belirlenmesi açısından önemlidir. Çalışmada ağır kombine/kombine immün yetmezlik düşünülen fakat genetik tanısı bilinmeyen 27 hastada yeni nesil dizileme temelli HaloPlex paneli ile hastalığa neden olan mutasyonların bulunması amaçlanmıştır. Kullanılan panel primer immün yetmezliklerle ilgili olabilecek 356 geni hedeflemektedir. Dizileme işlemi için Illumina HiSeq 2000 (Illumina Inc., ABD) sistemi kullanılmıştır. Çalışma sonunda 27 hastanın 24'ünde DNA zenginleştirme ve dizileme işlemleri başarılı olmuş, 8 hastada ağır kombine/kombine immün yetmezliğe neden olan genetik defektler saptanmıştır. Saptanan mutasyonların hepsi daha önce ağır kombine/kombine immün yetmezliğe neden olduğu bilinen genlerde bulunmuştur ve bunlardan 5 tanesi ilk defa tanımlanmıştır. Herhangi bir mutasyon bulunamamış diğer hastalar için tüm ekzom ya da genom dizileme yöntemleri ile araştırma yapılması gerektiği düşünülmektedir. Kullanılan panelin primer immün yetmezlikli hasta gruplarında genetik defektlerin araştırılması için güvenilir ve hızlı bir yöntem olduğu anlaşılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Ağır kombine immün yetmezlik, yeni nesil dizileme, genetik tanı

Destekleyen Kurumlar: Araştırmacı Baran Erman Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi tarafından BAP6091 projesi kapsamında desteklenmiştir.

ABSTRACT

Erman, B. Investigation of causative genetic defects in severe combined immunodeficiency patients by next generation sequencing. Hacettepe University Institute of Health Sciences, Ph.D. Thesis in Immunology, Ankara, 2015. Severe combined immunodeficiency is the most severe form of primary immunodeficiencies. Patients with SCID present with high susceptibility to fatal bacterial, viral and fungal infections in their first year of life. Early diagnosis can be life-saving for the patients. The only curative therapy is hematopoietic stem cell transplantation and determination of the underlying genetic defect is crucial for conditioning regimens for HSCT. We aim to determine the causative gen defects in 22 patients with SCID and 5 patients with CID by a new next generation sequencing based technology, HaloPlex. The HaloPlex panel includes primers for 356 genes associated with primary immunodeficiencies. Illumina HiSeq 2000 system was used for sequencing. Genomic DNA enrichment and sequencing were accomplished in 24 patients out of 27 and 8 causative genetic defects were detected. All mutations were in known PID-related genes but 5 of them are novel mutations. The other patients should be investigated by whole genom or exom sequencing. The HaloPlex panel was thought to be fast and reliable method to determine the underlying genetic defects for PIDs.

Key Words: Severe combined immunodeficiency, next generation sequencing, genetic diagnosis

Investigator Baran Erman was supported by Hacettepe University, Scientific Research Unit.

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR	x
ŞEKİLLER	xi
TABLolar	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. İmmün Sistem	3
2.1.1. Doğal Bağışıklık	3
2.1.2. Edinsel Bağışıklık	4
2.2. Lenfosit Gelişimi ve Antijen Reseptör Genlerinin Yeniden Düzenlenmesi	5
2.2.1. V(D)J Rekombinasyonu	6
2.3. Primer İmmün Yetmezlikler	10
2.3.1. Kombine Ve Ağır Kombine İmmün Yetmezlikler	11
2.3.2. Ağır Kombine İmmün Yetmezliklerin Sınıflandırması	14
2.3.3. Ağır Kombine İmmün Yetmezliklerde Tedavi	20
2.4. İmmünolojide Kullanılan Genetik Yöntemler Ve Uygulamaları	22
2.4.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu	22
2.4.2. DNA Dizi Analizi	23
2.4.3. Genetik Haritalama	24
2.4.4. Yeni Nesil Dizileme Yöntemleri	25
3. GEREÇ ve YÖNTEMLER	27
3.1. Hastalar	27
3.2. Yöntemler	30
3.2.1. DNA İzolasyonu	31
3.2.2. Hedeflenmiş Tüm Ekzom Dizileme	31

3.2.3. Illumina Sistemi ile Dizileme İşlemleri	41
3.2.4. Verilerin Analizi	44
3.2.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Ve Sanger Dizileme	46
4.BULGULAR	48
4.1. Enzimatik Kesim İşleminin Doğrulanması	48
4.2. Amplifikasyonun Doğrulanması Ve Hedef DNA Miktarının Kontrolü	49
4.3. Hastalığa Neden Olabilecek Varyantların Belirlenmesi	50
4.3.1. Bir Numaralı Hasta	50
4.3.2. İki Numaralı Hasta	52
4.3.3. Üç Numaralı Hasta	53
4.3.4. Dört Numaralı Hasta	54
4.3.5. Beş Numaralı Hasta	56
4.3.6. Altı Numaralı Hasta	57
4.3.7. Yedi Numaralı Hasta	57
4.3.8. Sekiz Numaralı Hasta	59
4.3.9. Dokuz Numaralı Hasta	59
4.3.10. On Numaralı Hasta	59
4.3.11. On Bir Numaralı Hasta	60
4.3.12. On İki Numaralı Hasta	60
4.3.13. On Üç Numaralı Hasta	61
4.3.14. On Dört Numaralı Hasta	61
4.3.15. On Beş Numaralı Hasta	61
4.3.16. On Altı Numaralı Hasta	61
4.3.17. On Yedi Numaralı Hasta	62
4.3.18. On Sekiz Numaralı Hasta	62
4.3.19. On Dokuz Numaralı Hasta	62
4.3.20. Yirmi Numaralı Hasta	63
4.3.21. Yirmi Bir Numaralı Hasta	63
4.3.22. Yirmi İki Numaralı Hasta	63
4.3.23. Yirmi Üç Numaralı Hasta	63

4.3.24. Yirmi Dört Numaralı Hasta	64
4.3.25. Yirmi Beş Numaralı Hasta	65
4.3.26. Yirmi Altı Numaralı Hasta	65
4.3.27. Yirmi Yedi Numaralı Hasta	65
5.TARTIŞMA	67
6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER	72
KAYNAKLAR	73
EKLER	
Etik Kurul	

SİMGELER ve KISALTMALAR

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
ADA	Adenozin deaminaz
AK2	Adenilat kinaz 2
AKİY	Ağır kombine immün yetmezlik
BTK	Bruton tirozin kinaz
ddNTP	dideoksinükleotid
DNA	Deoksiribo nükleik asit
dNTP	deoksinükleotid
EDTA	Etilendiamin tetra asetik asit
GVHD	Graft versus host disease
HKHN	Hematopietik kök hücre nakli
HPV	İnsan papilloma virus
Ig	İmmüoglobulin
IVIG	İntravenöz immüoglobulin
KİY	Kombine immün yetmezlik
NHEJ	Non homologous end joining
NK	Doğal öldürücü
PAMP	Patojen ilişkili moleküler patern
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PRR	Patern tanıma reseptörü
RAG1	Rekombinasyon aktive edici gen 1
RAG2	Rekombinasyon aktive edici gen 2
RSS	Rekombinasyon sinyal dizileri
TdT	Terminal deoksinükleotid transferaz
XLA	X'e bağlı agammaglobulinemi

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Lenfosit gelişim basamakları	5
2.2. Lenfoid seri hücrelerin farklılaşması	6
2.3. Rekombinant sinyal dizileri	7
2.4. V(DJ) rekombinasyonu	8
2.5. Ağır kombine immün yetmezlikli hastalarda akım sitometri analizi örneği	13
2.6. Ağır kombine immün yetmezlikli hastaların dağılımı	14
2.7. IL2RG ve JAK3 sinyal yolağı	16
2.8. CD3 molekülleri	17
2.9. ADA metabolik yolu	19
3.1. HaloPlex çalışma prensibi	32
3.2. Enzimlerin hazırlanması	34
3.3. Enzim kesimi için plağın hazırlanması	34
3.4. Enzim kesimi DNA örneklerinin plağa eklenmesi	35
3.5. Enzim kesim işlemine uğrayan DNA'nın görüntüsü	36
3.6. Illumina dizi motifleri	40
3.7. Amplifiye olmuş DNA örneği	40
3.8. "Flow cell" in görünümü	41
3.9. DNA'nın kümeleştirilmesi	42
3.10. HiSeq sistemi ile dizileme işlemi	44
4.1. Dokuz numaralı hastanın enzimatik kesim işlemi sonuçları	48
4.2. On sekiz numaralı hastanın enzimatik kesim işlemi sonuçları	49
4.3. Bir numaralı hasta ve aile bireylerinde bulunan varyantların DNA dizi analizi görüntüleri ve mutasyonun gendeki lokasyonu	51
4.4. İki numaralı hasta ve aile bireylerinde bulunan varyantların DNA dizi analizi görüntüleri ve mutasyonun gendeki lokasyonu	53
4.5. Üç numaralı hasta ve aile bireylerinde bulunan varyantların DNA dizi analizi görüntüleri ve mutasyonun gendeki lokasyonu	54

4.6. Dört numaralı hasta ve aile bireylerinde bulunan varyantların DNA dizi analizi görüntüleri ve mutasyonların gendeki lokasyonları	56
4.7. Beş numaralı hastada bulunan varyantın DNA dizi analizi görüntüleri ve mutasyonun gendeki lokasyonu	57
4.8. Yedi numaralı hasta ve aile bireylerinde bulunan varyantların DNA dizi analizi görüntüleri ve mutasyonun gendeki lokasyonu	58
4.9. On numaralı hasta ve aile bireylerinde bulunan varyantların DNA dizi analizi görüntüleri ve mutasyonun gendeki lokasyonu	60
4.10. On altı numaralı hastada bulunan varyantın gendeki lokasyonu	62
4.11. Yirmi üç numaralı hasta ve aile bireylerinde bulunan varyantların DNA dizi analizi görüntüleri ve mutasyonun gendeki lokasyonu	64
4.12. Yirmi yedi numaralı hastada bulunan mutasyonun gendeki lokasyonu	65

TABLOLAR

2.1. Doğal ve edinsel immün sistemin birleşenleri	4
2.2. Lenfosit reseptör genlerinin yeniden düzenlenmesi sonucu ortaya çıkan rekombinasyon sayıları.	9
2.3. Ağır kombine immün yetmezlikler.	12
3.1. Çalışmada bulunan, AKİY düşünülen hastaların özellikleri. HKHN Hematopoietik kök hücre nakli.	28
3.2. Çalışmada bulunan, AKİY düşünülen hastaların laboratuvar özellikleri. ALS: Absolü lenfosit sayısı. ME: Maternal engraftman.	29
3.3. Kombine immün yetmezlik düşünülen hastaların özellikleri. ALS: Absolü lenfosit sayısı (mm ³) Lenfosit subsetleri: %	30
3.4. Hastalarda daha önce araştırılan genler.	30
3.5. HaloPlex panelinde bulunan kombine ve ağır kombine immün yetmezlik genleri.	33
3.6. Hazırlanan PCR karışımının içeriği.	39
4.1. Bir numaralı hastada bulunan varyant.	51
4.2. İki numaralı hastada bulunan varyant.	52
4.3. Üç numaralı hastada bulunan varyant.	54
4.4. Dört numaralı hastada bulunan varyantlar.	55
4.5. Beş numaralı hastada bulunan varyant	57
4.6. Yedi numaralı hastada bulunan varyant	58
4.7. On numaralı hastada bulunan varyant.	60
4.8. On üç numaralı hastada bulunan varyantlar.	61
4.9. On altı numaralı hastada bulunan varyant.	62
4.10. Çalışmaya alınan hastalarda saptanan varyantların listesi.	66

1. GİRİŞ

Primer immün yetmezlikler heterojen bir hastalık grubu olup, göreceli olarak daha hafif klinik seyir gösteren ya da yaşamı tehdit edecek düzeyde ağır türleri mevcuttur. Organizmanın savunma mekanizmalarında görev yapan kritik moleküllerin sentezlenmesi sağlayan genlerdeki mutasyonlar, epigenetik faktörler ve fenokopik mekanizmalar primer immün yetmezliklerin ortaya çıkmasına neden olmaktadır (1).

Batı toplumlarında genel olarak primer immün yetmezliklerin görülme sıklığı 1/10000 ile 1/100000 canlı doğum arasında değişmektedir (1). Ancak Türkiye’de akraba evliliklerinin yaygın, doğurganlığın artmış olduğu göz önüne alındığında bu hastalık grubunun görülme sıklığının çok daha fazla olduğu düşünülmektedir.

Bu hastalıklar enfeksiyonlara yatkınlık, otoimmün bulgular, lenfoproliferasyon ve malignansi, allerji ve inflamasyonun ön planda olduğu klinik tablolar ile karşımıza çıkmaktadırlar.

Primer immün yetmezlik hastalıkları içerisinde ağır kombine immün yetmezlikler (AKİY) hematopoietik kök hücre nakli (HKHN) veya gen tedavisi yapılmadığı takdirde yaşamın ilk yıllarında ölümlerle sonuçlanacak bir hastalık tablosuna yol açmaktadırlar. Yaşamın ilk aylarında klinik olarak belirtiler ortaya çıkmakta, erken tanı, etkin tedavi sağlayabildiği için yaşam kurtarıcı olabilmektedir (2).

Primer immün yetmezlik hastalıklarında benzer klinik tablolar farklı genetik defektlerle ortaya çıkabildiği gibi, aynı genetik defekt farklı klinik tablolarla da karşımıza çıkabilmektedir. Klinik tanının yanında hastalığa neden olan moleküler bozukluğun saptanması, prognozun ön görülmesi ve tedavinin planlanması yanı sıra preimplantasyon genetiği, prenatal tanı ve gen tedavisinin planlanması açısından önem taşımaktadır.

Primer immün yetmezliklere neden olan genetik defektlerin saptanmasında genetik haritalama ve Sanger dizileme gibi klasik yöntemler uzun yıllardır kullanılmaktadırlar. Özellikle aday genlerin Sanger dizileme ile araştırılması zaman alıcı bir yöntemdir ve sadece belirli sayıda genin araştırılmasına olanak tanır. Son

yıllarda klasik yöntemlere alternatif olarak tanımlanmış yeni nesil dizileme teknikleri kullanılmaya başlanmıştır. Tüm ekzom dizileme, Ng. SB. ve arkadaşları tarafından 2009 yılında tanımlanmıştır (3). Yeni nesil teknolojiler yardımıyla dönüşümsel bir yaklaşım sağlayarak kompleks ve monogenik hastalıklardaki, sorumlu mutasyonu saptamakta kullanılmaktadır. Tüm ekzom dizileme yöntemi, sık veya nadir olmasına bakmaksızın ekzomdaki her bir genetik varyantın gösterilmesini sağlamaktadır. Bu nedenle bu yüksek çözünürlüklü dizileme yöntemi son dönemde nadir varyantların tanımlanmasında tercih edilen bir yöntem halini almaktadır. Ekzom dizileme yöntemi günümüzde primer immün yetmezlikli hastalarda genetik defektlerin belirlenmesinde kullanılan en geçerli yöntem gibi görünmektedir.

Son yıllarda yeni nesil dizileme yöntemlerinin kullanılmaya başlanmasıyla primer immün yetmezliklere neden olan genetik mutasyonların belirlenme sıklığı giderek artan bir oranda devam etmektedir. Özellikle belirli hastalık gruplarına yönelik yeni nesil dizileme teknolojilerini temel alan, hedeflenmiş genlerin dizilemesine yönelik panellerin kullanımı hedeflenmektedir. Bu paneller hastalığa neden olan, daha önce tanımlanmış veya hastalıkla ilişkili olabilecek genleri hedef alan farklı sayıda primerleri içeren sistemler olarak tasarlanmaktadır. Hedeflenen genlerin sayısı, amaca bağlı olarak onlarla ifade edilen rakamlardan, yüzlerce genin hedef alındığı büyük sistemlere kadar çeşitlenmektedir. Tasarlanan bu sistemlerin immün yetmezlikleri araştıran laboratuvarlar tarafından rutin olarak genetik araştırmalar için kullanılması amaçlanmaktadır.

Bu çalışmada yeni nesil ekzom dizileme temelli, yeni bir teknoloji olan HaloPlex yöntemiyle klinik olarak ağır kombine/kombine immün yetmezlik düşünülen hastalarda ve aile bireylerinde, hastalığa neden olan moleküler defektler DNA düzeyinde araştırılacaktır. Kullanılan panel primer immün yetmezliklere neden olabileceği bilinen toplam 356 geni hedeflemektedir. Çalışmada hem genetik defektlerin saptanması hem de uygulanacak yeni nesil dizileme yönteminin bu hasta grubunda etkin ve hızlı olarak kullanılabileceğinin gösterilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İmmün Sistem

İmmünite terimi Latince *immunitas* sözcüğünden gelmekte ve eski Roma'da senatörlerin sahip olduğu bir çeşit vergi dokunulmazlığı anlamını taşımaktadır. Bilimsel olarak ise immünite hastalıklardan özellikle enfeksiyöz hastalıklardan korunma anlamına gelmektedir. Canlılarda immüniteden sorumlu hücre ve moleküllerin oluşturduğu yapıya immün sistem, bu sistemin antijenlere karşı oluşturduğu reaksiyona ise immün yanıt adı verilmektedir (4).

İmmün sistemin fizyolojik fonksiyonu enfeksiyona neden olan mikroorganizmalara karşı vücut savunmasıdır. Bu savunma immün sistemin farklı mekanizmaları aracılığıyla gerçekleştirilmektedir. Bu mekanizmalar doğal (*innate*) bağışıklık ve edinsel (adaptif) bağışıklık mekanizmalarıdır (5).

2.1.1. Doğal Bağışıklık

Vücut savunması ilk olarak doğal bağışıklığın erken dönemde reaksiyonuyla başlamaktadır. Mikroorganizmalara karşı savunmanın erken basamakları doğal bağışıklığın birleşenleri tarafından oluşturulmaktadır. Bu birleşenler epitel doku ve antimikrobiyal ürünler gibi fiziksel ve kimyasal bariyerler, fagositer hücreler, kompleman komponentleri ve sitokinlerdir (Tablo 2.1). Doğal bağışıklık mekanizmaları mikroorganizmaların sahip olduğu PAMP (*pathogen associated molecular patterns*) adı verilen moleküler yapılar aracılığıyla tetiklenmektedir. Bu moleküler yapılar patojen tanıyan reseptörler (PRR-*pattern recognition receptors*) tarafından algılanmakta ve immün cevap oluşturulmaktadır. Doğal bağışıklık vücut savunmasının erken dönemini oluşturmakta ve enfeksiyöz ajanlara karşı özgüllüğü ve çeşitliliği edinsel bağışıklığa göre oldukça sınırlı kalmaktadır (4,5).

2.1.2. Edinsel Bağışıklık

İmmün sistemin doğal immüniteye göre antijenlere karşı daha spesifik ve karşılaşılan ajanlara adapte olarak daha güçlü yanıt veren şekli edinsel bağışıklık olarak adlandırılmaktadır. Edinsel bağışıklığın en önemli özelliği hafıza oluşturabilmesidir. Bu sayede vücut savunması aynı ajanla tekrar karşılaşıldığı zaman daha hızlı ve güçlü olarak yanıt verebilmektedir. Edinsel immün yanıt primer olarak lenfosit adı verilen hücreler ve bu hücreler tarafından üretilen çeşitli proteinler aracılığıyla oluşturulmaktadır. Lenfositler yüzeylerinde bulunan reseptörler aracılığıyla antijen adı verilen molekülleri tanırlar. Antijenler genellikle protein ya da polisakkarit yapıda olmalarına karşın lipid veya nükleik asit formları da mevcuttur. Antijenlere karşı B lenfositler tarafından üretilen proteinler antikor olarak adlandırılmaktadır. T lenfositler ise ürettikleri sitokinler aracılığıyla ve immün sistemin efektör fagositer hücrelerini uyararak immün yanıt oluşturmakta ve çeşitli alt gruplara ayrılmaktadırlar (Tablo 2.1) (4,5).

Lenfositler milyarlarla ifade edilen sayılarda farklı antijeni tanıma özelliğine sahip hücrelerdir. Bu özellikleri reseptörlerinde bulunan özelleşmiş yapılar sayesinde ortaya çıkmaktadır. Kemik iliğinde ve timusta lenfosit gelişimi sırasında gerçekleşen çeşitli moleküler mekanizmalar ile bu yapıların oluşumu ve antijenik çeşitlilik sağlanmaktadır (4). İmmün sistemde görev yapan hücrelerin gelişiminde ve işlev görmesinde çeşitli düzeylerde yer alan pek çok molekülü kodlayan genlerdeki mutasyonlar primer immün yetmezliklere neden olmaktadır.

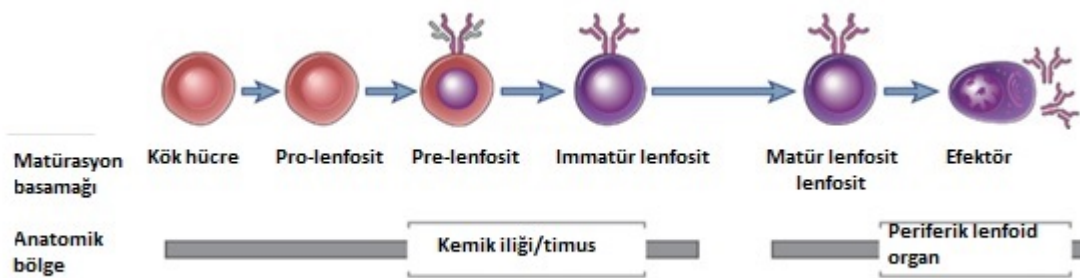
Tablo 2.1. Doğal ve edinsel immün sistemin birleşenleri

	Doğal Bağışıklık	Edinsel Bağışıklık
Spesifite	Mikrobiyal yüzey molekülleri	Antijenik yapılar
Çeşitlilik	Sınırlı	Çok geniş
Hafıza	Hayır	Evet
Hüresel ve Kimyasal Bariyerler	Deri, mukozal epitel, antimikrobiyal ürünler	Lenfositler ve antikorlar
Kan proteinleri	Kompleman componentleri	Antikorlar
Hücreler	Fagositer hücreler, NK hücreleri	Lenfositler

2.2. Lenfosit Gelişimi ve Antijen Reseptör Genlerinin Yeniden Düzenlenmesi

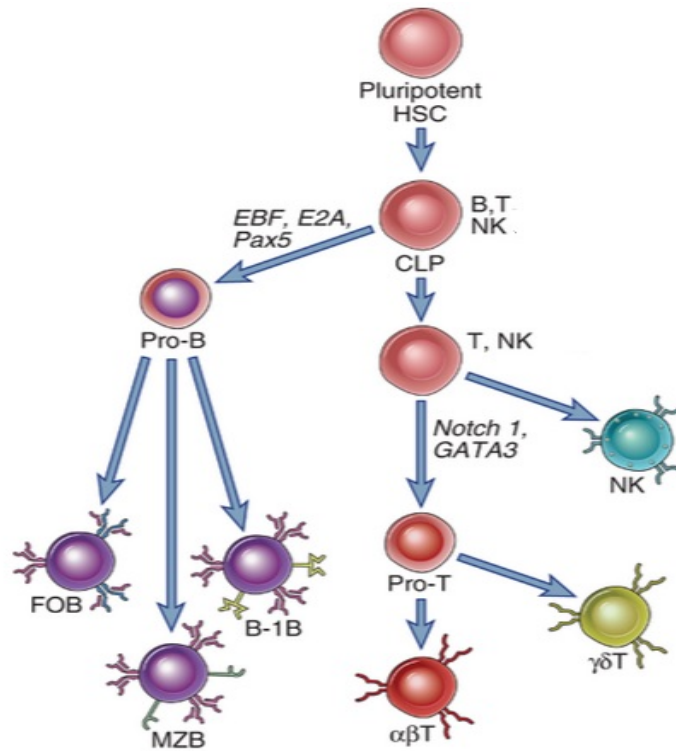
Lenfositler çok yüksek kapasitede farklı antijeni tanıyabilme özelliği olan reseptörlere sahip hücrelerdir. Bu çeşitlilik kemik iliği ve timusta T ve B hücre gelişimi sırasında gerçekleşmektedir. Primer lenfoid organlarda matür lenfositlere farklılaşma mekanizmasına lenfosit gelişimi ya da matürasyonu adı verilmektedir. Antijen reseptör genlerinin yeniden düzenlenmesi lenfosit gelişim sürecinin önemli özelliği olup, hem T hem de B hücrelerde benzer moleküler ve hücresel olaylar sonucu gerçekleştirilmektedir (4).

T ve B lenfositler kemik iliğinde üretilmekte, matürasyon basamakları ise B lenfositlerin yine kemik iliğinde, T lenfositlerin ise timusta gerçekleşmektedir (Şekil 2.1). Pluripotent hematopoietik kök hücreden lenfoid progenitörler üretilmekte ve bu öncül hücreler T, B ve NK (doğal öldürücü- *natural killer*) hücrelerine farklılaşmaktadır (Şekil 2.2). T ve B lenfositlerin gelişimi için antijen reseptör genlerinin yeniden düzenlenmesi anahtar mekanizmadır. Bu düzenlenme sonrasında her bir hücre klonu belirli bir antijene özgül reseptör eksprese etmektedir. Yeniden düzenlenme mekanizması sadece immün repertuarı artırmakla kalmaz, gelişim basamaklarında lenfositlerin hayatta kalabilmelerini sağlayan sinyal iletimleri için de zemin hazırlamaktadır (4)



(Abbas, A., Lichtman, A., Pillai, S. (2007). *Cellular and Molecular Immunology*'den değiştirilerek alınmıştır.)

