

**TC.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOCK8 EKSİKLİĞİ OLAN HASTALARDA T HÜCRE RESEPTÖR
REPERTUVARININ YENİ NESİL DİZİLEME İLE BELİRLENMESİ**

Ceren BOZKURT

**İmmünoloji Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ANKARA
2022**

**TC.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOCK8 EKSİKLİĞİ OLAN HASTALARDA T HÜCRE RESEPTÖR
REPERTUVARININ YENİ NESİL DİZİLEME İLE BELİRLENMESİ**

Ceren BOZKURT

**İmmünoloji Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Baran ERMAN**

**ANKARA
2022**

ONAY SAYFASI

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOCK8 EKSİKLİĞİ OLAN HASTALARDA T HÜCRE RESEPTÖR REPERTUVARININ YENİ
NESİL DİZİLEME İLE BELİRLENMESİ

Öğrenci: Ceren BOZKURT

Danışman: Doç. Dr. Baran ERMAN

Bu tez çalışması 06.09.2022 tarihinde jürimiz tarafından "İmmünoloji Programı" nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Deniz ÇAĞDAŞ AYVAZ (imza)
Hacettepe Üniversitesi Çocuk Sağlığı
Ve Hastalıkları AD. /Pediatrik İmmünoloji Bölümü

Tez Danışmanı: Doç Dr. Baran ERMAN (imza)
Hacettepe Üniversitesi Çocuk Sağlığı
Ve Hastalıkları AD. /Pediatrik İmmünoloji Bölümü

Üye: Prof. Dr. Ş. Selin AYTAÇ EYÜPOĞLU (imza)
Hacettepe Üniversitesi Çocuk Sağlığı
Ve Hastalıkları AD. /Çocuk Hematoloji Bölümü

Üye: Doç. Dr. Hande CANPINAR (imza)
Hacettepe Üniversitesi Kanser Enstitüsü
Temel Onkoloji AD. /Onkoloji Bölümü

Üye: Doç. Dr. Z. Şule HASKOLOĞLU (imza)
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi / Çocuk
İmmünoloji ve Alerji Bilim Dalı

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Müge YEMİŞÇİ ÖZKAN
Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan **“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”** kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezin erişime açılması mezuniyet tarihinden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. ⁽¹⁾
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezin erişime açılması mezuniyet tarihinden itibaren ... ay ertelenmiştir. ⁽²⁾
- Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. ⁽³⁾

09 / 09 / 2022

(İmza)

Ceren BOZKURT

¹“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”

- (1) Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.
- (2) Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.
- (3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, tezin yapıldığı kurum tarafından verilir *. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlerle ilişkin gizlilik kararı ise, ilgili kurum ve kuruluşun önerisi ile enstitü veya fakültenin uygun görüşü üzerine üniversite yönetim kurulu tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir.
Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir

* Tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu tarafından karar verilir.

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Doç. Dr. Baran ERMAN danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

Ceren BOZKURT

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerini bana aktaran, çalışmaları ile bana pek çok fırsat sunan, laboratuvar ve burs desteğini bana sağlayan tez danışmanım sayın Doç. Dr. Baran Erman'a teşekkür ederim.

Bilgi birikimleri ile her zaman bizleri destekleyen, derslerde ve akademik hayatımızda biz öğrencilere ışık tutan, deneyimlerini bize aktararak yol gösteren değerli bölüm hocalarım sayın Prof. Dr. İlhan Tezcan'a, Prof. Dr. Deniz Çağdaş Ayvaz'a, Dr. Saliha Esenboğa'ya ve Dr. Sevil Oskay Halaçlı'ya, tez süresince her sorumda bana yardımcı olan sayın Hacer Neslihan Bildik'e, Pınar Özge Aydın'a ve Öznur Akbal'a teşekkür ederim.

Tez çalışmamı gerçekleştirebilmem için bana hasta örneklerini sağlayan sayın Prof. Dr. Aydan İkinciogulları'na, Prof. Dr. Ayşe Metin'e, Doç. Dr. Şule Haskoloğlu'na, Prof. Dr. Figen Doğu'ya ve Prof. Dr. Safa Barış'a teşekkür ederim.

Yüksek lisansa başladığım günden beri varlıkları, dostlukları, bilgileri ve heyecanları ile bana her zaman destek olan, her sorumda yanımda olan, tüm stresimi saygıyla ve sevgiyle göğüsleyen dostlarım ve yüksek lisans arkadaşlarım Sidem Didar Tekeoğlu ve Dilan İnan'a çok teşekkür ederim.

Son olarak hayatta her zaman desteğini arkamda hissettiğim, her mutluluğumu ve üzüntümü paylaşabildiğim, eğitimimi ve kararlarımı hep destekleyen, okumam için sonsuz emek gösteren, çok mutlu bir hayat yaşamamı sağlayan canım ablam Bahar Bozkurt'a, annem Ayşe Bozkurt'a ve babam Halil Bozkurt'a sonsuz teşekkür ederim. Bu tez çalışmasını onlara ithaf ediyorum.

Bu tez çalışması Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÖZET	ix
ABSTRACT	x
SİMGELER VE KISALTMALAR	xi
ŞEKİLLER	xiii
TABLolar	xv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Primer İmmün Yetmezlikler	2
2.1.1. Kombine İmmün Yetmezlikler	3
2.1.2. DOCK8 Molekülü ve Eksikliği	3
2.2. İmmün Sistem ve T Hücre Yanıtı	5
2.3. Lenfosit Gelişimi	7
2.3.1. Antijen Reseptörlerinin Yapısı ve Genleri	9
2.3.2. Lenfositlerin Olgunlaşma Basamaklarında Seçilim Aşaması	11
2.3.3. V(D)J Rekombinasyonu	14
2.3.4. T Lenfosit Çeşitliliğinin Oluşması	17
2.3.5. T lenfositlerin Timus Olgunlaşma Basamakları	18
2.4. İmmün Repertuar Çalışmaları	19
3. GEREÇ VE YÖNTEM	22
3.1. Hastalar	22
3.2. Yöntemler	22
3.2.1. PBMC İzolasyonu	22
3.2.2. CD4+ / CD8+ T Hücre İzolasyonu	23
3.2.3. RNA İzolasyonu	24
3.2.4. RNA Konsantrasyonu Ölçümü	24
3.2.5. TCR β Amplifikasyonu	24
3.2.6. Biyoinformatik ve İstatistiksel Analizler	26

4. BULGULAR	28
4.1. Hastaların Klinik ve Laboratuvar Özellikleri	28
4.1.1. Hasta 1	31
4.1.2. Hasta 2	31
4.1.3. Hasta 3	31
4.1.4. Hasta 4	32
4.1.5. Hasta 5	32
4.1.6. Hasta 6	32
4.2. TCR Repertuar Analizleri	32
4.3. CD4+ T Hücre Sonuçları	33
4.3.1. TRB Repertuar Çeşitliliği	33
4.3.2. CD4+ T Hücrelerde V Zincirini Kodlayan Genlerin Kullanımı (<i>Gene Usage</i>)	35
4.4. CD8+ T Hücre Sonuçları	46
4.4.1. TRB Repertuar Çeşitliliği	46
4.4.2. CD8+ T Hücrelerde V Zincirini Kodlayan Genlerin Kullanımı (<i>Gene Usage</i>)	48
5. TARTIŞMA	61
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	65
7. KAYNAKLAR	67
8. EKLER	
EK-1: Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzni	
EK-2: Yüksek Lisans Tez Çalışması Orijinallik Raporu Ekran Görüntüsü	
EK-3: Orijinallik Dijital Makbuz	
9. ÖZGEÇMİŞ	

ÖZET

Bozkurt, C. DOCK8 Eksikliği Olan Hastalarda T Hücre Reseptör Repertuarının Yeni Nesil Dizileme ile Belirlenmesi. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü İmmünoloji Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2022. Primer immün yetmezliklerde immün repertuarın tanımlanması ve adaptif immün yanıtların karakterizasyonu hastalıklara yaklaşım ve hastalıkların değerlendirilmesi açısından önemlidir. İmmün repertuarın oluşumunda en önemli faktörlerden biri V(D)J rekombinasyonudur. T hücre reseptörünü oluşturan V (*variable*), D (*diversity*) ve J (*joining*) genlerinin rekombinasyonu sonucu oluşan çeşitlilik, farklı antijenlere bağlanmadaki en önemli bölge olan CDR3 (*complementarity determining region 3*) bölgesi, yeni nesil dizileme teknolojileri ve biyoinformatik programları kullanılarak araştırılabilmektedir. Bu çalışmada, DOCK8 eksikliği tanısı almış hastalarda T hücre reseptör repertuarı araştırılmıştır. Öncelikle hastalardan lenfosit izolasyonu gerçekleştirildi. Lenfositlerden, manyetik negatif seperasyon yöntemi ile, CD4+ ve CD8+ T hücreler izole edildi. Elde edilen CD4+ ve CD8+ T hücrelerden total RNA izolasyonu yapıldı, konsantrasyon ölçümü ile total RNA miktarları kaydedildi. SMARTer teknolojisi ile TRB zincir amplifikasyonu gerçekleştirildi. Elde edilen diziler Illumina Miseq kullanılarak dizilendi. Çıkan sonuçların biyoinformatik ve istatistik analizleri Cogent, Immunarch ve IMGTools programları aracılığı ile yapıldı. Hastaların ve kontrollerin CD4+ T hücre repertuar çeşitliliği ve eşsiz klonotip sayıları arasında anlamlı farklılık elde edilmedi. Hastaların CD4+ T hücre V-J gen kullanımlarının kontrollerden farklı profilde olduğu görüldü. Hastaların CD8+ T hücre repertuar çeşitliliği ve eşsiz klonotip sayılarında kontrole oranla belirgin düşüklük saptandı. Hastaların CD8+ T hücrelerinde farklı V-J genlerinin kullanım frekanslarının kontrole oranla belirgin olarak düşük olduğu gözlemlendi. CD8+ T hücrelerin CDR3 uzunluklarının dağılımının CD4+ T hücelere oranla düşük olduğu sonucu elde edildi. Elde edilen sonuçlarda DOCK8 eksikliği olan hastaların CD8+ T hücre repertuarlarının belirgin şekilde etkilenmesi, DOCK8 mutasyonlarının CD4+ ve CD8+ hücre repertuarının oluşumunda etkisi olabileceğine ve DOCK8 proteininin hücre farklılaşmasında rolü olabileceğine dair ipuçları vermektedir. Bu çalışma, DOCK8 eksikliğinde görülen hücre içi patojenlere ve kutanöz enfeksiyonlara yatkınlığın, CD8+ T hücre repertuarının etkilenmesi sebebiyle oluşabileceğine dair fikir vermektedir.

Anahtar Kelimeler: DOCK8 Eksikliği, Yeni Nesil Dizileme, TCR Repertuarı

ABSTRACT

Bozkurt, C. Characterization of T Cell Receptor Repertoire in Patients with DOCK8 Deficiency by Next-Generation Sequencing. Hacettepe University, Graduate School of Health Sciences, Immunology Program, Master's Thesis, Ankara, 2022. Identification of immune repertoire is crucial to characterize adaptive immune responses in terms of disease approach. V(D)J recombination is one of the most crucial factors in the development of the immune repertoire. The repertoire diversity that results from V (variable), D (diversity), and J (joining) genes and the structure of CDR3 (*complementarity determining region 3*) can be investigated by using next-generation sequencing (NGS) technologies and bioinformatics softwares. In this study, the T cell receptor (TCR) repertoire was evaluated in patients with DOCK8 deficiency. First, lymphocyte isolation was performed from the patients. By using magnetic negative separation technique, CD4⁺ and CD8⁺ T cells were separated from lymphocytes. Total RNA was extracted from the collected CD4⁺ and CD8⁺ T cells, and total RNA concentration were determined. TCR β chain amplification was performed with SMARTer technology. The TCR region was sequenced by Illumina Miseq. Bioinformatics and statistical analyzes of the results were carried out by using Cogent, Immunarch and IMGT softwares. The results showed that there was no significant difference between the CD4⁺ T cell repertoire diversity and unique clonotype numbers of patients and controls. It was observed that CD4⁺ T cell V-J gene usage of the patients was different than the controls. The patients' CD8⁺ T cell repertoire richness and number of distinct clonotypes were considerably lower than those of the control group. It was observed that the frequency of the usage of diverse V-J genes in CD8⁺ T cells of the patients was significantly lower than in the control. It was revealed that the distribution of CDR3 lengths of CD8⁺ T cells was lower than those of CD4⁺ T cells. The results showed that patients with DOCK8 deficiency have drastically altered CD8⁺ T cell repertoires, which suggests that DOCK8 mutations may affect how CD4⁺ and CD8⁺ cell repertoires are generated. DOCK8 protein may be thought to play a key role in the differentiation. This study indicates that the skewed CD8⁺ T cell repertoire may influence the susceptibility to infections by intracellular pathogens and cutaneous infections observed in DOCK8 deficiency.

Keywords: DOCK8 deficiency, next generation sequencing, TCR repertoire

SİMGELER VE KISALTMALAR

APC	Antigen Presenting Cell
AR-HIES	Autosomal Recessive Hyper IgE Syndrome
AT	Ataxia Talangiectasia
BCR	B Cell Receptor
CD	Cluster of Differentiation
CDC	Cell Division Cycle
CDR	Complementarity Determining Region
CVID	Common Variable Immunodeficiency
DAMP	Damage Associated Molecular Pattern
DNA	Deoxyribonucleic Acid
DOCK	Dedicator of Cytokinesis
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
GEF	Guanine Exchange Factor
HV	Hyper Variable
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule
Ig	İmmunoglobulin
IUIS	International Union of Immunological Societies
KİY	Kombine İmmün Yetmezlik
MHC	Major Histocompatibility Complex
NGS	Next Generation Sequencing
NHEJ	Non-Homologous End Joining
NK	Natural Killer
PAMP	Pathogen associated Molecular Pattern
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PİY	Primer İmmün Yetmezlik
RACE	Rapid Amplification of cDNA Ends

RAG	Recombination Activation Gene
RNA	Ribonucleic Acid
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RSS	Recombination Signal Sequences
SCID	Severe Combined Immunodeficiency
TCR	T Cell Receptor
Tdt	Terminal Deoxynucleotidyl Transferase
TLR	Toll-Like Receptor
TRA	T Cell Receptor Alpha Locus
TRB	T Cell Receptor Beta Locus
UMI	Unique Molecular Identifier
ÜSYE	Üst Solunum Yolu Enfeksiyonu

ŞEKİLLER

2.1.	DOCK8 molekülü'nün TCR aracılı düzenleyici aktivitesi	4
2.2.	Kök hücrelerden lenfositlerin oluşumunu gösteren olgunlaşma basamakları	8
2.3.	Lenfoid öncüllerden farklı transkripsiyon faktörleri aracılı lenfosit soylarının oluşumu	9
2.4.	T hücre reseptör yapılarının çeşitlilik sağlayıcı bölgelerini gösteren X-ray kristal görüntüsü	10
2.5.	T lenfositlerin MHC sınıf I ve MHC sınıf II molekülleri ile etkileşimi	11
2.6.	T lenfositlerin olgunlaşma basamaklarında seleksiyon aşamaları	13
2.7.	Rekombinasyon sinyal dizileri	14
2.8.	Rekombinasyon sinyal dizilerinin 12 baz çiftlik boşluk ve 23 baz çiftlik boşluk yapıları	15
2.9.	RAG enzimlerinin RSS'ler ile etkileşimi	16
2.10.	Kesilen ve stabil hale getirilen DNA'nın <i>coding joints</i> ve <i>signal joints</i> kısımları	16
2.11.	DNA'nın kesilmesi ve onarılması aşamaları	16
2.12.	T hücrelerin timustaki gelişim basamakları	19
3.1.	PBMC İzolasyonu	23
3.3.	SMARTer Human TCR a/b Profiling Kit V2 PCR çalışma prensibi	26
4.1.	CD4+ T hücrelerin TCR β zincirinin çeşitliliği.	34
4.2.	CD4+ T hücrelerin TCR β zincirinin CDR3 bölgelerinin nükleotit ve aminoasit uzunlukları.	35
4.3.	1 numaralı hastanın CD4+ T hücre reseptörlerinin V-J zincirlerini kodlayan genleri.	37
4.4.	2 numaralı hastanın CD4+ T hücre reseptörlerinin V-J zincirlerini kodlayan genleri.	39
4.5.	3 numaralı hastanın CD4+ T hücre reseptörlerinin V-J zincirlerini kodlayan genleri.	41
4.6.	4 numaralı hastanın CD4+ T hücre reseptörlerinin V-J zincirlerini kodlayan genleri.	43
4.7.	5 numaralı hastanın CD4+ T hücre reseptörlerinin V-J zincirlerini kodlayan genleri.	45

4.8.	CD8+ T hücrelerin TCR β zincirinin çeşitliliği.	47
4.9.	CD8+ T hücrelerin TCR β zincirinin CDR3 bölgelerinin nükleotit ve aminoasit uzunlukları.	48
4.10.	1 numaralı hastanın CD8+ T hücre reseptörlerinin V-J zincirlerini kodlayan genleri.	51
4.11.	2 numaralı hastanın CD8+ T hücre reseptörlerinin V-J zincirlerini kodlayan genleri.	53
4.12.	3 numaralı hastanın CD8+ T hücre reseptörlerinin V-J zincirlerini kodlayan genleri.	55
4.13.	4 numaralı hastanın CD8+ T hücre reseptörlerinin V-J zincirlerini kodlayan genleri.	57
4.14.	5 numaralı hastanın CD8+ T hücre reseptörlerinin V-J zincirlerini kodlayan genleri.	59
4.15.	6 numaralı hastanın CD8+ T hücre reseptörlerinin V zincirini kodlayan genleri.	60

TABLÖLAR

2.1. V, D ve J gen segmentlerinin insan lokuslarındaki sayıları	17
4.1. Hastaların bilgileri ve geçirdiği enfeksiyonlar.	28
4.2. Tam kan test sonucu.	29
4.3. Lenfosit alt grupları.	30
4.4. Hastaların genetik test sonucu.	31

1. GİRİŞ

Primer immün yetmezlikler (PİY), immün sistem komponentlerinde görülen bozukluklar sonucu ortaya çıkan, enfeksiyonlara yatkınlık, otoimmünite ve malignansi gibi geniş bir klinik spektrumda gözlenen nadir hastalık grubudur. DOCK8 eksikliği, ciltte ve solunum yollarında tekrarlayan viral enfeksiyonlar ile karakterize bir primer immün yetmezlik hastalığıdır. DOCK8 eksikliği atopi, otoimmünite ve bazı kanser türlerine yatkınlık gibi geniş bir klinik spektruma sahiptir ve çoğunlukla hayatı tehdit eden bulgular ile karşımıza çıkmaktadır. 9. Kromozomdaki *DOCK8* geni tarafından kodlanan DOCK8 proteini, lenfositlerde yüksek oranda ifade edilen, aktin hücre iskeletinin düzenlenmesinde rol oynayan bir guanin nükleotid değişim faktörüdür ve birçok önemli hücresel aşamada görev almaktadır. *DOCK8* geninde görülen fonksiyon kaybı mutasyonları DOCK8 eksikliği ile sonuçlanmaktadır.

Adaptif immün sistemin efektör elemanları olan T hücreler, çok sayıda farklı antijeni tanımak üzere özelleşmiş T hücre reseptörü taşırlar. T hücre antijen reseptörlerinin farklı antijenleri tanınması olgusu, T lenfosit repertuarı olarak adlandırılmaktadır. T lenfosit repertuarının çeşitliliği, farklı antijenlere verilecek adaptif yanıtı belirlemektedir. T hücre antijen reseptörlerinin farklı antijenleri tanınması için özelleşmiş değişken (*variable*) bölgeleri ve her antijen reseptörü için aynı olan sabit (*constant*) bölgeleri vardır. Değişken bölgelerin farklılığı, farklı antijenleri tanıma yeteneği ile ilişkilidir. T hücrelerin çeşitli antijen reseptörleri, *variable* (V), *diversity* (D) ve *joining* (J) gen segmentlerinin yeniden düzenlenmesiyle oluşur. Bu özelleşmiş süreç, V(D)J rekombinasyonu olarak adlandırılmaktadır [1].