Şekil 2.1. Lenfosit gelişim basamakları



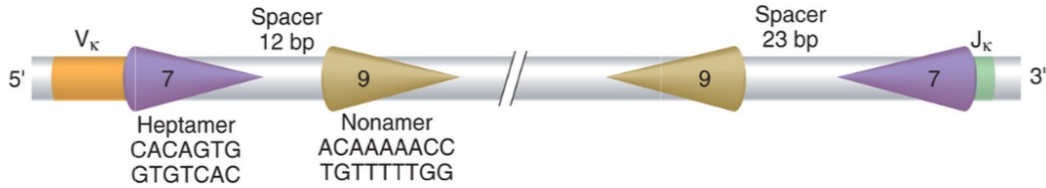
(Abbas, A., Lichtman, A., Pillai, S. (2007). *Cellular and Molecular Immunology*)

Şekil 2.2. Lenfoid seri hücrelerin farklılaşması

2.2.1. V(D)J Rekombinasyonu

Lenfosit reseptörlerini oluşturan farklı zincirleri kodlayan genler farklı kromozomlarda yerleşmişlerdir. Her bir zincir için yeniden düzenlenme somatik rekombinasyon mekanizmalarıyla gerçekleştirilmektedir. V (variable), D (diversity) ve J (joining) adı verilen gen segmentlerinin farklı kombinasyonlarla önce kesilip sonra çeşitli moleküller aracılığı ile bir araya gelmesi (DNA tamiri) bu rekombinasyon mekanizmasının basamaklarını oluşturmaktadır. Bu özelleşmiş yeniden düzenlenme V(D)J rekombinasyonu olarak adlandırılmaktadır. Rekombinasyon basamakları genetik olarak, gelişmekte olan her bir hücrede somatik olarak gerçekleşmektedir. Yani her bir lenfosit reseptör zincirinin hücre tarafından sentez edilmesi, yeniden düzenlenen rekombine DNA'nın transkripsiyonu sonrasında olmaktadır. V(D)J rekombinasyonu 4 farklı basamakta çeşitli enzimatik reaksiyonlarla gerçekleştirilmektedir (4):

1.Sinapsis: Rekombinasyon mekanizmalarının başlatılması için lenfositlere özgü faktörlerin DNA üzerindeki belirli dizileri tanımları gerekmektedir. Bu diziler rekombinasyon sinyal dizileri (*RSS-recombination signal sequences*) olarak adlandırılmaktadır ve V gen segmentinin 3' ucu ile, J segmentinin 5' ucunda yerleşmişlerdir (Şekil 2.3). Rekombinasyon sinyal dizileri bir heptamer, bir ara bölge ve bir nanomerden oluşmaktadır. Heptamer kodlanma bölgesinin hemen yanında yerleşik, 7 nükleotidten oluşan yüksek oranda korunmuş bir dizidir. Heptameri 12-23 baz çiftinden oluşan bir ara bölge (spacer) takip etmektedir. Son olarak da 9 nükleotidten oluşan ve yine yüksek oranda korunmuş bir nanomer bölgesi bulunmaktadır. Rekombinasyonun ilk basamağında RAG1 (*recombination activating gene-1*) proteini DNA' nın kodlanan bölgesiyle (V ya da J segmentleri) heptamer arasına bağlanmaktadır. RAG1 yalnızca RAG2 (*recombination activating gene-2*) proteini ile kompleks bir yapı oluşturarak işlevsel hale gelmektedir (Şekil 2.4) (4).



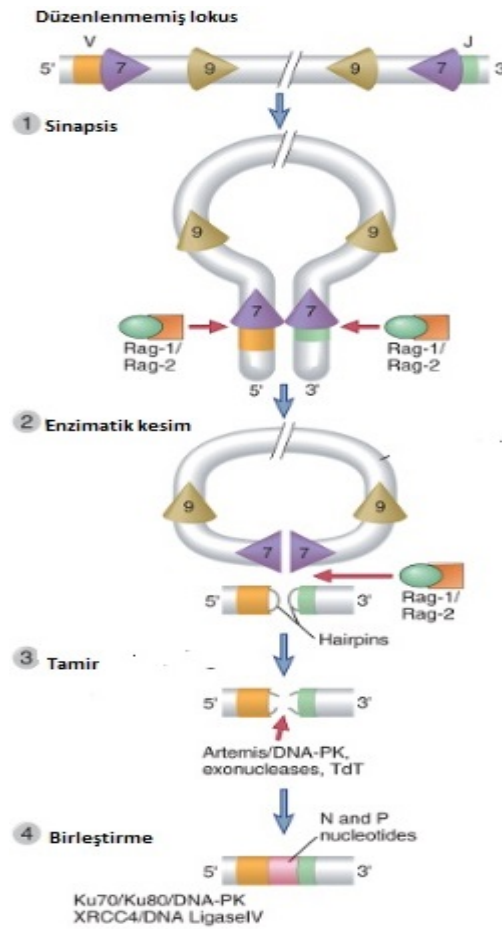
(Abbas, A., Lichtman, A., Pillai, S. (2007). *Cellular and Molecular Immunology*)

Şekil 2.3. Rekombinant sinyal dizileri

2. Enzimatik Kesim: Bu basamakta RAG1/2 kompleksi DNA' yı kodlanan bölge ile heptamer arasından keser ve iki kodlanan uç ile rekombinasyon sinyal dizisinin geri kalan bölgesi ayrılır. Kodlanan uçlar bir araya gelerek "hairpin" (saç tokası) yapısını, dizinin geri kalanı ise küt çift sarmal kırıkları oluşturmaktadır. RAG1/2 kompleksi enzimatik kesim işleminin yanında ayrılan bu uçları bir arada tutma işlevini de yerine getirmektedir (Şekil 2.4) (4).

3 ve 4. İşleyiş, Tamir ve Birleştirme: Rekombinasyonun son basamakları homolog olmayan birleştirme (NHEJ- *non homologous end joining*) mekanizmasıdır. NHEJ proteinleri hücrelerde DNA kırıklarını tamir etme görevi görmektedirler. V(D)J rekombinasyonu sırasında oluşan DNA kırıklarına Ku70 ve KU80 proteinleri

bağlanarak ortama DNA-PK (*DNA-dependent protein kinase*) enziminin gelmesini sağlarlar. DNA-PK çift sarmal DNA kırıklarını tamir eden bir enzimdir. DNA-PK ise Artemis adı verilen enzimi fosforile etmektedir. Aktive olan Artemis enzimi kodlanan uçlardaki “*hairpin*” yapısını açmaktadır. Açık uçların birleştirilmesi (ligasyon) ise DNA ligaz 4 enzimi tarafından gerçekleştirilmektedir (Şekil 2.4) (4).



(Abbas, A., Lichtman, A., Pillai, S. (2007). *Cellular and Molecular Immunology*'den değiştirilerek alınmıştır.)

Şekil 2.4. V(D)J rekombinasyonu

V(D)J rekombinasyonu yalnızca lenfosit gelişimi sırasında bu hücrelerde yani immatür lenfositlerde görülmektedir. RAG1 ve RAG2 proteinleri de sadece gelişmekte olan lenfositler tarafından eksprese edilmektedir. Bu nedenle rekombinasyonun ilk basamaklarını etkileyen mutasyonlar hastalarda lenfosit

gelişimini durdurmakta ve klasik ağır kombine immün yetmezliğe neden olmaktadır. NHEJ mekanizmasında yer alan proteinleri etkileyen mutasyonlarda ise hastalarda iyonize radyasyona karşı artmış sensitivite görülmektedir (2).

V(D)J rekombinasyonu sonucunda oluşan antijen çeşitliliği kombinasyonel çeşitlilik olarak adlandırılmaktadır. Fakat bu kombinasyon sayısı V, D, J gen segmentlerinin sayısı ile orantılı olarak ortaya çıkmaktadır (Tablo 2.2). Gelişimini tamamlayan matür lenfositlerde ise antijenik çeşitlilik çok daha fazladır. Bunu sağlayan mekanizma ise nükleotidlerin gen segmentleri arasında eklenip çıkarılmasıdır (*junctional diversity*). Bu işlem V-D, D-J ya da V-J gen segmentleri arasında gerçekleşmektedir. Rekombinasyon sırasında RAG-1 tarafından kesilen kodlanan diziler “*hairpin*” yapısını oluştururlar ve bu yapı Artemis tarafından asimetrik olarak açılmaktadır. Sonuçta bir DNA sarmalı diğerinden daha kısa kalmaktadır ve bu kısa bölgeye uzun bölgeyle eşlenecek şekilde nükleotidler eklenmektedir. Bu eklenen nükleotidler P nükleotidleri olarak adlandırılmaktadır. Diğer mekanizma ise N nükleotidleri olarak adlandırılan dizilerin tesadüfi olarak segmentlerin arasına yerleştirilmesidir. Bu işlemden sorumlu enzim TdT (*terminal deoxynucleotidyl transferase*) olarak bilinmektedir. Tüm bu yeniden düzenlenme mekanizmaları sonucunda lenfosit reseptör çeşitliliği B lenfositlerde 10^{11} , T lenfositlerde ise 10^{18} ’e kadar çıkmaktadır (4).

Tablo 2.2. Lenfosit reseptör genlerinin yeniden düzenlenmesi sonucu ortaya çıkan rekombinasyon sayıları.

Mekanizma	Ig		TCR			
Mekanizma	Ağır zincir	κ	α	β	γ	δ
V segmentleri	85	35	54	67	14	20-30
D segmentleri	27	0	0	2	0	3
J segmentleri	6	5	61	4	5	4
Toplam potansiyel çeşitlilik	10^{11}		10^{16}		10^{18}	

2.3. Primer İmmün Yetmezlikler

Primer immün yetmezlikler heterojen bir grup hastalık olup, hafif seyreden ya da hayatı tehdit edecek düzeyde ağır formları mevcuttur. Hastalığa yol açan moleküler defektler immün sistemin gelişimini ve fonksiyonunu etkileyen genlerle ilgilidir (1). Sorumlu gendeki mutasyonların tipi yanında hastanın genetik kompozisyonu bu hastalıklarla ilgili çok fazla fenotipik çeşitliğinin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Bu çeşitlilik klinik olarak enfeksiyonlara yatkınlık, otoimmünite, inflamasyon, alerji ve malignansi olarak karşımıza çıkmaktadır (6). Benzer fenotipler farklı genetik defektler sonucunda ortaya çıkabildiği gibi, aynı genetik defekt farklı fenotipik özelliklerle de ortaya çıkabilmekte, farklı immün yetmezlikler birbirleriyle örtüşen özellikler gösterebilmektedir.

Batı toplumlarında primer immün yetmezliklerin görülme sıklığı 1/10000 oranındadır (1). Akraba evliliklerinin yaygın olduğu ülkemizde özellikle otozomal resesif kalıtım gösteren primer immün yetmezliklerin görülme sıklığının daha fazla olduğu düşünülmektedir.

İlk tanımlanan primer immün yetmezlik 1952 yılında Ogden Bruton tarafından gösterilen X'e bağlı agamaglobulinemidir (*XLA-X-linked agammaglobulinemia*) (7). Hastalığa neden olan mutasyon ise 1993 yılında BTK (Bruton tirozin kinaz) geninde gösterilmiştir (8). Bugüne kadar 300 civarında primer immün yetmezlik tarif edilmiştir. 200 civarında primer immün yetmezliğin genetik defekti saptanmış olmasına karşın, altta yatan genetik eksikliğin bilinmediği pek çok hastalık vardır. Gelecek 10 yıl içinde primer immün yetmezliklerden sorumlu gen defekti sayısının yaklaşık 3000'e ulaşacağı tahmin edilmektedir. Primer immün yetmezliklerin önemli bir kısmı monogenik hastalıklardır ve otozomal resesif kalıtım göstermektedirler (9).

Uluslararası İmmünoloji Dernekleri Birliği Komitesi'nin (*ESID-International Union of Immunological Societies Expert Committee*) 2014 yılında yayınladığı son sınıflandırmaya göre primer immün yetmezlikler şu şekilde gruplandırılmıştır (10):

- 1-Kombine İmmün Yetmezlikler
- 2-Sendromik özellikleriyle tanımlanan immün yetmezlikler
- 3-Primer antikor eksiklikleri
- 4-İmmün disregülasyon hastalıkları
- 5-Fagositer hücre hastalıkları
- 6-Doğal bağışıklık hastalıkları
- 7-Otoinflamatuvar hastalıklar
- 8-Kompleman eksiklikleri
- 9-Fenokopik primer immün yetmezlikler

2.3.1. Kombine Ve Ağır Kombine İmmün Yetmezlikler

Kombine immün yetmezlikler (KİY) T ve B hücre gelişimi ve fonksiyonunda bozuklukla ortaya çıkan, fenotipik olarak heterojen bir hastalık grubudur. Yaklaşık 75000/ 100000 canlı doğumda bir görülmektedir (11). Fakat akraba evliliği oranının yüksek olduğu toplumlarda daha yaygın olduğu bilinmektedir. Bunun yanında yenidoğan tarama programlarının yaygınlaşmasıyla bu sayının artacağı düşünülmektedir. Bu hastalıkların birçoğu otozomal resesif kalıtım göstermektedir ve günümüze kadar 60'tan fazla farklı genetik defekt saptanmıştır (10).

Ağır kombine immün yetmezlikler (AKİY) ise primer immün yetmezliklerin en ağır formudur. Bu hastalık grubu T lenfositlerin yokluğu ya da afonksiyonel olmasıyla karakterize, bunun yanında B lenfositlerin de gelişiminde ve fonksiyonunda bozuklukların eşlik ettiği bir hastalık grubudur (2). Klasik olarak ağır kombine immün yetmezlikler B hücrelerin olup olmadığına bağlı olarak sınıflandırılmaktadır (Tablo 2.3). NK hücrelerin varlığı da bu sınıflandırmaya dahil edilebilir.

Tablo 2.3. Ağır kombine immün yetmezlikler.

T- B+ AKİY	T- B- AKİY
Gama yaygın zincir eksikliği	DNA rekombinasyon eksiklikleri
JAK3 eksikliği	a) RAG1 eksikliği
IL7R α eksikliği	b) RAG2 eksikliği
CD45 eksikliği	c) Artemis eksikliği
CD3 δ eksikliği	d) DNA PKC eksikliği
CD3 ϵ eksikliği	Retiküler disgenezis (AK2 eksikliği)
CD3 ζ eksikliği	ADA eksikliği
Koronin 1 A eksikliği	

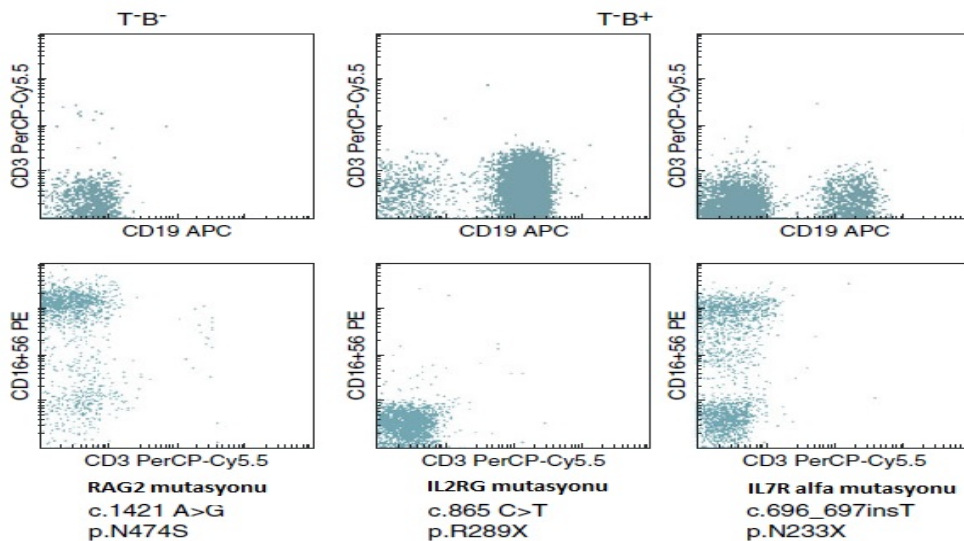
Kombine/ağır kombine immün yetmezlik ilk olarak Glanzmann ve Riniker tarafından ağır *Candida* enfeksiyonu olan, aralarında akrabalık olan 2 süt çocuğunda 1950 yılında gösterilmiştir (12). 1968 yılında ise İsviçre’de agamaglobulinemiyle birlikte ağır lenfopeni saptanan 2 hastada hücrel ve hümoral eksikliğin bir arada bulunduğu yeni bir immün yetmezlik tanımlanmış ve bu sendrom İsviçre tipi agamaglobulinemi (*Swiss type agamaglobulinemia*) olarak adlandırılmıştır (13). 1970 yılında Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından oluşturulan bir komite bu hastalığa ağır kombine immün yetmezlik adının verilmesini kararlaştırmıştır (14). 1972 yılında ise Amerika Birleşik Devletleri’nde ağır kombine immün yetmezlik düşünülen bir çocukta adenozin deaminaz (ADA) enzim eksikliği saptanmış ve primer immün yetmezliğe neden olan ilk metabolik defekt bu proteinin yokluğuyla tanımlanmıştır (15).

Ağır kombine immün yetmezlik genellikle yaşamın ilk yılında ortaya çıkan, hayatı tehdit eden bakteriyel, viral (özellikle sitomegalovirus, parainfluenza ve rotavirus) ve *Pneumocystis jiroveci pneumoniae*, *candida*, *aspergillus* gibi fırsatçı enfeksiyonlarla karakterizedir. Erken tanı bu hastalar için yaşamsal önem taşımaktadır. Bu enfeksiyonlar genellikle solunum yolu ve gastrointestinal sistemi tutarken, menenjit, artrit, idrar yolu enfeksiyonları da görülebilmektedir (16). Bakteriyel enfeksiyonlar erken infantil dönemde maternal IgG varlığı nedeniyle daha

az olasılıkla mevcut olup, uzamış otit media ya da *staphylococcus*, *pseudomonas* gibi invaziv bakteriyel enfeksiyonlar görülebilmektedir. Ağır invaziv fungal enfeksiyonlar ölümcül seyretmektedir. Özellikle uzamış, mukozal kandidiazis daha yaygındır (2).

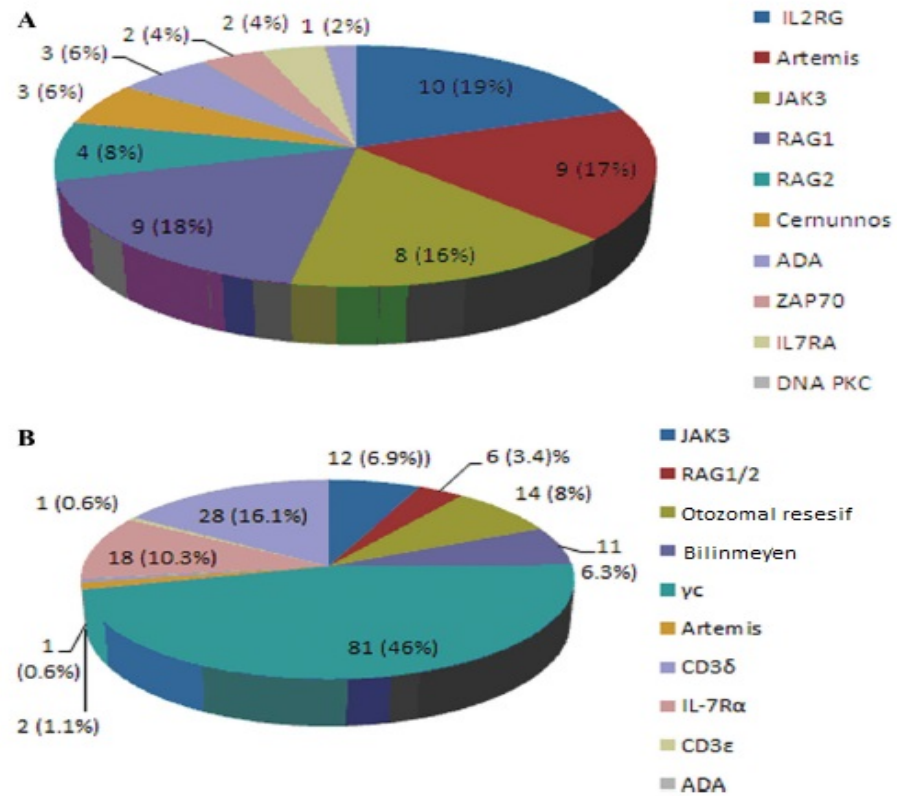
Klinik bulguları ağır kombine immün yetmezlik ile uyumlu bir hastada dolaşımdaki T lenfosit sayısının düşük olması beklenmektedir. B hücre ve NK hücre sayıları ise değişkenlik göstermektedirler. Tanı için periferik kandan akım sitometri ile immün fenotiplendirme yapılması önemlidir. Bazı durumlarda hastada ağır lenfopeni saptanmazken lenfosit subsetleri düşük olabilmektedir. Klasik ağır kombine immün yetmezlikli hastalarda yapılacak akım sitometri analizlerinin bir örneği şekil 2.5'te gösterilmiştir (2).

Ağır kombine immün yetmezliğe neden olan genetik bozuklukların birçoğu otozomal resesif kalıtım göstermektedir. Bu nedenle bu hastalarda akrabalık olup olmadığı saptanmalı, ailede daha önce küçük yaşta kaybedilen bireyler varsa araştırılmalıdır (17). Dünya genelinde X kromozomuna bağlı geçiş gösteren AKİY formları (IL2RG) en yaygın alt grupken, Türkiye gibi akraba evliliği oranının yüksek olduğu bölgelerde otozomal resesif geçişli formlar daha yaygın görülmektedir (Şekil 2.6) (18).



(Van der Burg, M., Gennery, AR. (2011) *Educational paper. The expanding clinical and immunological spectrum of severe combined immunodeficiency*'den değiştirilerek alınmıştır.)

Şekil 2.5. Ağır kombine immün yetmezlikli hastalarda akım sitometri analizi örneği



(Sanal O, Tezcan I. *Thirty years of primary immunodeficiencies in Turkey*'den değiştirilerek alınmıştır.)
A. Hacettepe Üniversitesi (Türkiye) B. Duke Üniversitesi (ABD)

Şekil 2.6. Ağır kombine immün yetmezlikli hastaların dağılımı

2.3.2. Ağır Kombine İmmün Yetmezliklerin Sınıflandırması

Klasik ağır kombine immün yetmezlikler T lenfosit yokluğunda B lenfositlerin bulunup bulunmamasına göre sınıflandırılmaktadırlar.

T- B+ AKİY

Bu grup ağır kombine immün yetmezliklerin çoğu sitokin aracılı sinyal iletiminde bozukluğa neden olan genetik defektler sonucu ortaya çıkmaktadır. Hastalarda dolaşımda ağır T Hücre lenfopenisi görülürken, B hücre sayıları normaldir.

Gama Yaygın Zincir (IL2RG) Eksikliği

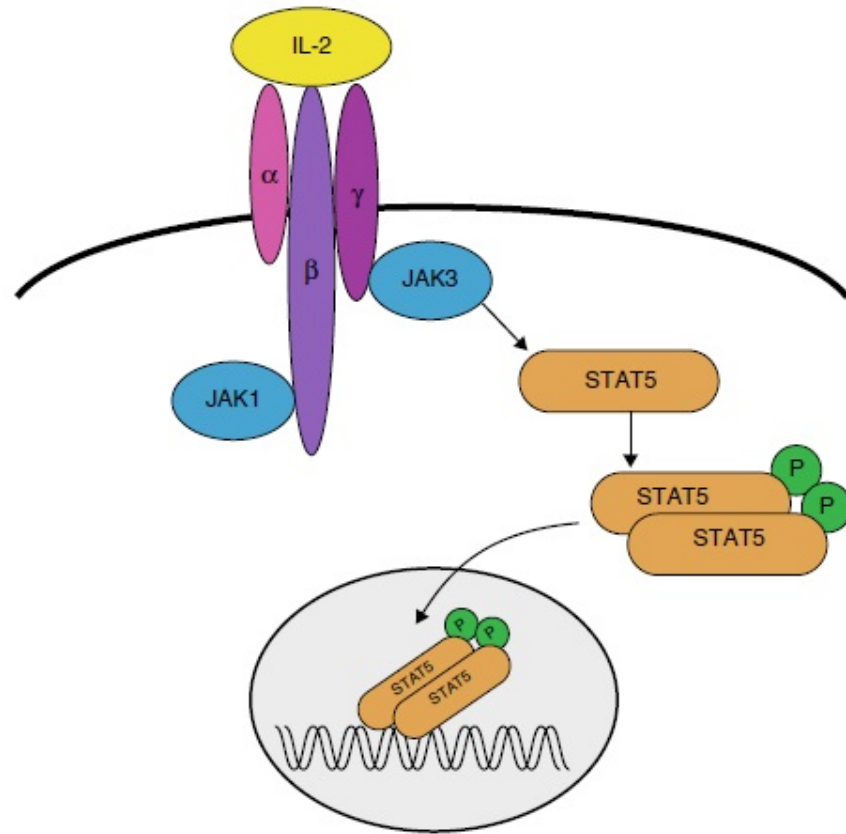
İnterlökin-2 reseptör gama zincirini kodlayan IL2RG geninde bulunan mutasyonlar sonucu ortaya çıkmaktadır. X kromozomuna bağlı geçiş gösteren tek AKİY'dir. Yaygın gama zinciri IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 ve IL-21 gibi sitokinlerin reseptörlerinin yapısında bulunan ortak bir moleküldür. BU sitokinler aracılığıyla başlatılan sinyalizasyon gama zincir eksikliğinde devam edememekte ve bu T hücre gelişimini durdurmaktadır (Şekil 2.7) (19). Bu hastalarda dolaşımda NK hücre sayısı da oldukça azalmıştır ya da yoktur. IL2RG geni X kromozomunda bulunmaktadır.

JAK3 (Janus kinase 3) Eksikliği

Yukarıda adı geçen sitokinler aracılığıyla başlatılan sinyalizasyon JAK1 ve JAK3 moleküllerinin aktive olmasıyla ve reseptör zincirlerindeki tirozin dizilerinin fosforilasyonu ile devam etmektedir (Şekil 2.7). JAK moleküllerinin birbirlerini fosforile etmesiyle STAT5 transkripsiyon faktörünün de fosforilasyonu ve aktivasyonu gerçekleştirilir (20,21). JAK3 eksikliği otozomal resesif geçişlidir. JAK3 geni 19. kromozomun kısa kolunda bulunmaktadır.

IL-7R α (interlökin-7 reseptör alfa) eksikliği

IL-7 hem T hem B lenfosit gelişimi sırasında gerekli bir sitokindir. IL-7 reseptör eksikliğinde sinyal mekanizması bozulduğundan dolayı özellikle timusta T lenfosit gelişimi durmaktadır. B lenfositler IL-7 eksikliğini tolere edebilmektedirler. Bu hücrelerin kemik iliğinde gelişimi sırasında salgılanan TSLP (*thymic stromal lymphopoietin*) gibi sitokinler IL-7-IL-7R sinyalizasyonundaki eksikliği kompanse edebilmektedirler. IL-7R α eksikliği otozomal resesif geçişlidir ve bu hastalarda dolaşımdaki NK hücre sayısı da normaldir (22). IL-7R α geni 5. kromozomun kısa kolunda bulunmaktadır.



(Van der Burg, M., Gennery, AR. (2011) *Educational paper. The expanding clinical and immunological spectrum of severe combined immunodeficiency*'den değiştirilerek alınmıştır.)

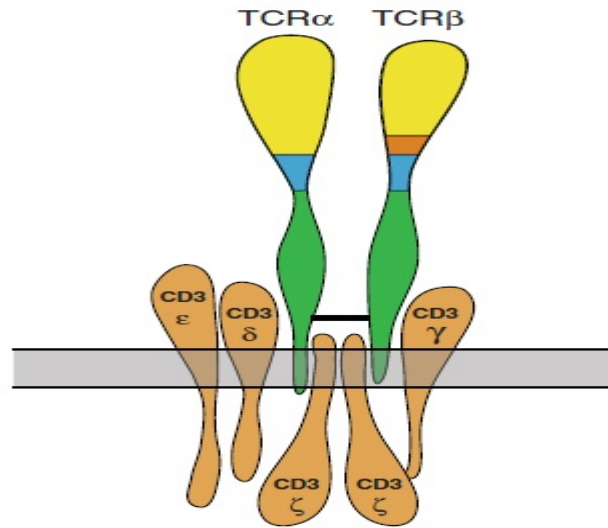
Şekil 2.7. IL2RG ve JAK3 sinyal yolağı

CD45 Eksikliği

CD45 sitoplazmik kısmında tirozin fosfatase domainleri içeren bir membran proteinidir. Bu molekülün lenfositlerin aktivasyonunda ve inhibisyonunda kompleks bir rolü olduğu bilinmesine rağmen T hücre sinyal yolağını hangi mekanizmalarla regüle ettiği tam olarak anlaşılamamıştır (4). CD45 molekülünü kodlayan PTPRC (*protein tyrosine phosphatase, receptor type, C*) geninde otozomal resesif kalıtım gösteren çeşitli delesyonlar ve nokta mutasyonları T lenfosit gelişimini durdurmakta ve ağır kombine immün yetmezliğe yol açmaktadır (23). CD45 eksikliği otozomal resesif geçişlidir . PTPRC geni 1. kromozomun uzun kolunda bulunmaktadır.

CD3 Zincir Eksiklikleri

CD3 kompleksi, T hücre reseptör aracılı sinyal iletiminde görevli ve 4 farklı zincirden oluşan bir yapıdır (Şekil 2.8). Bu yapıyı oluşturan zincirlerden herhangi birini etkileyen moleküler defektler kompleks yapının sinyal iletim özelliğini bozmaktadır. Bu da timusta T hücre gelişimi için gerekli sinyal iletimini durdurmaktadır (24). Bu hastalarda dolaşımda NK hücre sayısı normalken, γ/δ T hücreler de bulunmamaktadır. CD3 eksiklikleri de otozomal resesif geçişlidir. CD3 zincir genleri 11. kromozomun uzun kolunda bulunmaktadır.



(Van der Burg, M., Gennery, AR. (2011) *Educational paper. The expanding clinical and immunological spectrum of severe combined immunodeficiency*'den değiştirilerek alınmıştır.)

Şekil 2.8. CD3 molekülleri

Koronin1A Eksikliği

Koronin1A aktin regülasyonunda rol oynayan bir proteindir. Bu molekülü etkileyen mutasyonlar timusta aktin regülasyonunun bozulmasına yol açmakta ve gelişen T hücrelerin lokalizasyonu bozulmaktadır (25). Son yıllarda yapılan çalışmalarla bu proteinin sadece aktin regülasyonunda değil immün homeostazın sağlanmasında, kalsiyum-kalsinörin sinyalizasyonunda da rol aldığı gösterilmiştir. Koronin1A eksikliği olan hastalarda ağır T hücre lenfopenisi yanında B hücre ilişkili EBV lenfoproliferasyonuna yatkınlık gözlemlenmektedir (26). Koronin1A eksikliği

eksikliği otozomal resesif geçişlidir. CORO1A geni 16. kromozomun kısa kolunda bulunmaktadır.

T- B+ AKİY

Bu grup ağır kombine immün yetmezliklerin çoğu VD(J) rekombinasyonunun bozulmasına yol açan moleküler defektler sonucu ortaya çıkmaktadır. Bu moleküler bozukluklar rekombinasyon mekanizmasının, dolayısıyla T ve B lenfosit reseptör yeniden yapılanmasının durmasına yol açmaktadırlar ki bu da lenfosit gelişimini durdurmaktadır. Dolaşımda ağır T ve B hücre lenfopenisi görülmektedir. Tüm T- B+ ağır kombine immün yetmezlik formları otozomal resesif kalıtım göstermektedir.

DNA Rekombinasyon Defektleri

RAG1 Ve RAG2 (*recombination activating gene 1/2*) Eksiklikleri

VD(J) rekombinasyonunun ilk basamağında RAG1 ve RAG2 proteinleri heterodimerik bir yapı oluşturarak rekombinasyon sinyal dizisinin enzimatik kesim işlemini sağlamaktadırlar (Bkz. Şekil 2.4). Bu proteinleri kodlayan genlerdeki mutasyonlar rekombinasyon mekanizmasının durmasına yol açarlar. Bu nedenle lenfosit gelişimi erken basamakta sonlandırılmaktadır (2). RAG1 ve RAG2 genleri 11. kromozomun kısa kolunda bulunmaktadır.

Artemis Ve DNA PKcs (DNA protein kinaz) Eksikliği

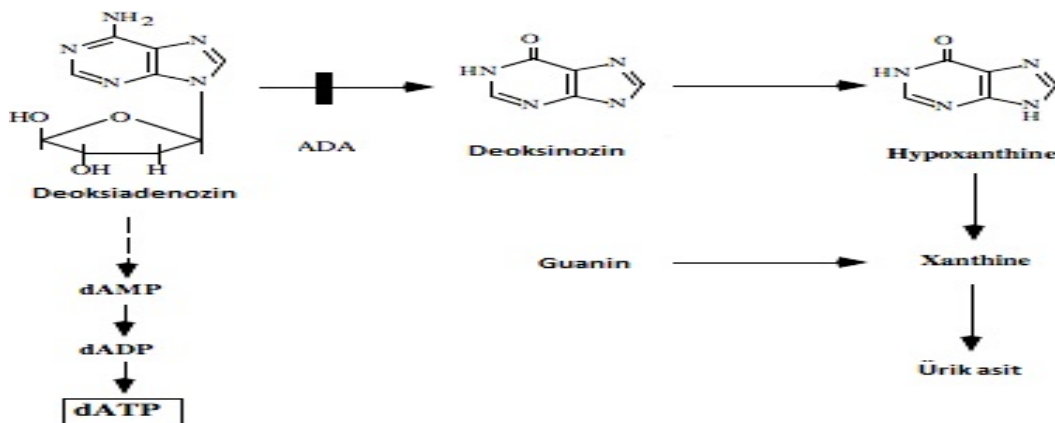
VD(J) rekombinasyonunun ikinci basamağında yer alan Artemis ve DNA protein kinaz kompleksi rekombinaz tamir proteinleridir. Bu proteinleri etkileyen mutasyonlar VD(J) rekombinasyon mekanizmasının ve lenfosit gelişiminin durmasına yol açmaktadırlar (Bkz. Şekil 2.4) (2). Artemis proteini DCLRE1C geni tarafından kodlanmaktadır. DCLRE1C geni 10. kromozomun kısa kolunda bulunmaktadır. DNA protein kinaz proteini PRKDC geni tarafından kodlanmaktadır. PRKDC geni 8. kromozomun uzun kolunda bulunmaktadır.

Retiküler Disgenezis

AK2 (adenilat kinaz 2) proteini mitokondriyal enerji metabolizmasını düzenleyen bir enzimdir. Eksikliğinde kemik iliğinde hematopoietik kök hücreden lenfoid/myeloid seri progenitörlerinin oluşması etkilenmekte ve hücreler apoptoza giderek ölmektedirler. Bu nedenle dolaşımda hem granülositler hem de lenfositler eksiktir. Ayrıca timusta ve sekonder lenfoid organlarda hipoplazi görülebilmektedir. AK2 eksikliği ağır kombine immün yetmezliklerin en ağır formudur ve yaşamın henüz ilk günlerinde belirti verebilmektedir (27). AK2 geni 1. kromozomun kısa kolunda bulunmaktadır.

ADA (Adenozin deaminaz) Eksikliği

ADA hücrelerde pürin metabolizmasında yer alan bir enzimdir. Adenozinin inozine parçalanmasını katalizlemektedir (Şekil 2.9). Bütün memeli hücrelerinde bulunmasına rağmen primer olarak immün sistem hücrelerinde görev aldığı bilinmektedir. Eksikliğinde özellikle lenfoid seri hücreler için toksik olan metabolitlerin birikimi sonucunda, bu hücreler apoptoza giderek ölmektedir. Hastalarda dolaşımda T ve B lenfositlerin yanında NK hücreleri de bulunmamaktadır (28, 29). ADA geni 20. kromozomun uzun kolunda bulunmaktadır.



(<http://seqcore.brcf.med.umich.edu/mcb500> sayfasından değiştirilerek alınmıştır.)

Şekil 2.9. ADA metabolik yolu

Atipik Ağır Kombine İmmün Yetmezlikler Ve Omenn Sendromu

Klasik ağır kombine immün yetmezlik bulguları gösteren bazı hastalar, yaşamın ilk yılından sonra da rezidüel bir T hücre immünitesi ile yaşamlarına devam edebilmektedirler. Ağır kombine immün yetmezliğe neden olan genlerdeki hipomorfik mutasyonlar T hücre gelişimini ya da fonksiyonunu etkilemekle birlikte bir miktar hücre gelişim ve immün yanıt bu hastalarda olabilmektedir (30).

Omenn sendromu RAG1, RAG2, Artemis, IL7RA, RMRP, ADA, DNA ligaz IV, IL-2RG, AK2 genlerinde bulunan hipomorfik mutasyonlar sonucu ortaya çıkan ve belirli klinik özellikler ile tanımlanmış bir hastalıktır. Sendrom klinik olarak yoğun eritomatöz lezyonlar, eritroderma, lenfadenopati ve hepatosplenomegali ile karakterizedir. Eritomatöz lezyonlar doğumda veya yaşamın ilk haftalarında ortaya çıkabilmektedir. Hastalarda ağır fırsatçı enfeksiyonlara yatkınlık ve gelişme geriliği görülebilmektedir. Dolaşımda T lenfosit bulunmakta, IgE seviyesi yüksek ve eozinofili bulunabilmektedir (31, 32).

Klasik ağır kombine immün yetmezlik ve Omenn sendromunun klinik özellikleri ve immünolojik fenotipleri iyi tanımlanmıştır. Bununla birlikte ağır kombine immün yetmezliğe neden olan genlerdeki hipomorfik mutasyonların neden olduğu, çok farklı klinik prezentasyonlarla ortaya çıkabilen, klinikte göreceli olarak farklı belirtiler gösteren kombine immün yetmezlik formları atipik ağır kombine immün yetmezlikler olarak adlandırılmaktadır (30). Günümüzde moleküler tetkiklerin gelişmesiyle birlikte bu tür farklı prezentasyonlarla seyreden atipik kombine immün yetmezliklerin klinik fenotipleri daha ayrıntılı olarak tanımlanabilecektir.

2.3.3. Ağır Kombine İmmün Yetmezliklerde Tedavi

Ağır kombine immün yetmezlikler için küratif tedavi yöntemi hematopoietik kök hücre naklidir (HKHN). Kök hücre kaynağı genellikle kemik iliği olsa da, bazı durumlarda kordon kanı ya da periferik kandan izole edilen kök hücreler de kullanılabilir (2). B hücre pozitif ağır kombine immün yetmezliklerde başarı oranının daha yüksek olduğu bilinmektedir (33). Kök hücre nakli enfeksiyonlar

başlamadan yapılırsa daha başarılı sonuç alınmaktadır (34). Bu nedenle yenidoğan tarama programlarının yaygınlaşması tedavi açısından önem taşımaktadır. HLA uyumlu akraba donörlerden yapılan kök hücre nakilleri en başarılı sonuç alınan tedavilerdir. 2010 yılında Avrupa İmmün Yetmezlik Derneği (ESID) aracılığı ile yayınlanan çok merkezli çalışmada 1968-2005 yılları arasında yapılan kök hücre nakillerinin sonuçları açıklanmıştır. Buna göre HLA uyumlu kardeş donörlerden yapılan nakillerde başarı oranı % 90 civarındadır. Yarı uyumlu akrabalarından yapılan nakillerde ise bu oran % 66 olarak belirtilmiştir (35).

Kök hücre nakillerinde donörden alınan hücrelerle normal hematopoezin sağlanması için kemoterapötik hazırlık rejimi uygulanabilir. Özellikle yarı uyumlu donörlerden yapılan nakillerde hazırlık rejiminin verilmesiyle daha iyi sonuç alınabilmektedir. Hazırlık rejiminin verilmesiyle hastanın kemik iliğinde nakil yapılan kök hücrelerin engrafmanına yer sağlanmış olur (17). Kemoterapi şartlarının hastanın durumuna göre belirlenmesi başarılı sonuçlar alınmasını sağlamaktadır fakat yapılan bazı çalışmalarda hastalarda uzun dönem sekellerin ortaya çıkabileceği gösterilmiştir (36). Kemoterapi kısırlığa yol açabilmektedir. Hipotiroidizm kemoterapiye sekonder olarak hastaların yaklaşık % 10'unda görülebilmektedir. JAK3 ve IL2RG eksikliklerinde ise HPV (human papilloma virus) ilişkili siğiller rapor edilmiştir (37).

HKHN yapılan hastalarda B hücre rekonstitüsyonunun derecesine bağlı olarak hastalara intravenöz immünoglobulin (IVIG) tedavisi verilebilmektedir.

HKHN yapıldıktan sonra ortaya çıkan en önemli komplikasyon "Graft versus host" hastalığı (GVHD-Graft versus host disease)'dir. GVHD donörün matür T lenfositlerinin, hastanın antijen sunan hücreleri aracılığıyla aktive olup, inflamasyona ve doku hasarına yol açmasıdır (38). GVHD tedavisi için kortikosteroidler ile immün supresif tedavi verilmektedir. Uzun süreli tedavilerde enfeksiyonlara yatkınlık ve osteopeni gibi çeşitli problemler ortaya çıkabilmektedir (17).

ADA eksikliklerinde polietilen-glikolize ADA (PEG-ADA) enzim replasman tedavisi alternatif bir yöntem olarak kullanılmaktadır. Fakat hayat boyu kullanım

ihtiyacı, pahalı olması ve kısmi bir iyileşme sağlaması bu yöntemin dezavantajlarıdır (39).

Gen terapisi ADA ve IL2RG eksikliği olan hastalarda kullanılmaktadır. ADA eksikliklerinde ilk yapılan denemelerde kısmi başarı sağlanmış, hastaların büyük bir kısmında PEG-ADA enzim tedavisine devam edilmiştir. Son zamanlarda bu hastalarda gen tedavisi ve düşük doz kemoterapi ile daha başarılı sonuçlar alınmaktadır (40). IL2RG eksikliği olan hastalarda ise gen terapisi ile immün yeniden yapılanma sağlanabilmektedir. Kemoterapiye ihtiyaç duyulmaz. Fakat kullanılan retroviral vektörlerin DNA üzerinde onkogenlere yakın olarak bağlanıp, bunları aktive etmesi lenfoproliferatif hastalıklara neden olabilmektedir (41). Bu nedenle lentiviral vektörlere geçilmiş olup, başarılı sonuçlar yayımlanmıştır.

2.4. İmmünolojide Kullanılan Genetik Yöntemler Ve Uygulamaları

Primer immün yetmezliklerin büyük bir çoğunluğu monogenik hastalıklardır. Özellikle kombine immün yetmezliklerin kesin tanısı için moleküler defektin hangi gende bulunduğunu saptamak çok önemlidir. Hastanın klinik durumuna göre saptanan aday genlerde klasik yöntemlerle dizileme yapılması en temel yaklaşımdır. Klasik Sanger dizileme çalışması için genomik DNA'nın izolasyonu ve amplifikasyonu gerekmektedir.

2.4.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Polimeraz zincir reaksiyonu ilk olarak 1985 yılında Kary Mullis tarafından geliştirilmiştir (42). Temel olarak DNA'nın belirli bir bölgesinin in vitro olarak çoğaltılması esasına dayanmaktadır. Hızlı ve basit bir yöntem olmasından dolayı özellikle dizileme çalışmaları için kullanımı gerekli ve yaygındır.

Az miktarda DNA ile bir tüp içinde gerçekleşen reaksiyon 3 basamaktan oluşmaktadır. İstenilen DNA bölgesinin çoğaltılması için, o bölgeye komplementer bir çift oligonükleotid primer dizisi ile bu primerlerden sentezi sağlayacak bir DNA polimeraz enzimi gereklidir. Reaksiyonlarda genellikle *Thermus aquaticus* bakterisinden elde edilen, ısıya dayanıklı Taq polimeraz enzimi kullanılmaktadır.

Zincir reaksiyonun ilk basamağı denatürasyon basamağıdır ve 95 °C' de DNA çift sarmalın açılması gerçekleştirilir. Daha sonra sıcaklık düşürülerek komplementer dizilerin DNA'nın istenilen bölgesine bağlanması sağlanır. Bu işlem primer çiftlerinin yapısına göre farklı sıcaklık derecelerinde gerçekleşmektedir ve reaksiyonun ikinci basamağıdır (annealing). Üçüncü aşamada ise Taq polimerazın primer diziden başlayarak DNA sentezi yapması, istenilen bölgeyi uzatması beklenmektedir (elongation). Uzatma işlemi 70-75 °C'de gerçekleşmektedir ve özellikle Taq polimeraz için bu değer 72 °C'dir (43, 44).

2.4.2. DNA Dizi Analizi

DNA dizi analizi ya da moleküler klonlama her bir DNA parçasındaki nükleotid dizilerinin belirlenmesini sağlayan yöntemdir. Günümüzde bu yöntem biyoteknoloji, adli tıp ve klinik uygulamalarda sıklıkla kullanılmaktadır ve insan genom projesinin gerçekleşmesi DNA dizi analizlerine dayanmaktadır.

DNA dizi analizi ilk olarak 1970'li yıllarda iki farklı grup tarafından farklı yöntemlerle geliştirilmiştir. Allan Maxam ve Walter Gilbert tarafından geliştirilen yöntem, DNA'nın kimyasal modifikasyonu ve enzimatik olarak bazların kesilmesi esasına dayanmaktadır (45). Sanger ve Coulson ise zincir sonlandırma yöntemiyle ilerleyen bir metot geliştirmişlerdir (46). Zaman içinde bu zincir sonlandırma yönteminin geliştirilmesiyle Sanger dizileme yöntemi bütün dünyada tercih edilen model olmuştur.

Sanger dizileme yöntemi DNA polimeraz reaksiyonunun zincir sonlandırıcı 3' OH grubuna sahip olmayan dideoksinükleotidlerin (ddNTP) eklenmesiyle sonlandırılması işlemidir. Bu yöntemde DNA sentezi bir ucundan radyoizotop ile işaretlenmiş primerler kullanılarak başlatılmaktadır. Her bir sentez için 4 ayrı baz içeren (A,C,G,T) ddNTP'lerle, her bir baz için 4 farklı reaksiyon gerçekleştirilmektedir. DNA sentezi ilerlerken bir ddNTP'nin ipliğe bağlanmasıyla reaksiyon durmaktadır. Sonuçta her bir reaksiyonda reaksiyonu durduran ddNTP ile sonlanan, bir dizi farklı büyüklükte işaretli DNA parçacığı oluşur. Oluşan bu parçacıklar jel elektroforezi kullanılarak birbirinden ayrılmakta ve X ışını kullanılarak otoradyografiyle

görüntülenmektedir. Günümüzde dizi analizleri radyoaktif parçalar yerine floresan boya ile işaretlenmiş primerler kullanılarak otomatik sistemler tarafından görüntülenmektedir.

2.4.3. Genetik Haritalama

Genetik haritalama, genlerin lokalizasyonları ve fonksiyonları arasında bağlantı kurmak için kullanılan istatistiksel bir yöntemdir. Genetik haritalamanın parametrik yöntemi bağlantı (linkage) analizidir. Mayoz bölünme sırasında aynı kromozomda bulunan birbirine yakın alleller birlikte aktarılmaktadırlar. Bu kural temel alınarak, iki genin nesilden nesile aktarılırken bağlantılı olup olmadıkları linkage analizi ile saptanabilmektedir (47). Bu yöntemle bir hastalıktan sorumlu olabilecek aday genin bulunabileceği kromozomal bölge istatistiksel olarak saptanabilmektedir. Fakat bulunan bir bölgede onlarca hatta yüzlerce farklı aday gen ortaya çıkmaktadır. Ayrıca bağlantı analizlerinin yapılabilmesi için hastalıktan etkilenen bir aileden, birkaç farklı kuşaktan çok sayıda etkilenmiş kişinin araştırılması gerekmektedir. 2012 yılında Lopez-Herrera ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada LRBA genindeki mutasyonun yeni bir kombine immün yetmezliğe neden olduğu gösterilmiştir (48). Yapılan bu çalışmada bağlantı analizi kullanılmış, 4 farklı nesilden 5 hastada yapılan skorlamalar sonucunda 81 farklı genin bulunduğu kromozomal bir bölge saptanarak sorumlu gene ulaşılmıştır.

Homozigotluk haritalaması ya da otozigote haritalaması otozomal resesif geçişli hastalıklarda, sorumlu genin bulunduğu bölgenin saptanması için sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Aynı atadan gelen, kuşaklar boyu aynı şekilde kalıtılan homozigot alleller ya da kromozomal bölgeler otozigot olarak adlandırılmaktadır (49). Akraba evliliğinin yüksek olduğu bölgelerde otozomal resesif kalıtım gösteren hastalıkların daha yüksek oranda görüldüğü bilinmektedir. Anne, babası akraba olan hastalarda homozigotluk haritalaması yapılarak aday genin yer aldığı kromozomal bölge saptanabilmektedir. Özellikle nadir görülen otozomal resesif geçişli hastalıklarda, hastalıktan sorumlu genin saptanan homozigot bölgede bulunma ihtimali oldukça yüksektir (49). Özellikle son yıllarda homozigotluk haritalaması ve

tüm genom dizileme yöntemleri bir arada kullanılarak immün yetmezliklerden sorumlu bir çok genin tanımlanması yapılmıştır.

2.4.4. Yeni Nesil Dizileme Yöntemleri

Günümüzde yeni nesil dizileme yöntemlerinin geliştirilmesiyle birlikte çok yüksek hacimde DNA dizilerinin okunması mümkün hale gelmiştir. Tüm genom, tüm ekzom dizileme yöntemleri özellikle nadir hastalıklara neden olan mutasyonların tanısında yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Yeni nesil dizileme yöntemi ilk olarak Ng, SB. ve arkadaşları tarafından 2009 yılında geliştirilmiştir (3). Büyük hacimli dizileme yöntemlerinde temel, DNA'nın enzimatik reaksiyonlarla kesilerek çok sayıda DNA parçasıyla bir kütüphane oluşturulmasına dayanmaktadır. DNA kütüphanelerinin oluşturulmasıyla, kütüphaneyi oluşturan DNA fragmentleri amplifikasyona uygun hale gelmektedir (50). Günümüzde tüm dünyada yaygın olarak kullanılan birkaç adet farklı yeni nesil dizileme platformu mevcuttur. Illumina®, Applied Biosystems Inc, LifeTechnologies ve Pacific Bioscience gibi kuruluşların farklı platformları farklı dizileme yöntemleriyle yüksek verimli okuma yapmaktadır.

Son zamanlarda, belirli hedef DNA bölgelerin dizilemesini yapmak için geliştirilmiş "*capturing/targeting whole exom*" teknolojileri kullanılmaya başlamıştır. Bu yeni nesil teknolojilerde belirli sayıda gen hedeflenmekte ve amplifikasyon sadece belirlenen bölgeler için gerçekleştirilmektedir. Özellikle nadir görülen primer immün yetmezlikler gibi hastalıklarda rutin olarak kullanılmak üzere "hedef bölge seçimi" temelli platformlar oluşturulmaktadır. Isaac J. Nijman ve arkadaşlarının 2014 yılında yayınladıkları çalışmada primer immün yetmezliğe neden olan 170 genin dizilemesine yönelik yeni nesil teknoloji kullanılmıştır (51).

Primer immün yetmezlikler gibi nadir görülen ve bir çoğu otozomal resesif kalıtım gösteren hastalıkların tanısında moleküler tekniklerin geliştirilmesi, hastalığa neden olan yeni genetik mutasyonların ortaya çıkarılmasında önemli bir gelişme sağlamıştır. Özellikle bu tür hastalıkların daha yaygın olarak ortaya çıktığı, akraba evliliklerinin yüksek olduğu bölgelerde gen haritalama çalışmaları ile birlikte yeni

nesil dizileme yöntemlerinin beraber kullanılması mutasyonların saptanmasını daha kolay hale getirmiştir. Son birkaç yıl içinde bu tekniklerle birlikte ortaya çıkan immün yetmezliklerden bazıları coronin 1A, IL-21, NIK, CD27, CARD11 eksiklikleridir (52-56).