Primer immün yetmezliklerde immün repertuarın belirlenmesi, adaptif immün yanıtın karakterizasyonu için önemlidir. Bu kapsamda çeşitli immün yetmezlik gruplarında immün repertuar çalışmasının yapılması, sistematik bir değerlendirme yapılabilmesi açısından gereklidir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Primer İmmün Yetmezlikler

Primer immün yetmezlikler, enfeksiyonlara yatkınlık, immün disregülasyon ve malignite gibi geniş bir spektrumda karşımıza çıkan genetik hastalıklardır. Hastalığa yol açan moleküler defektler, immün sistemin gelişimi ya da fonksiyonları ile ilişkili genlerde yer almaktadır. Sorumlu gendeki hastalık yapıcı mutasyonla birlikte hastanın genetik kompozisyonu PİY'de çok çeşitli fenotiplerin ortaya çıkmasına sebep olmaktadır. Bu geniş fenotipik spektrumda enfeksiyonlara yatkınlık, otoimmünite, inflamasyon, alerji ve malignansi karşımıza çıkabilir. Gastrointestinal bozukluklar, hematolojik hastalıklar, otoimmün/otoinflamatuvar durumlar, atopi veya malignite gibi enfeksiyöz olmayan belirtiler, altta yatan immün yetmezliği olan bazı hastalarda, baskın klinik tablolar olabilir [2].

Farklı immün yetmezlikler, klinik sunumlarında birbiriyle örtüşen özellikler gösterebilmektedir. Aynı genetik defektler farklı klinik bulgulara sebep olabileceği gibi, benzer fenotipik bulgular farklı genetik defektler kaynaklı da ortaya çıkabilmektedir. [3] Günümüze kadar primer immün yetmezliklere neden olan 470'ten fazla genetik etiyoloji tanımlanmıştır [4]. Primer immün yetmezliklerin genetik etiyolojilerinin geniş spektrum göstermesi ve klinik sunumlarının çok çeşitli olabilmesi sebebiyle, immün yetmezliklerin sınıflandırılması oldukça önemlidir. PİY sınıflandırılması zaman içinde fenotiplere göre ve genetik defektlere göre değişiklik göstermiştir. IUIS (*International Union of Immunological Societies*) PİY sınıflandırması 10 ana kategoride değerlendirilmektedir. Sınıflandırma aşağıda verildiği gibidir:

- I- Kombine hücresel ve hüморal immün yetmezlikler
- II- Eşlik eden başka bulguları veya sendromik özellikleri olan kombine immün yetmezlikler
- III- Antikor eksiklikleri
- IV- İmmün disregülasyon hastalıkları

- V- Fagositer hücrelerin sayısal ve fonksiyonel bozuklukları
- VI- İntrinsik ve doğal immün sistem eksiklikleri
- VII- Otoinflamatuvar hastalıklar
- VIII- Kompleman eksikliği
- IX- Kemik iliği yetersizliği
- X- Primer immün yetersizliklerin fenokopileri

2.1.1. Kombine İmmün Yetmezlikler

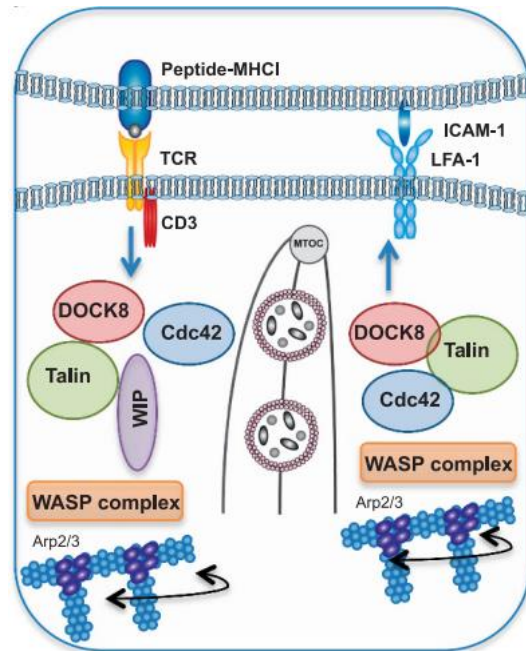
Kombine immün yetmezlikler (KİY), hem hümorale hem de hücresele bağışıklığı etkileyen genetik defektler sonucu ortaya çıkan PİY alt grubudur. Hümorale ve hücre aracılı bağışıklığın kombine eksiklikleri, immün yetmezliklerin en ciddi olanlarıdır. Kombine immün yetmezliklerin geniş alt grubunu oluşturan en ağır formu, ağır kombine immün yetmezlik (*SCID-severe combined immunodeficiency*) olarak adlandırılmaktadır.

2.1.2 DOCK8 Molekülü ve Eksikliği

Dedicator of Cytokinesis 8 (DOCK8) eksikliği kombine bir immün yetmezlik olup tekrarlayan enfeksiyonlar, alerji, atopi ve malignansi gibi geniş bir PİY kliniği ile karşımıza çıkmaktadır. DOCK8 eksikliği ilk olarak 2009 yılında, Otozomal Resesif Hiper IgE Sendromlu (AR-HIES) 21 hastada AR-HIES'in etiyolojisinde tanımlanmıştır [5].

DOCK8 proteini, aktin hücre iskeletinin düzenlenmesinde görev alan guanin değişim faktörlerinin (*GEF-guanine exchange factor*) DOCK süper ailesine aittir [6]. DOCK8 proteini, adaptif immün sistemde pek çok farklı mekanizmada görev almaktadır. DOCK8, CDC42 (cell division cycle 42) molekülü ile etkileşerek aktin polimerizasyonu ve hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesi gibi önemli hücresele mekanizmaların regülasyonunda görev almaktadır. GEF aktivitesi gösteren DOCK8, CDC42 molekülünün aktif hale gelmesini sağlamaktadır. Aynı zamanda, immün

sinaps oluşumu, immün hücrelerin trafiği, polarizasyon, sitokin üretimi ve immün hücrelerin yaşamsal devamlılığı açısından kritik öneme sahiptir. Aktin hücre iskeletini düzenleyerek adezyon moleküllerinin ve sitotoksik granüllerin immün sinapsta toplanmasını kolaylaştırmaktadır (Şekil 2.1) [7]. DOCK8 eksikliği olan hastalarda bu etkileşimlerin eksikliği sebebiyle B, T ve NKT (*natural killer T*) hücrelerin sağ kalımının ve uzun ömürlü hafıza hücre yanıtının bozulması gibi durumlar gözlemlenebilmektedir [8]. DOCK8 eksikliği olan T ve NK hücreler, sitotripsis olarak adlandırılan bir hücre ölüm mekanizmasına girerler. Dokular arası geçiş sırasında gerçekleşen bu hücre ölüm mekanizması, özellikle deri gibi sınırlı dokularda gerçekleştiği için DOCK8 eksikliği görülen hastalarda herpetik viral cilt enfeksiyonlarına yatkınlık gözlemlenmektedir [8]. DOCK8 molekülü aynı zamanda ICAM (*intercellular adhesion molecule*) aracılı hücreler arası bağlantıda ve TLR-9 (*toll-like receptor 9*) aracılı B hücre sinyalleşmesinde görev alarak humoral immüniteyi düzenlemektedir. DOCK8 eksikliğinde antikor üretimi ve bellek B hücre oluşumu gibi humoral süreçlerde bozukluk gözlemlenebilmektedir [9].



(DOCK8 Regulates Signal Transduction Events to Control Immunity, Conor J Kearney et al., 2017)

Şekil 2.1. DOCK8 molekülü'nün TCR aracılı düzenleyici aktivitesi

DOCK8 geninde meydana gelen fonksiyon kaybı mutasyonları, *DOCK8* eksikliğine sebep olmaktadır. *DOCK8* eksikliği olan hastalar, genellikle solunum yolu enfeksiyonları, egzema, hipereozinofili, yüksek serum IgE (immunoglobulin E)

seviyesi ve tekrarlayan bakteriyel, fungal ve viral enfeksiyonlarla karşımıza çıkmaktadır. DOCK8 eksikliği görülen hastalarda çoğunlukla ağır, kalıcı ve tedaviye direnç gösterebilen, Varicella zoster, Molluscum contagiosum, Herpes simplex ve Human Papilloma virüsleri dahil kutanöz viral enfeksiyonlar gözlemlenmektedir [7].

Hastalığın tanısında, klinik bulgular ve laboratuvar bulguları değerlendirilmekte ve genetik analiz yapılmaktadır. Tekrarlayan enfeksiyon, otoimmünite ve malignensi görülen hastalarda atopik hastalıklar da sorgulanmalı ve bu hastalar DOCK8 eksikliği açısından değerlendirilmelidir. Eozinofili ve yüksek serum IgE seviyesi DOCK8 eksikliğinin laboratuvar bulguları arasında olduğu için bu durumlar dikkate alınmalıdır. DOCK8 protein ifadesi western blot ya da akım sitometrisi yöntemleri ile değerlendirilebilmektedir.

2.2. İmmün Sistem ve T Hücre Yanıtı

İmmünite terimi bilimsel olarak, enfeksiyonlardan korunma anlamına gelmektedir. İmmün sistem, diğer adıyla bağışıklık sistemi, vücuda saldıran ve organizmayı tehlikeye atabilecek yapıları tanıyabilen, bu yapılara saldırabilen ve yok edebilen hücrelerden, dokulardan ve çözünür vaziyette işlev gören ürünlerden oluşan bir sistemdir [1]. İmmün sistem elemanlarının enfeksiyonlara verdiği yanıt immün yanıt olarak adlandırılmaktadır. Yirminci yüzyılın başlarında bağışıklık yanıtının altında yatan mekanizmalar, hücre aracılı immün yanıt ve humoral yanıt olmak üzere iki gruba ayrılmıştır [10].

Vücuda giren mikroplara ve yabancı maddelere karşı immün sistem, doğal bağışıklık ve edinsel (adaptif) bağışıklık olmak üzere iki temel yolla yanıt vermektedir. Doğal bağışıklık, enfeksiyondan sonraki birkaç saat içinde hızlı bir yanıt verebilmektedir. İstilacı patojenlere karşı vücut savunmasının erken aşamaları, doğal bağışıklık elemanları tarafından oluşturulur. Doğal bağışıklığı oluşturan elemanlar fagositer hücreler, kompleman sistemi proteinleri, sitokinler, epitel doku, fiziksel ve kimyasal bariyerlerdir [1]. Doğal bağışıklık, mikroorganizmalar üzerinde bulunan özelleşmiş yapıları (PAMP-*pathogen associated molecular patterns*) ve hasarlı doku hücrelerinde bulunan yapıları (DAMP-*damage associated molecular patterns*)

tanyarak yanıt vermektedir [1]. Bu yapılar, motif tanıyıcı reseptörler (*PRR-pattern-recognition receptor*) tarafından algılanmakta ve immün cevap oluşturulmaktadır.

Edinsel bağışıklık doğal bağışıklığa göre, antijenlere daha spesifik ve güçlü yanıt verebilmektedir. Adaptif bağışıklık, antijen adı verilen pek çok sayıda yabancı ajanı tanıyabilen ve bu ajana tepki verebilen bir yanıt oluşturur. Adaptif bağışıklık tepkisini, lenfosit adı verilen hücreler oluşturmaktadır. Farklı immün yanıt oluşturan iki temel lenfosit popülasyonu B ve T lenfositler, çok sayıda antijeni tanıyabilen çeşitli reseptörleri üzerinde bulundurmaktadır [1]. Reseptörlerin tanıyabildiği antijenler protein, polisakkarit, lipid ya da nükleik asit formda olabilmektedir. Adaptif immün sistem, bu antijenlere karşı hümmoral ya da hücre temelli yanıt verebilmektedir.

Adaptif immüitenin hümmoral yanıtı, kandaki çözünür moleküller, mukozal salgılar ve B lenfositler tarafından üretilen antikorlar aracılığıyla verilmektedir. Antikorlar, mikrobiyal ajanları tanıyabilir, nötralize edebilir ve fagositler ve kompleman sistemi elemanları tarafından elimine edilmek üzere hedef haline getirebilirler [1]. Adaptif immüitenin hücre aracılı yanıtlarını T lenfositler vermektedir. T lenfositler, ürettikleri sitokinler aracılığıyla, immün sistemin efektör elemanları olan fagositer hücreleri uyarabilmekte ya da doğrudan T hücre yanıtı oluşturabilmektedir.

Adaptif immün yanıt sırasında, antijenlerin yakalanmasını ve lenfositlerin aktivasyonunu içeren bir dizi olay gerçekleşmektedir. Epitel bariyerlerden giren antijenlere ve mikroplara karşı adaptif yanıt, ikincil lenfoid organlarda oluşmaktadır [1]. Bu antijenlerin lenfositlere sunulması görevini üstlenen özelleşmiş antijen sunucu hücreler (*APC-antigen presenting cells*) bulunmaktadır. Özelleşmiş antijen sunucu hücreler, antijenleri yakalayarak naif T hücrelere sunarlar ve adaptif yanıtı tetikleyebilirler. APC tarafından sunulan antijenin tanınması sonucunda T hücre yanıtı oluşmaktadır. Bu işlem T hücre yüzeyinde bulunan T hücre reseptör kompleks yapıları aracılığıyla gerçekleştirilmektedir. Antijenin lenfositlere sunumu sonucunda yaşam sinyali alan lenfositler aktif hale gelmektedir. Aktif hale gelen lenfositlerin çoğalması ve klonal olarak genişlemesi gerçekleşmektedir. Enfeksiyon ortadan kalktıktan sonra, lenfosit aktivasyonu için gerekli olan sinyaller azalır, efektör hücrelerin çoğu ortadan

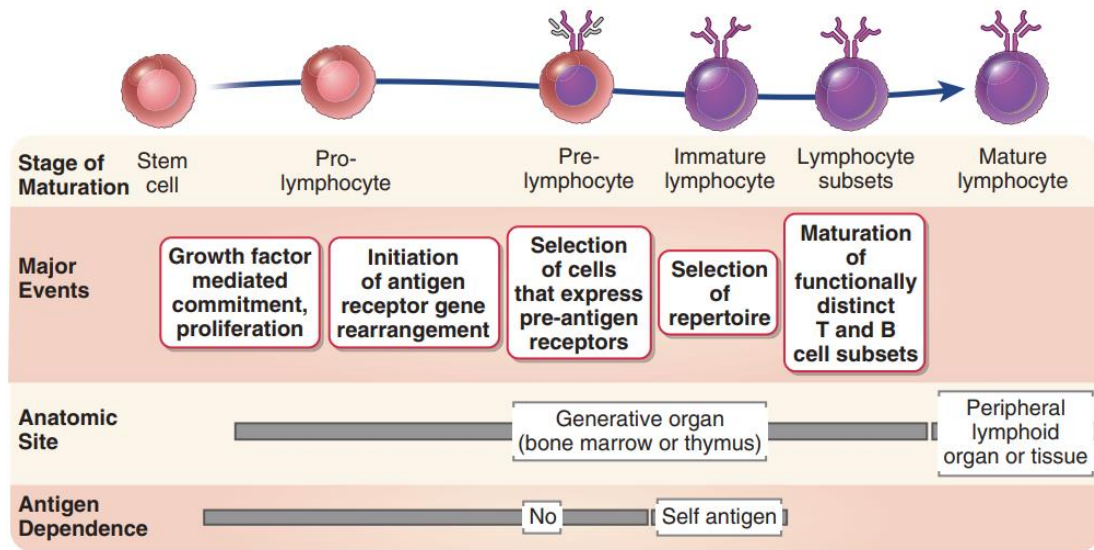
kaldırılır ve immün yanıt azalır [1]. Bu olgu immün homeostaz olarak adlandırılmaktadır.

2.3. Lenfosit Gelişimi

T ve B hücrelerinin timus ve kemik iliğinde olgunlaşmaları sırasında, reseptör çeşitliliğini oluşturan olaylar meydana gelmektedir. Lenfosit öncüllerinin primer lenfoid organlarda, olgunlaşmış lenfositlere farklılaşması, lenfosit matürasyonu olarak adlandırılmaktadır [1]. Lenfosit matürasyonu sırasında meydana gelen olaylar başlıca aşağıda verildiği gibidir:

- Öncül hücrelerin T lenfoid ya da B lenfoid soyuna farklılaşmalarının belirlenmesi
- Lenfosit öncüllerinin çoğalarak erken gelişim süreçlerine girmesi
- Antijen reseptör genlerinin yeniden düzenlenmesi ve reseptör proteinlerinin oluşumu
- İşlevsel olan ve olmayan hücrelerin seçilimi
- B ve T hücre alt gruplarına farklılaşma

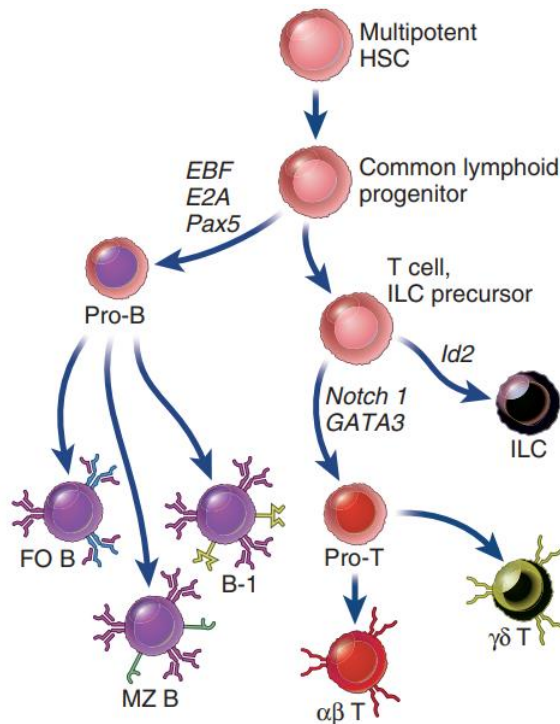
Fetal karaciğer ve kemik iliğinde üretilen hematopoetik kök hücreler (HSCs- *hematopoetic stem cells*), lenfositler de dâhil olmak üzere tüm kan hücrelerinin soylarını oluşturabilmektedir. T lenfosit öncülleri, kemik iliğinde üretilmekte ve olgunlaşma basamaklarını timusta tamamlamaktadır (Şekil 2.2).



(Abbas, A., Lichtman, A., Pillai, S. (2018). *Cellular and Molecular Immunology*)

Şekil 2.2. Kök hücrelerden lenfositlerin oluşumunu gösteren olgunlaşma basamakları

Multipotent hematopoetik kök hücrelerden lenfoid öncülleri üretilmektedir. Bu öncül hücrelerinin, belirli hücreyel sinyaller aracılığıyla T hücre soyuna doğru gelişimi gerçekleşmektedir. Farklı transkripsiyon faktörleri, lenfoid öncüllerden B ve T hücre soylarının gelişimini yönlendirmektedir (Şekil 2.3).