3. GEREÇ ve YÖNTEMLER

3.1. Hastalar

Çalışmaya Hacettepe Üniversitesi İhsan Doğramacı Çocuk Hastanesi İmmünoloji Bilim Dalı'nda Ocak 2000- Aralık 2013 tarihleri arasında ağır kombine immün yetmezlik düşünülen 22 hasta, kombine immün yetmezlik düşünülen 5 hasta ve aile bireyleri dahil edilmiştir. Hastalar ağır kombine immün yetmezlik tanısı olsa da hiç birinde hastalığa neden olan moleküler defekt bilinmemektedir. Toplam 15 erkek ve 12 kız hasta çalışmada yer almıştır. Hastalarda akrabalık oranı % 70'dir (19/27). Hastaların çeşitli klinik ve laboratuvar özellikleri tablo 3.1, tablo 3.2 ve tablo 3.3'te verilmiştir. Bazı hastalarda önceki yıllarda klasik Sanger dizileme yöntemi ile araştırılan genlerin listesi ise tablo 3.4'te verilmiştir. RAG1 geninde hastalığa neden olan mutasyonun gösterildiği bir hasta ise pozitif kontrol olarak çalışmaya alınmıştır.

Hasta ve ebeveynlerine çalışma ile ilgili bilgiler verilmiş ve onam formları alınmıştır. Çalışma için Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan gerekli izin belgesi GO 13/511 kayıt numarası ile alınmıştır.

Tablo 3.1. Çalışmada bulunan, AKİY düşünülen hastaların özellikleri. HKHN Hematopoietik kök hücre nakli.

Hasta No.	Tanı yaşı	Cinsiyet	Akrabalık	Lenfosit fenotipi	HKHN
1	2 ay	E	Var	T- B-	Evet
2	3 ay	E	Var	T- B-	Evet
3	1 ay	K	Var	T- B+	Evet
4	4 ay	E	Yok	T- B-	Hayır
5	6 ay	E	Yok	T- B+	Hayır
6	4 ay	K	Var	T- B+	Evet
7	9 ay	K	Var	T- B+	Hayır
8	7 ay	K	Var	T- B-	Hayır
9	4 ay	K	Yok	T- B-	Hayır
10	5 ay	E	Yok	T- B+	Evet
11	7 ay	E	Var	T- B+	Hayır
12	5 ay	E	Var	T- B+	Evet
13	12 ay	E	Var	T- B-	Evet
14	1 ay	K	Var	T- B-	Evet
15	2 ay	K	Yok	T- B-	Evet
16	2 ay	E	Var	T- B-	Hayır
17	4 ay	E	Var	T- B-	Evet
18	11 ay	K	Var	T- B+	Hayır
19	7 ay	E	Var	T- B+	Evet
20	7 ay	E	Var	T- B+	Evet
21	5 ay	K	Yok	T- B+	Hayır
22	36 ay	K	Yok	T- B+	Hayır

Tablo 3.2. Çalışmada bulunan, AKİY düşünülen hastaların laboratuvar özellikleri.
ALS: Absolü lenfosit sayısı. ME: Maternal engraftman.

Hasta No.	ALS/mm ³	CD3 (%)	CD19 (%)	CD16-56 (%)
1	1000	2	2	77
2	1000	1	2	73
3	2400	0	80	1
4	2600	49 (ME)	1	44
5	2200	4	32	16
6	2100	4	67	4
7	1500	3	75	0
8	2000	29 (ME)	0	64
9	1400	0	0	98
10	990	1	92	1
11	3400	6	92	0
12	1800	5	59	6
13	2100	75 (ME)	14	6
14	510	0	0	81
15	2700	1	0	16
16	1400	0	1	44
17	940	1	0	67
18	910	2	84	0
19	1800	87 (ME)	9	0
20	700	3	61	2
21	800	7	80	4
22	1400	6	40	1

Tablo 3.3. Kombine immün yetmezlik düşünölen hastaların özellikleri. ALS: Absolü lenfosit sayısı (mm3) Lenfosit subsetleri: %

Hasta No	Cinsiyet	Akrabalık	Yaş	ALS	CD3	CD4	CD8	CD16/56	CD19
23	E	Var	8	2100	66	15	40	1	30
24	K	Var	35	1600	54	13	33	9	12
25	K	Var	15	2300	77	36	43	8	8
26	E	Var	15	900	72	15	53	11	11
27	E	Yok	19	900	68	22	42	20	1

Tablo 3.4. Hastalarda daha önce araştırılan genler.

Hasta No.	Araştırılan gen
1	RAG1, RAG2
4	IL2RG, JAK3
5	ADA
6	AK2
11	JAK3
12	IL7R α , CD3 δ , Koronin 1A
18	JAK3
19	IL2RG, JAK3

3.2. Yöntemler

Kan örneklerinin toplanması ve DNA izolasyonu Hacettepe Üniversitesi İhsan Doğramacı Çocuk Hastanesi İmmünoloji Bilim Dalı'nda, diğer işlemler ise "Avusturya, Viyana, CeMM- "Research Center for Molecular Medicine of the Austrian Academy of Sciences" merkezinde araştırmacı Baran Erman tarafından yapılmıştır.

3.2.1. DNA İzolasyonu

Çalışmaya katılan hastalardan, İmmünoloji Bilim Dalı kan alma ünitesinde NaEDTA içeren tam kan tüplerine 1 cc periferik kan alınmıştır. Periferik kandan DNA izolasyonu Qiagen EZ1 kan DNA izolasyon kiti (Qiagen, Hilden, Almanya) kullanılarak robotik çalışma sisteminde (Qiagen, Hilden, Almanya) gerçekleştirilmiştir. Kemik iliği nakli yapılmış, sağlıklı bir hastadan ise DNA izolasyonu bukkal hücrelerden Qiagen EZ1 doku DNA izolasyon kiti kullanılarak yapılmıştır. İzole edilen DNA'ların konsantrasyonları Qubit 2.0 Fluorometre (Invitrogen/Life Technologies) ile ölçülmüştür.

3.2.2. Hedeflenmiş Tüm Ekzom Dizileme

Hastalardan izole edilen DNA'ların dizileme işlemi için 356 geni kapsayan bir panel kullanılmıştır. Panel bugüne kadar tanımlanmış 200'e yakın immün yetmezlik geni ile yine immün sistemi etkileyen mekanizmalarda yer alan toplam 356 geni hedeflemektedir. DNA'nın zenginleştirme işlemi için bu 356 genin primerlerinin yer aldığı "*HaloPlex Target Enrichment System*" (Agilent Technologies Inc.,2013, ABD) kullanılmıştır. Yöntem üretici firmanın hazırladığı D.5, (Mayıs 2013) protokolüne göre çalışılmıştır. Panelde bulunan ve ağır kombine immün yetmezliğe neden olan, daha önce tanımlanmış genlerin listesi tablo 3.4'de verilmiştir. HaloPlex panelinin çalışma prensibi genomik DNA'nın enzimatik kesimi, indeks primerlerin DNA'ya hibridizasyonu, hedef problemlerin yakalanması ve PCR amplifikasyonuna dayanmaktadır. (Şekil 3.1)

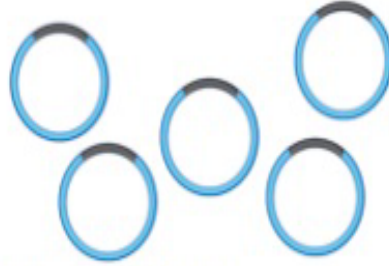
Genomik DNA'nın parçalanması



DNA parçalarının HaloPlex problemleriyle hibridizasyonu



Biotin bağlı DNA-HaloPlex hibridlerinin streptavidin kaplı manyetik boncuklarla yakalanması



Dizileme işlemi için amplifikasyon



(Agilent Technologies Inc. Mayıs 2013 D.5 protokolünden değiştirilerek alınmıştır.)

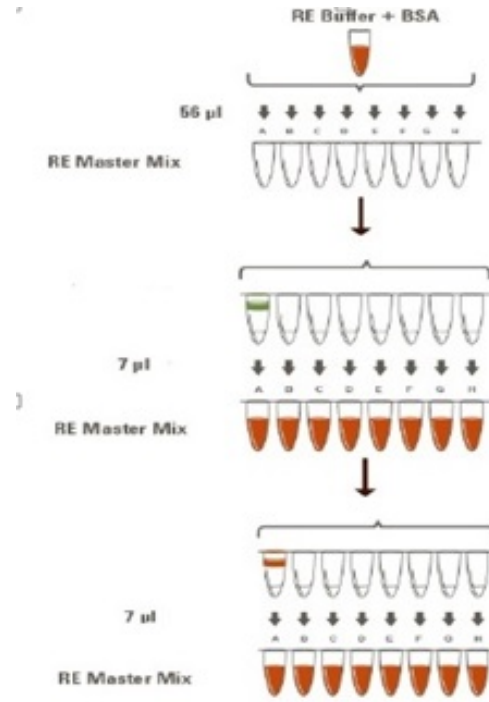
Şekil 3.1. HaloPlex çalışma prensibi

Tablo 3.5. HaloPlex panelinde bulunan kombine ve ağır kombine immün yetmezlik genleri.

IL2RG	JAK3	IL7R α	PTPRC	CD3 δ	CD3 ϵ
CD3 ζ	CORO1A	RAG1	RAG2	Artemis	PRKDC
AK2	ADA	CD40	CD3G	CD8A	ZAP70
TAP1	TAP2	TAPBP	RFX5	RFXAP	RFXANK
ITK	RMRP	MAGT1	DOCK8	RHOH	STK4
TRAC	LCK	MALT1	IL21R	IL21	UNC119
CARD11	OX40	IKBKB	PIK3CD	LRBA	CD27
DNALIG4	WAS	WIP	NBS1	MRE11	PMS2
RNF168	RMRP	STAT3	TYK2	DKC1	NHP2
NOLA3	RTEL1	TERC	TERT	TINF2	FOXN1
ORAI1	STIM1	STAT5B	IKAROS	TTC7A	CD40L
SH2D1A	DLM1	DNMT3B	2BTB24	MCM4	TBX1
CHDT	SEMA3E	SMARCAL1	TCN2	SLC46A1	MTHFD1
SPINK5	SP110	POLE1			

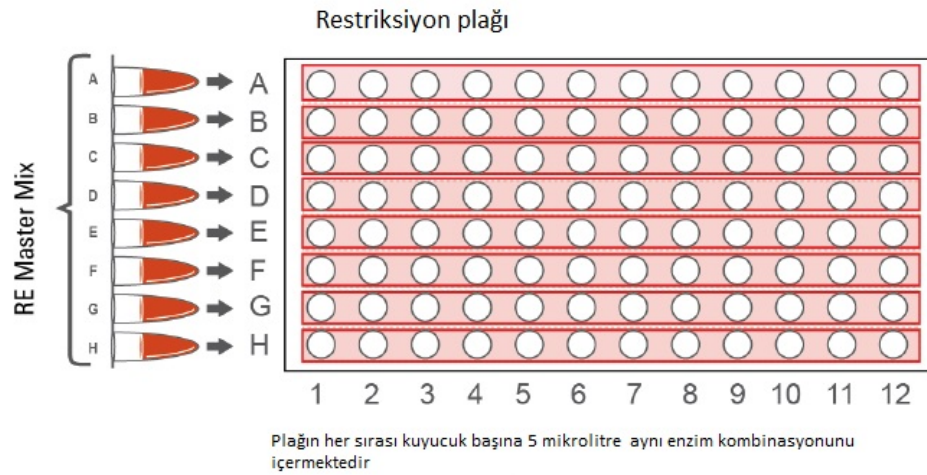
Genomik DNA'nın Enzimatik Parçalanması

Hastalardan izole edilen DNA örneklerinin her birinin konsantrasyonu 200+25 ng, toplam 225 ng olacak şekilde hazırlandı. Enzimatik kesim işlemi 12 örneğin bir arada yer alacağı 96 kuyucuklu plaklarda yapıldı. Metinde verilen şekiller ve protokol 12 örneğin yer aldığı işleme göre verilmiştir (şekil 3.2 ve 3.3). Her bir plak için 11 adet hasta örneği ile bir adet HaloPlex kitinde yer alan amplifiye edilmiş kontrol DNA örneği kullanıldı. Her bir örnek için 0.2 ml PCR tüpleri hazırlanarak tüplere 5 μ l DNA eklendi. Tüplerdeki örnekler 45 μ l nükleazlardan arındırılmış dH₂O ile dilüe edildi.



(Agilent Technologies Inc. Mayıs 2013 D.5 protokolünden değiştirilerek alınmıştır.)

Şekil 3.2. Enzimlerin hazırlanması

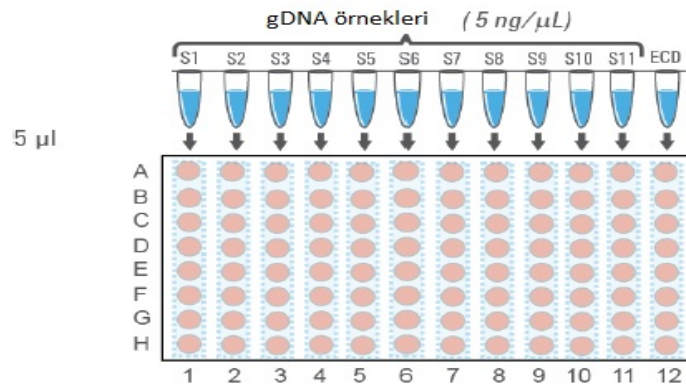


(Agilent Technologies Inc. Mayıs 2013 D.5 protokolünden değiştirilerek alınmıştır.)

Şekil 3.3. Enzim kesimi için plağın hazırlanması

DNA Kütüphanesinin Oluşturulması

Genomik DNA kütüphanesinin hazırlanması için 2 farklı restriksiyon enzimi kullanıldı ve her bir enzim için 8 farklı reaksiyonla kesim işlemi yapıldı. Restriksiyon enzimlerini içeren karışımın hazırlanması için 476 µl RE (restriction enzyme) buffer ve 11.9 µl BSA solusyonu karıştırılarak 1.5 ml' lik tüpe 12 örnek için toplam 56 µl RE buffer/ BSA karışımı kondu. İki farklı enzim için, her bir enzimden yine 12 örneğe yetecek şekilde toplam 7 µl enzim RE buffer/BSA karışımına eklendi (Şekil 3.4). 96 kuyucuklu plaklara 16 farklı kesim reaksiyonu için 2 farklı enzimle hazırlanan karışım, her bir kuyucuğa 5 µl miktarda yatay sırada (8*12), her bir plak sütununda 16 reaksiyon olacak şekilde eklendi (Şekil 2.3.4). Son olarak plaklara, hazırladığımız 12 DNA örneğinden 5 µl (son konsantrasyon 5 ng/ µl) eklenerek, plaklar plastik filmlerle kapatıldı. Enzim reaksiyonlarının karışması için plaklar kısa süre vortekslendi. Hazırlanan plaklar termal *cycler*' a şu programda yerleştirildi: 37 °C'de 30 dakika, 8 °C'de 10 dakika.



(Agilent Technologies Inc. Mayıs 2013 D.5 protokolünden değiştirilerek alınmıştır.)

Şekil 3.4. Enzim kesimi DNA örneklerinin plağa eklenmesi

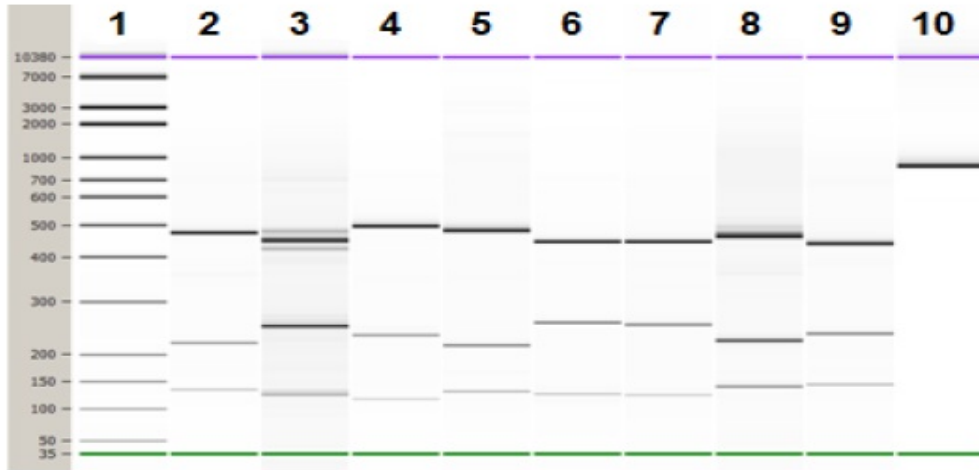
Enzimatik Kesim İşleminin Doğrulanması

Hasta DNA örneklerinin enzimatik parçalanma işleminin kontrolü 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies Inc., ABD) sistemi ve yüksek hassasiyete sahip

Agilent DNA kitleri-p/n 5067-4626 kullanıldı. Doğrulama işlemi 2100 Expert Software (Agilent Technologies Inc., ABD) B.02.07 ile yapıldı.

İşlemin ilk basamağı yüksek hassasiyete sahip DNA kitinde bulunan DNA çip içine örneklerin yerleştirilmesidir. İlk olarak çipte işaretlenmiş kuyucuğa DNA bantlarının görülmesini sağlayan gel-dye karışımından 9 µl eklendi. Çipe özel olarak hazırlanmış bir piston yardımıyla boyanın jele yayılması beklendikten sonra şekilde görülen kuyucuklara yine 9'ar µl gel-dye eklendi. Kalan kuyucuklara 5 µl DNA markır eklenerek çip, örneklerin yüklenmesine hazır hale getirildi. Hasta DNA örnekleri ve DNA ladder her kuyucuğa 1 µl olacak şekilde pipetlendi. Daha sonra hazırladığımız çip 60 saniye, 2000 rpm'de vortekslendi ve 2100 Bioanalyzer sisteminde analiz edildi.

Analizler için kullandığımız DNA kiti enzimatik kesime uğramamış, 800 bp büyüklüğünde bir PCR ürününe sahiptir. Kontrol basamağı için, elde edilen görüntüde bu kontrol DNA ürününün jel üzerindeki yerini görmemiz gerekmektedir. Enzimatik parçalanmaya uğrayan hasta örneklerinin ise 125, 225 ve 450 bp büyüklüğünde baskın bantlar vermesi beklenmektedir. Bu örneklerde 100-2500 bp büyüklüğünde farklı bantlar da görülebilmektedir (Şekil 3.5).



(Agilent Technologies Inc. Mayıs 2013 D.5 protokolünden değiştirilerek alınmıştır.)

Şekil 3.5. Enzim kesim işlemine uğrayan DNA'nın görüntüsü

DNA Parçalarının HaloPlex Problara Hibridizasyonu

Bu aşamada oluşturulan DNA kütüphanesindeki hedef genlerin HaloPlex indeks problara hibridizasyonu gerçekleştirildi. İndeks dizileri içeren proplar DNA parçalarıyla birleşerek dairesel bir hibrid yapısı oluşturmaktadır (BKZ. Şekil 3.1).

İlk basamakta hibridizasyon solusyonu (*hybridization master mix*) protokole göre hazırlandı (50 µl hibridizasyon solusyonu + 20 µl HaloPlex prob). 12 örnek için hazırladığımız 12 adet 0.2 ml PCR tüpleri içerisine hazırlanan karışımdan 70 µl ve hedef genlerin primerlerini içeren "indexing primer cassette"lerden 10 µl eklendi. Bir önceki basamakta enzimatik parçalanmaya uğrayan hasta DNA örnekleri de tüplere eklenerek kısa süre vortekslendi. Hibridizasyon reaksiyon tüpleri termal *cycler*'a yerleştirildi ve belirtilen program uygulandı: 95 °C'de 10 dakika, 54 °C'de 3 saat.

Hedef DNA'nın Yakalanması

Bu aşamada dairesel yapıdaki DNA-HaloPlex prob hibridlerinin (bu hibrid yapılar biotin içermektedir) streptavidin boncuklarla yakalanması gerçekleştirilmiştir.

Bu işlemin gerçekleştirilebilmesi için 1.5 ml'lik tüplerin yerleştirileceği manyetik bir platforma ihtiyaç duyulmaktadır. İlk aşamada HaloPlex manyetik boncukları içeren solusyondan her tüpe 40 µl eklendi. Tüpler manyetik platforma yerleştirildi ve 5 dakika bekletilerek boncukların mıknatıs yüzeyine bağlanması (tüpün içerisindeki boncukların platformda bulunan mıknatısa doğru hareketi) gözlemlendi. Manyetik boncuklar tüpün bir yüzeyinde toplandıktan sonra süpernatant bir pipet yardımıyla temizlendi. Tüplere 40 µl yakalama (capture) solusyonu eklendi ve bu karışım hibridizasyon reaksiyonlarının bulunduğu örneklerle karıştırıldı. Tüm örnekler 80 µl'ye ayarlanmış otomatik pipet ile 15 kez karıştırıldı ve oda ısısında 15 dakika inkübasyona bırakıldı. Tüpler kısaca santrifüj edildikten sonra manyetik platforma yerleştirildi. Tüplerin içerisindeki solüsyonun temizlendiği gözlemlendikten sonra süpernatant 200 µl'lik otomatik pipet ile alındı. Tüplerde kalan boncuklar/hibrid örnekler karışımı 100 µl yıkama solüsyonu eklenerek, 80 µl'ye

ayarlanmış otomatik pipet ile resüspande edildi. Tüpler thermal cycler'da 10 dakika 46 °C'de inkübe edildi. İnkübasyondan sonra tüpler tekrar manyetik platforma yerleştirildi ve boncukların manyetik alana doğru toplanmasından sonra süpernatant temizlendi. Sonuç olarak streptavidin içeren boncukların biotin kaplı problara bağlanması gerçekleştirildi.

Yakalanan Dairesel DNA Parçalarının Bağlanması

Bu aşamada DNA-HaloPlex prob hibridlerinin açık uçlarının DNA ligaz eklenerek bağlanması gerçekleştirilmiştir.

İlk olarak 47.5 µl ligasyon solüsyonu 2.5 µl DNA ligaz ile karıştırılarak bağlanma karışımı (*DNA ligation master mix*) hazırlandı. Hazırlanan karışımdan her bir reaksiyon tüpüne 50 µl eklendi. Tüpler 40 µl'ye ayarlanmış otomatik pipet ile 15 kez resüspande edildi ve termal cycler'da 55 °C'de, 10 dakika inkübe edildi.

NaOH İle DNA'nın Ayrıştırılması

Bu aşamada DNA parçalarının manyetik boncuklardan ayrılması gerçekleştirildi.

Reaksiyon tüpleri manyetik platforma yerleştirilerek, tüpün içerisindeki solüsyon temiz olana kadar 30 saniye bekletildi ve 50 µl'ye ayarlanmış otomatik pipet ile süpernatant temizlendi. Tüpler manyetik platformdan kaldırıldı ve 100 µl, üretici firma tarafından sağlanan SSC buffer (Agilent Technologies Inc., ABD) eklendi. 80 µl'ye ayarlanmış otomatik pipet ile resüspande edildikten sonra tüpler tekrar manyetik platforma yerleştirildi. Solüsyonun berraklaşması gözlemlendikten sonra SSC buffer 120 µl'ye ayarlanmış otomatik pipet ile temizlendi. Her tüpe 25 µl 50 mM NaOH eklendi ve 15 µl'ye ayarlanmış otomatik pipet ile resüspande edildi. Örnekler oda ısısında 1 dakika bekletilerek DNA'nın ayrılması sağlandı.

DNA Kütüphanesinin Amplifikasyonu

Bu aşamada hedeflenen ve HaloPlex problemler tarafından yakalanan DNA parçalarının amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir.

Amplifikasyon için hazırladığımız PCR karışımının (*PCR master mix*) içeriği tablo 3.6'da verilmiştir.

Tablo 3.6. Hazırlanan PCR karışımının içeriği.

Kullanılan Reaktif Madde	12 reaksiyon için gerekli miktar
Nükleazlardan arındırılmış dH ₂ O	209.3 µl
5X Herculase II Reaction Buffer	130 µl
dNTPs	5.2 µl
Primer 1	13 µl
Primer 2	13 µl
2 M asetik asit	6.5 µl
Herculase II Fusion DNA Polymerase	13 µl

Hazırlanan karışım 12 ade 0.2 ml'lik PCR tüplerine 30'ar µl dağıtılarak, tüplere DNA örneklerinden 20 µl eklendi. Tüpler termal *cycler*'a yerleştirilerek belirtilen programda, 30 döngü olacak şekilde amplifikasyon yapıldı: 98 °C'de 2 dakika, 98 °C'de 30 saniye, 60 °C'de 30 saniye, 72 °C'de 1 dakika, 72 °C'de 10 dakika.

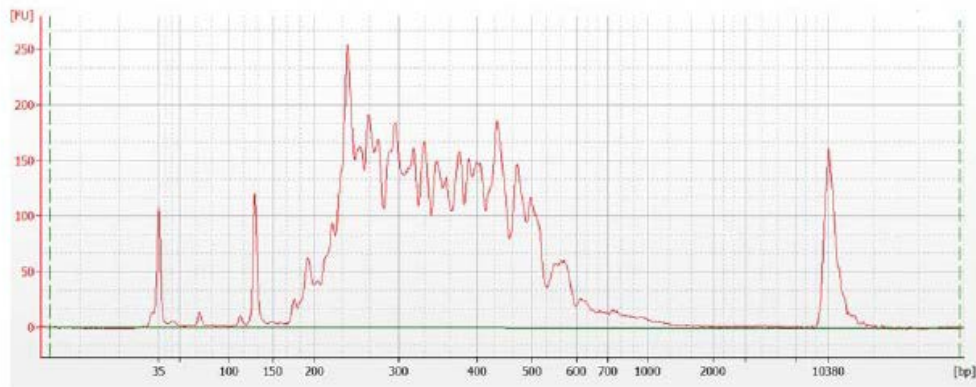
Amplifiye Edilen Kütüphanenin Pürifikasyonu

Pürifikasyon için AMPure XP (Beckman Coulter, Inc. ABD) kiti kullanıldı. İlk aşamada amplifiye edilen örneklerden 40 µl örnek yeni PCR tüplerine aktarıldı. Her bir tüpe 40 µl nükleazlardan arındırılmış dH₂O ve 100 µl AMPure XP boncuklarından oluşan karışım eklenerek tüpler vortekslendi. Örnekler oda ısısında 5 dakika karıştırılarak inkübe edildi ve inkübasyonu takiben, tüpler manyetik platforma yerleştirildi. Tüplerin içindeki solüsyonun berraklaşması gözlemlendikten sonra 180 µl'ye ayarlanmış otomatik pipet ile süpernatant atıldı ve 200 µl % 70'lik etanol eklendi. Etanol ile yıkama işlemi 2 kez tekrar edildi ve tüpler manyetik platformdan kaldırıldı. Her tüpe 40 µl 10 nM Tris-asetat solüsyonu eklendi ve 30 µl'ye ayarlanmış otomatik pipet ile resüspand edildi. Oda ısısında 2 dakika bekletilerek DNA'nın boncuklardan ayrılması sağlandı. Son olarak tüpler tekrar manyetik platforma

yerleştirilerek berraklaşmadan sonra yaklaşık 40 olan süpernatant yeni tüplere aktarıldı.

DNA Amplifikasyonunun Doğrulanması

Bu aşamada hedef DNA parçalarının amplifikasyonunun doğrulanması ve ölçümü gerçekleştirilmiştir. İşlem için DNA'nın enzimatik parçalanması basamağında olduğu gibi 2100 Bioanalyser cihazı ve High Sensitivity DNA Assay



(Agilent Technologies Inc., ABD) kit kullanılmıştır ve protokol daha önce anlatıldığı gibi uygulanmıştır.

Şekil 3.6. Illumina dizi motifleri

Amplifiye edilen hedef DNA ve HaloPlex problemlerinden (amplikonlar) oluşan parçalar Şekil 3.6'daki yapıları içermektedir. Amplifikasyon sonunda amplikonların 175-625 bp büyüklüğünde (çoğunluğu 225-525 bp) olması beklenmektedir. Analiz sonucunda ortaya çıkan elektrofenogramların ise Şekil 3.7'de olduğu gibi gözlemlenmesi beklenmektedir. 125-625 bp aralıktaki piklerin büyüklüğü hesaplanarak, toplam amplifiye olmuş DNA miktarı hesaplanabilmektedir (Şekil 3.7).



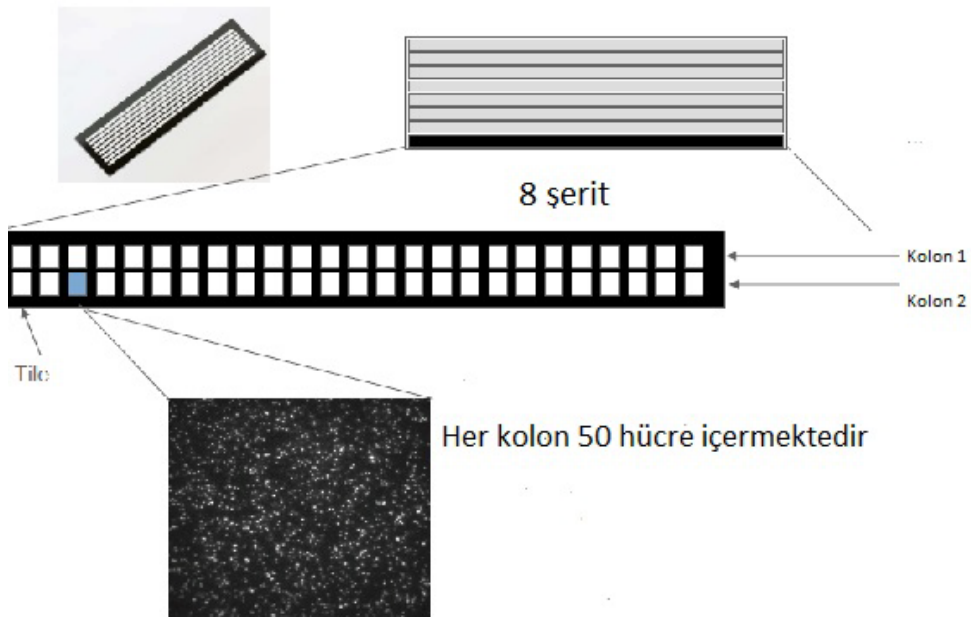
Sarı: PCR primerleri Siyah: Illumina dizi elementleri Kırmızı: Örnek indeksi Mavi: Hedef dizi

(Agilent Technologies Inc. Mayıs 2013 D.5 protokolünden değiştirilerek alınmıştır.)

Şekil 3.7. Amplifiye olmuş DNA örneği

3.2.3. Illumina Sistemi ile Dizileme İşlemleri

Hedeflenen DNA bölgelerinin dizileme işlemi Illumina HiSeq2000 (Illumina Inc., ABD) sistemi kullanılarak yapılmıştır. Illumina sistemleri sentezleyerek dizileme (*SBS-sequencing by synthesis*) teknolojisini kullanarak çalışmaktadır. Bu teknoloji ile kullanılan sistemin çeşidine göre, tek bir okumada 300 kilobazdan, 1 terabaza kadar olan büyüklükte bir veri elde edilebilmektedir. Dizileme işlemleri için “*flow cell*” (Illumina Inc., ABD) adı verilen özel bir aparat kullanılmaktadır. Flow cell DNA parçalarının bağlandığı adaptör oligonükleotid dizilerinin olduğu, silika yapıda 8 şerite sahiptir. Her şeritte 2 kolon ve 50 hücre bulunmaktadır (Şekil 3.8). Dizileme işleminin büyüklüğüne göre kullanılacak hücre ve şerit sayısı seçilebilmektedir. Dizileme işleminin ilk basamağı ise DNA örneklerinin kümeleştirilmesidir.



(Illumina Temmuz 2012, HiSeq 2000 protokolünden değiştirilerek alınmıştır.)

Şekil 3.8. “Flow cell”in görünümü

DNA Parçalarının Kümeleştirilmesi (*DNA clustering*)

Dizileme işleminin HiSeq2000 sisteminde yapılmasından önce, sahip olduğumuz DNA kütüphanesinin çeşitli adaptörlere bağlanarak kümeleştirilmesi

daha verimli bir okuma elde etmemize olanak tanımaktadır. Kümeleştirme işlemi Illumina firmasının cBot cihazı (Illumina Inc., ABD) ile yapılmıştır. cBot geliştirilmiş otomatik bir klonal amplifikasyon sistemidir. Amaç, sahip olduğumuz DNA kütüphanesindeki parçaların *flow cell* aparatının yüzeyinde bulunan oligonükleotidlere hibridizasyonunun sağlanmasıdır. Reaksiyonlar için firma tarafından sağlanan TruSeq PE-401-3001 kiti (Illumina Inc., ABD) kullanılmıştır.

Kümeleştirme reaksiyonlarının ilk aşaması DNA parçalarının adaptör dizilere sabitlenmesidir. Bu parçalar izotermal köprü amplifikasyon reaksiyonlarıyla çoğaltılmaktadırlar. Yüzeğe bağlanan DNA'lar en yakındaki adaptör dizilere bağlanarak bir "*loop*" yapısı oluştururlar. Yüksek duyarlı DNA polimeraz bu parçaları oligonükleotidlerden başlayarak kopyalamakta ve çift sarmal yapıda DNA köprüleri oluşturmaktadır. Oluşan bu çift sarmal köprü yapısı denatüre edilerek 2 adet tek sarmal DNA oluşturulur. 2 adet DNA tekrar "*loop*" yapısı oluşturmakta ve reaksiyon bu şekilde çoğalarak devam etmektedir. Amplifikasyon aşamasından sonra çoğalan milyonlarca sayıda çift sarmal DNA köprüleri denatüre edilerek, ters sarmal, enzimatik kesim ile ayrılmaktadır. 5' ucu *flow cell* yüzeyine bağlı tek sarmal DNA parçasının diğer ucunda (bağlı olmayan serbest uç) bulunan adaptör dizilere ise sekans primerleri bağlanarak, hedef kütüphane dizileme işlemine hazır hale getirilmektedir (Şekil 3.9)



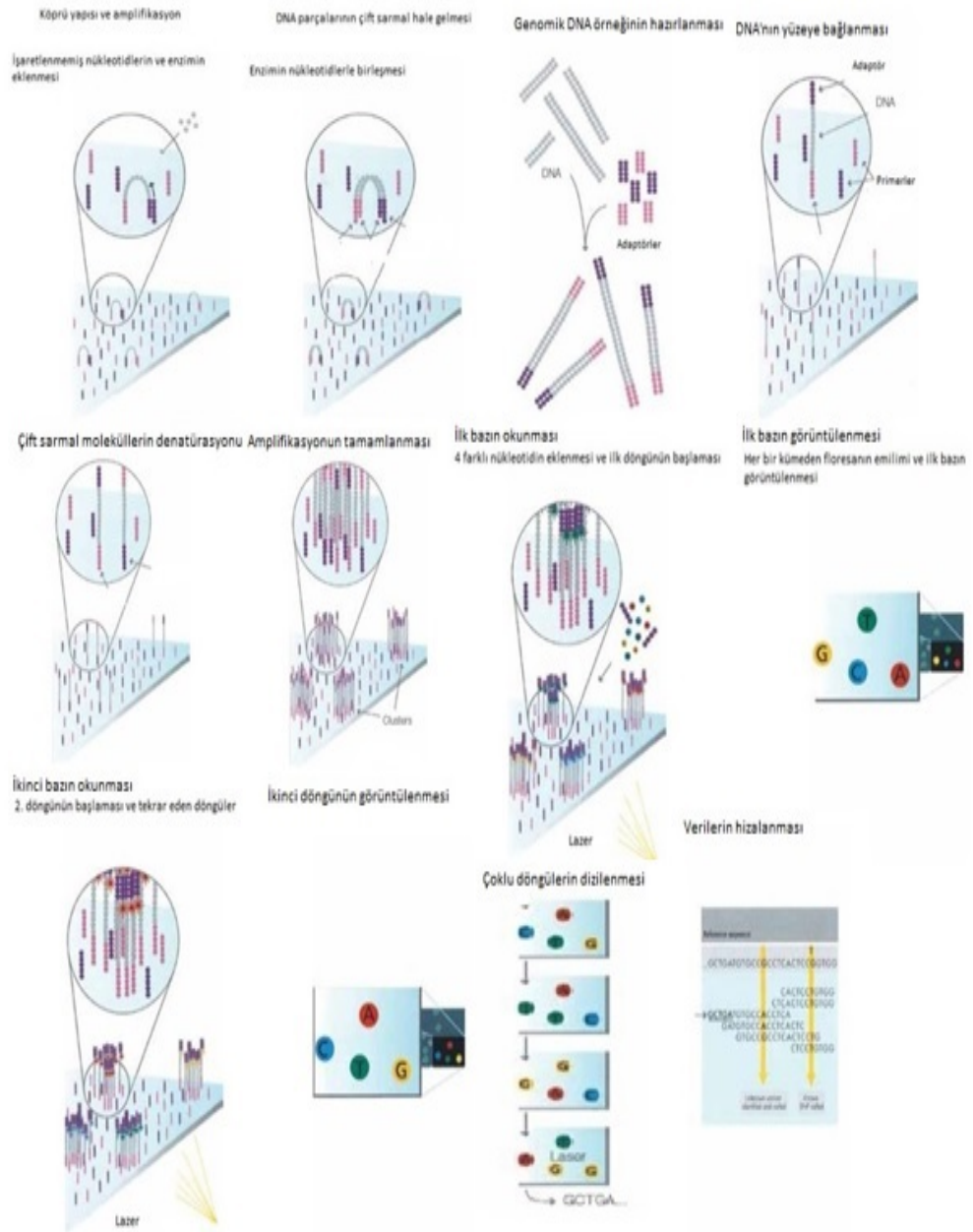
(Illumina Temmuz 2012, HiSeq 2000 protokolünden değiştirilerek alınmıştır.)

Şekil 3.9. DNA'nın kümeleştirilmesi

Dizileme

Illumina sistemleri sentezleyerek dizileme (*SBS-sequencing by synthesis*) teknolojisini kullanmaktadır. Kümeleştirilip çoğaltılan DNA parçaları her bir okuma siklusunda bir bazın saptanmasıyla okunmaktadır. Sistem toplam 101 siklus yaparak iki yönlü okuma (*forward* ve *reverse*) gerçekleştirmektedir. Dizileme işlemleri için floresan boyalarla işaretlenmiş 4 nükleotid kullanılmaktadır. Her bir okuma siklusunda floresan işaretli bir deoksiniükleozit trifosfat (dNTP) nükleik asit zincirine bağlanmakta ve bu polimerizasyonun sonlandırılmasını sağlamaktadır. Böylece her bir dNTP'nin bağlanması sonucu tek bir bazın görüntülenmesi gerçekleştirilmiş olur.

Reaksiyonlar ve ilk döngü işaretli 4 bazın, primerlerin ve DNA polimerazın eklenmesi ile başlamaktadır. Lazer kaynağından gelen ilk uyarımdan sonra floresan boyanın emisyonu ile ilk bazın saptanması gerçekleştirilir ve ikinci döngü ilkinde olduğu gibi tekrar eder. İkinci bazın görüntülenmesinden sonra dizileme döngüleri DNA parçalarındaki bazların görüntülenmesi için devam etmektedir. Her bir döngüde bir bazın okunması sağlanmaktadır (Şekil 3.10). Dizileme sonucu elde edilen veriler imaj dosyalarıdır. Siklusların DNA parçalarının büyüklüğüne göre gerçekleştirilip sonlanmasından sonra, bir noktadan elde edilen görüntüler birleştirilerek hedef bölgenin nükleotid dizisi saptanmış olur. Okuma işlemi hem düz hem de ters yönde iki defa gerçekleştirilerek daha doğru ve kuvvetli sonuçlar alınması sağlanmaktadır. HiSeq 2000 sistemi okumaları HiSeq Control Software (HCS), (Illumina Inc., ABD) 1.4.8 ve Real Time Analysis Software (RTA) 1.12.4.2., (Illumina Inc., ABD) yazılımlarını kullanarak yapmaktadır. Dizileme için yapılan bütün işlemler Illumina firması tarafından hazırlanan Temmuz 2012 tarihli "*HiSeq 2000*" protokolüne göre uygulanmıştır.



(Illumina Temmuz 2012, HiSeq 2000 protokolünden değiştirilerek alınmıştır.)

Şekil 3.10. HiSeq sistemi ile dizileme işlemi

3.2.4. Verilerin Analizi

Dizileme işlemi sonucu elde edilen veriler imaj dosyası (tiff) olarak kayıt edilmektedir. Bu verilerin analizleri için ticari olarak kullanıma sunulan çeşitli programlar kullanılmıştır. Bu programlar hem nükleotid dizilerinin bir araya

getirilmesi hem de filtreleme işlemleri için kullanılmıştır. Sonuçta her bir hasta için elde kalan veriler hastaların klinik durumlarına göre değerlendirilmiştir. Bu değerlendirme sonucunda hastalığa neden olabilecek aday genler belirlenmiş ve klasik Sanger dizileme ile mutasyonların taraması yapılmıştır.

Burrows-Wheeler Aligner Yazılımı

Burrows-Wheeler Aligner yazılımı elde edilen farklı boyutlardaki verilerin, daha geniş boyutlu bir referans dizisine göre haritalanmasını sağlayan bir programdır. Çalışma sonucu elde edilen veriler bu yazılım kullanılarak 2009 yılında güncellenen insan genom 19 (hg19) dizisine göre hizalanmıştır.

GATK (*The Genome Analysis Toolkit*) (Broad Institute 2015)

Elde edilen veriler ilk aşamada insan genom dizisine hizalanmasına rağmen her bir hastanın genomunda bulunan insersiyon ve delesyonlar (*indels*) nedeniyle hizalamada çeşitli sorunlar ortaya çıkabilmektedir. GATK yazılımı kısmi yeniden hizalama ve nükleotidlerin yeniden kalibrasyonunu sağlayan bir programdır. Kişinin genomunda bulunan insersiyon ve delesyonlar bir çok bazın referans genoma göre yanlış hizalanmasıyla sonuçlanabilmektedir. Bu hizalama hataları tek nükleotid varyantlar (SNP) olarak değerlendirilebilmektedir. Çalışmamızda bu hataları düzeltmek ve yeniden hizalamayı sağlamak amacıyla GATK programı kullanılmıştır.

SnPEff Yazılımı

SnPEff 2012 yılında Pablo Cingolani ve arkadaşları tarafından geliştirilmiş bir yazılımdır (57). Genomda bulunan varyantların etkilerini kategorize etmek için kullanılmaktadır. Bir genom dizilendiği zaman, SnPEff, varyantların anotasyonlarını genomik lokasyonlarına göre yapmakta ve kodlama etkilerini ortaya çıkarmaya çalışmaktadır. Annotate edilen genomik lokasyonlar intronik, UTR, "*upstream*", "*downstream*", "*splice site*", ya da ekzonik bölgelerdir. Bu varyantların kodlama etkileri ise "*synonymous*", "*non-synonymous*", amino asit değişikliği, stop kodon

oluşumu ya da kaybı, veya çerçeve kayması etkileridir. Çalışmamızda bu etkilerin anotasyonları için SnpEff yazılımı kullanılmıştır.

Analiz Edilen Verilerin Hastaların Klinik Durumlarına Göre Filtrelenmesi

SnpEff yazılımı ile annotate edilen veriler her bir hasta için yaklaşık olarak 500-1000 varyant olacak şekilde sonuçlanmıştır. Bu sonuçlardan daha önce tanımlanan SNV'ler MAF (*minor allele frequency*) değerlerine göre filtrelendi. Filtreleme sonucunda yalnızca minör frekansları %5'in altında olan varyantlar değerlendirildi. Bu varyantlar içinde hastanın klinik durumuna göre sorumlu olabilecek aday genler belirlenerek klasik dizileme yöntemiyle değerlendirildi.

3.2.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Ve Sanger Dizileme

Çalışmada elde edilen veriler analiz edildiğinde hastalığa neden olabilecek varyantlar belirlenmiş ve klasik kapiller dizileme yöntemiyle doğrulamaları yapılmıştır.

PCR Protokolü

Reaksiyon için:

Hazırlanan 0.2 ml'lik PCR tüplerinde 2 µl 10X polimeraz buffer (lifetechnologies, ABD), 2 µl dNTP (lifetechnologies, ABD) karışımı, 1 µl DMSO (Sigma-Aldrich, Almanya), 10-20 ng DNA, 0.1 µl Taq polimeraz (lifetechnologies, ABD), 18 µl nükleazlardan arındırılmış dH₂O ve 1 µl ters ve düz primer ile reaksiyon hazırlandı. Elde edilen ürünler yüzde 1.5 agaroz jele 2 µl olacak şekilde yüklendi ve amplifiye olmuş DNA parçalarının büyüklükleri, kullanılan "ladder" DNA parçalarıyla karşılaştırıldı.

PCR Pürifikasyonu

PCR ürünlerinin pürifikasyonu Qiagen MinElute 96 UF (Qiagen, Almanya) plakları kullanılarak yapıldı. PCR ürünlerinin bulunduğu her tüpe 50 µl HPLC H₂O (Sigma-Aldrich, Almanya) eklendi. Tüplerdeki sulandırılmış ürünler pürifikasyon

plağına eklenerek 800 mbar basınçla filtreler kuruyuncaya kadar vakumlandı. 50 µl HPLC H₂O ile yıkama yapılarak vakum işlemi tekrarlandı. Kuyucuklardaki filtrelerde kalan, pürifiye edilmiş DNA'ların ayrılması için her kuyucuğa 20 µl, 5nM Tris eklendi ve plak orta hızda 10 dakika vortekslendi. Elde edilen ürünler dizileme işlemi için PCR plaklarına transfer edildi.

Sanger Dizileme

Dizileme işlemi DNA'nın lineer amplifikasyonunu takiben, çoğaltılan parçaların bir kapiller içine enjekte edilmesiyle gerçekleştirildi (şekil).

Reaksiyon için plaktaki kuyucuklara 7 µl PCR ürünü, 1.5 µl dH₂O, 0.5 µl BigDye v3.1 (lifetechnologies, ABD) ve 1 µl düz ya da ters primer eklendi (reaksiyonlar hem düz hem ters primerler ile ayrı ayrı gerçekleştirilmiştir). Hazırlanan karışım kullanılan PCR programı: 96 °C'de 1 dakika, 96 °C'de 10 saniye, 50 °C'de 5 saniye, 60 °C'de 4 dakika (25 döngü).

BigDye Ürünlerinin Pürifikasyonu Ve Dizileme

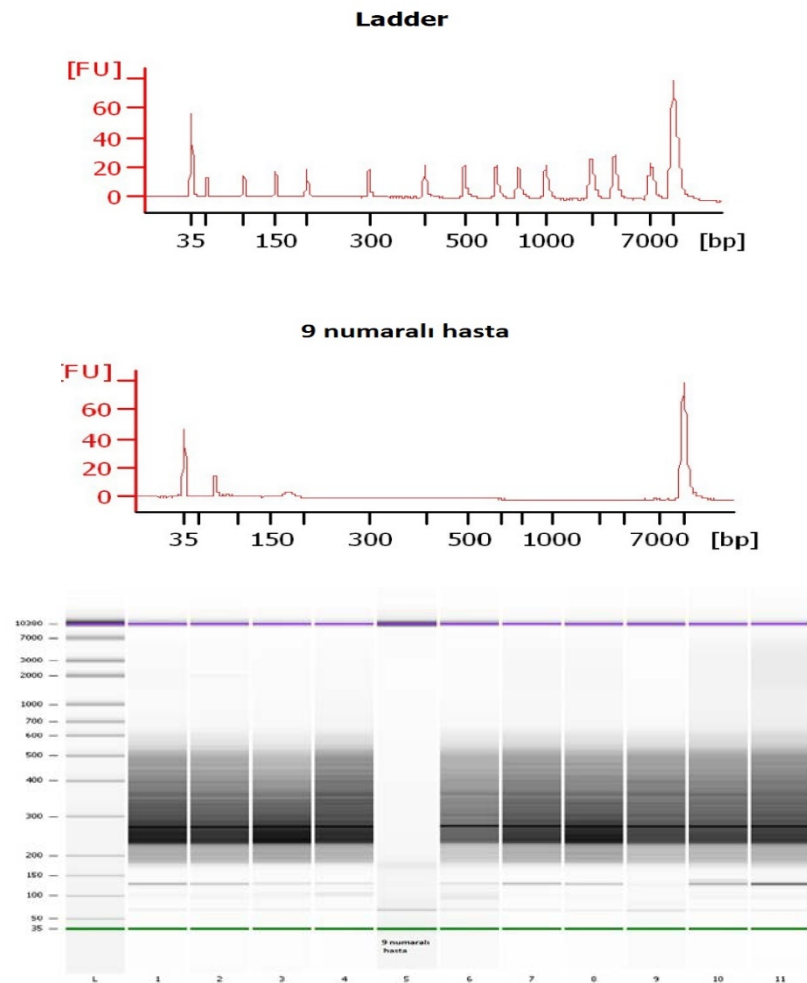
Ürünlerin pürifikasyonu için %6'lık Sephadex G50 (Sigma-Aldrich, Almanya) kullanıldı. İşlemin yapıldığı 96 kuyucuklu, filtreli plaklarda her bir kuyucuğa 250 µl Sephadex G50 eklendi ve 2300 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Bu işlem 2 kere yapılarak plaklar pürifikasyon için Sephadex G50 ile kaplandı. Kuyucuklara 10 µl HPLC H₂O ile dilüe ettiğimiz ürünler 20 µm olacak şekilde eklendi ve 2000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.

Dizileme işlemi 3130 xl Sequencer (Applied Biosystems, ABD) cihazında yapıldı. Bu cihaz için özel üretilen 96 kuyucuklu plaklarda her bir kuyucuğa 10 µl formamid (FA) eklendi. Bu şekilde hazırlanan kuyucuklara pürifiye ettiğimiz ürünlerden 2 µl eklendi. Plak septa ile kapatılarak 1000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Örnekler thermal cycler'da 98 °C'de 2 dakika bekletilerek denatüre edildi. Plak 3130 xl cihazına yerleştirilerek dizileme işlemi başlatıldı. İşlem sonunda elde edilen veriler Sequencher 5.1 (GeneCodes Corporation, ABD) programı ile kromatogramlar halinde görüntülenerek analiz edildi.

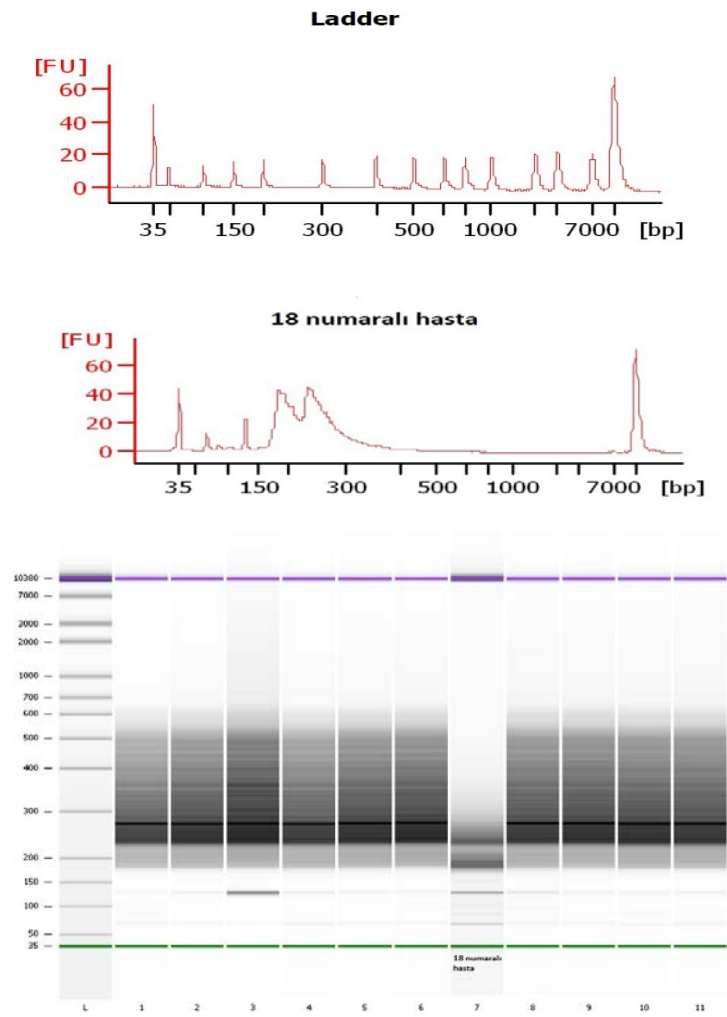
4.BULGULAR

4.1. Enzimatik Kesim İşleminin Doğrulanması

HaloPlex paneli ile hedef genlerin amplifikasyonu için uygulanan protokolün ilk aşaması olan genomik DNA'nın enzimatik kesim işlemi sonuçlarını incelediğimizde 27 hastadan 2 tanesinde parçalanmanın gerektiği gibi olmadığı görülmüştür. 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies Inc. ABD) cihazı ile yapılan analizler sonucunda, 9 ve 18 numaralı hastaların elektroforez görüntülerinde parçalanmanın tam olmadığı ve enzimatik kesim işleminin yeterli oranda gerçekleşmediği anlaşılmıştır (Şekil 4.1 ve 4.2). Diğer 25 hastanın elektroforez görüntüleri ise verilen standart sonuçlar ile uyumlu bulunmuştur.