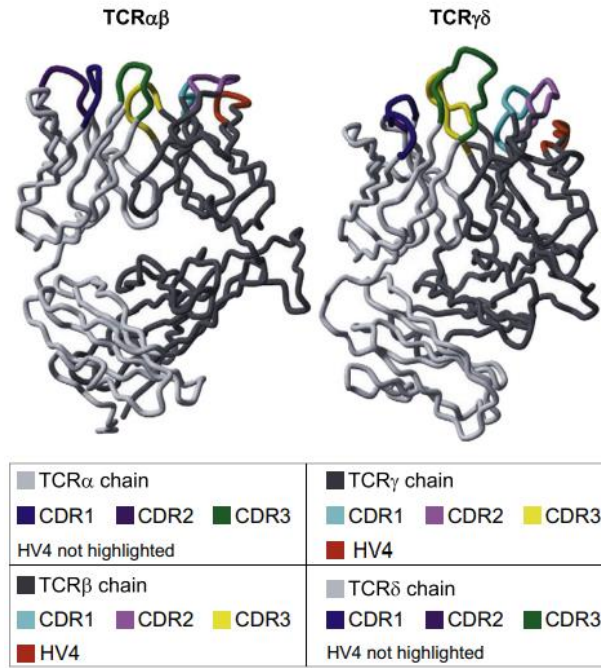
(Abbas, A., Lichtman, A., Pillai, S. (2018). *Cellular and Molecular Immunology*)

Şekil 2.3. Lenfoid öncüllerden farklı transkripsiyon faktörleri aracılı lenfosit soylarının oluşumu

2.3.1. Antijen Reseptörlerinin Yapısı ve Genleri

Lenfositler çok sayıda çeşitli antijeni tanıyabilen reseptörlere sahiptir. Bu çeşitlilik T ve B lenfositlerin kemik iliği ve timusta olgunlaşmaları sırasında gerçekleşmektedir. T lenfosit üzerinde bulunan özelleşmiş T hücre reseptör yapıları, antijenlerin tanınmasından sorumludur. T hücre reseptörleri, tüm olgunlaşmış T hücrelerin yüzeyinde bulunmaktadır. Antijenlerin T lenfositlere sunulması, antijen sunucu konak hücre yüzeyindeki MHC (*major histocompatibility complex*) molekülleri aracılığıyla yapılır. Antijenik yapıyı gösteren MHC molekülü T hücre reseptörü ile etkileşime geçerek antijen sunumunu gerçekleştirir.

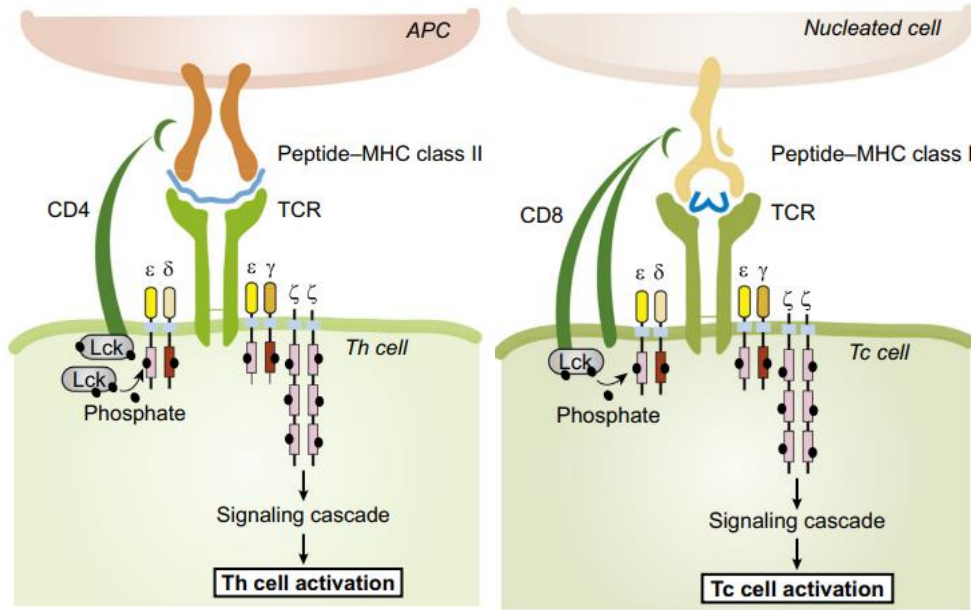
T hücre reseptörü, tek bir antijen bağlanma bölgesine sahip heterodimerik bir glikoproteindir [1]. TCR $\alpha\beta$, birbirlerine disülfid bağlarıyla bağlı α ve β zincirinden, TCR $\gamma\delta$, yine birbirine disülfid bağları ile bağlı γ ve δ zincirinden oluşmaktadır. Her T hücre reseptör zinciri, V (*variable*) olarak ifade edilen değişken ve C (*constant*) olarak ifade edilen sabit bölge içermektedir. Antijen bağlanma bölgesi olan V bölgesi, her iki T hücre reseptör polipeptidinin N-terminal uçlarından oluşur. Antijen bağlanma bölgesindeki aminoasitler hem sunulan antijen ile hem de antijenin bağlı olduğu MHC molekülü ile temas kurmaktadır. T hücre reseptörünün V bölgesi, aminoasit çeşitliliğinin görüldüğü gölgeler içermektedir. Bu bölgeler, tamamlayıcılık belirleyici (*complementarity determining*) CDR1, CDR2 ve CDR3, hiper değişken (*hyper variable*) HV4 olarak adlandırılır. [10] CDR3 bölgesi en polimorfik bölge olarak ifade edilir ve TCR yapısındaki en büyük çeşitliliği sağlayan bölge CDR3 bölgesi olarak tanımlanmaktadır (Şekil 2.4). TCR molekülünün sitoplazmik kuyruğu yeterli uzunlukta olmadığı için sinyal transdüksiyonu işlevini CD3 kompleksiyle birlikte çalışarak gerçekleştirir [10]. CD3 kompleksinin iki temel görevi vardır. Birinci görevi hücre içi sinyalizasyonu sağlamaktır. İkinci görevi, TCR molekülünün yüzeyde ifade edilmesini sağlamaktır. T hücrelerde bulunan CD4 ve CD8 ko-reseptör yapıları, MHC moleküllerinin polimorfik olmayan bölgelerine bağlanarak TCR sinyalizasyonunu kolaylaştırır [1].



(Mak T.W., Saunders M.E., Jett B.D., 2014. *Primer to the Immune Response*)

Şekil 2.4. T hücre reseptör yapılarının çeşitlilik sağlayıcı bölgelerini gösteren X-ray kristal görüntüsü

CD4 ifade eden T lenfositler sınıf II MHC molekülleri ile etkileşime girebilirken, CD8 ifade eden T lenfositler sınıf I MHC molekülleri ile etkileşime girmektedir (Şekil 2.5). Bir TCR molekülü peptid bağlı MHC molekülü ile etkileşime geçtikten sonra, çoğalması ve yaşamsal devamlılığı için bir dizi sinyal almaktadır. Bu sinyali alan T hücre, klon oluşturmaya başlar. Oluşan T hücre klonu, gerekli immünolojik yanıtın oluşmasını sağlamaktadır.



(Mak T.W., Saunders M.E., Jett B.D., 2014. *Primer to the Immune Response*)

Şekil 2.5. T lenfositlerin MHC sınıf I ve MHC sınıf II molekülleri ile etkileşimi

2.3.2. Lenfositlerin Olgunlaşma Basamaklarında Seçilim Aşaması

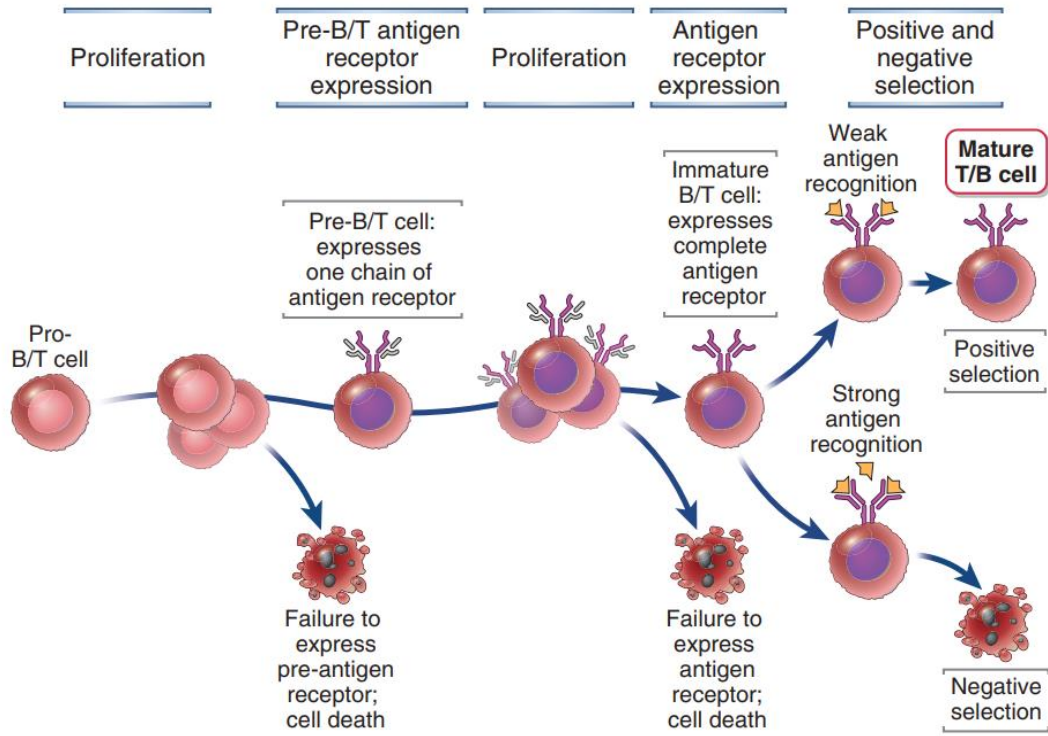
Lenfositlerin gelişim aşaması çok sayıda kontrol noktası içermektedir. Bu kontrol noktalarından ilki, pre-antijen reseptörünün oluşmasıdır. İkinci kontrol noktası, pre-antijen reseptörünü başarılı bir şekilde oluşturan lenfositlerin, tamamlanmış reseptör yapısını ifade etmesidir. Üçüncü kontrol aşaması, tam bir reseptör yapısını ifade eden lenfositlerin kendi antijenine karşı verdiği yanıtı göre seçilime uğramasıdır.

İlk kontrol noktasında oluşumu gerçekleşen pre-antijen reseptörleri, oluşan lenfositlerin hayatta kalması, proliferasyonları ve devam eden olgunlaşma süreçleri için gerekli olan yaşamsal sinyallerin iletilmesini sağlamaktadır. Bir timosit, başarılı bir *TRB* lokusunun düzenlemesi sonrasında *TCRβ* zincir proteinini sentezler ve pre-antijen reseptörünü ve oluşan *TCRβ* zincirini birleştirir. Pre-antijen reseptörünü ifade eden timositler, birinci kontrol noktasını başarıyla tamamlamış olur. Üretken bir *TCRβ* zinciri oluşturamayan timositler, pre-antijen reseptörü ifade edememekte ve ortadan kaldırılmaktadır. *TRB* gen lokusunun düzenlenmesi homolog kromozomlardan yalnızca birinde gerçekleşmektedir. Gen düzenlenmesinin başladığı kromozom, diğer

kromozom üzerinde yeniden düzenlemeyi baskılamak için sinyal gönderir. Bu durum, alelik dışlama olarak adlandırılmaktadır [10].

Fonksiyonel bir TCR β zincirinin üretilmesi, her iki kromozomda da *TRA* gen lokusunun düzenlenmesini başlatmaktadır. *TRA*, kromozomlardan herhangi birinde başarılı bir şekilde düzenlenirse, sentezlenmiş olan TCR β zinciri ile birleşebilen TCR α zinciri oluşturabilmektedir. *TRA* düzenlenmesi her iki homolog kromozomda da başarısız olan hücreler, apoptoz aracılığıyla ortadan kaldırılmaktadır. Üretken bir TCR α zinciri oluşturan timositler, yüzeylerinde fonksiyonel TCR $\alpha\beta$ reseptör yapısını ifade etmektedir [10].

Bir sonraki kontrol noktasında, reseptörlerin yüzey ifadesini gerçekleştiren timositler, kendi antijenine verdiği yanıtı göre seçilime uğramaktadır. Bu seçim işlemi santral (merkezi) tolerans olarak tanımlanır. Merkezi T hücre toleransı, kendi antijenini kuvvetli şekilde tanıyan timositlerin, timustan ayrılmadan önce elimine edilmesini gerektirir. Santral tolerans, seçilmeme, negatif seçilme ve pozitif seçilme süreçlerinden oluşmaktadır. Olgunlaşmış T lenfositlerin bağışıklık tepkisi oluşturabilmesi için hem MHC'yi hem de peptidi aynı anda tanıması gerekir. Bu sebeple timustaki timositin, uygun derecede afinite ile kendi MHC molekülüne bağlanması gerekir. Kendi MHC molekülüne yeterli afinite ile bağlanamayan TCR içeren timositler, konağı savunma açısından işlevsiz olacağı için seçilmemekte ve apoptoza uğramaktadır (Şekil 2.6).



(Abbas, A., Lichtman, A., Pillai, S. (2018). *Cellular and Molecular Immunology*)

Şekil 2.6. T lenfositlerin olgunlaşma basamaklarında seleksiyon aşamaları

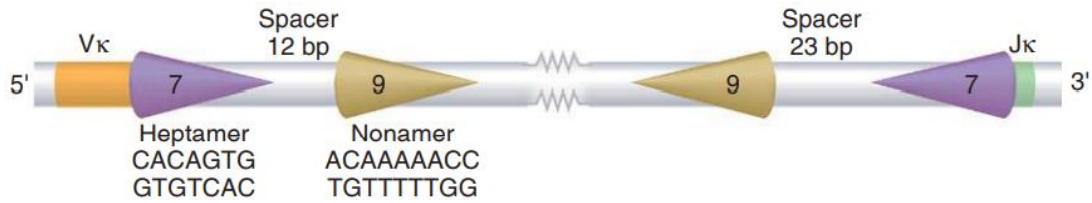
Timustaki seçim sürecindeki timositlerin yaklaşık %80'i seçilmezler [10]. Kendi MHC molekülüne yüksek afinite ile bağlanan TCR içeren timositler, konakçı hücreler için tehlike oluşturabileceği ve otoimmün bir yanıtı tetikleyebileceği için negatif seçilime uğramaktadır. Burada gerçekleşen güçlü bağlanma, timositte apoptozu indükleyen sinyalleşmeyi tetikler ve bu hücrelerin ortadan kaldırılmasını sağlar. Olgunlaşma aşamasındaki timositlerin yaklaşık %20'si negatif seçilime uğramaktadır. Kendi MHC molekülüne orta derecede afinite ile bağlanan TCR içeren timositler, pozitif seçilime uğramaktadır. Burada gerçekleşen orta düzeyde bağlanma gerekli sinyalizasyonu tetikleyerek, timositin bir sonraki olgunlaşma basamağına geçmesini sağlamaktadır. Olgunlaşma aşamasındaki timositlerin yaklaşık %1-2'si pozitif seçilime uğramaktadır. Seçim sırasında kendi antijenine yüksek afinite ile bağlanan bazı soylar, T hücre toleransından kaçabilmektedir. Bu soylar, sonraki aşamada periferik tolerans mekanizmaları aracılığıyla ortadan kaldırılmaktadır [10].

2.3.3. V(D)J Rekombinasyonu

Lenfositlerin farklı antijenleri tanımasını sağlayan reseptör yapıları, V, D ve J gen segmentlerinin her bir lenfositte, yeniden düzenlenmesi ile oluşturulmaktadır. Bu gen segmentlerinin yeniden düzenlenmesi V(D)J rekombinasyonu olarak adlandırılmaktadır. Rekombinasyon aşamasında iki temel faktör yer almaktadır:

- Rekombinasyon sinyal dizileri (*RSS-recombination signal sequences*)
- Rekombinasyon aktivasyon genleri (*RAG-recombination activation gene*) [11]

RSS'ler RAG enzimlerine, gen segmentlerini rekombine edebilecekleri bölgeleri gösteren kısa dizilerdir. RSS'ler iki farklı yapıda bulunmaktadır. Bunlardan birincisi korunmuş heptamer ve nonamer dizileri arasında 23 baz çiftlik boşluk bulunduran RSS yapılarıdır. İkincisi, korunmuş nonamer ve heptamer dizileri arasında 12 baz çiftlik boşluk bulunduran RSS yapılarıdır (Şekil 2.7). Bazı segmentler 12 baz çift boşluk yapıda RSS ile bir araya gelirken, bazı segmentler 23 baz çift boşluk yapıda RSS ile bir araya gelmektedir.

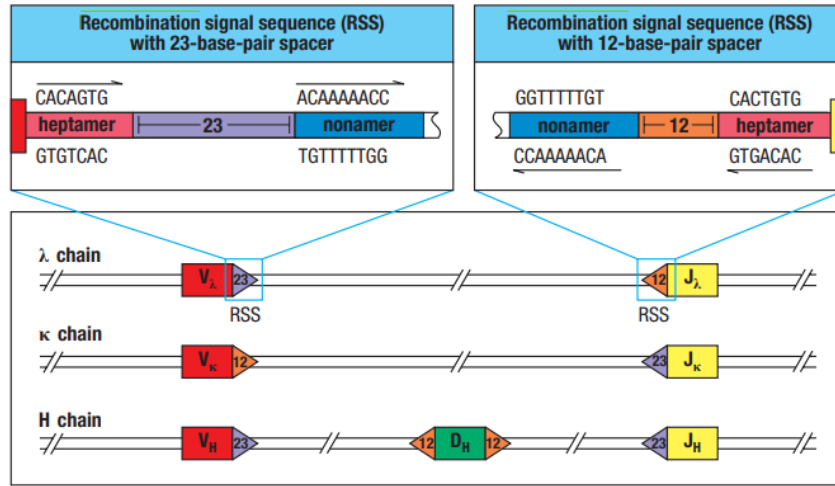


(Abbas, A., Lichtman, A., Pillai, S. (2018). *Cellular and Molecular Immunology*)

Şekil 2.7. Rekombinasyon sinyal dizileri

RSS'lerin farklı yapılarda bulunması, rekombinasyon mekanizmasında enzimlerin doğru segmentleri bir araya getirmesini sağlayan bir düzen oluşturmaktadır. Bu sayede, doğru segmentler fonksiyonel bir şekilde bir araya getirilebilmektedir (Şekil 2.8). Bu durum, 12/23 kuralı olarak isimlendirilmektedir [11]. RSS'ler RAG adı verilen enzimler tarafından tanınmaktadır. RAG1 (*recombination activating gene 1*) ve RAG2 (*recombination activating gene 2*) enzimleri bir araya gelerek DNA'ya RSS bölgelerinden bağlanmaktadır. RAG enzimlerinin bir araya gelmesiyle oluşan enzimatik yapı bir bölgesinden 23-RSS'yi, diğer bölgesinden 12-RSS'yi bağlar (Şekil 2.9). Bağlanma işlemi sonrasında

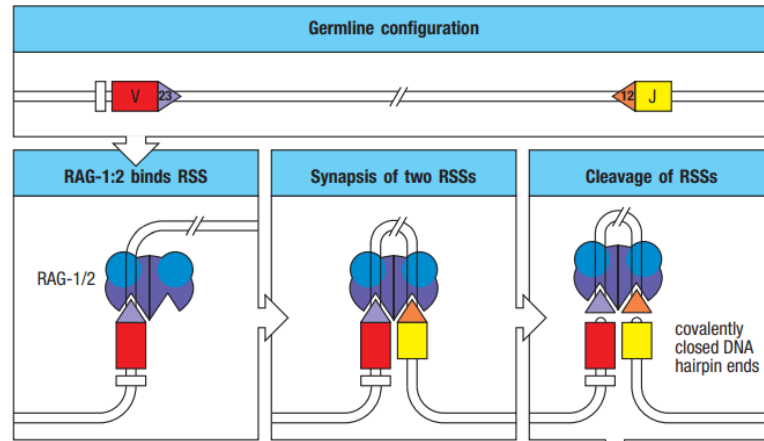
segmentler birbirine yaklaşır ve segmentler arasında kalan DNA bölgesi bir düğüm (*loop*) yapısı oluşturur. Daha sonra RAG enzimleri, RSS'leri keser. Kesilen DNA bölgesi ve RSS'leri içeren kısım daha sonrasında kullanılmayacak olan '*signal joints*' kısmıdır [11]. Bitişik hale getirilen segmentleri içeren '*coding joints*' kısmı, DNA onarım enzimleri tarafından stabilize edilmektedir (Şekil 2.10).