Şekil 4.1. Dokuz numaralı hastanın enzimatik kesim işlemi sonuçları



Şekil 4.2. On sekiz numaralı hastanın enzimatik kesim işlemi sonuçları

4.2. Amplifikasyonun Doğrulanması Ve Hedef DNA Miktarının Kontrolü

Hedeflenen gen bölgelerinin HaloPlex proplar ile hibridizasyonu ve sonrasında amplifikasyonun doğrulanması işlemleri 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies Inc., ABD) cihazı ile yapılmıştır. Sonuçlar incelendiğinde, enzimatik kesim aşamasında parçalanmanın gerçekleşmediği 2 örnekte beklenildiği gibi amplifikasyonun da olmadığı görülmüştür. 18 numaralı hastada bir miktar amplifiye DNA görülmesine karşın bu miktar protokolde verilen standartlara uymamaktadır. Diğer hasta örneklerinde ise amplifikasyonun standartlara uygun şekilde gerçekleştiği gözlemlenmiştir.

4.3. Hastalığa Neden Olabilecek Varyantların Belirlenmesi

Filtreleme işlemlerinden sonra elde edilen tüm varyantlar bir strateji belirlenerek incelenmiştir. Öncelikle ağır kombine/kombine immün yetmezliğe neden olan genlerde, daha önce tanımlanmış varyantlar, daha sonra ise yine bilinen genlerde bulunan fakat daha önce tanımlanmamış varyantlar incelenmiştir. Bilinen genlerde herhangi bir mutasyonun bulunmadığı hastalarda ise ağır kombine/kombine immün yetmezliğe neden olabilecek genler incelenmiştir. Belirlenen varyantlar eğer hastanın klinik durumunu açıklıyorsa bu değişimlerin doğrulaması kapiller dizileme işlemi ile yapılmıştır. Dizileme işlemleri için varyantın bulunduğu kromozomal pozisyona göre tasarlanan primerler kullanılmıştır. Aşağıda, hastalarda bulunan ve ağır kombine/kombine immün yetmezliğe neden olabilecek varyantlar ve yapılan doğrulama işlemlerinin sonuçları her hasta için ayrıntılı olarak verilmiştir. Hastalarda bulunan ve ağır kombine/kombine immün yetmezliğe neden olabilecek tüm varyantların listesi bölüm sonunda Tablo 4.10'da verilmiştir.

ORA11 geninde bulunan rs72003075 numaralı ve PRKDC geninde bulunan rs11411516 numaralı varyantlar bütün hastalarda aynı şekilde ortaya çıktığından dolayı elimine edilmiştir.

4.3.1. Bir Numaralı Hasta

T- B- ağır kombine immün yetmezlik düşünülen, anne, baba arasında birinci derece akrabalık olan hastada RAG1 geninde daha önce birleşik (*compound*) heterozigot olarak tanımlanmış bir tek nükleotid değişimi homozigot olarak saptanmıştır (Tablo 4.1) (58). Hastanın klinik bulguları RAG1 eksikliği ile uyumlu olup, bulunan varyantın doğrulaması kapiller dizileme yöntemi ile yapılmıştır. Dizileme sonucunda hastada aynı varyantın bulunduğu saptanmıştır (Şekil 4.3). Belirtilen pozisyonda bulunan G>A tek nükleotid değişimi R737H amino asit değişimine neden olmaktadır ve proteinin katalitik çekirdek (*catalytic core*) bölgesini etkilemektedir. Hastanın anne ve babasında aynı varyant heterozigot olarak bulunmuş, ailedeki segregasyon da doğrulanmıştır.

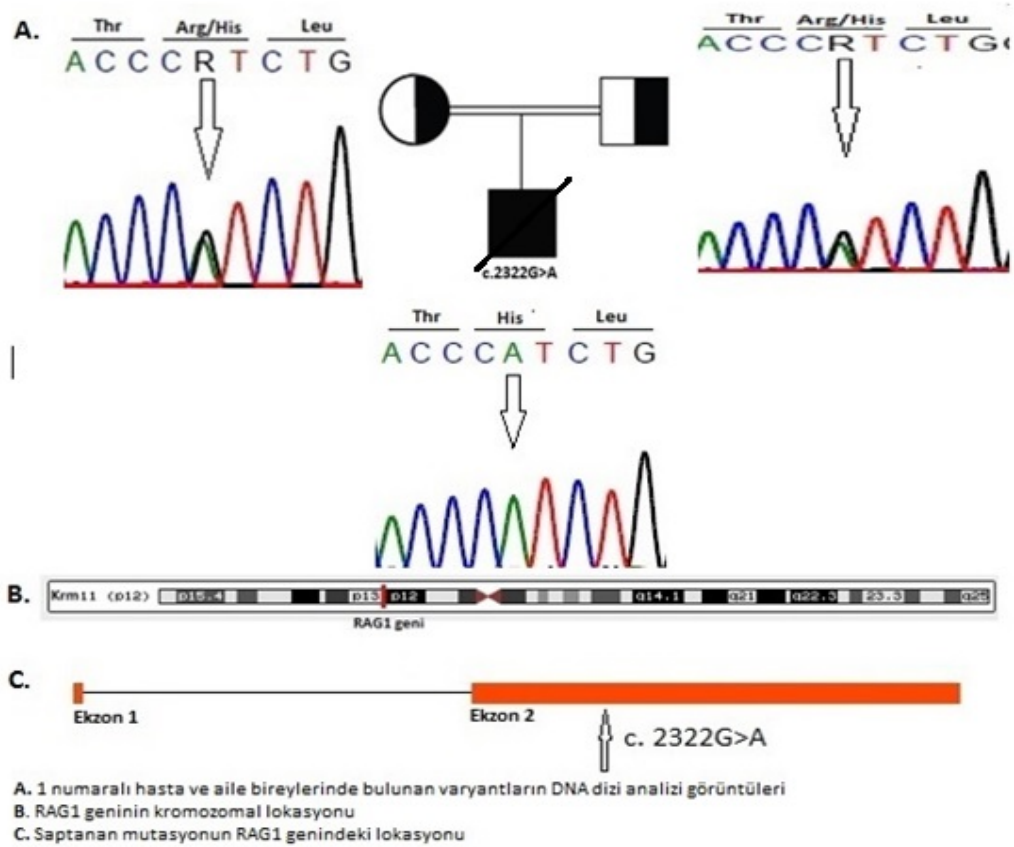
PCR işlemleri için şu primerler kullanılmıştır:

Düz: 5'-3' GCAGATGAGTCTGACCACGA 309bp

Ters: 5'-3' GGAACGCCAGACCTCATAAC 309bp

Tablo 4.1. Bir numaralı hastada bulunan varyant.

Krom. No.	Pozisyon	ID	Ref.	Bulunan	Fonksiyon
11	36597064	rs104894286	G	A	Missense



Şekil 4.3. Bir numaralı hasta ve aile bireylerinde bulunan varyantların DNA dizi analizi görüntüleri ve mutasyonun gendeki lokasyonu

4.3.2. İki Numaralı Hasta

T- B- ağır kombine immün yetmezlik düşünülen, anne, baba arasında birinci derece akrabalık olan hastada RAG1 geninde tek nükleotid değişimi homozigot olarak saptanmıştır (Tablo 4.2). Hastanın klinik bulguları RAG1 eksikliği ile uyumlu olup, bulunan varyantın doğrulaması kapiller dizileme yöntemi ile yapılmıştır. Dizileme sonucunda hastada aynı varyantın bulunduğu saptanmıştır (Şekil 4.4). Belirtilen pozisyonda bulunan G>A tek nükleotid değişimi R716Q amino asit değişimine neden olmaktadır. Mutasyon proteinin katalitik alt ünitesini etkilemektedir. Missense etkisi olan mutasyonun Polyphen ve SIFT tahmin programlarında sonucu, Polyphen için olası zarar verici (probably damaging, skor: 0.999), SIFT için zarar verici olarak bulunmuştur. Hastanın anne ve babasında aynı varyant heterozigot olarak bulunmuş, ailedeki segregasyon da doğrulanmıştır.

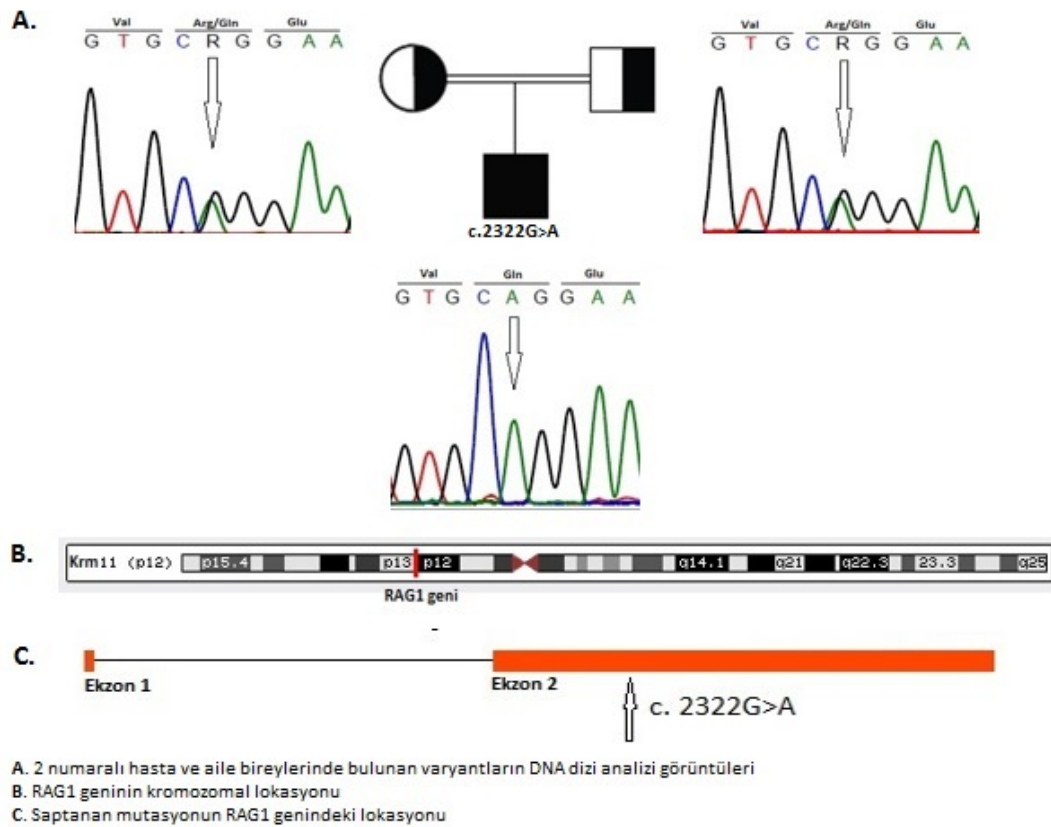
PCR işlemleri için şu primerler kullanılmıştır:

Düz: 5'-3' GCAGATGAGTCTGACCACGA 291 bp

Ters: 5'-3' ACGTTCCAGGTTCTCAGCAT 291 bp

Tablo 4.2. İki numaralı hastada bulunan varyant.

Krom. No.	Pozisyon	ID	Ref.	Bulunan	Fonksiyon
11	36597001	.	G	A	Missense



Şekil 4.4. İki numaralı hasta ve aile bireylerinde bulunan varyantların DNA dizi analizi görüntüleri ve mutasyonun gendeki lokasyonu

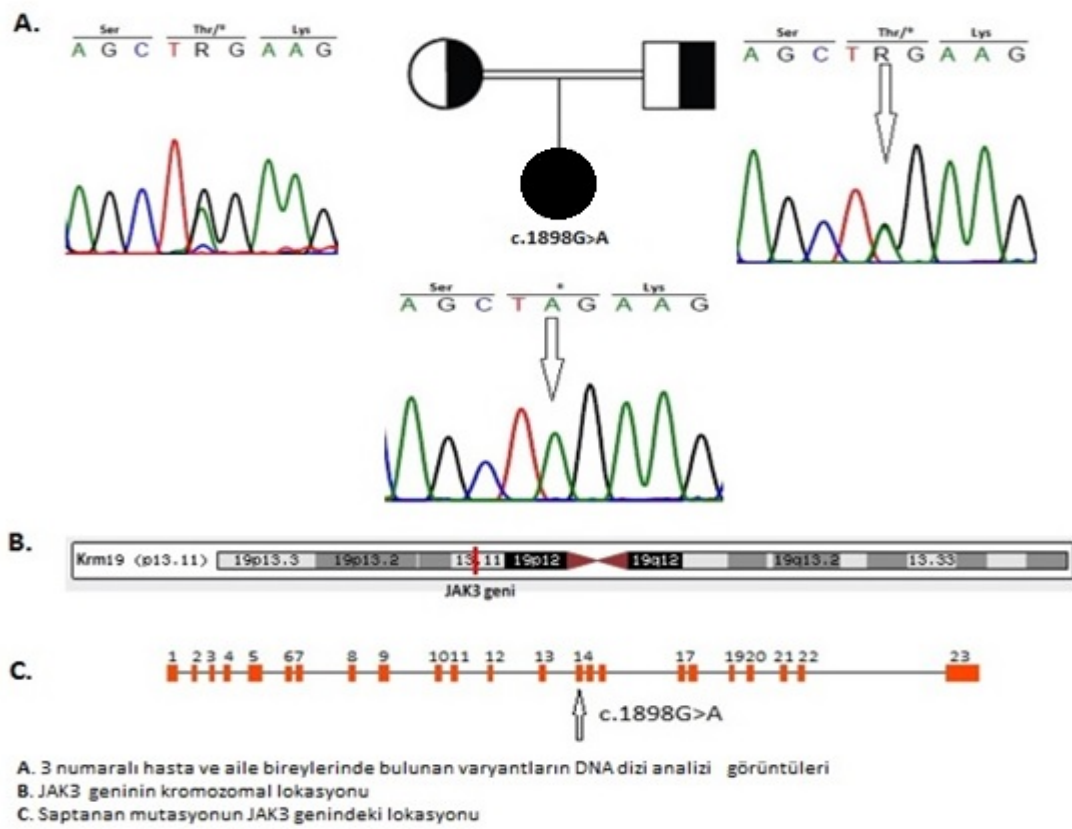
4.3.3. Üç Numaralı Hasta

T- B+ ağır kombine immün yetmezlik düşünülen, anne, baba arasında birinci derece akrabalık olan hastada JAK3 geninde tek nükleotid değişimi homozigot olarak saptanmıştır (Tablo 4.3). Hastanın klinik bulguları JAK3 eksikliği ile uyumlu olup, bulunan varyantın doğrulaması kapiller dizileme yöntemi ile yapılmıştır. Dizileme sonucunda hastada aynı varyantın bulunduğu doğrulanmıştır (Şekil 4.5). Belirtilen pozisyonda bulunan G>A tek nükleotid değişiminin nonsense etkisi olup, 638. amino asitten (W638*) sonra stop kodon oluşmasına neden olmaktadır. Hastanın anne ve babasında aynı varyant heterozigot olarak bulunmuş, ailedeki segregasyon da doğrulanmıştır. Hastaya 1 yaşında hematopietik kök hücre nakli

yapılmış olup şu an sağlıklı şekilde yaşamını sürdürmektedir. DNA izolasyonu bukkal hücrelerden yapılmıştır.

Tablo 4.3. Üç numaralı hastada bulunan varyant.

Krom. No.	Pozisyon	ID	Ref.	Bulunan	Fonksiyon
19	17946779	.	G	A	Nonsense



Şekil 4.5. Üç numaralı hasta ve aile bireylerinde bulunan varyantların DNA dizi analizi görüntüleri ve mutasyonun gendeki lokasyonu

4.3.4. Dört Numaralı Hasta

T- B- ağır kombine immün yetmezlik düşünülen hastada hastalıktan sorumlu olabilecek homozigot bir varyant bulunamamıştır. Anne, baba akrabalığı olmayan hastada RAG1 geninde iki farklı heterozigot varyant saptanmıştır (Tablo 4.4).

Literatürde RAG1 geninde hastalığa neden olan birleşik heterozigotluk daha önce gösterilmiştir (58). Hastada bulunan varyantlardan biri ise daha önce atipik ağır kombine immün yetmezlik tanısı ile izlenen 2 Türk hastada gösterilmiştir (A444W) (59). Her iki varyantın da doğrulaması kapiller dizileme yöntemi ile yapılmıştır. Dizileme sonucunda hastada aynı varyantların bulunduğu doğrulanmıştır (Şekil 4.6 ve şekil 4.7). 36595279 kromozomal pozisyonunda bulunan varyant için Polyphen sonucu zarar verici (damaging, skor:0.998), SIFT sonucu da aynı şekilde zarar verici olarak bulunmuştur. 36596185 kromozomal pozisyonunda bulunan varyant için ise Polyphen sonucu olası zarar verici (probably damaging, skor:1), SIFT sonucu damaging olarak bulunmuştur.

Hastanın anne, baba ve kız kardeşinde de inceleme yapılmış, değişikliğin babadan kalıtıldığı saptanmıştır. Kız kardeşte herhangi bir değişiklik bulunmamıştır.

PCR işlemleri için şu primerler kullanılmıştır:

11. kromozom 36596185

Düz: 5'-3' CCAACATCTTCTGTCGCTGA 327 bp

Ters: 5'-3' GCATGCAAAGGCTGAAAAT 327 bp

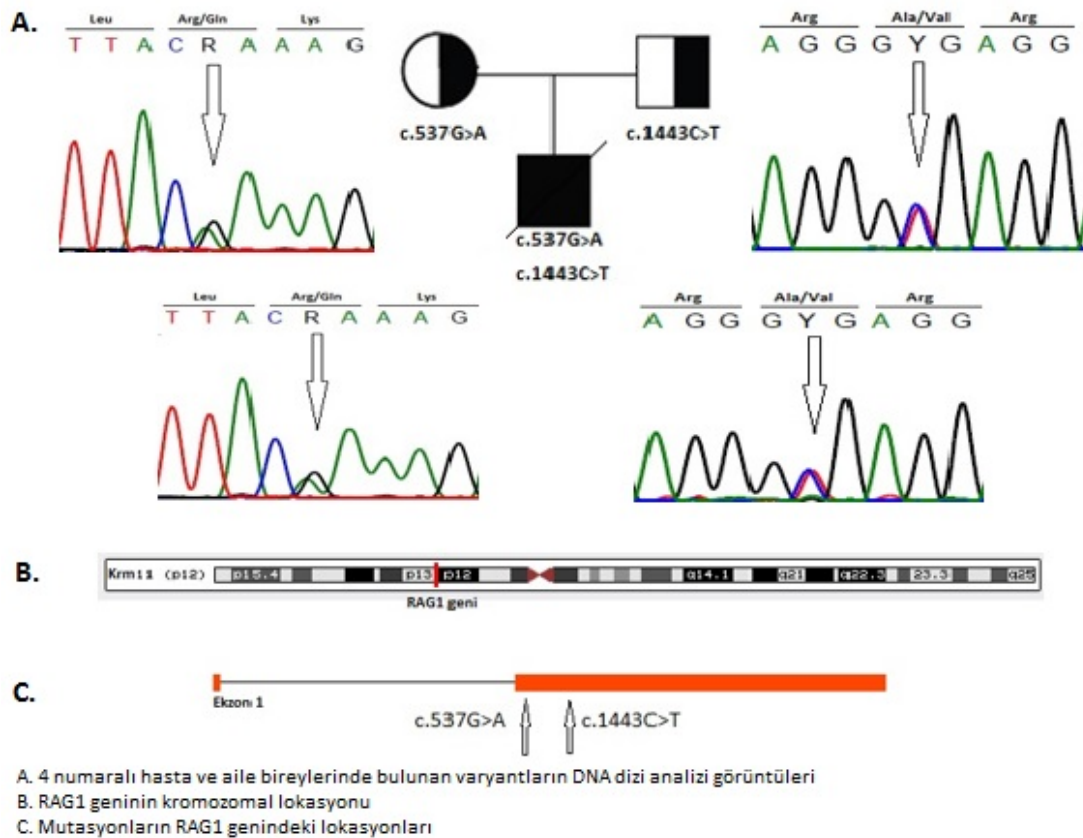
11. kromozom 36595279

Düz: GAGGAACGTGACCATGGAGT 384 bp

Ters: CCCATGACTTTGAGGCATCT 384bp

Tablo 4.4. Dört numaralı hastada bulunan varyantlar.

Krom. No.	Pozisyon	ID	Ref.	Bulunan	Fonksiyon
11	36596185	rs199474685	C	T	Missense
11	36595279	rs372110434	G	A	Missense



Şekil 4.6. Dört numaralı hasta ve aile bireylerinde bulunan varyantların DNA dizi analizi görüntüleri ve mutasyonların gendeki lokasyonları

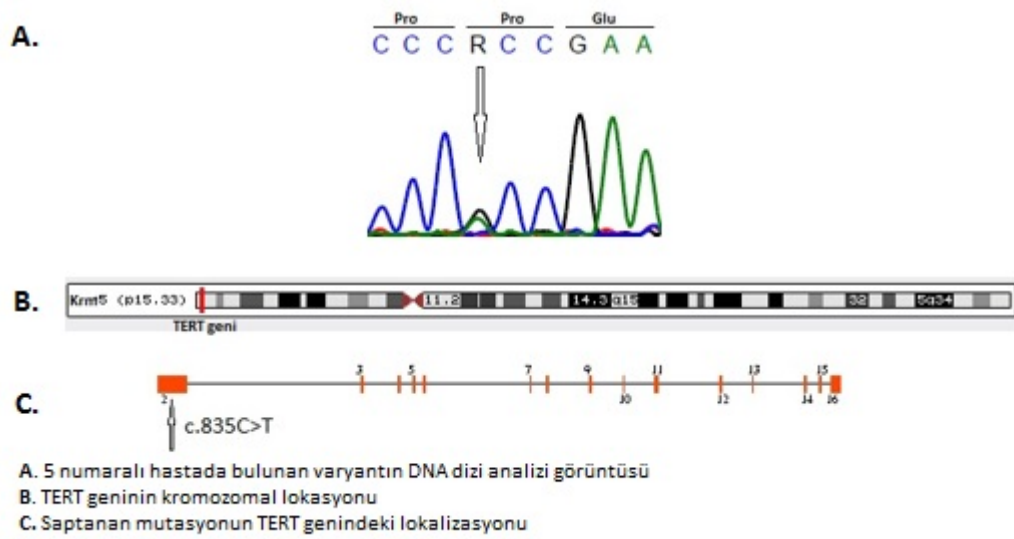
4.3.5. Beş Numaralı Hasta

T- B- ağır kombine immün yetmezlik düşünülen hastanın anne, baba akrabalığı bulunmamaktadır. Filtreleme sonucunda hastalığa neden olabilecek homozigot bir varyant bulunamamıştır. Heterozigot varyantlar arasında ise daha önce diskerozis konjenita ve aplastik anemi hastalıklarında tanımlanan, TERT (telomerase reverse transcriptase) geninde bulunan bir varyant saptanmıştır (Tablo 4.5) (60). Varyantın doğrulaması yapılmış olmasına rağmen daha önce tanımlanan çalışmada da hastalığın kesin nedeni olup olmadığı bilinmemektedir. Değişiklik TERT proteininin N terminal bağlayıcı domainini etkilemektedir fakat enzim aktivitesini bozduğuna ilişkin bir kanıt bulunmamaktadır. Bahsedilen çalışmada 80 hasta içinde 5'inde, 197 sağlıklı kontrol içinde de 8'inde hem homozigot, hem de heterozigot

olarak gösterilmiştir. Ayrıca bizim çalışmamızda yer alan hastanın klinik bulguları da dizkeratozis konjenita ile uyumlu değildir.

Tablo 4.5. Beş numaralı hastada bulunan varyant

Krom. No.	Pozisyon	ID	Ref.	Bulunan	Fonksiyon
5	1294166	rs61748181	G	A	Missense



Şekil 4.7. Beş numaralı hastada bulunan varyantın DNA dizi analizi görüntüleri ve mutasyonun gendeki lokasyonu

4.3.6. Altı Numaralı Hasta

T- B+ ağır kombine immün yetmezlik düşünülen hastada, hedeflenmiş 365 gende hastalığa neden olabilecek herhangi bir varyant saptanamamıştır.

4.3.7. Yedi Numaralı Hasta

T- B+ ağır kombine immün yetmezlik düşünülen, anne, baba arasında birinci derece akrabalık olan hastada JAK3 geninde tek nükleotid insersiyonu homozigot olarak saptanmıştır (Tablo 4.6). Hastanın klinik bulguları JAK3 eksikliği ile uyumlu

olup, bulunan varyantın doğrulaması kapiller dizileme yöntemi ile yapılmıştır. Dizileme sonucunda hastada aynı varyantın bulunduğu saptanmıştır (Şekil 4.8). Belirtilen pozisyonda bulunan c.1383_1384insG insersiyonu genomda çerçeve kayması etkisi göstermektedir. Hastanın anne ve babasında aynı varyant heterozigot olarak bulunmuş, ailedeki segregasyon da doğrulanmıştır. Ayrıca 2 kardeş de incelenmiş fakat onlarda aynı varyant bulunmamıştır.

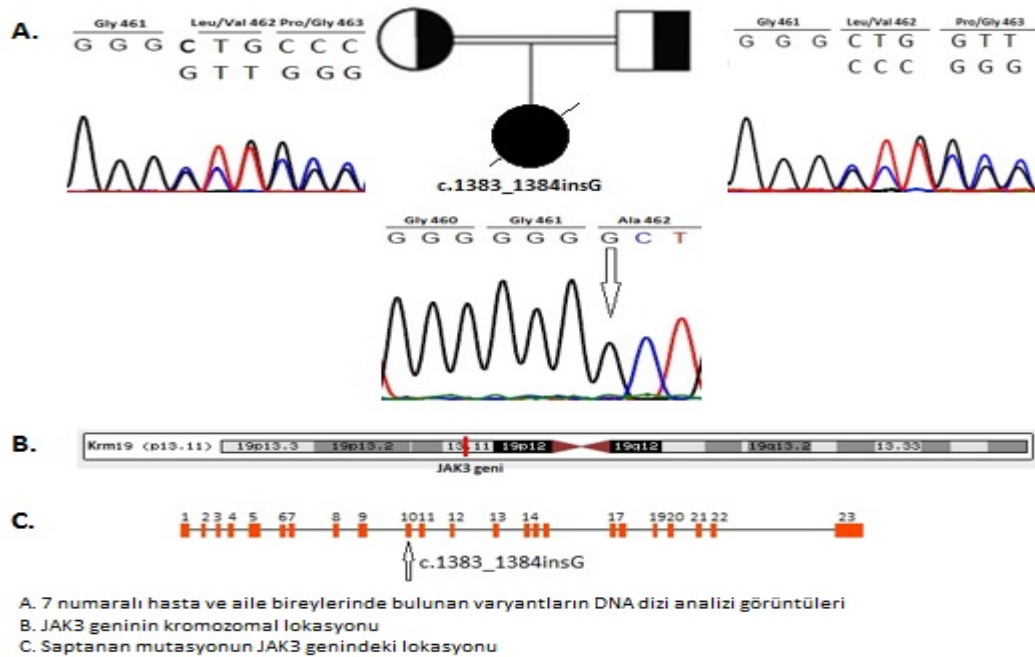
Tablo 4.6. Yedi numaralı hastada bulunan varyant

Krom. No.	Pozisyon	ID	Ref.	Bulunan	Fonksiyon
19	17950343	.	G	GG	Frameshift

PCR işlemleri için şu primerler kullanılmıştır:

Düz: 5'-3' GTCCAGATCAGCCACTCAT 338 bp

Ters: 5'-3' CCAGACTCCGTCTCCAAAAA 338 bp



Şekil 4.8. Yedi numaralı hasta ve aile bireylerinde bulunan varyantların DNA dizi analizi görüntüleri ve mutasyonun gendeki lokasyonu

4.3.8. Sekiz Numaralı Hasta

T- B- ağır kombine düşünülen hastada daha önce tanımlanmış, hastalığa neden olabilecek herhangi bir varyant bulunamamıştır. SIPA1L3 (signal-induced proliferation-associated 1 like 3) geninde homozigot bir tek nükleotid değişimi saptanmıştır. Missense etkisi olan varyant incelenmiş, genin kodladığı proteinin hematopoietik progenitör hücrelerin farklılaşmasında yer aldığı belirlenmiştir. Fakat ne insanlarda ne de fare modellerinde genin eksikliğine dair bir kayıt yoktur. Protein bir GTPaz aktivatörüdür ve aynı kökenden gelen SIPA1 geninde bazı polimorfizmlerin meme kanseriyle ilişkisi olduğu gösterilmiştir (61). Polyphen ve SIFT programlarında incelenen SIPA1L3 varyantı için sonuçlar tolere edilebilir olarak bulunmuştur.

4.3.9. Dokuz Numaralı Hasta

T- B- ağır kombine immün yetmezlik düşünülen hastada HaloPlex protokolü sırasında enzimatik kesim işlemi başarısız olmuştur.

4.3.10. On Numaralı Hasta

T- B+ ağır kombine immün yetmezlik düşünülen hastada IL2RG geninde tek nükleotid değişimi homozigot olarak saptanmıştır (Tablo 4.7). Anne, baba arasında akrabalık bulunmayan erkek hastanın klinik bulguları IL2RG eksikliği ile uyumlu olup, bulunan varyantın doğrulaması kapiller dizileme yöntemi ile yapılmıştır. Dizileme sonucunda hastada aynı varyantın bulunduğu doğrulanmıştır (Şekil 4.9). Belirtilen pozisyonda bulunan G>A nükleotid değişimi nonsense etki göstermekte ve stop kodon oluşumuna neden olmaktadır. IL2RG X'e bağlı geçiş göstermektedir. Hastanın anne, baba ve kız kardeşinde aynı varyant incelenmiş, annenin ve kız kardeşin taşıyıcı olduğu saptanmıştır.

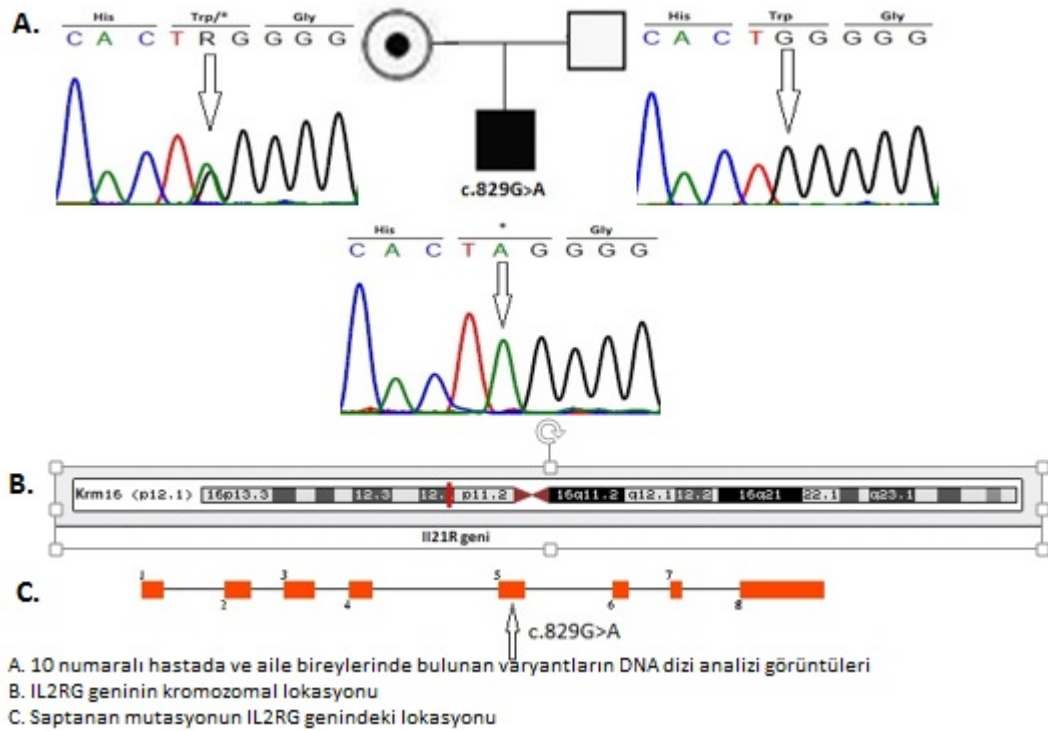
PCR işlemleri için şu primerler kullanılmıştır:

Düz: 5'-3' GAGATGGGGCACCAAGTTTA 364 bp

Ters: 5'-3' ATGACACTGGTGGGTGTTCA 364 bp

Tablo 4.7. On numaralı hastada bulunan varyant.

Krom. No.	Pozisyon	ID	Ref.	Bulunan	Fonksiyon
X	70329098	.	G	A	Nonsense

**Şekil 4.9.** On numaralı hasta ve aile bireylerinde bulunan varyantların DNA dizi analizi görüntüleri ve mutasyonun gendeki lokasyonu

4.3.11. On Bir Numaralı Hasta

T- B+ ağır kombine immün yetmezlik düşünülen hastada, hedeflenmiş 365 gende hastalığa neden olabilecek herhangi bir varyant saptanamamıştır.

4.3.12. On İki Numaralı Hasta

T- B+ ağır kombine immün yetmezlik düşünülen hastada, hedeflenmiş 365 gende hastalığa neden olabilecek herhangi bir varyant saptanamamıştır.

4.3.13. On Üç Numaralı Hasta

T- B- ağır kombine immün yetmezlik düşünülen hastada, ZAP70 ve JAK3 genlerinde 3 farklı tek nükleotid değişimi homozigot olarak saptanmıştır (Tablo 4.8). Bu genlerin her ikisindeki eksikliklerin de T- B+ ağır kombine immün yetmezliğe neden olmalarına rağmen varyantların doğrulamaları kapiller dizileme yöntemi ile yapılmıştır. Sonuçta her 3 varyantın da yanlış pozitif olduğu anlaşılmıştır.

Tablo 4.8. On üç numaralı hastada bulunan varyantlar.

Krom. No.	Pozisyon	ID	Ref.	Bulunan	Fonksiyon
2	98350041	.	G	A	Missense
19	17945726	.	C	T	Missense
19	17953195	.	C	A	Missense

4.3.14. On Dört Numaralı Hasta

T- B- ağır kombine immün yetmezlik düşünülen hastada, hedeflenmiş 365 gende hastalığa neden olabilecek herhangi bir varyant saptanamamıştır.

4.3.15. On Beş Numaralı Hasta

T- B- ağır kombine immün yetmezlik düşünülen hastada, hedeflenmiş 365 gende hastalığa neden olabilecek herhangi bir varyant saptanamamıştır.

4.3.16. On Altı Numaralı Hasta

T- B- ağır kombine immün yetmezlik düşünülen hastada, hastalığa neden olabilecek, daha önce tanımlanmış genlerde (ağır kombine immün yetmezlik genleri) herhangi bir varyant saptanamamıştır. TTC7A (Tetratricopeptide repeat domain 7A) eksikliği intestinal atreziyle karakterize kombine bir immün yetmezliktir (62). 16 numaralı hastada bu gende daha önce gösterilen bir tek nükleotid değişimi saptanmıştır (Tablo 4.9). Fakat bu varyantın klinik bir etkisi olup olmadığı

bilinmemektedir. SIFT skorlamasında tolere edilebilir sonucu alınan varyant kapiller dizileme yöntemi ile doğrulanmıştır. Hastada aynı varyantın bulunduğu gösterilmesine rağmen anne ve babadan DNA örnekleri alınamamıştır. Bununla birlikte hastanın kliniğe de TTC7A eksikliği ile uyumlu bulunmamıştır.

Tablo 4.9. On altı numaralı hastada bulunan varyant.

Krom. No.	Pozisyon	ID	Ref.	Bulunan	Fonksiyon
2	47287925	rs140166160	C	A	Missense



Şekil 4.10. On altı numaralı hastada bulunan varyantın gendeki lokasyonu

4.3.17. On Yedi Numaralı Hasta

T- B- ağır kombine immün yetmezlik düşünülen hastada, hedeflenmiş 365 gende hastalığa neden olabilecek herhangi bir varyant saptanamamıştır.

4.3.18. On Sekiz Numaralı Hasta

T- B+ ağır kombine immün yetmezlik düşünülen hastada HaloPlex protokolü sırasında enzimatik kesim işlemi başarısız olmuştur.

4.3.19. On Dokuz Numaralı Hasta

T- B+ ağır kombine immün yetmezlik düşünülen hastada HaloPlex protokolü sonunda amplifikasyon doğrulanmış olmasına rağmen dizileme işlemi başarısız olmuş

ve sonuç alınamamıştır. cBot protokolü ya da HiSeq 2001 cihazında okumalar yapılırken bir sorun olduğu düşünülmektedir.

4.3.20. Yirmi Numaralı Hasta

T- B+ ağır kombine immün yetmezlik düşünülen hastada, hedeflenmiş 365 gende hastalığa neden olabilecek herhangi bir varyant saptanamamıştır.

4.3.21. Yirmi Bir Numaralı Hasta

T- B+ ağır kombine immün yetmezlik düşünülen hastada, hedeflenmiş 365 gende hastalığa neden olabilecek herhangi bir varyant saptanamamıştır.

4.3.22. Yirmi İki Numaralı Hasta

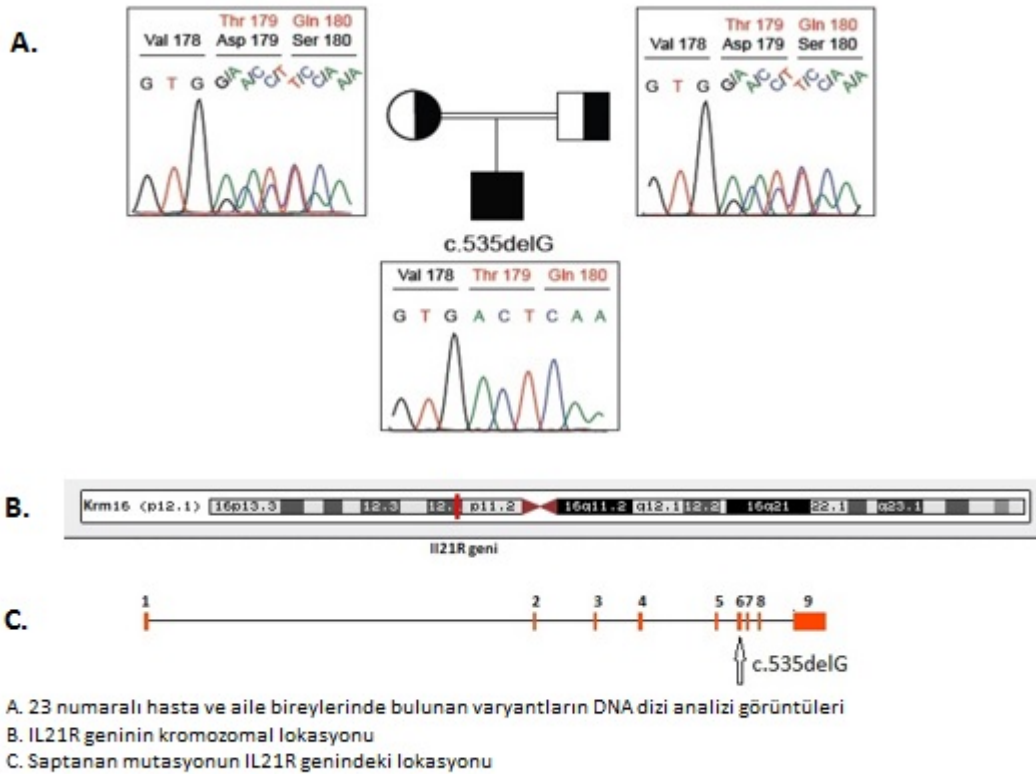
T- B+ ağır kombine immün yetmezlik düşünülen hastada, hedeflenmiş 365 gende hastalığa neden olabilecek herhangi bir varyant saptanamamıştır.

4.3.23. Yirmi Üç Numaralı Hasta

Birinci derece akraba anne, babadan olan hastanın 6 aylıkken ishal şikayeti başlamış, endoskopi sonucu çölyak hastalığı ile uyumlu bulunmuştur. Kliniğimize 4 yaşındayken başvuran hastanın sık tekrarlayan otit, tinea corporis, diş apsesi, herpes enfeksiyonu ve 5 yaşında kaybedilmiş bir kızkardeş öyküsü mevcuttur. Büyüme gelişme geriliği, bilateral kulak zarında perforasyon ve hepatosplenomegali olan hastanın immunolojik değerlendirmesi sonucunda CD4+ ve NK hücre lenfopenisi saptanmıştır. Karaciğer biyopsisi sklerozan kolanjit ile uyumlu olan hastanın gayta analizinde ve endoskopik biyopsi materyalinde Crptosporidium enfeksiyonu görülmüştür.

Kombine immün yetmezlik düşünülen hastada IL-21R geninde tek nükleotid delesyonu homozigot olarak saptanmıştır. Hastanın klinik bulguları IL-21R eksikliği ile uyumlu olup, bulunan varyantın doğrulanması kapiller dizileme yöntemi ile yapılmıştır. Dizileme sonucunda hastada aynı varyantın bulunduğu doğrulanmıştır

(Şekil 4.10). Belirtilen pozisyonda bulunan c.535delG delesyonu genomda çerçeve kayması etkisi göstermektedir. Hastanın anne ve babasında aynı varyant heterozigot olarak bulunmuş, ailedeki segregasyon da doğrulanmıştır. Ayrıca hastanın kız kardeşi de incelenmiş fakat aynı varyant bulunmamıştır.



Şekil 4.11. Yirmi üç numaralı hasta ve aile bireylerinde bulunan varyantların DNA dizi analizi görüntüleri ve mutasyonun gendeki lokasyonu

4.3.24. Yirmi Dört Numaralı Hasta

Kombine immün yetmezlik düşünülen hastada, hedeflenmiş 365 gende hastalığa neden olabilecek herhangi bir varyant saptanamamıştır.

4.3.25. Yirmi Beş Numaralı Hasta

Kombine immün yetmezlik düşünülen hastada, hedeflenmiş 365 gende hastalığa neden olabilecek herhangi bir varyant saptanamamıştır.

4.3.26. Yirmi Altı Numaralı Hasta

Kombine immün yetmezlik düşünülen hastada, hedeflenmiş 365 gende hastalığa neden olabilecek herhangi bir varyant saptanamamıştır.

4.3.27. Yirmi Yedi Numaralı Hasta

1 yaşından itibaren sık pnömoni, otit ve sinüzit öyküsü olan hasta kemik kırığı nedeniyle 2 kez opere edilmiştir. Kronik ishal şikayeti olan ve inflamatuvar barsak hastalığı düşünülen hastada IgG düşüklüğü ve CD4+ T hücre lenfopenisi bulunmaktadır.

Kombine immün yetmezlik düşünülen hastada PIK3CD geninde tek nükleotid değişimi heterozigot olarak saptanmıştır. Hastanın klinik bulguları PIK3CD eksikliği ile uyumlu olup, bulunan varyantın doğrulanması kapiller dizileme yöntemi ile yapılmıştır. Dizileme sonucunda hastada aynı varyantın bulunduğu doğrulanmıştır. Belirtilen pozisyonda bulunan G>A tek nükleotid değişiminin missense etkisi olup E1045K amino asit değişimine neden olmaktadır. PIK3CD geninde bulunan heterozigot, fonksiyon kazanımı "*gain of function*" mutasyonlar daha önce tanımlanmıştır.



Şekil 4.12. Yirmi yedi numaralı hastada bulunan mutasyonun gendeki lokasyonu

Tablo 4.10. Çalışmaya alınan hastalarda saptanan varyantların listesi.

Hasta No	Gen	Pozisyon	Ref.	Bulunan	Doğrulama	Segregasyon
1	RAG1	36597064	G	A	+	+
2	RAG1	36597001	G	A	+	+
3	JAK3	17946779	G	A	+	+
4	RAG1	36596185	C	G	+	+
4	RAG1	36595279	T	A	+	+
4	RAG1	36595591	C	A	-	-
5	TERT	1294166	G	A	+	+
7	JAK3	17950343	G	GG	+	+
10	IL2RG	70329098	G	A	+	+
13	ZAP70	98350041	G	A	-	-
13	JAK3	17945726	C	T	-	-
13	JAK3	17953195	C	A	-	-
16	TTC7A	47287925	C	A	+	+
23	IL21R	27455890	GG	G	+	+
27	PI3KCD	9787030	G	A	+	+

5.TARTIŞMA

Primer immün yetmezlikler heterojen bir hastalık grubu olup, hastalarda görülen genetik mutasyonların çeşitliliği klinik olarak çok farklı fenotiplerin ortaya çıkmasına neden olmaktadır (1). Ülkemiz gibi akraba evliliklerinin yaygın olarak görüldüğü toplumlarda özellikle otozomal resesif kalıtım gösteren immün yetmezliklerin görülme sıklığının yüksek olduğu düşünülmektedir (18).

Ağır kombine immün yetmezlikler primer immün yetmezliklerin ağır seyirli, yaşamı kısa sürede tehdit eden türüdür (2). Bu hasta grubunda bir çok vakanın tedavi programının planlanmasının hastalığa neden olan genetik defektin bilinmesi ile daha rasyonel olarak gerçekleştirileceği düşünülürse, moleküler bozuklukların saptanmasının önemi ortaya çıkmaktadır. Günümüzde ağır kombine immün yetmezliklerin tedavisinde küratif yöntemin HKHN olduğu bilinmektedir. Bunun yanında gen tedavisinin de son yıllarda uygulanmaya başlanmasıyla, hem kök hücre nakli için uygulanacak hazırlık rejiminin, hem de gen tedavisinin şartlarının belirlenmesi, altta yatan genetik defektin bilinmesiyle doğrudan ilişkilidir (63). Bir diğer hasta grubu kombine immün yetmezlikler olup; çok çeşitli klinik ve laboratuvar belirtileri ile prezente olmaktadır .

Son yıllarda geliştirilen yeni nesil dizileme yöntemlerinin kullanılmaya başlaması primer immün yetmezliklere neden olan mutasyonların tanımlanmasını daha kolay hale getirmiştir ve her geçen gün hastalığa neden olan yeni genetik defektlerin sayısı artarak literatürde yerini almaktadır (64). Yeni nesil dizileme yöntemlerinden biri olan hedeflenmiş tüm ekzom dizileme hızlı, düşük maliyetli ve güvenilir bir yöntemdir. Özellikle bir hastalık grubunda belirli sayıda geni analiz etmek için tüm ekzom dizilemeye oranla daha uygun bir yöntemdir. Çünkü elde edilen sonuçlarda yer alan yanlış pozitif varyantların değerlendirilmesi, yeni nesil dizileme yöntemleriyle güvenilir sonuçlara ulaşmanın en önemli basamaklarından biridir. Tüm ekzom dizileme sonucu elde edilen varyant sayısı belirli bir grup genin hedeflenmesiyle elde edilen varyant sayısından çok daha fazladır. Sonuçların analiz aşamasında, hastalığa neden olabilecek varyantların gözden kaçırılmaması, bazı varyantların ise daha ileri çalışmalar için o hastaya özel olarak çalışma dışı

bırakılması kritik öneme sahiptir (65). Bu bilgiler ışığında primer immün yetmezliklerle ilgili olabilecek 356 genin hedeflendiği HaloPlex paneli ile ağır kombine/kombine immün yetmezlik tanısı düşünülen bir hasta grubunda, hastalıktan sorumlu olabilecek genetik defektler araştırılmıştır.

HaloPlex teknolojisi genomik DNA'nın daireselleştirilmesi ve hazırlanan problara hibridizasyonunu temel alan bir zenginleştirme sistemi üzerine kurulmuştur. Çalışmaya ağır kombine immün yetmezlik düşünülen 22, kombine immün yetmezlik düşünülen 5 hasta dahil edilmiştir. 27 hastanın 2 tanesinde zenginleştirme işlemi başarısızlıkla sonuçlanmıştır (%7). İlk defa kullanılan çalışma protokolünde uygulama sırasında hatalı bir durum olabileceği düşünülmektedir. Bir hastada ise dizileme işlemleri sonucunda herhangi bir veri elde edilememiştir (%3). Sonuçta 27 hastanın 24'ünde sağlıklı veriler elde edilmiş (%88), 6 hastada ağır kombine immün yetmezliğe neden olabilecek, 2 hastada ise kombine immün yetmezliğe neden olabilecek mutasyonlar gösterilmiştir (%33). Çalışmaya başlarken gen tanımlaması yönünden, yüzde 50 oranında başarı beklenirken, hastaların yaklaşık % 30'unda hastalığa neden olan mutasyon belirlenebilmiştir. Saptanan bu varyantlardan 5 tanesi daha önce tanımlanmamış mutasyonlardır ve hastalığın nedenini açıklamaktadırlar (bkz hasta no: 2, 3, 7, 10, 23). Bu mutasyonların 3 tanesi tek nükleotid değişimi, 1 tanesi tek bazdan oluşan bir delesyon, 1 tanesi ise tek bazdan oluşan bir insersiyondur. Daha önce ağır kombine immün yetmezlik tanısıyla izlenen bir hastada heterozigot olarak rapor edilen bir RAG1 mutasyonu, 1 numaralı hastada homozigot olarak saptanmıştır (58). Daha önce homozigot olarak tanımlanan iki farklı varyant ise 4 numaralı hastada birleşik heterozigot olarak gösterilmiştir (59). Tanımlanan mutasyonlardan 5 tanesi yeni gösterilmiş olmasına karşın hepsi daha önce bilinen genlerde saptanmışlardır. Bir hastada ortaya çıkan ve TERT geninde bulunan varyantın hastalıktan sorumlu mutasyon olabileceği düşünülmüştür. TERT mutasyonlarına bağlı otozomal dominant diskeratozis konjenita hastalığı literatürde yer almaktadır (60). Bu eksikliğe bağlı olarak klinik fenotip deride retiküler hiperpigmentasyon, avuç içinde hiperkeratozis, anemi ve pansitopeni olarak karşımıza çıkmaktadır. Fakat bu klinik tablo hastamızın fenotipi

ile uyumlu bulunmamıştır. Bir diğer hastada ise TTC7A geninde saptanan varyant daha önce tanımlanan bir mutasyondur (62). TTC7A eksikliği olan hastalar ağır kombine immün yetmezlik fenotipi gösterebilmelerine rağmen, bu hastaların en belirgin klinik özellikleri çoklu intestinal atrezilerdir. Bu nedenle TTC7A geninde saptanan varyant hastamızın klinik fenotipini açıklamamaktadır. Primer immün yetmezliklerin çok geniş bir klinik spektrumda ortaya çıktığı bilinmektedir. Bununla birlikte, yeni tanımlanan immün yetmezliklerin daha fazla sayıda hastada gösterilmesi hastaların fenotipik özelliklerinin tanımlanmasına katkı sağlamaktadır (6). Çünkü epigenetik ve çevresel faktörler bu hastalarda fenotipik çeşitliliği etkilemektedir (1). İki hastamızda saptanan varyantların hastaların klinik durumlarını açıklamamasının, bu faktörlerin fenotipik çeşitliliğe etkisine bağlı olduğu düşünülmektedir. Çalışmada bulunan diğer 20 hastada ise ağır kombine/kombine immün yetmezliğe neden olabilecek bir varyant gösterilememiştir. Kullandığımız HaloPlex paneli 356 gen için tasarlanmış olup, çalışmaya katılan hastalarda bu genlerin dışında kalan ve immün sistem ile ilişkili bir proteini kodlayan, daha önce tanımlanmamış bir gende defekt olabileceği düşünülmektedir. Son yıllarda oldukça yüksek bir oranda tanımlanan ve yeni kombine immün yetmezliklere yol açan mutasyonların mevcut yöntemle genetik defekt saptanamayan bu hastalarda araştırılması için tüm ekzom dizileme yönteminin kullanılmasının uygun olacağı düşünülebilir. Ayrıca hastalığa neden olabilecek defektlerin ekzonik bölgeler dışında (promotor, regülatör bölgeler ya da intronlar) da bulunabileceği düşünülürse genom dizileme yönteminin kullanılması da bu hastalarda gündeme gelmektedir.