(Murphy K., Weaver C., 2017, Janeway's Immunobiology)

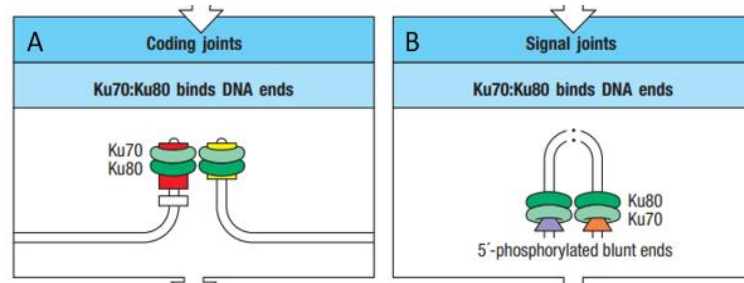
Şekil 2.8. Rekombinasyon sinyal dizilerinin 12 baz çiftlik boşluk ve 23 baz çiftlik boşluk yapıları

Coding joints bölgesinin enzimler tarafından stabilize edilmesiyle, her iki DNA ucunda da '*hairpin*' olarak adlandırılan saç tokasına benzer yapı oluşur. Artemis molekülünü içeren kompleks yapı, *hairpin* yapısına bağlanarak aradaki kovalent bağın kopmasını sağlar ve böylece DNA yapısı, her iki tarafta da yeni nükleotidler eklenebilecek şekilde, tek zincir yapıda uçlar oluşturur. Bu tek zincir yapıdaki nükleotidler, P nükleotidler olarak adlandırılmaktadır [11]. Bu aşamada Tdt (*terminal deoxynucleotidyl transferase*) enzimi rastgele bir şekilde, açık uçlara yeni nükleotidlerin eklenmesi işlemini gerçekleştirmektedir. Tdt tarafından eklenen nükleotidler N nükleotid olarak adlandırılmaktadır. Daha sonra, iki açık uçlu DNA yapısı, DNA ligaz enzimi tarafından birleştirilir ve oluşan herhangi nükleotid uyumsuzlukları bu aşamada ortadan kaldırılır (Şekil 2.11). Son aşamada, DNA polimeraz enzimi çift zincir yapısını oluşturmak üzere nükleotidleri ekler ve tamamlanmış yapıda çift zincirli DNA oluşur.



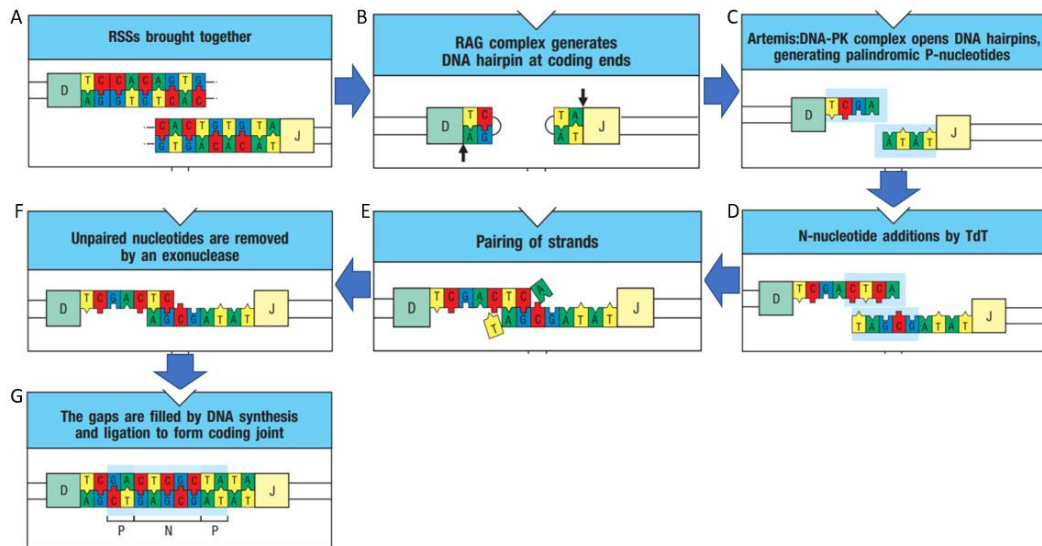
(Murphy K., Weaver C., 2017, Janeway's Immunobiology)

Şekil 2.9. RAG enzimlerinin RSS'ler ile etkileşimi



(Murphy K., Weaver C., 2017, Janeway's Immunobiology)

Şekil 2.10. Kesilen ve stabil hale getirilen DNA'nın *coding joints* ve *signal joints* kısımları



(Murphy K., Weaver C., 2017, Janeway's Immunobiology'den değiştirilerek alınmıştır.)

Şekil 2.11. DNA'nın kesilmesi ve onarılması aşamaları

DNA onarımları sırasında NHEJ (*non-homologous end joining*) tamir mekanizması işlemektedir. N nükleotidlerin eklenmesi sırasında üç ve üçün katları kadar nükleotid eklenmesi çerçeve kayması durumunun oluşmaması için idealdir. Fakat her rekombinasyon sırasında üç ve üçün katları kadar nükleotid eklenmeyebilir ya da nükleotid eklenmesi sırasında oluşan dizi sonlandırma dizisi olabilir. Bu durumda fonksiyonel bir protein oluşması gerçekleşmemektedir [11].

2.3.4. T Lenfosit Çeşitliliğinin Oluşması

T lenfosit repertuarının oluşumunda, çeşitliliğe katkı sağlayan üç temel mekanizma yer almaktadır. Bu mekanizmalardan birincisi, rekombinasyon sırasında farklı V, D ve J segmentlerinin bir araya gelmesi sonucunda çeşitlilik oluşmasına dayanmaktadır. Her bir TCR lokusu farklı sayılarda V, D ve J segmentleri içerir. İnsanda *TRB* lokusu yaklaşık 50 V, 2 D ve 12 J gen segmenti içerirken, *TRA* lokusu, 45 V ve 55 J gen segmenti içermektedir (Tablo 2.1). TCR β proteininin değişken bölgesi, V, D ve J gen bölgeleri tarafından kodlanırken, TCR α proteininin değişken bölgesi, V ve J gen bölgeleri tarafından kodlanmaktadır [1]. Rekombinasyon sırasında farklı V, D ve J segmentlerinin bir araya gelmesi ile oluşan çeşitlilik '*combinatorial diversity*' olarak adlandırılmaktadır.

Tablo 2.1. V, D ve J gen segmentlerinin insan lokuslarındaki sayıları

Mechanism	Immunoglobulin			T Cell Receptor $\alpha\beta$		T Cell Receptor $\gamma\delta$	
	Heavy Chain	κ	λ	α	β	γ	δ
V (Variable) segments	45	35	30	45	50	5	2
D (Diversity) segments	23	0	0	0	2	0	3
N region diversification	V-D, D-J	None		V-J	V-D, D-J	V-J	V-D1, D1-D2, D1-J
J (Joining) segments	6	5	4	55	12	5	4
Total potential repertoire with junctional diversity		$\sim 10^{11}$			$\sim 10^{16}$		$\sim 10^{18}$

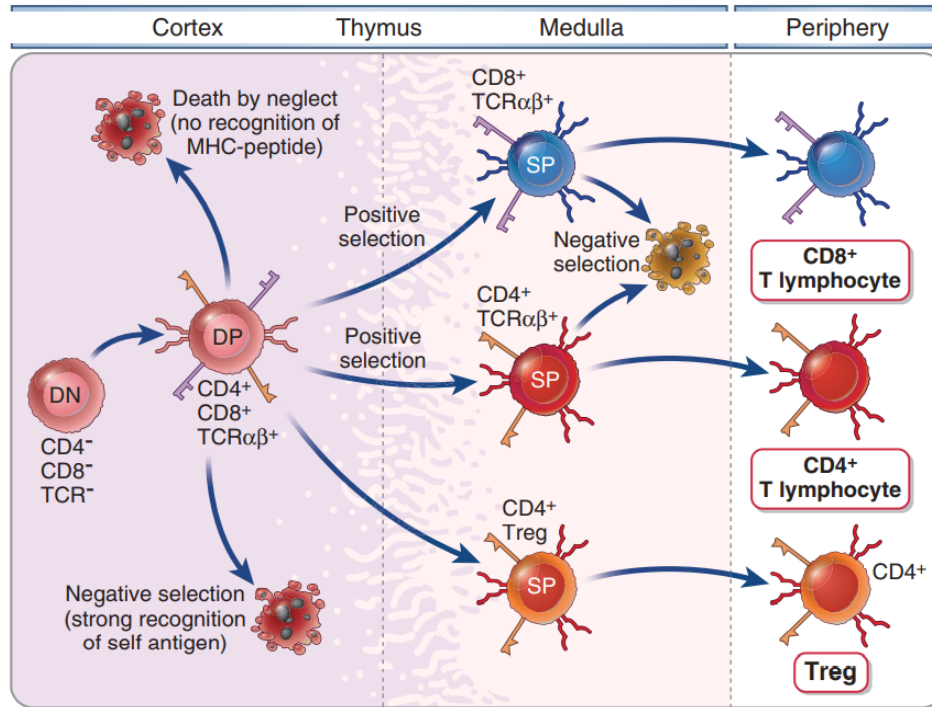
(Abbas, A., Lichtman, A., Pillai, S. (2018). *Cellular and Molecular Immunology*'den değiştirilerek alınmıştır.)

Çeşitliliğe katkı sağlayan mekanizmalardan ikincisi, Tdt enzimi tarafından rastgele bir şekilde N nükleotidlerin eklenmesidir. Açık uçlu DNA zincirlerinin tamamlayıcılığının sağlanması için Tdt enzimi tarafından N nükleotitlerin eklenmesi, her rekombinasyon sırasında rastgele bir şekilde gerçekleşmesi ve farklı sayılarda N nükleotidlerin eklenebiliyor olması dolayısıyla çeşitliliğe katkı sağlamaktadır. Bu çeşitlilik '*junctional diversity*' olarak adlandırılmaktadır.

Çeşitliliğe katkı sağlayan bir diğer mekanizma ise zincirlerin eşleşmesi sırasında meydana gelen '*chain pairing*' olarak adlandırılan çeşitlilik mekanizmasıdır. Yeni oluşturulan TCR α zinciri ile TCR β zincirlerinin ya da TCR γ zinciri ile TCR δ zincirlerinin rastgele bir şekilde eşleşmesi, repertuar çeşitliliğine katkı sağlamaktadır. İnsanda olası $\alpha\beta$ heterodimerlerinin sayısı 10^{18} olabileceği bilinmektedir [10].

2.3.5. T lenfositlerin Timus Olgunlaşma Basamakları

Lenfosit öncülleri, kemik iliğinde üretildikten sonra timusa giderek olgunlaşma basamaklarını tamamlamaktadır. Lenfositlerin timusta olgunlaşma basamakları şekil 2.12'de gösterildiği gibidir. $\alpha\beta$ T hücre öncülleri timusa vardıklarında, yüzeylerinde hem CD4 hem de CD8 ko-reseptör ifadesine sahip olmadıkları için '*double negative*' formda bulunurlar. *Double negative* T öncüller aynı zamanda yüzeylerinde TCR ifadesi bulundurmayan hücrelerdir. Daha önce bahsedilen rekombinasyon aşamalarını gerçekleştiren ve pozitif seçilen T hücreler, yüzeylerinde TCR ifade etmektedir [1]. Bu aşamadaki T hücreler yüzeylerinde hem CD4 hem de CD8 ko-reseptörünü ifade etmeleri sebebiyle '*double positive*' olarak adlandırılır.



(Abbas, A., Lichtman, A., Pillai, S. (2018). *Cellular and Molecular Immunology*)

Şekil 2.12. T hücrelerin timustaki gelişim basamakları

Double positive fazdaki timositler, her iki sınıf MHC molekülleri ile etkileşim kurabilme yeteneğine sahiptirler. Bu aşamadaki timositler TCR yapılarının self-peptidlere verdiği yanıtı göre negatif ya da pozitif seçilime uğrarlar. Her iki ko-reseptörü de ifade eden timositler, CD8 ko-reseptörü aracılığıyla MHC sınıf I molekülleri ile etkileşim kurarsa CD4 ifadesini kaybederler. Aynı şekilde, CD4 ko-reseptörü aracılığıyla MHC sınıf II molekülleri etkileşim kuran timositler CD8 ifadesini kaybederler. MHC molekülleri ile TCR etkileşimi sırasında pozitif seçilen timositler bir sonraki faza geçmiş olurlar. Bir sonraki faz, '*single positive*' olarak adlandırılan ve yalnızca CD4 ya da yalnızca CD8 ifade eden timositlerin bulunduğu olgunlaşma basamağıdır [10]. T hücre reseptörünün self peptid-self MHC kompleksine bağlanma derecesine göre pozitif seçilen lenfositler yaşam sinyali olarak hayatta kalmaktadır.

2.4. İmmün Repertuar Çalışmaları

Yeni nesil dizileme teknolojileri, çok sayıda dizi okuması ile araştırmacılara yüksek derinlik ile TCR repertuar karakterizasyonu yapma olanağı sağlamaktadır

[12]. TCR repertuarı dizileme ve profillemeye, immün mekanizmaların araştırılması ve klinik uygulamaların geliştirilmesi açısından önemlidir. Çok yönlü repertuar analizi programları, kanser, inflamasyon, otoimmünite, hematopoetik kök hücre transplantasyonu, nadir hastalıklar ve enfeksiyon çalışmalarında kullanılmaktadır. Yeni nesil dizileme kullanılarak yapılan immün repertuar analizi çalışmaları aynı zamanda aşılama, immünoterapi, hastalığın tanısında kullanılabilecek biyobelirteç, tedaviye klinik yanıt ve kişiselleştirilmiş tedavilerin düzenlenmesinde önemli bulgular sağlayabilmektedir.

2018 yılında Xiao Liu ve Jinghua Wu tarafından yayımlanan derlemede çeşitli teknikler ile yapılan immün repertuar çalışmalarından bahsedilmiştir. Bunun yanında TCR ve BCR çeşitliliğinin görselleştirilmesi için TCR spektratriplmesi ve TCR immünoskopu gibi düşük çözünürlüklü yöntemler kullanılmıştır [13]. Belirli bir V gen ailesini ifade eden T hücreler, protein düzeyinde, akım sitometri yöntemi kullanılarak uzun zamanlardır incelenmektedir. Ayrıca T hücre popülasyonu, floresan etiketli monoklonal antikolar kullanılarak tek tek veya multipleks formatta sıralanmakta ve nicelendirilmektedir. Bu yöntemler de düşük çözünürlükte yöntemler olarak ifade edilmektedir [13]. Malignite, sekonder immün yetmezlikler ve primer immün yetmezlikler gibi pek çok hastalık grubunda immün repertuar çalışmalarından elde edilen sonuçlar, farklı hastalık gruplarında repertuar çalışmalarının gerekliliğini göstermektedir.

Yüksek verimli teknolojilerin immün repertuar çalışmalarında kullanılması ilk olarak, 2009 yılında J. Weinstein ve arkadaşları tarafından zebra balığı antikor repertuarının dizilenmesi [14] ile gerçekleştirilmiştir. Daha sonra farklı sistemler kullanılarak, değişken CDR3 bölgeleri dizilerek TCR beta zinciri araştırılmıştır [15].

İmmün repertuarın genişliği, patojenlere verilen yanıtta önemli rol almaktadır. Bu sebeple, primer immün yetmezliklerde enfeksiyonlara yatkınlık görülmesi ile immün repertuarın ilişkisi araştırılmaktadır. İmmün disregülasyon hastalıklarında immün repertuarın rolü [16], CVID (*common variable immunodeficiency*) hastalığında somatik mutasyonların ve T hücre klonalitesinin araştırılması [17], RAG eksikliğinde T ve B hücre çeşitliliğinin araştırılması [18], DNA onarım ve metilasyon defektlerinde

T hücre repertuar anomalilerinin araştırılması [19] gibi pek çok çalışma yapılmıştır. Yapılan çalışmalarda sonuçlar immün yetmezlikler açısından aydınlatıcı olmuştur. RAG eksikliğinde T ve B hücre çeşitliliğinin araştırıldığı çalışmada, RAG eksikliği olan hastalarda kontrol grubuna oranla düşük çeşitlilik olduğu gösterilmiştir [18]. DNA onarım defektlerinin araştırıldığı çalışmada AT (ataksi talenjektazi) hastalarında kontrole oranla TCR β repertuarında belirgin bir düşüş gözlemlenmiştir. DOCK8 eksikliğinde yeni nesil dizileme ile yapılan repertuar çalışması, 2019 yılında B hücre repertuarının araştırılması üzerinedir [20]. Çalışmada BCR çeşitliliği, gen kullanımı (*gene usage*) düzeyleri, V-J eşleşmeleri gibi parametreler analiz edilmiştir. Bu çalışmada DOCK8 eksikliği olan hastaların kontrole oranla BCR çeşitliliğinde ve antikor aviditesinde düşüş gözlemlenmiştir.

İmmün repertuarın veri analizi, bir veya birden fazla çeşitlilik indeksinin hesaplanmasını içermektedir. Çeşitlilik hesaplamalarında Chao, D50 indeksleri sıkça kullanılan indekslerdendir. Veri analizinin diğer bir basamağı ise V ve J genlerinin kullanımının gösterilmesini içermektedir. Farklı V ve J genlerinin kullanımı '*gene usage*' olarak ifade edilmektedir. Yapılan çalışmalarda, çeşitliliğe katkı sağlayan faktörlerin değerlendirilmesinde CDR3 kompozisyonu ve uzunluğu araştırılmaktadır. Rekombinasyon sırasında gerçekleşen insersiyon ve delesyonlar da immün repertuar analizlerinde kullanılan önemli çeşitlilik kriterlerindedir.

Repertuar çalışmalarında başlangıç materyali olarak genomik DNA ya da mRNA (*messenger RNA*) kullanılmaktadır. Araştırmanın amacına göre başlangıç materyali değişiklik gösterebilmektedir ve her ikisinin de avantajları ve dezavantajları bulunmaktadır. Genomik DNA daha stabil bir yapıya sahip olması ve tek kopya halinde bulunması sebebiyle çalışması daha kolay bir materyaldir. Genomik DNA, rekombinasyon öncesi ve sonrası V(D)J fragmanlarını ve üretken olmayan (*non-productive*) yeniden düzenlemeleri de içermektedir. RNA ise sadece üretken (*productive*) dizileri içermektedir. DNA ile yapılan araştırmalarda in-del ve somatik mutasyonlar tespit edilebilmektedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hastalar

Tez çalışmasına, genetik olarak DOCK8 eksikliği tanısı almış ve mutasyonları doğrulanmış 6 hasta ve 4 negatif kontrol dahil edilmiştir. Sağlıklı kontroller çocuk polikliniğine gelen sağlıklı, yaş ve cinsiyet açısından uyumlu bireylerden seçilmiştir. Çalışmaya dahil edilen bireylere çalışma ile ilgili bilgi verilmiş olup, gerekli onam formu alınmıştır. Çalışma için, Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan gerekli izin belgesi GO 21/801 kayıt numarası ile alınmıştır.

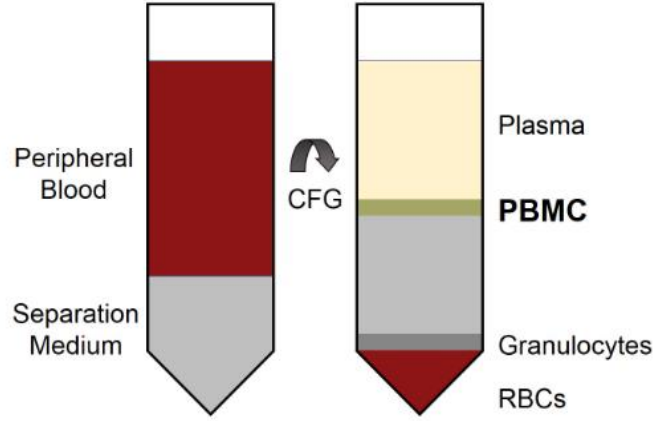
3.2. Yöntemler

Hastalara ve kontrollere ait kan örnekleri, Türkiye'de bulunan farklı immünoloji merkezlerinden alınmıştır. Kan örneklerinden yapılan PBMC (*peripheral blood mononuclear cells*) izolasyonu, CD4+/CD8+ T lenfosit izolasyonu, RNA izolasyonu, RNA konsantrasyonu ölçümü ve TCR β amplifikasyon aşamaları Hacettepe Üniversitesi Genombilim ve Nadir Hastalıklar Uygulama ve Araştırma Merkezi Can Sucak Translasyonel İmmünoloji Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

3.2.1. PBMC İzolasyonu

Periferik kan mononükleer hücrelerin izolasyonu için her bir hastadan ve sağlıklı kontrolden 3-15 mL periferik kan, K2-EDTA içeren tüplerde toplandı. Toplanan kanlar 1:1 (v/v) oran ile oda sıcaklığında 1X distile PBS ile seyreltildi. Seyreltilen kan örnekleri, 5:2 (v/v) oran ile 4mL Ficoll (*Sigma Aldrich-Histopaque 1077*) üzerine yavaşça ve kontrollü bir şekilde yayıldı. Daha sonra örnekler 400 xg'de 30 dk fren ayarı sıfıra getirilerek santrifüj edildi. Lenfositlerin bulunduğu katman (şekil 3.1) toplanarak başka tüpe aktarıldı. Farklı tüpe aktarılan periferik kan mononükleer hücreleri 10 mL RPMI-1640 ile 8 dk 400 xg'de santrifüj edilerek yıkandı. Süpernatant kısmı uzaklaştırıldı ve yıkanmış hücreler 1mL RPMI-1640 ile resüspand edildi. 10 μ L hücre süspansiyonu 1:1 (v/v) oranda Tripan mavisi boyası ile 2 dk inkübe edildi. Boyanan hücreler hücre sayım cihazına 10 μ L hacimde yüklenerek

sayım yapıldı. Hücrelerin sayısı ve canlılık oranları kaydedildi. RPMI-1640 içinde bekleyen hücreler 5 dk 400 xg'de santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırıldı.



(Cell Application Inc. PBMC protokolünden alınmıştır.)

Şekil 3.1. PBMC İzolasyonu

3.2.2. CD4+ / CD8+ T Hücre İzolasyonu

İzole edilen periferik kan mononükleer hücrelerinden CD4+ / CD8+ hücrelerinin izolasyon işlemi manyetik izolasyon kiti (*Biolegend, USA*) kullanılarak kit potokolüne uygun olarak yapıldı. İzolasyon tamponu olarak %2 FBS (*fetal bovine serum*) ve 1mM EDTA içeren Ca^{+2} Mg^{+2} içermeyen dPBS kullanıldı. İnkübasyon tamponu deney süresi boyunca buzda inkübe edildi. Hücreler 200 μ L izolasyon tamponu ile resüspand edildi. Polipropilen tüplere 100 μ L CD4 ve 100 μ L CD8 hücre süspansiyonu aktarıldı. Her bir tüpe 10 μ L kendi biotin-antikor kokteyli eklenerek buz üzerinde 15 dk inkübe edildi. İnkübasyon süresi bitince her bir tüpe 10 μ L *streptavidin-nanobead* eklenerek buz üzerinde 15 dk inkübe edildi. 15 dk inkübasyon sonunda her bir tüpe 2,5 mL inkübasyon solüsyonu eklendi ve resüspand edildi. Tüpler manyetik seperasyon kolumu içerisine yerleştirilerek 5 dk inkübe edildi. Süpernatant kısımları etiketlenen tüplere aktarıldı. Manyetik kolum içindeki tüplere 2,5 mL izolasyon tamponu ile ikinci yıkama yapılarak 5 dk inkübe edildi. Tekrar süpernatantlar diğer tüplere aktarıldı. Elde edilen 5 mL hücre süspansiyonu 300 xg'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant atılarak elde edilen CD4+ ve CD8+ hücrelerin sayısı kaydedildi. Kit protokolünün optimizasyonu için ilk çalışılan örnekler akım sitometri

yöntemi kullanılarak kontrol edilmiştir. Kontrol işlemi sonucunda %90 ve üzeri verimlilik ile hücrelerin izolasyonunun gerçekleştiği gösterilmiştir.

3.2.3. RNA İzolasyonu

CD4+ ve CD8+ hücrelerin total RNA izolasyonu, RNA izolasyon kiti ile (*Macherey-Nagel-Nucleospin*) kit protokolüne uygun olarak hücrelerden izole edildi. Öncelikle hücreler lizis solüsyonu kullanılarak parçalandı. Filtre kullanılarak lizat temizlendi. RNA bağlanma koşullarına getirmek için %70 etanol kullanılarak filtre yıkandı. Lizat diğer filtreye aktarılarak RNA'nın bağlanması sağlandı. RNA bağlanması sonrasında DNA'nın sindirimi gerçekleştirildi. Sonrasında kitle yer alan yıkama solüsyonları ile filtre yıkandı. DNA'dan ve proteinlerden kurtarılmış olan RNA, elüsyon tamponu ile filtreden kurtararak izole edildi.

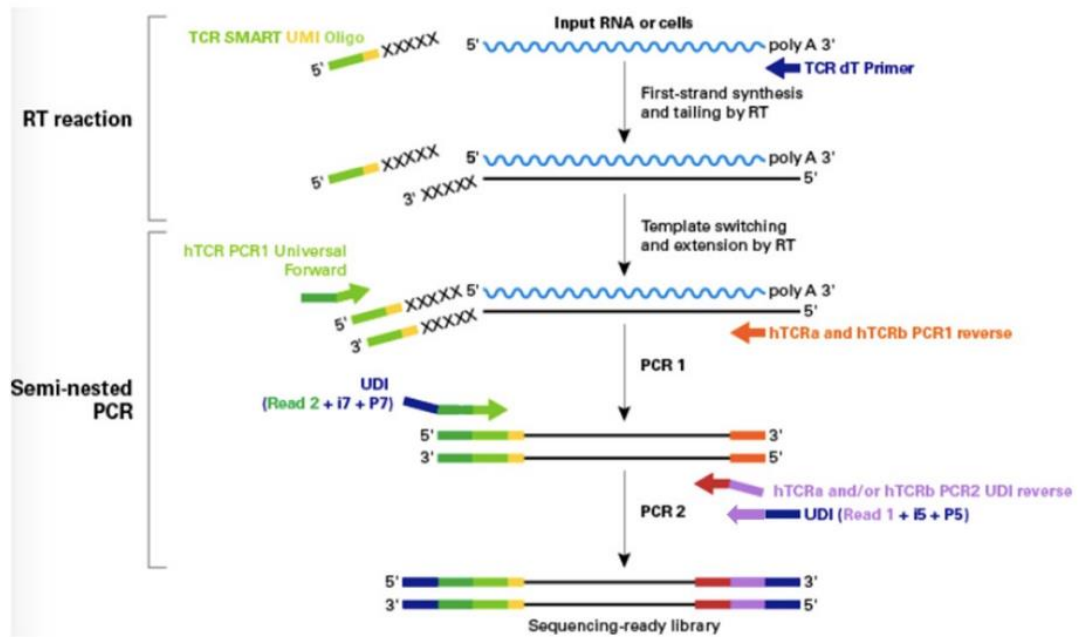
3.2.4. RNA Konsantrasyonu Ölçümü

Her hasta ve kontrol grubunun CD4+ ve CD8+ hücrelerinden izole edilen RNA'ların miktarları kit (*Qubit RNA HS Assay*) kullanılarak standartlar aracılığıyla ölçüldü. Protokol kullanılarak standartlaştırılan ölçüm sonuçları 3 ng/mL ve daha fazlası RNA miktarı elde edilmiş olarak kaydedildi. Örneklerden elde edilen RNA miktarları *TCR α/β* amplifikasyonu aşamasının başında kullanılacak RNA miktarının optimizasyonunun yapılabilmesi amacıyla belirlenmiştir.

3.2.5. TCR β Amplifikasyonu

Örneklerden elde edilen RNA'ların TCR α/β profillemesi için kit (*TAKARA Bio SMARTer Human TCR α/β Profiling Kit V2*) kullanılmıştır. *TCR α/β* amplifikasyonu kit protokolüne uygun olarak gerçekleştirilmiştir. *SMARTer Human TCR α/β Profiling Kit V2* SMART teknolojisi (*Switching Mechanism at 5' End of RNA Template*) prensibini kullanarak TCR transkriptlerinin tam V(D)J değişken bölgelerini yakalamak için 5' RACE (*rapid amplification of cDNA ends*) benzeri bir yaklaşım kullanılmaktadır. Ayrıca, veri analizi sırasında PCR (*polymerase chain reaction*) hata düzeltilmesini ve klonotip nicelemeyi kolaylaştırmak için benzersiz moleküler tanımlayıcıların (*unique molecular identifiers-UMI oligos*) kullanımını içermektedir.

Kit protokolüne göre başlangıç materyali olarak RNA ya da saflaştırılmış T hücreler kullanılabilir. Bu çalışmada başlangıç materyali olarak örneklerden elde edilen RNA kullanıldı. Örneklerden elde edilen RNA'ların miktarlarına göre başlangıç materyalinden ne kadar kullanılacağı optimize edildi ve hesaplandı. İlk zincir cDNA sentezi TCR dt primer kullanılarak ters transkripsiyon aracılı sentezlenmiştir. Ters transkripsiyon aracılı cDNA sentezi sonrasında, *TCRa* ve/veya *TCRβ* transkriptlerinin değişken bölgelerine karşılık gelen cDNA dizilerini çoğaltmak için iki aşamalı amplifikasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. PCR1 şablon olarak cDNA'yı kullanır ve *forward* ve *reverse* olmak üzere iki primer içerir. İlk PCR sonucunda, tüm değişken bölge ve *TCRa* ve/veya *TCRβ* cDNA'nın sabit bölgesinin önemli bir bölümü çoğaltılmıştır. PCR2 şablon olarak PCR1 ürününü kullanmaktadır. Bu aşama sonucunda, *semi-nested* primerler aracılı tüm değişken bölge ve *TCRa* ve/veya *TCRβ* cDNA'nın sabit bölgesinin önemli bir bölümü çoğaltılmıştır. Bu tez çalışmasında sadece *TCRβ* profillemesi yapıldığı için *TCRa* amplifikasyonları gerçekleştirilmemiştir. PCR2 aşamasında, *Illumina* ile uyumlu olan NGS kütüphanesi, *SMARTer RNA unique dual index*'ler kullanılmaktadır. PCR1 ve PCR2 amplifikasyon aşamaları *semi-nested* PCR mekanizması aracılığıyla gerçekleştirilmiştir. Kit çalışma prensibini içeren şema, şekil 3.3' te verildiği gibidir.



(TAKARA Bio USA, SMARTer Human TCR a/b Profiling Kit V2 kullanıcı kılavuzundan alınmıştır.)

Şekil 3.3. SMARTer Human TCR a/b Profiling Kit V2 PCR çalışma prensibi

Bir sonraki aşamada, manyetik boncuklar kullanılarak, amplifiye edilen kütüphanenin pürifikasyonu gerçekleştirildi. Amplifiye olan DNA ürününün boyutu ve kalitesi DNA analizer ile ölçüldü. Aşamaların tamamlanması ile kütüphane dizileme ve analiz aşamaları için hazır hale getirildi. Dizileme işlemi *Illumina Miseq* cihazı ile gerçekleştirildi. *Illumina paired-end* dizileme teknolojisi kullanıldı. *Paired-end* dizileme, fragmentin her iki ucundan da dizileme yapılmasını sağlayan ve böylece yüksek kaliteli ve hizalanabilir diziler oluşturulmasını sağlamaktadır. Bu teknolojinin en önemli avantajı, iki kat daha fazla okuma üreterek daha doğru bir hizalama işlemi yapılmasını ve in-del (insersiyon-delesyon) gibi okunması zorlu değişikliklerin tespit edilmesi sağlamaktır.

3.2.6. Biyoinformatik ve İstatistiksel Analizler

Kütüphane oluşturulması için kullanılan kit, PCR kopyalarını ve benzersiz moleküler tanımlayıcılara dayalı hataları ortadan kaldıran, daha doğru ve güvenilir klonotip arama ve niceleme sağlayan Takara Bio'nun *Cogent™ NGS Immune Profiler* yazılımı ile analiz edilmek için tasarlanmıştır ve bu yazılım ile uyumludur. *Cogent* yazılımı, *SMARTer Human TCR a/b Profiling Kit V2* kullanılarak hazırlanan kitaplıklardan, *Illumina* dizileyiciler tarafından oluşturulan *FASTQ* dosyalarındaki dizi verilerini analiz etmek üzere tasarlanmış bir programdır.

Biyoinformatik analizler ve istatistiksel analizler, R programlama dilinde immün repertuarın araştırılması için gerekli analizlerin yapılmasını sağlayan '*Immunarch*' paket programı ve '*IMGT*' kullanılarak gerçekleştirilmiştir. *Immunarch* paket programında çeşitlilik tahmini yapmak için kullanılan çeşitlilik parametreleri bulunmakta.

- Chao1- Bir popülasyondaki tür sayısının tahmin edildiği parametrik olmayan asimptotik bir çeşitlilik indeksidir. Chao1 değerinin artışı çeşitliliğin artışına işaret etmektedir.
- D50- Bir popülasyonun %50'sindeki türlerin yüzdelerini ifade eden çeşitlilik indeksidir. D50 değerinin artışı çeşitliliğin artışına ve klonotipik genişlemelerin az olduğuna işaret etmektedir.

IMGT programında V-J gen kullanım haritalarını elde edilebilmekte. Program aracılığıyla her bir hasta ve kontroldeki V-J genlerinin bir arada kullanımlarını gösteren haritalar elde edildi.

Verilerin istatistiksel analizi programlar aracılığıyla gerçekleştirilmiştir. Bağımlı iki örneklem testlerinden Wilcoxon testi, non-parametrik çok örneklem testlerinden Kruskal Wallis testi kullanılmıştır. Çoklu karşılaştırmalarda düzeltme için Holm-Benferroni düzeltmesi uygulanmıştır. Test istatistiğine ilişkin anlamlılık düzeyi 0,05 olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Hastaların Klinik ve Laboratuvar Özellikleri

Hastaların klinik ve laboratuvar bulguları ve genetik analiz sonuçları tablo 4.1, tablo 4.2, tablo 4.3 ve tablo 4.4'te gösterilmiştir.

Tablo 4.1. Hastaların bilgileri ve geçirdiği enfeksiyonlar.

Hasta No	Cinsiyet	Yaş	Akrabalık	Semptom görülme yaşı	Enfeksiyonlar
H1	E	11	Var	3 yaş	ÜSYE, Pnömoni
H2	K	4	Var	3 yaş	Pnömoni
H3	E	9	Var	6 ay	Pnömoni, Herpes Keratiti, cilt enfeksiyonları
H4	E	9	Var	2 yaş 6 ay	ÜSYE
H5	E	1	Var	7 ay	Pnömoni
H6	E	3	Var	14 gün	Oral kandidiyazis, Paranişi, Pnömoni, ÜSYE, Stafilokok(döküntü), Rotavirüs(ishal)

(ÜSYE: Üst solunum yolları enfeksiyonu)

Tablo 4.2. Tam kan test sonucu.

Testler	Hastalar												
	H1	Ref	H2	Ref	H3	Ref	H4	Ref	H5	Ref	H6	Ref	
Tam Kan Hücre Sayım													
Lökosit(10³/μL)	19,7	4,3-11,4	11,8	5,0-17,0	12,3	3,7-11,1	6,37	3,7-11,1	9,67	5,0-17,0	5,20	5,0-17,0	
Lenfosit(10³/μL)	2	1,7-5,7	2,4	1,5-9,5	3,4	1,5-7,6	2,21	1,5-7,6	2,74	1,5-9,5	1,75	1,5-9,5	
Nötrofil(10³/μL)	13,6	1,0-8,0	5,8	1,0-8,5	9,5	1,0-8,0	2,86	1,0-8,0	1,89	1,0-8,5	2,11	1,0-8,5	
Trombosit(10³/μL)	442	150-400	823	150-400	379	150-400	247	150-400	456	150-400	171	150-400	
Monosit(10³/μL)	1,6	0,2-1,0	1,6	0,2-1,0	0,8	0,2-1,0	0,76	0,2-1,0	1,01	0,2-1,0	0,7	0,2-1,0	
Eozinofil(10³/μL)	3,5	<1,01	2	<0,81	6	<1,01	0,45	<1,01	3,76	<0,81	0,63	<0,81	
Bazofil(10³/μL)	0,1	<0,21	0,1	<0,21		<0,21	0,09	<0,21	0,05	<0,21	0,01	<0,21	
Hemoglobin(g/dL)	11,3	11,5-15,5	9,4	11,5-14,0	14,3	11,5-15,5	13,7	11,5-15,5	9,5	11,5-14,0	11	11,5-14,0	
Lenfosit													
CD3(%/10³/μL)	58/1,1 6	58-82/1,1- 4,1	41/0,9 8	55-79/1,9- 3,6	60/2,0	57-81/1,0- 4,9	62/1,4	57-81/1,0- 4,9	36,8/1, 5	51-77/1,3- 6,5	32/0,5 6	55-79/1,9- 3,6	
CD4(%/10³/μL)	39/0,4 5	26-48/0,6- 2,4	23/0,2 3	26-49/0,6- 2,0	14/0,2 8	24-47/0,5- 2,7	33/0,4 6	24-47/0,5- 2,7	83,5/1, 3	29-55/0,7- 4,5	26/0,2 4,5	26-49/0,6- 2,0	
CD8(%/10³/μL)	18/0,2 1	16-32/0,4- 1,5	15/0,1 5	9-35/0,3- 1,3	28/0,5 6	17-37/0,3- 2,1	27/0,3 8	17-37/0,3- 2,1	13/1,1 9	15-33/0,4- 3,2	5/0,03 3,2	9-35/0,3- 1,3	
CD19(%/10³/μL)	38/0,7 6	10-30/0,2- 1,4	51/1,2	11-31/0,3- 1,2	16/0,5 4	10-27/0,2- 2,2	16/0,3 5	10-27/0,2- 2,2	50/1,3 7	17-41/0,5- 3,6	46/0,8 3,6	11-31/0,3- 1,2	
CD16/56(%/10³/μL)	2/0,04	8-30/0,2- 1,0	5/0,12	5-28/0,2- 1,2	0,6/0,0 2	8-28/0,2- 0,9	13/0,2 9	8-28/0,2- 0,9	10/0,2 7	4-15/0,2- 1,3	13/0,2 3	5-28/0,2- 1,2	
İmmüoglobülin													
IgA(mg/dL)	401	62-390	187	57-282	143	62-390	49,1	62-390	24	26-296	94,2	57-282	
IgG(mg/dL)	1510	842-1943	865	745-1804	1134	842-1943	1180	842-1943	252	604-1941	857	745-1804	
IgM(mg/dL)	18,8	54-392	22,3	78-261	9	54-392	45,4	54-392	30	71-235	48,1	78-261	
IgE(IU-mL)	7798	0-200	6083	0-200	4932	0-200	159	0-200	40	0-200	171	0-200	

Not: Referans aralığı dışındaki değerler koyu renkle belirtilmiştir.

Tablo 4.3. Lenfosit alt grupları.