Kullanılan panel ile bir uygulama protokolü sırasında 16-96 tane hasta örneği çalışılabilmektedir. Hasta sayısının artması özellikle dizileme ve analiz basamaklarında toplam süreyi uzatacaktır. Fakat 356 geni kapsayan böyle bir çalışmada yaklaşık 2 aylık sürede verilerin elde edilebilmesi uygulanabilir bir yöntem olduğunu ortaya çıkarmaktadır. Sonuçlar HaloPlex panelinin belirli bir sayıda hastayı kapsayan grup çalışmalarında uygun olarak kullanılabilmesine dikkat çekmektedir. Aynı hasta grubu için yapılacak tüm ekzom ya da genom dizileme çalışmaları ise daha fazla süre gerektirmekte ve özellikle daha ileri aşamalar için gündeme

gelmektedir. Bu tür belirli hasta gruplarının hedeflendiği çalışmalarda (örneğin AT, YDİY, IBD) daha az sayıda hedef genin olduğu paneller kullanılırsa sonucun daha kısa sürede ve etkili bir şekilde elde edilebileceği ortaya çıkmaktadır.

Yeni nesil dizileme çalışmalarında dizilenen genlerin kapsanma “coverage “ değerleri çalışmanın güvenilirliğini gösteren en önemli parametredir. Genomda bulunan bir bazın farklı DNA parçalarında bulunmasını yani kapsanma sayısını ifade eden bu terim yapılan çalışmada elde edilen varyantların doğruluğunu göstermektedir (66). Kullandığımız HaloPlex panelinde elde edilen sonuçlarda bu değer özellikle ağır kombine immün yetmezliklere neden olan genlerde kontrol edilmiş ve en az 20X değerinde olduğu saptanmıştır (20X-1500X arasında değişmektedir). Aynı laboratuvarında daha önce yapılan bir ekzom dizileme çalışmasıyla karşılaştırıldığında değerlerin diğer çalışmaya oranla oldukça yüksek olduğu gösterilmiştir (data gösterilmemiştir). Isaac J. Nijman ve arkadaşlarının yaptığı, primer immün yetmezlik hastalarında 170 genin hedeflendiği yeni nesil dizileme çalışmasında 20X değerinde tüm hedeflenen bazların %90.4-%95.2 oranında kapsandığı belirtilmiştir (51). Bizim çalışmamızda ise bu oran ağır kombine immün yetmezlik genlerinde yaklaşık %99’dur. Bu sonuçlar yapılan çalışmanın oldukça güvenilir olduğunu ortaya koymaktadır.

Çalışmaya alınan 27 hastada ağır kombine/kombine immün yetmezlikten sorumlu olabilecek toplam 15 varyantın doğrulama işlemi Sanger dizileme ile yapılmıştır. Saptanan 15 varyantın 12’sinin (%80) hastalarda gerçekten bulunduğu gösterilmiştir. Lasse Pihlstrøm ve arkadaşlarının yaptığı (68), Parkinson hastalarında 70 genin hedeflendiği yeni nesil dizileme çalışmasında toplam 387 hastada sinonim olmayan 18 varyant bulunmuş ve 17’si (%94) doğrulanmıştır. Bu oran bizim çalışmamıza göre daha yüksek olmasına rağmen hem hasta sayısının 387 olması hem de daha az sayıda genin hedeflenmesi çalışmamızda elde edilen %80’lik oranın güvenilir olduğunu ortaya koymaktadır. Yeni nesil dizileme çalışmalarında yanlış pozitif sonuçların nedenlerinin benzer dizilerin hizalanmasındaki hatalar ya da PCR amplifikasyon basamakları sırasında ortaya çıkabilecek yanlış baz değişimleri olabileceği düşünülmektedir (69).

Ağır kombine immün yetmezliklerin tedavisinde kullanılan HKHN ve gen terapisi yöntemleri için hastalığa neden olan genetik defektin bilinmesi yaşamsal önem taşımaktadır. Aynı zamanda kök hücre nakli için uygun olan bir donörün bulunması durumunda, bu donörün de aynı mutasyonu taşıyıp taşımadığının belirlenmesi gerekmektedir. Bunun yanında in vitro fertilizasyon yöntemi ile yeni çocuk sahibi olmak isteyen ve hastalığa neden olan genetik mutasyonu taşıyan aileler için de genetik tanı yine yaşamsal öneme sahiptir. Preimplantasyon tanı yöntemlerinin geliştirilmesiyle birlikte sağlıklı embriyoların ana rahmine transfer edilmesi mümkün hale gelmiştir (67). Anne, baba taşıyıcı olan ailelerin in vitro fertilizasyon ile çocuk sahibi olmaları için hastalığa neden olan genetik defektin bilinmesi gerekmektedir. Bütün bu sonuçlar primer immün yetmezlikli hastalarda, eğer klasik yöntemlerle tanı konulamamışsa, genetik defektin belirlenmesi için yeni nesil dizileme yöntemlerinin kullanılması gerektiğine işaret etmektedir.

Çalışmamız sonucunda tedavi yöntemleri için erken ve genetik tanının bu denli önemli olduğu primer immün yetmezlikli hastalarda, kullandığımız HaloPlex yönteminin etkin, hızlı ve başarılı bir yöntem olduğu ortaya çıkmaktadır.

6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

1. Çalışmaya dahil edilen 27 hastanın 24'ünde yeni nesil dizileme işlemleri başarılı olmuş, sağlıklı sonuçlar alınmıştır (%88). Üç örnekte ise HaloPlex ve Illumina protokollerinin uygulanması sırasında enzimatik kesim ve dizileme işlemleri başarısız olmuş, sonuç alınamamıştır. Sonuç olarak 27 hastanın 24'ünde hedeflenen genom dizileri elde edilmiştir. Bu oran çalışmanın amacına ulaştığını göstermektedir.

2. Sağlıklı sonuçlar elde edilen 24 hastanın 8'inde hastalığa neden olan genetik defektler gösterilmiştir. Bu rakam %33'lük bir oranı ifade etmektedir.

3. Saptanan 8 mutasyonun 5'i ağır kombine immün yetmezlik düşünülen hastalarda, 2'si ise kombine immün yetmezlik gösterilen hastalarda tanımlanmıştır.

4. Saptanan tüm mutasyonlar daha önce ağır kombine/kombineimmün yetmezliğe neden olduğu bilinen genlerde gösterilmiştir. Bu mutasyonlardan 5 tanesi literatürde daha önce yer almayan, yeni tanımlanmış mutasyonlardır.

5. Hastalığa neden olduğu gösterilen 8 mutasyonun dışında, ağır kombine immün yetmezlik düşünülen 2 hastada saptanan 2 farklı mutasyon hastaların klinik durumlarını açıklamamaktadır (%7). Bu durum primer immün yetmezlikli hastalarda epigenetik ve çevresel faktörlerin fenotipe etkisini düşündürmektedir.

6. Çalışmada hastalığa neden olabilecek toplam 15 varyant saptanmış, bunların 12'si Sanger dizileme ile doğrulanmıştır. Bu oran hedeflenen genler için çalışmanın özgünlüğünün %80 olduğunu göstermiştir.

8. Hedeflenen genlerde kapsanma değerleri ağır kombine immün yetmezlik genlerinde kontrol edilmiş ve değerlerin 20X-1500X aralığında olduğu saptanmıştır. Ağır kombine immün yetmezlik genlerinde 20X değerinde %99'luk bir kapsanma mevcuttur. Bu sonuçlar çalışmanın güvenilirliğini kanıtlamaktadır.

9. Uygulanan yeni nesil dizileme yönteminin primer immün yetmezliği olan hasta gruplarında kısa sürede ve etkin şekilde kullanılabileceği düşünülmektedir.

10. Hastalığa neden olabilecek varyantların gösterilemediği hastalarda tüm ekzom ya da genom dizileme yöntemleriyle inceleme yapılması tavsiye edilmektedir.

KAYNAKLAR

1. Notarangelo, L.D. (2010) Primary immunodeficiencies. *J Allergy Clin Immunol*, 125, 182-94.
2. van der Burg, M., Gennery, A.R. (2011) Educational paper. The expanding clinical and immunological spectrum of severe combined immunodeficiency. *Eur J Pediatr*, 170 (5), 561-571.
3. Ng, S. B., Turner, E. H., Robertson, P. D., Flygare, S. D., Bigham, A. W., Lee, C. Ve diğçerleri. (2009) Targeted capture and massively parallel sequencing of 12 human exomes. *Nature*, 461 (7261), 272-276.
4. Abbas, A., Lichtman, A., Pillai, S. (2007). *Cellular and Molecular Immunology*. Elsevier.
5. Male, D., Brostoff, J., Roth, B. D., Roitt, M. I. (2013). *Immunology*. Elsevier.
6. Parvaneh, N., Casanova, J.L., Notarangelo, L.D., Conley, M.E. (2013) Primary immunodeficiencies: a rapidly evolving story. *J Allergy Clin Immunol*, 131 (2) , 314-323.
7. Bruton, O.C. (1952) Agammaglobulinemia. *Pediatrics*, 9, 722–728.
8. Vetrie, D., Vorechovský, I., Sideras, P., Holland, J., Davies, A., Flinter, F. Ve diğçerleri. (1993) The gene involved in X-linked agammaglobulinaemia is a member of the src family of protein-tyrosine kinases. *Nature*, 21, 361 (6409), 226-33.
9. Kumar, A., Teuber, S.S., Gershwin, M.E. (2006) Current perspectives on primary immunodeficiency diseases. *Clin Dev Immunol*, 13 (2-4), 223-59.
10. Al-Herz, W., Bousfiha, A., Casanova, J.L., Chatila, T., Conley, M.E., Cunningham-Rundles, C. Ve diğçerleri. (2014) Primary immunodeficiency diseases: an update on the classification from the international union of immunological societies expert committee for primary immunodeficiency. *Front Immunol*, 22, 5-162.
11. Lipstein, E.A., Vorono, S., Browning, M.F., Green, N.S., Kemper, A.R., Knapp, A.A. Ve diğçerleri. (2010) Systematic evidence review of newborn screening and treatment of severe combined immunodeficiency. *Pediatrics*, 125 (5), e1226.

12. Glanzmann, E., Riniker, P. (1950) Lymphozytophthise: Ein neues Krankheitsbild der Sauglingspathologie. *Ann Paediatr*, 175, 1–3.
13. Hitzig, W.H. (1968) Combined cellular and humoral deficiency states. *Proc R Soc. Med*, 61, 887–889.
14. Fudenberg, H.H., Good, R.A., Hitzig, W., Kunkel, H.G., Roitt, I.M., Rosen, F.S. Ve diğerleri. (1970) Classification of the primary immune deficiencies: WHO recommendation. *N Engl J Med*, 283, 656–657.
15. Giblett, E.R., Anderson, J.E., Cohen, F., Pollara, B., Meuwissen, H.J. (1972) Adenosine-deaminase deficiency in two patients with severely impaired cellular immunity. *Lancet*, 2, 1067–1069.
16. Rich, R.R., Fleisher, A.T., Shearer, T.W., Schroeder, W.H., Frew, J.A., Wevand, M.C. (2012). *Clinical Immunology*. Elsevier.
17. Lizzy, Rivers., Bobby, Gaspar. (2014) Severe combined immunodeficiency: recent developments and guidance on clinical management. *Archdischild*, 306425.
18. Sanal, O., Tezcan I. (2011) Thirty years of primary immunodeficiencies in Turkey. *Ann N Y Acad Sci*, 1238, 15-23.
19. Notarangelo, L.D., Giliani, S., Mella, P., Schumacher, R.F., Mazza, C., Savoldi, G. Ve diğerleri. (2000) Combined immunodeficiencies due to defects in signal transduction: defects of the gammac-JAK3 signaling pathway as a model. *Immunobiology*, 202 (2), 106-119.
20. Leonard, W.J., Lin, J.X. (2000) Cytokine receptor signaling pathways. *J.Allergy Clin Immunol*, 105, 877–888.
21. Lin, J.X., Leonard, W.J. (2000) The role of Stat5a and Stat5b in signaling by IL-2 family cytokines. *Oncogene*, 19, 2566–2576.
22. Puel, A., Ziegler, S.F., Buckley, R.H., Leonard, W.J. (1998) Defective IL7R expression in T(-)B(+)NK(+) severe combined immunodeficiency. *Nat Genet*, 20, 394–397.

23. Kung, C., Pingel, J.T., Heikinheimo, M., Klemola, T., Varkila, K., Yoo, L.I. Ve diğeri. (2000) Mutations in the tyrosine phosphatase CD45 gene in a child with severe combined immunodeficiency disease. *Nat Med*, 6 (3), 343-345.
24. Fischer, A., de Saint, B.G., Le Deist, F. (2005) CD3 deficiencies. *Curr. Opin Allergy Clin Immunol*, 5, 491–495.
25. Shiow, L.R., Roadcap, D.W., Paris, K., Watson, S.R., Grigorova, I.L., Lebet, T. Ve diğeri. (2008) The actin regulator coronin 1A is mutant in a thymic egress-deficient mouse strain and in a patient with severe combined immunodeficiency. *Nat Immunol*. 2008, 9 (11), 1307-1315.
26. Moshous, D., de Villartay, JP. (2014) The expanding spectrum of human coronin 1A deficiency. *Curr Allergy Asthma Rep*, 14 (12), 481.
27. Pannicke, U., Honig, M., Hess, I., Friesen, C., Holzmann, K., Rump, E.M. Ve diğeri. (2009) Reticular dysgenesis (aleukocytosis) is caused by mutations in the gene encoding mitochondrial adenylate kinase 2. *Nat Genet*, 41, 101–105.
28. Blackburn, M.R., Kellems, R.E. (2005) Adenosine deaminase deficiency: metabolic basis of immune deficiency and pulmonary inflammation. *Adv Immunol*, 86, 1-41.
29. Hershfield, M.S. (1993) Enzyme replacement therapy of adenosine deaminase deficiency with polyethylene glycol-modified adenosine deaminase (PEG-ADA). *Immunodeficiency*, 4, 93–97.
30. Felgentreff, K., Perez-Becker, R., Speckmann, C., Schwarz, K., Kalwak, K., Markelj, G. Ve diğeri. (2011) Clinical and immunological manifestations of patients with atypical severe combined immunodeficiency. *Clin Immunol*, 141 (1), 73-82.
31. Villa, A., Notarangelo, L.D., Roifman, C.M. (2008) Omenn syndrome: inflammation in leaky severe combined immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol*, 122, 1082–1086.
32. Aleman K., Noordzij, J.G., de Groot, R. (2001) Reviewing Omenn syndrome. *Eur. J. Pediatr*, 160, 718–725.

33. Neven, B., Leroy, S., Decaluwe, H., Le Deist, F., Picard, C., Moshous, D. Ve diğerleri (2009) Long-term outcome after hematopoietic stem cell transplantation of a single-center cohort of 90 patients with severe combined immunodeficiency. *Blood*, 113, 4114–4124.
34. Brown, L., Xu-Bayford, J., Allwood, Z., Slatter, M., Cant, A., Davies, E.G. Ve diğerleri. (2011) Neonatal diagnosis of severe combined immunodeficiency leads to significantly improved survival outcome: the case for newborn screening. *Blood*, 117 (11), 3243–3246.
35. Gennery, A.R., Slatter, M.A., Grandin, L., Taupin, P., Cant, A.J., Veys, P. Ve diğerleri. (2010) Transplantation of hematopoietic stem cells and long-term survival for primary immunodeficiencies in Europe: entering a new century, do we do better? *J Allergy Clin Immunol*, 126 (3), 602-610.
36. Borghans, J.A., Bredius, R.G., Hazenberg, M.D., Roelofs, H., Jol-van der Zijde, E.C., Heidt, J. Ve diğerleri. (2006) Early determinants of longterm T-cell reconstitution after hematopoietic stem cell transplantation for severe combined immunodeficiency. *Blood*, 108, 763–769.
37. Laffort, C., Le Deist, F., Favre, M., Caillat-Zucman, S., Radford-Weiss, I., Debre, M. Ve diğerleri. (2004) Severe cutaneous papillomavirus disease after haemopoietic stem-cell transplantation in patients with severe combined immune deficiency caused by common gammac cytokine receptor subunit or JAK-3 deficiency. *Lancet*, 363, 2051–2054.
38. Ferrara, J.L. (2009) Graft-versus-host disease. *Lancet*, 373 (9674), 1550-1561.
39. Hershfield, M.S. (1993) Enzyme replacement therapy of adenosine deaminase deficiency with polyethylene glycol-modified adenosine deaminase (PEG-ADA). *Immunodeficiency* 4, 93–97.
40. Gaspar, H.B., Bjorkegren, E., Parsley, K., Gilmour, K.C., King, D., Sinclair, J. Ve diğerleri (2006) Successful reconstitution of immunity in ADA-SCID by stem cell gene therapy following cessation of PEG-ADA and use of mild preconditioning. *Mol Ther*, 14, 505–513.

41. Hacein-Bey-Abina, S., Von Kalle, C., Schmidt, M., McCormack, M.P., Wulffraat, N., Leboulch, P. Ve diğerleri. (2003) LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science*, 302, 415–419.
42. Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 51, 263–273.
43. Garcia, J.G., Ma, S.F. (2005) Polymerase chain reaction: a landmark in the history of gene technology. *Crit Care Med*, 33 (12), 429-432.
44. Kubista, M., Andrade, J.M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K Ve diğerleri. (2006) The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med*, 27 (2-3), 95-125.
45. Maxam, A.M., Gilbert, W. (1977) A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74 (2), 560-564.
46. Sanger, F., Coulson, A.R. (1975) A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol*, 94 (3), 441-448.
47. Dawn Teare, M., Barrett, JH. (2005) Genetic linkage studies. *Lancet*, 366, 1036–1044.
48. Lopez-Herrera, G., Tampella, G., Pan-Hammarstrom, Q., Herholz, P., Trujillo-Vargas, C.M., Phadwal, K. Ve diğerleri. (2012) Deleterious mutations in LRBA are associated with a syndrome of immune deficiency and autoimmunity. *Am J Hum Genet*, 90, 986–1001.
49. Gibbs, J.R., Singleton, A. (2006) Application of genome-wide single nucleotide polymorphism typing: simple association and beyond. *PLoS Genet*, 2 (10), e150.
50. Buermans, H.P.J., den Dunnen, J.T. (2014) Next generation sequencing technology: Advances and applications. *Biochim Biophys Acta*, 1842 (10), 1932-1941.
51. Nijman, I.J., van Montfrans, J.M., Hoogstraat, M., Boes, M.L., van de Corput, L., Renner, E.D. Ve diğerleri. (2014) Targeted next-generation sequencing: a novel diagnostic tool for primary immunodeficiencies. *J Allergy Clin Immunol*, 133 (2), 529-534.

52. Moshous, D., Martin, E., Carpentier, W., Lim, A., Callebaut, I., Canioni, D. Ve diğerleri. (2013) Whole-exome sequencing identifies Coronin-1A deficiency in 3 siblings with immunodeficiency and EBV-associated B-cell lymphoproliferation. *J Allergy Clin Immunol*, 131 (6), 1594-1603.
53. Salzer, E., Kansu, A., Sic, H., Májek, P., Ikinçioğullari, A., Dogu, F.E. Ve diğerleri. (2014) Early-onset inflammatory bowel disease and common variable immunodeficiency-like disease caused by IL-21 deficiency. *J Allergy Clin Immunol*, 133 (6), 1651-1662.
54. Willmann, K.L., Klaver, S., Doğu, F., Santos-Valente, E., Garncarz, W., Bilic, I. Ve diğerleri. (2014) Biallelic loss-of-function mutation in NIK causes a primary immunodeficiency with multifaceted aberrant lymphoid immunity. *Nat Commun*, 19, 5355-5360.
55. Salzer, E., Daschkey, S., Choo, S., Gombert, M., Santos-Valente, E., Ginzel, S. Ve diğerleri. (2013) Combined immunodeficiency with life-threatening EBV-associated lymphoproliferative disorder in patients lacking functional CD27. *Haematologica*, 98 (3), 473-478.
56. Greil, J., Rausch, T., Giese, T., Bandapalli, O.R., Daniel, V., Bekeredjian-Ding, I. Ve diğerleri. (2013) Whole-exome sequencing links caspase recruitment domain 11 (CARD11) inactivation to severe combined immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol*, 131 (5), 1376-1383.
57. Cingolani, P., Platts, A., Wang le, L., Coon, M., Nguyen, T., Wang. L. Ve diğerleri. (2012) A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w1118; iso-2; iso-3. *Fly*, 6 (2), 80-92.
58. Schuetz, C., Huck, K., Gudowius, S., Megahed, M., Feyen, O., Hubner, B. Ve diğerleri. (2008) An immunodeficiency disease with RAG mutations and granulomas. *N Engl J Med*, 8, 358 (19), 2030-2038.
59. Villa, A., Sobacchi, C., Notarangelo, L.D., Bozzi, F., Abinun, M., Abrahamsen, T.G. Ve diğerleri. (2001) V(D)J recombination defects in lymphocytes due to RAG

- mutations: severe immunodeficiency with a spectrum of clinical presentations. *Blood*, 97 (1), 81-88.
60. Vulliamy, T.J., Walne, A., Baskaradas, A., Mason, P.J., Marrone, A., Dokal I. (2005) Mutations in the reverse transcriptase component of telomerase (TERT) in patients with bone marrow failure. *Blood Cells Mol Dis*, 34 (3), 257-263.
 61. Crawford, N.P., Ziogas, A., Peel, D.J., Hess, J., Anton-Culver, H., Hunter, K.W. (2006) Germline polymorphisms in SIPA1 are associated with metastasis and other indicators of poor prognosis in breast cancer. *Breast Cancer Res*, 8 (2), R16.
 62. Samuels, M. E., Majewski, J., Alirezaie, N., Fernandez, I., Casals, F., Patey, N. (2013) Exome sequencing identifies mutations in the gene TTC7A in French-Canadian cases with hereditary multiple intestinal atresia. *J. Med. Genet*, 50, 324-329.
 63. Mukherjee, S., Thrasher, A.J. (2013) Gene therapy for PIDs: Progress, pitfalls and prospects. *Gene*, 525 (2), 174-181.
 64. Chou, J., Ohsumi, T.K., Geha, R.S. (2012) Use of whole exome and genome sequencing in the identification of genetic causes of primary immunodeficiencies. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 12 (6), 623-628.
 65. Metzker, M.L. (2010) Sequencing technologies - the next generation. *Nature Reviews Genetics*, 11 (1), 31-46.
 66. Hedges, D.J., Guettouche, T., Yang, S., Bademci, G., Diaz, A., Andersen, A. Ve diğlerleri. (2011) Comparison of three targeted enrichment strategies on the SOLiD sequencing platform. *PLoS One*, 6 (4), e18595.
 67. Verlinsky, Y., Pergament, E., Strom, C. (1990) The preimplantation genetic diagnosis of genetic diseases. *J In Vitro Fert Embryo Transf*, 7 (1), 1-5.
 68. Pihlstrøm, L., Rengmark, A., Bjørnarå, K.A., Toft M. (2014) Effective variant detection by targeted deep sequencing of DNA pools: an example from Parkinson's disease. *Ann Hum Genet*, 78 (3), 243-52.
 69. False Positives from Next-Gen Sequencing. (t.y.).Erişim: 13 Mayıs 2014, <http://massgenomics.org/2013/06/ngs-false-positives.html>

EKLER

Etik kurul



T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı : 16969557 - 477

24 Ocak 2014

ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

Toplantı Tarihi : 22.01.2014 ÇARŞAMBA
Toplantı No : 2014/02
Proje No : GO 13/511 (Değerlendirme Tarihi 08.11.2013)
Karar No : GO 13/511 - 12

Üniversitemiz Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıklar Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof.Dr.F.İlhan TEZCAN'ın sorumlu araştırmacı olduğu Prof.Dr.Özden SANAL, Prof.Dr.Kaan BOZTUĞ, Doç.Dr.Deniz Çağdaş AYVAZ ve Uzm.Bio.Baran ERMAN ile birlikte çalışacakları GO 13/511 kayıt numaralı ve "Özel Bir Grup Hastalık Olan Doğal İmmün Sistem Eksiklikleri ve CD4 Eksikliği Olan Hastaların İmmünolojik ve Genetik Özelliklerinin Belirlenmesi" başlıklı proje önerisi araştırmacının gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş olup, etik açıdan uygun bulunmuştur.

- | | |
|---|---|
| 1.Prof. Dr. Nurten Akarsu (Başkan) | 9 Prof. Dr. Melahat Görduysus (Üye) |
| İZİNLİ | |
| 2. Prof. Dr. Nüket Örnek Buken (Üye) | 10. Prof. Dr. Cansın Saçkesen (Üye) |
| 3. Prof. Dr. M. N. Karim Sara (Üye) | 11. Prof. Dr. R. Köksal Özgül (Üye) |
| 4. Prof. Dr. Sevda F. Müftüoğlu (Üye) | 12. Prof. Dr. Ayşe Lale Doğan (Üye) |
| 5. Prof. Dr. Cenk Sökmensüer (Üye) | 13 Doç. Dr. S. Kutay Demirkan (Üye) |
| İZİNLİ | |
| 6. Prof. Dr. Volga Bayrakçı Tunay (Üye) | 14. Prof. Dr. Leyla Dinç (Üye) |
| 7. Prof. Dr. Songül Vaizoğlu (Üye) | 15. Yrd. Doç. Dr. H. Hüseyin Turmagöl (Üye) |
| İZİNLİ | |
| 8. Prof. Dr. Yılmaz Selim Erdal (Üye) | 16. Av. Meltem Onurlu (Üye) |