Lenfosit Alt Grupları	Hastalar											
	H1	Ref	H2	Ref	H3	Ref	H4	Ref	H5	Ref	H6	Ref
CD3+CD4+ (%/10 ³ /μL)	39/0,5	26-48/0,6- 2,4	23/0,23	26-49/0,6- 2,0	14/0,28	24-47/0,5- 2,7	33/0,46	24-47/0,5- 2,7	83,5/1,3	31-54/0,7- 4,5	26/0,15	26-49/0,6- 2,0
CD4+45RA+ (%/10 ³ /μL)	47,2/0,24	16-40/0,4- 2,0		20-41/0,5- 6,6	22/0,06	17-40/0,3- 2,4	19/0,09	17-40/0,3- 2,4		25-45/1,2- 5,6	21/0,03	20-41/0,5- 6,6
CD4+45RO+ (%/10 ³ /μL)		8-26/0,2- 0,8		8-42/0,2- 0,8		9-23/0,2- 1,0	19/0,09	9-23/0,2- 1,0		6-21/0,3- 1,4	9/0,01	8-42/0,2- 0,8
CD4+CCR7+CD45RA- (%/10 ³ /μL)	22,5/0,11				10/0,03							
CD4+CCR7-CD45RA- (%/10 ³ /μL)	27,4/0,14				56/0,16							
CD3+CD8+ (%/10 ³ /μL)	18/0,21	16-32/0,4- 1,5	15/0,15	9-35/0,3- 1,3	28/1,0	17-37/0,3- 2,1	27/0,38	17-37/0,3- 2,1	13/0,19	10-31/0,6- 3,0	5/0,03	9-35/0,3- 1,3
CD8+45RA+ (%/10 ³ /μL)	12,2/0,026	16-33/0,3- 1,5		13-31/0,3- 1,3	14/0,08	15-32/0,4- 2,0		15-32/0,4- 2,0		12-28/0,6- 2,5		13-31/0,3- 1,3
CD8+45RO+ (%/10 ³ /μL)		2-15/0,05- 0,4		2-10/0,06- 0,5		4-15/0,09- 0,8		4-15/0,09- 0,8		1-12/0,07- 1,4		2-10/0,06- 0,5
CD8+CCR7+CD45RA- (%/10 ³ /μL)	2,9/0,01				3/0,02							
CD8+CCR7-CD45RA- (%/10 ³ /μL)	43,8/0,09				17/0,09							

Not: Referans aralığı dışındaki değerler koyu renkle belirtilmiştir.

Tablo 4.4. Hastaların genetik test sonucu.

Hasta No	Varyant	Kalıtım	Sanger doğrulaması
H1	c.3067_3068dupAT p.V1024fs*13	Homozigot	Doğrulandı
H2	c.3067_3068dupAT p.V1024fs*13	Homozigot	Doğrulandı
H3	Exon 1-14 Del	Homozigot	Doğrulandı
H4	c.137G>A p.G46D , p.Gly46Asp	Homozigot	Doğrulandı
H5	Exon 1-7 Del	Homozigot	Doğrulandı
H6	c.C4902G p.Y1634X	Homozigot	Doğrulandı

(Del: Delesyon, Dup: Duplikasyon)

4.1.1. Hasta 1

İlk kez 3 yaşındayken döküntü şikâyeti ile hastaneye başvuran hastada hipereozinofili ve IgE yüksekliği saptanmıştır. Tekrarlayan döküntü, öksürük, balgam ve aralıklı ateş şikayetleri olan hastada pnömoni saptanmıştır. Hastanın daha önce sık enfeksiyon ve hastane yatışı öyküsü bulunmamaktadır. Koltuk altı ve genital bölgede döküntü ve pnömoni ile takipli hastanın B ve T alt gruplarında düşüklük ve T lenfosit aktivasyonunda düşüklük bulunmuştur. Hastanın anne ve babası arasında birinci dereceden akrabalık bulunmaktadır.

4.1.2. Hasta 2

İlk kez 3 yaşında pnömoni nedeniyle hastane yatışı gerçekleştirilen hastanın burun kenarında, aksillada, genital bölgede, perioral ve kulak arkasında kaşıntılı döküntüleri ve ileri derecede cilt kuruluğu mevcutmuş. Hastada lenfosit alt gruplarında düşüklük ve yüksek IgE tespit edilmiştir. Anne ve baba arasında birinci derece akrabalık olan hastanın büyük kardeşi *DOCK8* mutasyonu açısından pozitif bulunmuştur.

4.1.3 Hasta 3

İlk kez 6 aylıkken kasıkta kızarıklık şikâyeti ile hastaneye başvuran hastanın tedaviye dirençli ve ilerleyen yaşlarda vücudun diğer bölgelerine yayılan döküntüleri mevcutmuş. Pnömoni nedeniyle hastane yatışı bulunan hastanın sol gözünde tekrarlayan enfeksiyonu mevcutmuş. Tekrarlayan cilt enfeksiyonları bulunan hastanın

aynı zamanda ağız içi yara ve diş çürükleri şikayetleri mevcutmuş. Hastada hipogamaglobülinemi ve IgE yüksekliği tespit edilmiştir. Hastanın anne ve babası arasında birinci dereceden akrabalık bulunmaktadır.

4.1.4 Hasta 4

İlk şikayetleri 2 yaşından sonra başlayan hastanın sık enfeksiyon öyküsü bulunmamakta. Travma ile olan anjioödem ve rejyonel lenfadenopatisi mevcutmuş. Yılda 2-3 kez tekrarlayan üst solunum yolu enfeksiyonu sebebiyle hastane yatışları mevcutmuş. Hastanın immünoglobülin seviyelerinde düşüklük tespit edilmiştir. Hastanın anne ve babası arasında birinci dereceden akrabalık bulunmaktadır.

4.1.5. Hasta 5

Hastane başvurusu ilk kez 7 aylıkken yapılan hastanın şiddetli atopik dermatit çoklu besin alerjisi mevcutmuş. Süt ve süt ürünlerine karşı ürtiker anjioödem oluşturmakta. Hastanın immünoglobülin seviyelerinde düşüklük tespit edilmiştir. Anne ve baba arasında birinci derece akrabalık olan hastanın kardeşi DOCK8 tanılıdır.

4.1.6. Hasta 6

Hastada ilk kez 14 günlükken yaygın oral kandidiyazis tespit edilmiştir. Pnömoni sebebiyle hastane yatışı bulunan hasta 1 yaşında paranişi geçirmiş. Hastanın rotavirüs ishali sebebiyle hastane yatışı bulunmakta. Yılda 4-5 kez üst solunum yolu enfeksiyonu sebebiyle hastane yatışı mevcutmuş. Hastanın atopik dermatiti bir kez stafilokok ile enfekte olmuş. Hastanın anne ve babası arasında birinci dereceden akrabalık bulunmaktadır.

4.2. TCR Repertuvar Analizleri

Çalışmaya dahil edilen 6 hasta ve 4 negatif kontrolün CD4+ ve CD8+ hücrelerinden analiz edilebilecek sonuçlar elde edilmiştir. Kontrol 4'ün CD4+ hücreleri çalışmadığı için analiz sonucu elde edilememiştir. Toplamda 4 CD8+ kontrol ve 3 CD4+ kontrol örneğinin TCR analiz sonuçları çalışmaya dahil edilmiştir. Çalışmada yalnızca *TCRβ* zinciri dizilemesi gerçekleştirilmiş ve analiz sonuçları gösterilmiştir. Hastaların CD4+ T hücrelerinden alınan okuma sayıları 118700 ile

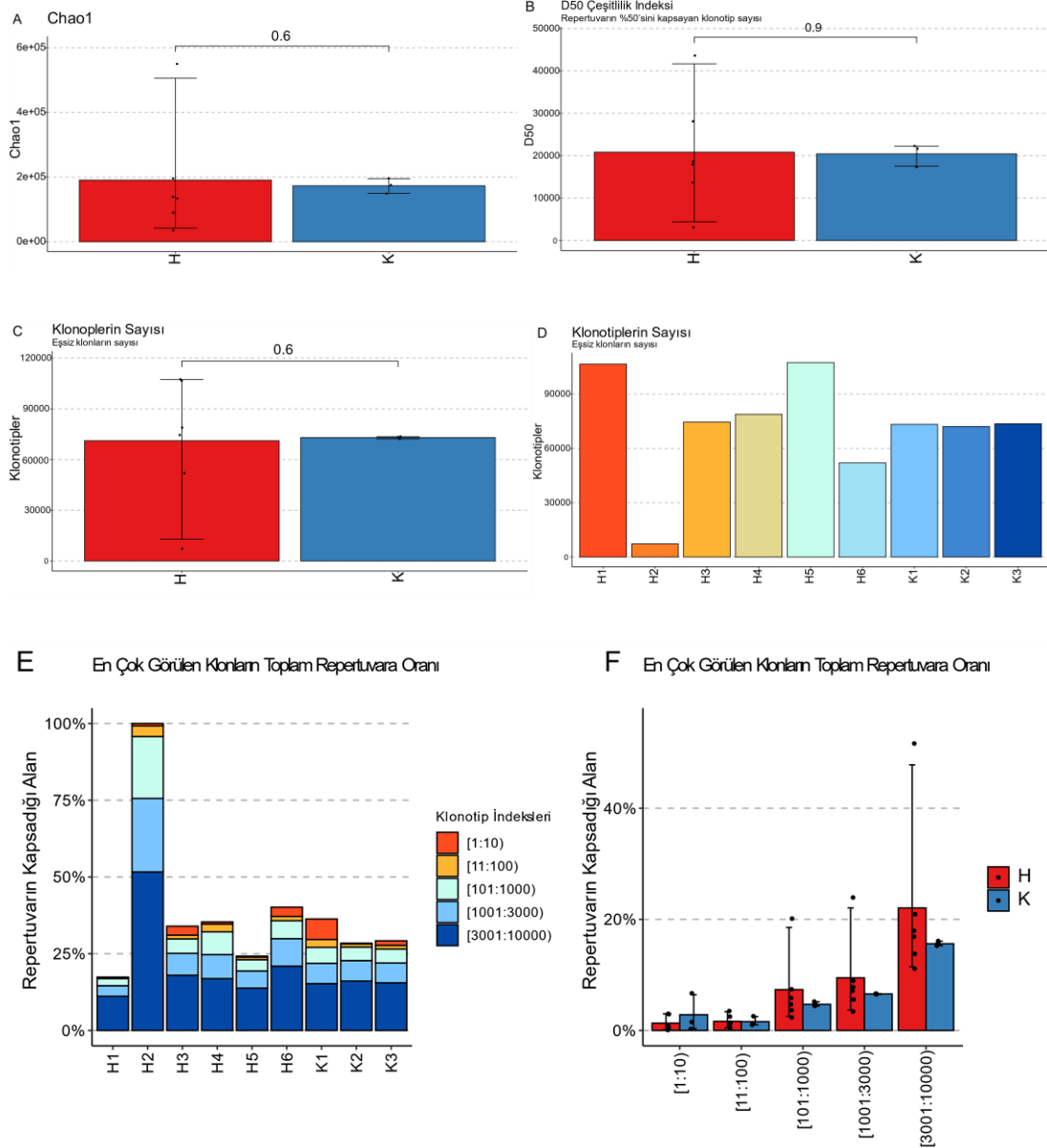
707186 arasında değişmektedir. Hastaların CD8+ T hücrelerinden alınan okuma sayıları 148127 ile 640216 arasında değişmektedir. Kontrollerin CD4+ T hücrelerinden alınan okuma sayıları 12305 ile 568796 arasında değişmektedir. Kontrollerin CD8+ T hücrelerinden alınan okuma sayıları 137000 ile 567223 arasında değişmektedir.

4.3. CD4+ T Hücre Sonuçları

4.3.1 TRB Repertuar Çeşitliliği

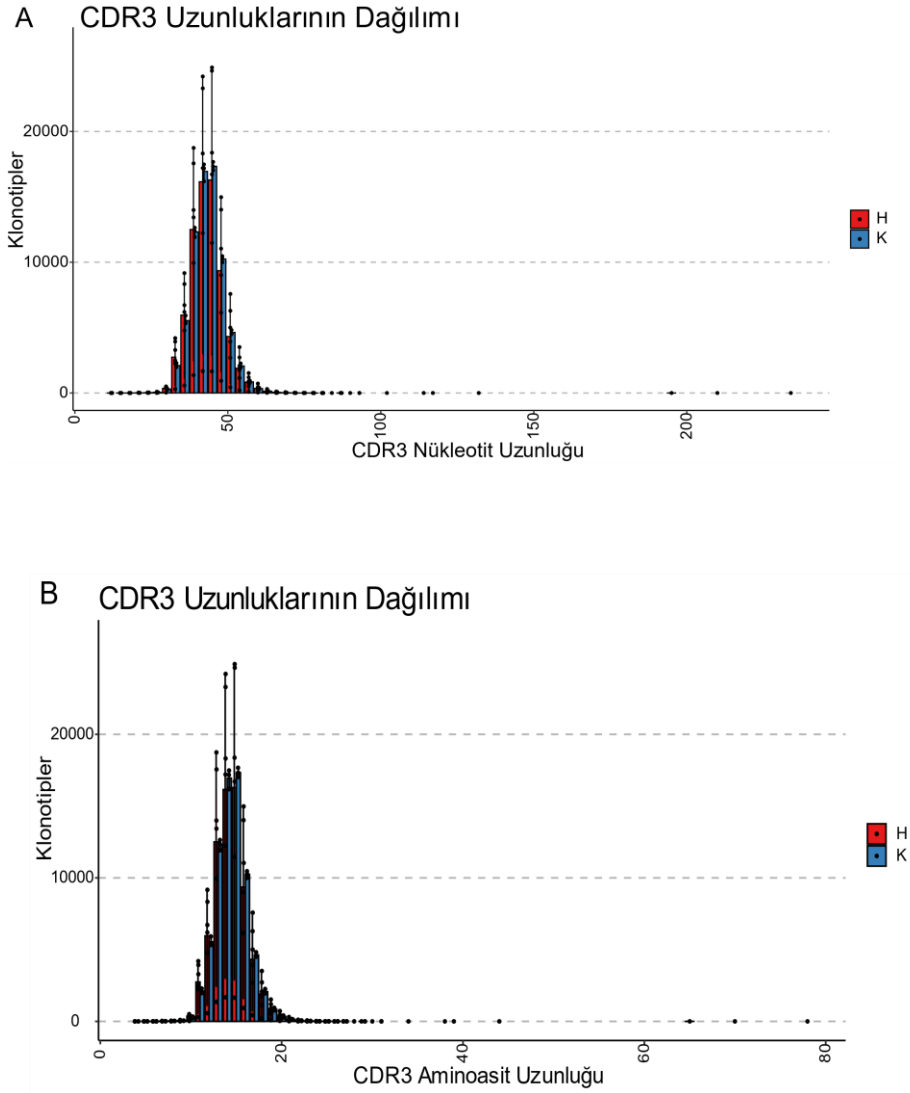
CD4+ T hücrelerin TCR β zincirinin repertuar çeşitliliği analizlerinde, Chao1 ve D50 çeşitlilik indekslerinin sonuçları, hasta ve kontrollerin eşsiz klonları ve klonotip sayıları şekil 4.1'de belirtilmiştir.

Şekil 4.1 A ve B'de Chao1 ve D50 çeşitlilik indeksleri kullanılarak kestirilen TCR β çeşitliliğinde, CD4+ T hücreler için hasta ve kontrol grupları arasında anlamlı ve belirgin farklılık gözlenmemiştir. Her iki indeks sonucu birbirine yakındır. Şekil 4.1 C'de eşsiz klonotip sayısında hasta ve kontrol grupları arasında anlamlı farklılık gözlenmemiştir. Eşsiz klonotip sayıları birbirine yakın elde edilmiştir. Şekil 4.1 D'de 2 numaralı hasta dışında tüm hasta ve kontrollerin eşsiz klonotip sayıları birbirine yakın elde edilmiştir. 2 numaralı hastanın eşsiz klonotip sayısında belirgin bir düşüklük gözlemlenmiştir. Şekil 4.1. E'de 2 numaralı hasta dışında tüm hasta ve kontrollerde, belirli klonların kapsadığı alanlar birbirine yakın gözlemlenmiştir. Hasta grubunun eşsiz klonotip sayısı ortalama ve yaklaşık olarak 70.000, kontrol grubunun eşsiz klonotip sayısı ortalama ve yaklaşık olarak 75.000'dir (Şekil 4.1 C).



Şekil 4.1. CD4+ T hücrelerin TCR β zincirinin çeşitliliği.

A) Chao1 çeşitlilik indeksi kullanılarak kestirilen TCR β çeşitliliği. B) D50 çeşitlilik indeksi kullanılarak kestirilen TCR β çeşitliliği. C, D) Hasta ve kontrollerin eşsiz klonotiplerinin sayısı. E) Belirlenen klonotip indeks aralıklarında hasta ve kontrol gruplarının repertuarlarındaki belirli klonların kapsadığı alan yüzdeleri. F) Klonotip indekslerinin hasta ve kontrol gruplarında kapsadığı alan yüzdeleri. Verilerin istatistiksel analizleri Wilcoxon ve Kruskal-Wallis testleri kullanılarak yapılmıştır ve Holm-Benferroni düzeltmesi uygulanmıştır. ($P < 0.05$)



Şekil 4.2. CD4+ T hücrelerin TCR β zincirinin CDR3 bölgelerinin nükleotit ve aminoasit uzunlukları.

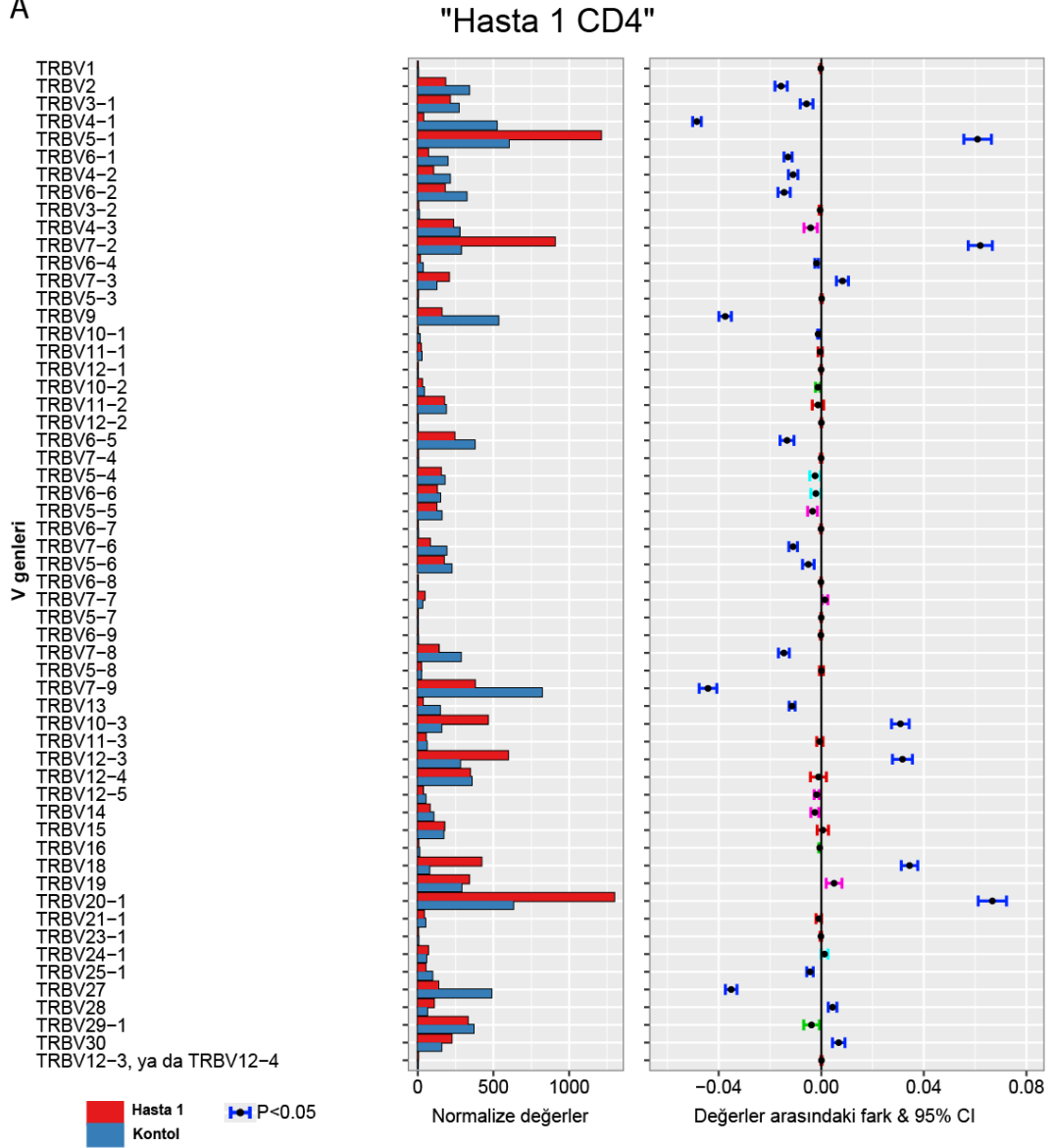
Hasta ve kontrol gruplarında, CDR3 aminoasit ve nükleotit uzunları açısından anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir.

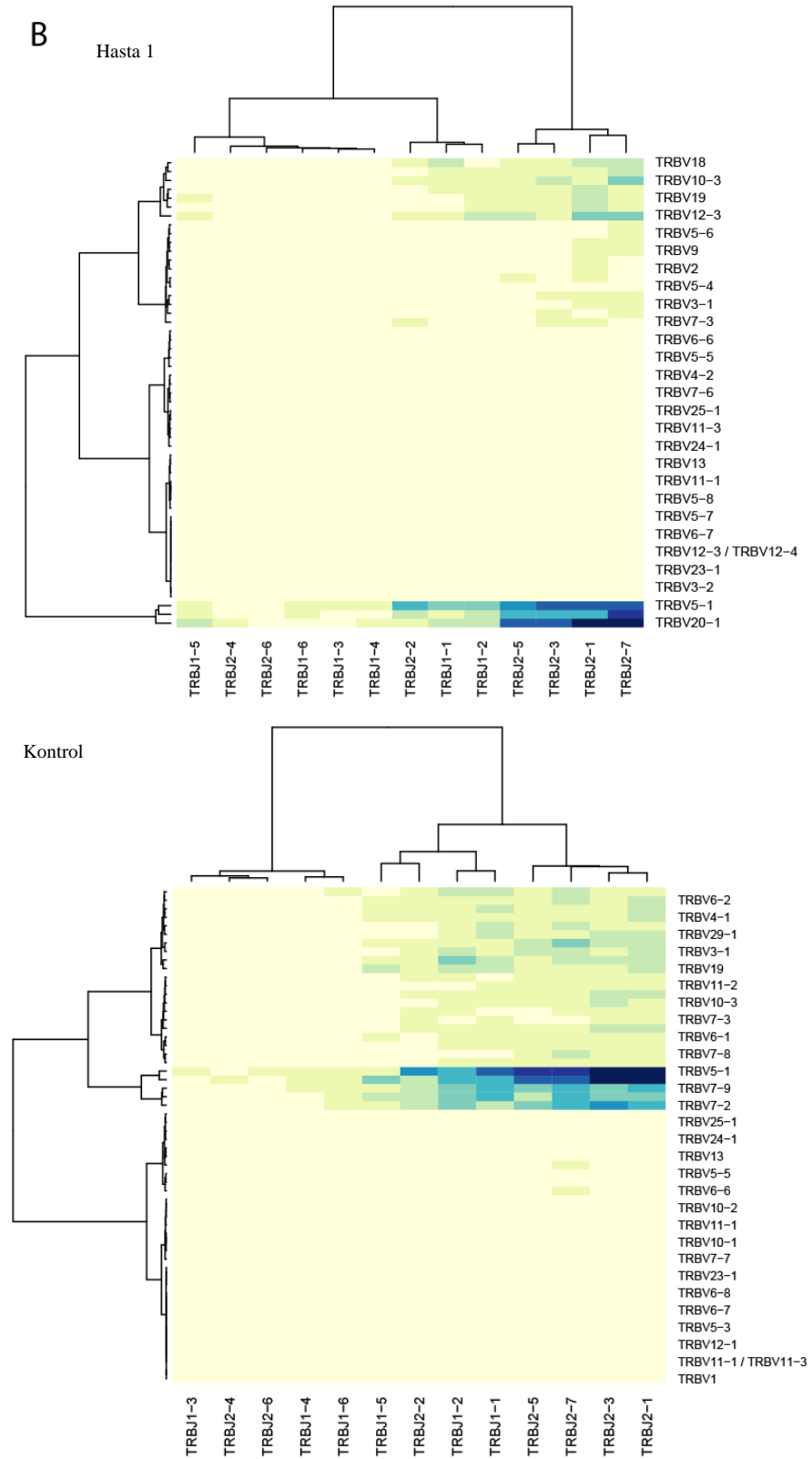
4.3.2. CD4+ T Hücrelerde V Zincirini Kodlayan Genlerin Kullanımı (*Gene Usage*)

CD4+ T hücrelerin TCR β zincirini kodlayan V genlerinin kullanımının analizi toplamda 5 hasta ve 3 kontrolde gerçekleştirilmiştir. 6 numaralı hastanın ve kontrol 4'ün CD4+ V gen kullanımı analizi yapılamamıştır. Hastaların V genlerinin kullanımını ve V-J zincirlerini kodlayan genlerin birlikte kullanımı gösteren grafikler şekil 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7 ve 4.8'de belirtilmiştir. V gen kullanımı grafiklerindeki

koyu mavi ile gösterilmiş hata çubukları, istatistiksel olarak anlamlı frekans farklılıklarını göstermektedir ($P < 0.05$).

A

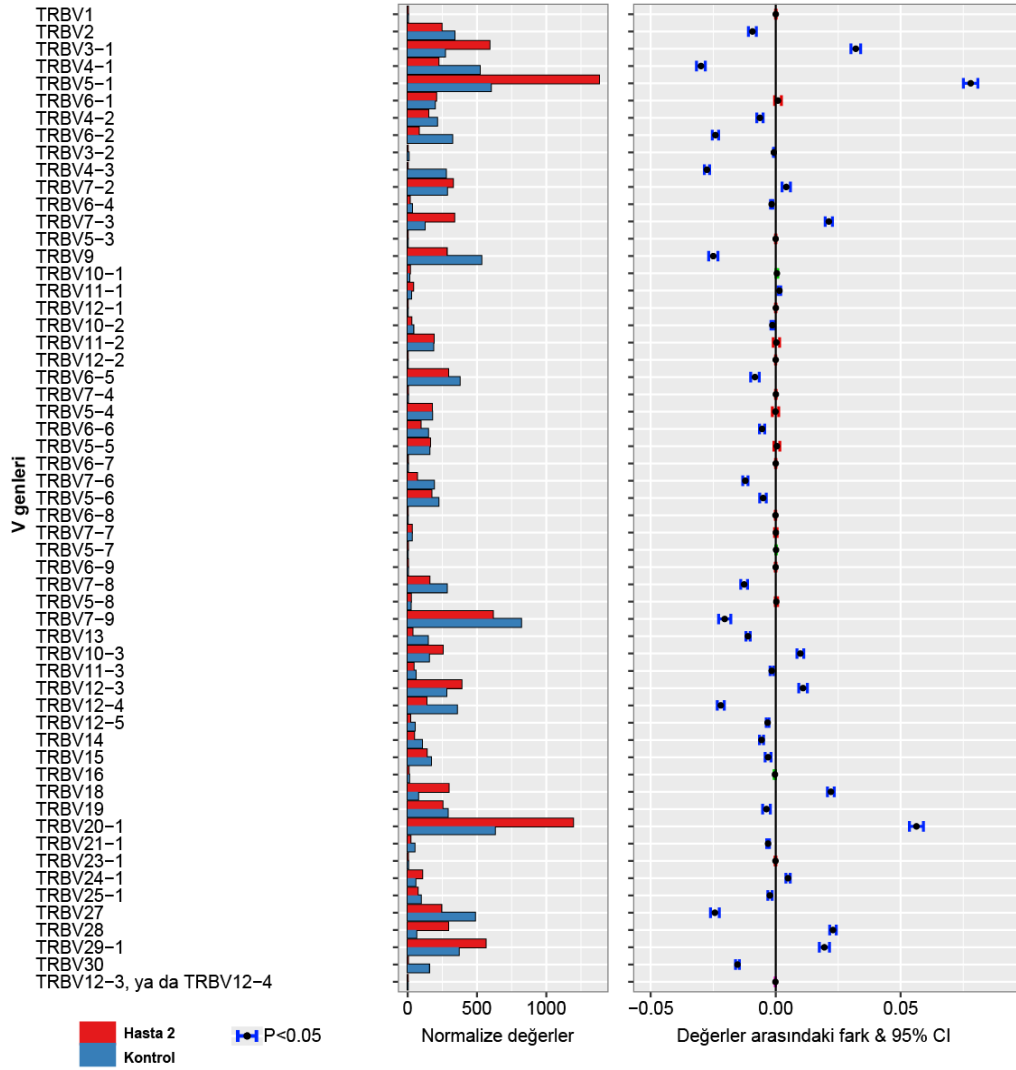


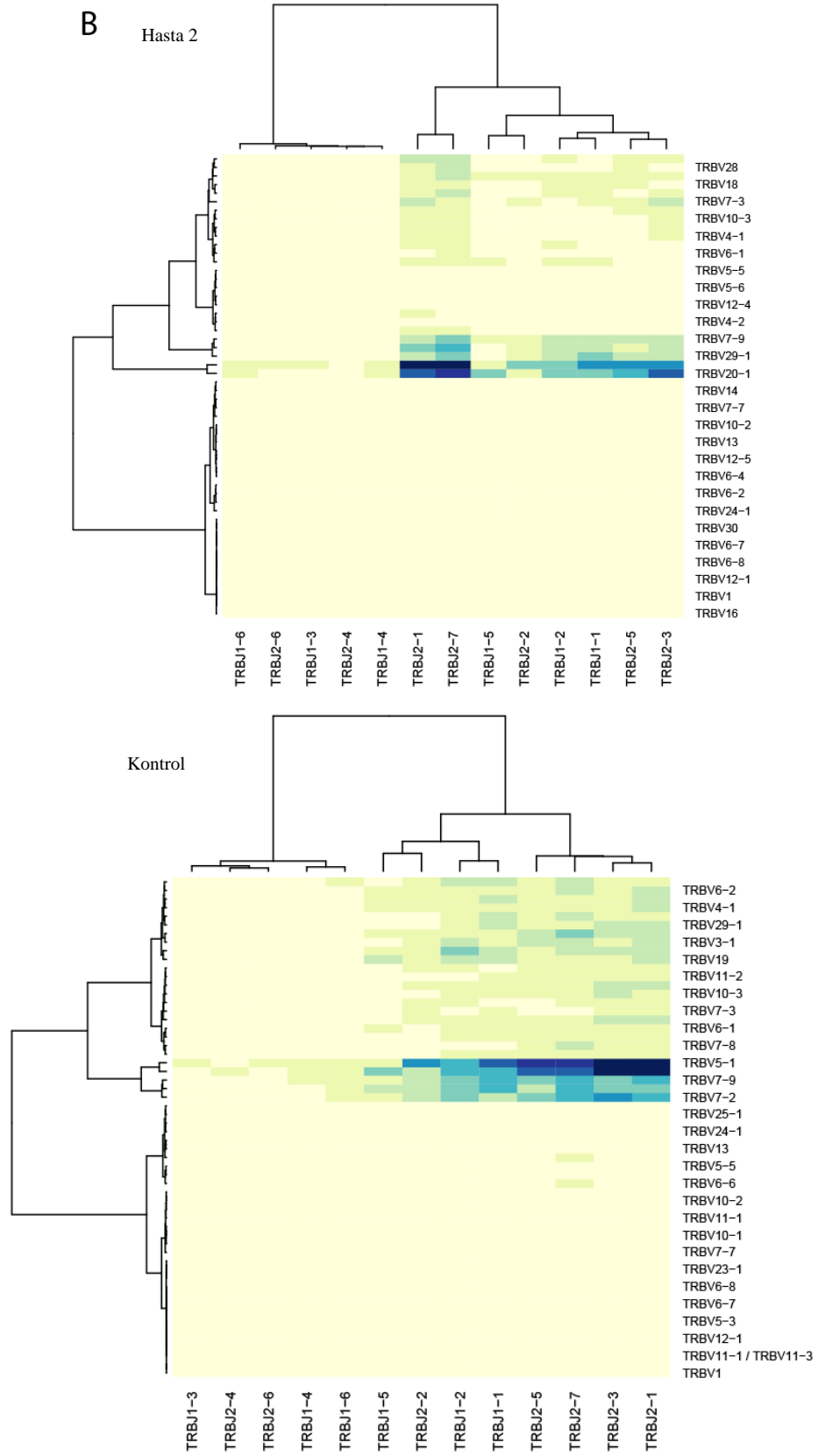


Şekil 4.3. 1 numaralı hastanın CD4+ T hücre reseptörlerinin V-J zincirlerini kodlayan genleri.

A

"Hasta 2 CD4"

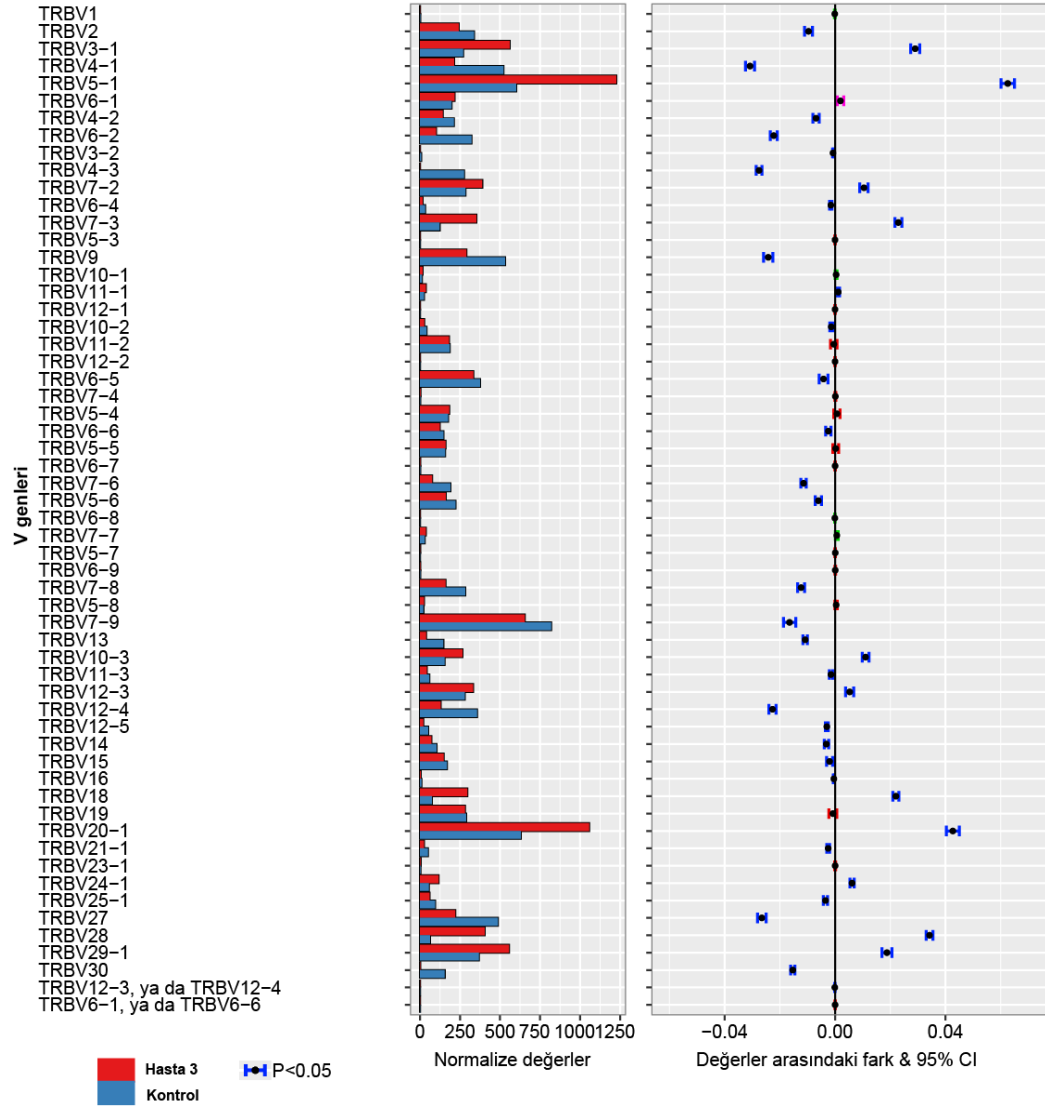


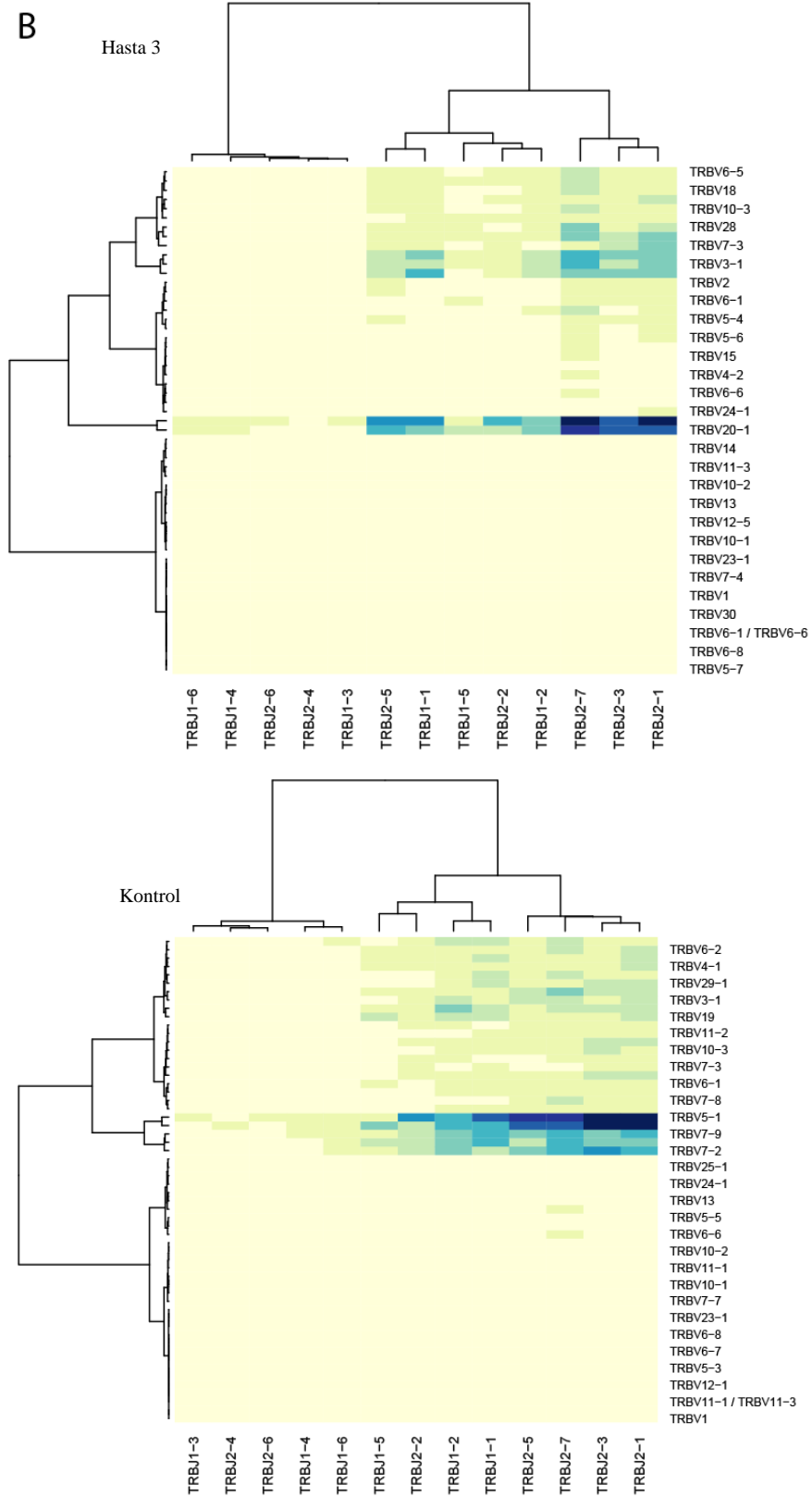


Şekil 4.4. 2 numaralı hastanın CD4+ T hücre reseptörlerinin V-J zincirlerini kodlayan genleri.

A

"Hasta 3 CD4"

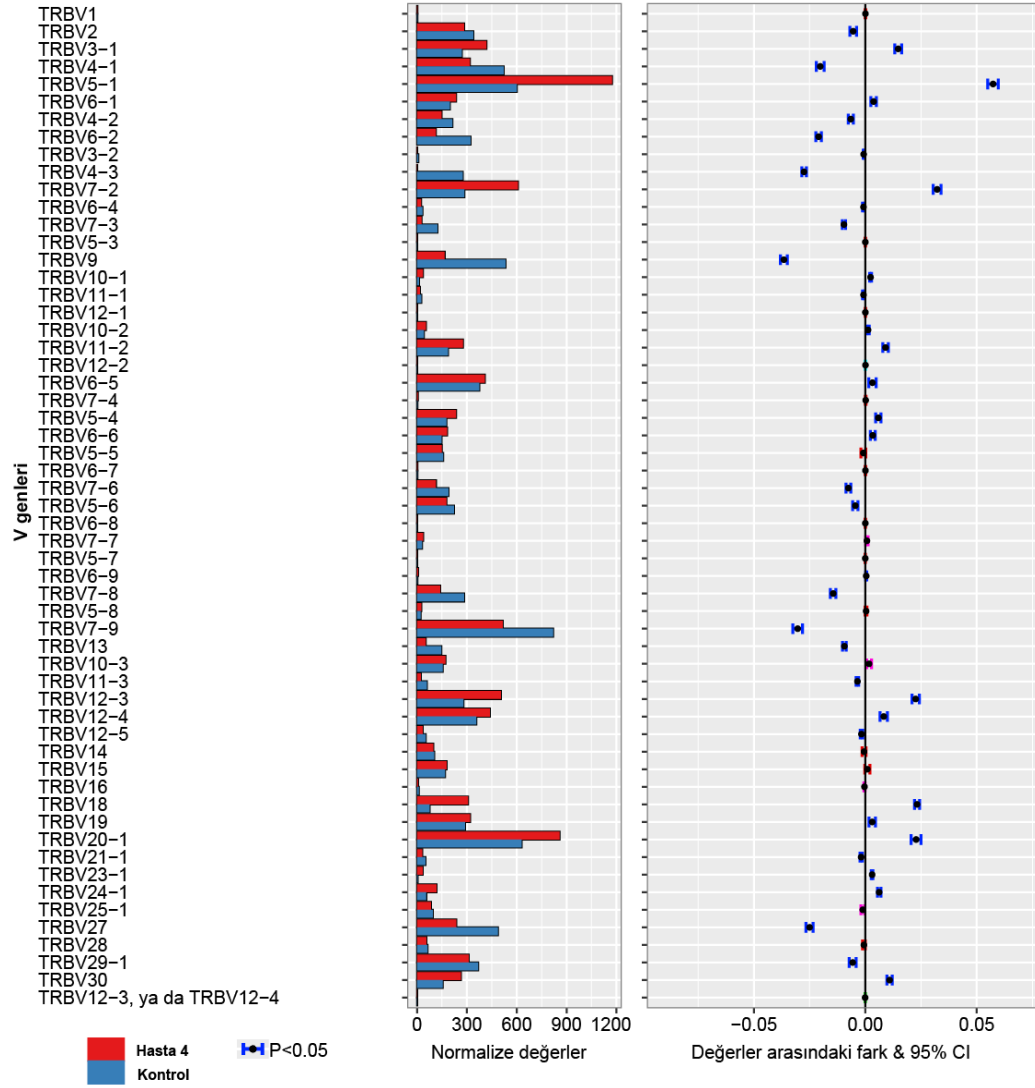


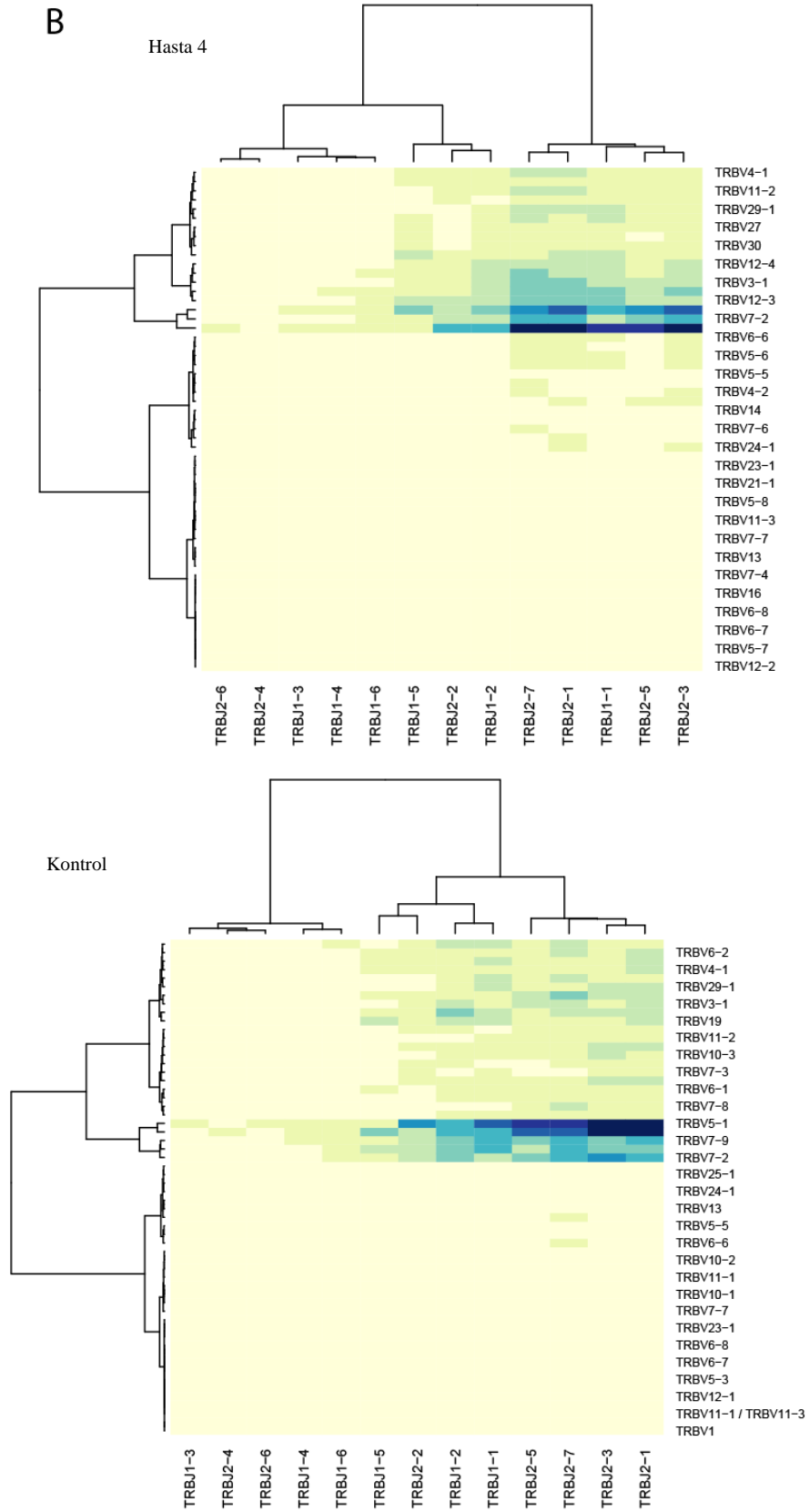


Şekil 4.5. 3 numaralı hastanın CD4+ T hücre reseptörlerinin V-J zincirlerini kodlayan genleri.

A

"Hasta 4 CD4"

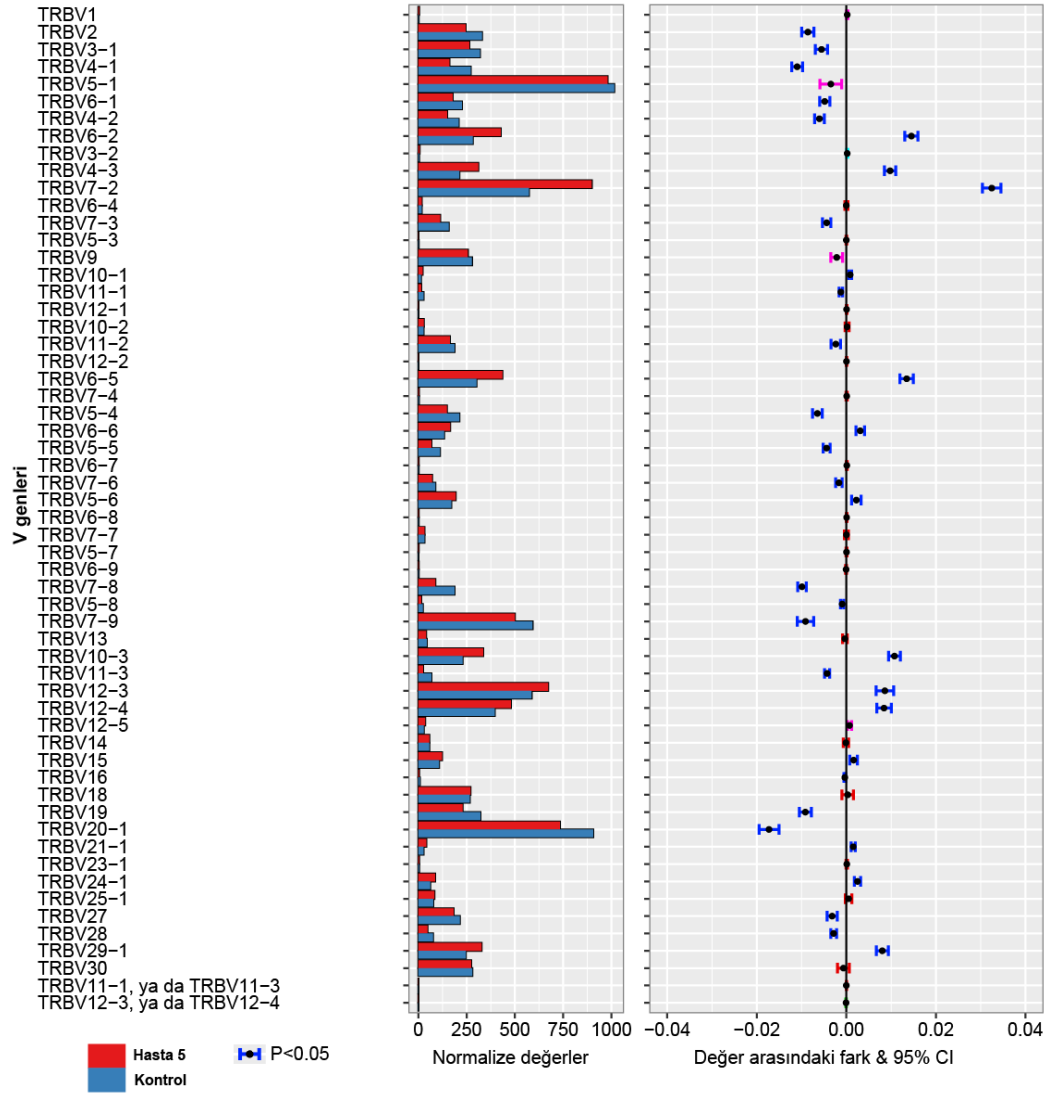


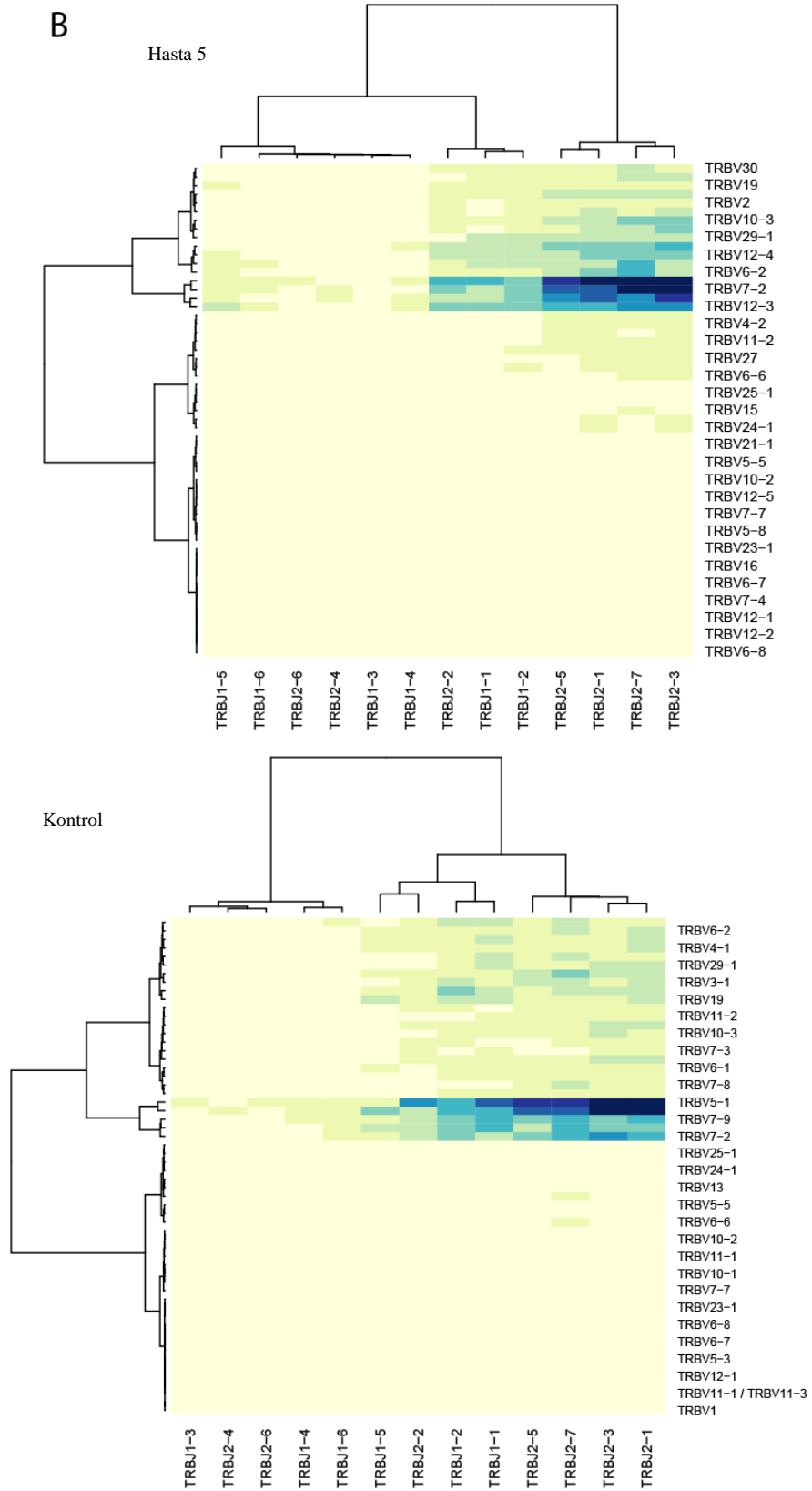


Şekil 4.6. 4 numaralı hastanın CD4⁺ T hücre reseptörlerinin V-J zincirlerini kodlayan genleri.

A

"Hasta 5 CD4"





Şekil 4.7. 5 numaralı hastanın CD4+ T hücre reseptörlerinin V-J zincirlerini kodlayan genleri.

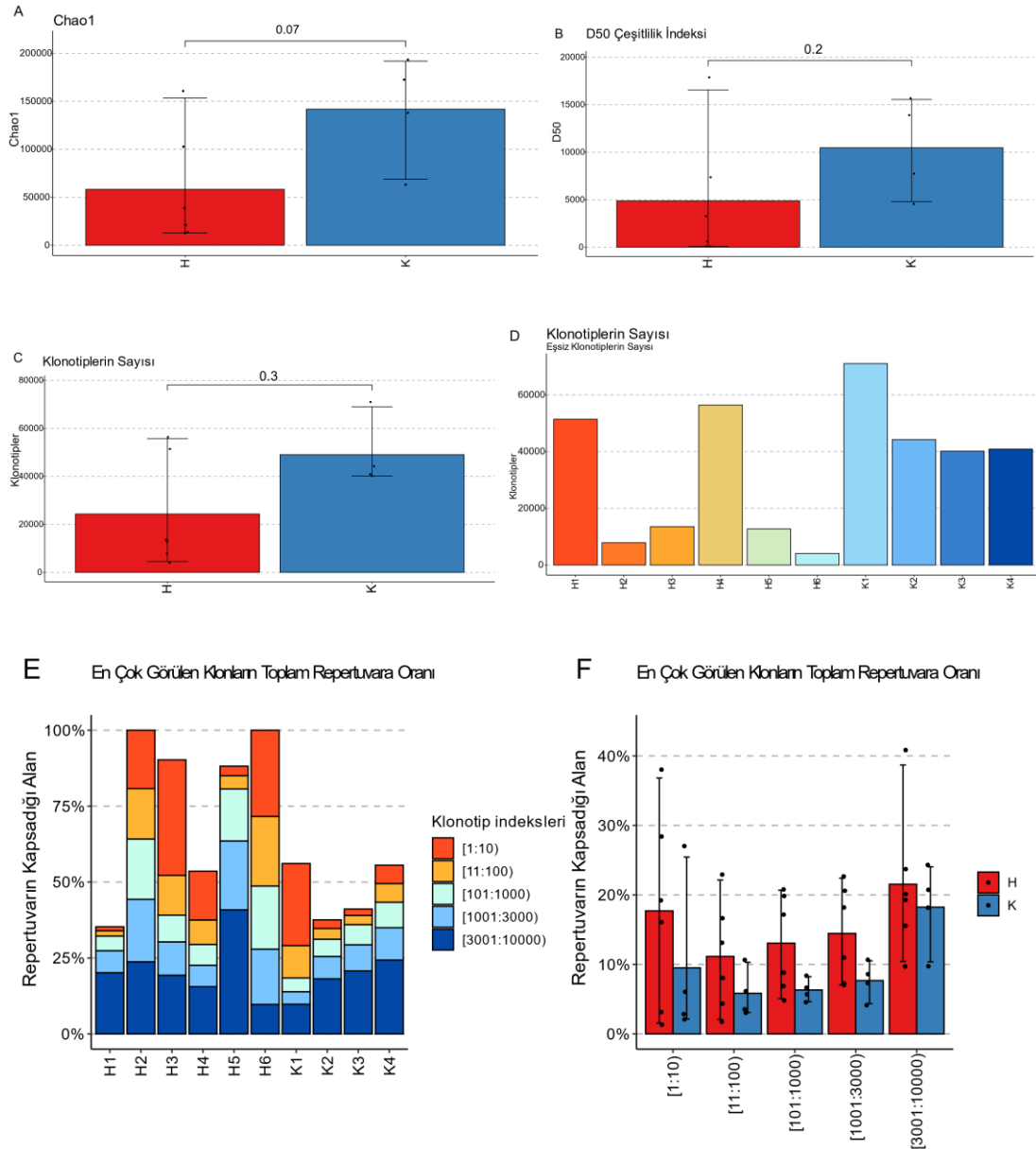
Hastaların CD4+ T hücre V gen kullanımı grafiklerinde birbirine yakın sonuçlar elde edilmiştir. Hasta 1, 2, 3 ve 4'te *TRBV5-1*, *TRBV7-2* ve *TRBV20-1* genlerinin kullanımında kontrole oranla anlamlı farklılık gözlenmiştir. 5 numaralı hasta V genlerinin kullanımında kontrole oranla anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. Hastaların CD4+ T hücrelerinin V-J gen kullanımları birbirleri ile benzerlik göstermektedir.

4.4. CD8+ T Hücre Sonuçları

4.4.1. TRB Repertuar Çeşitliliği

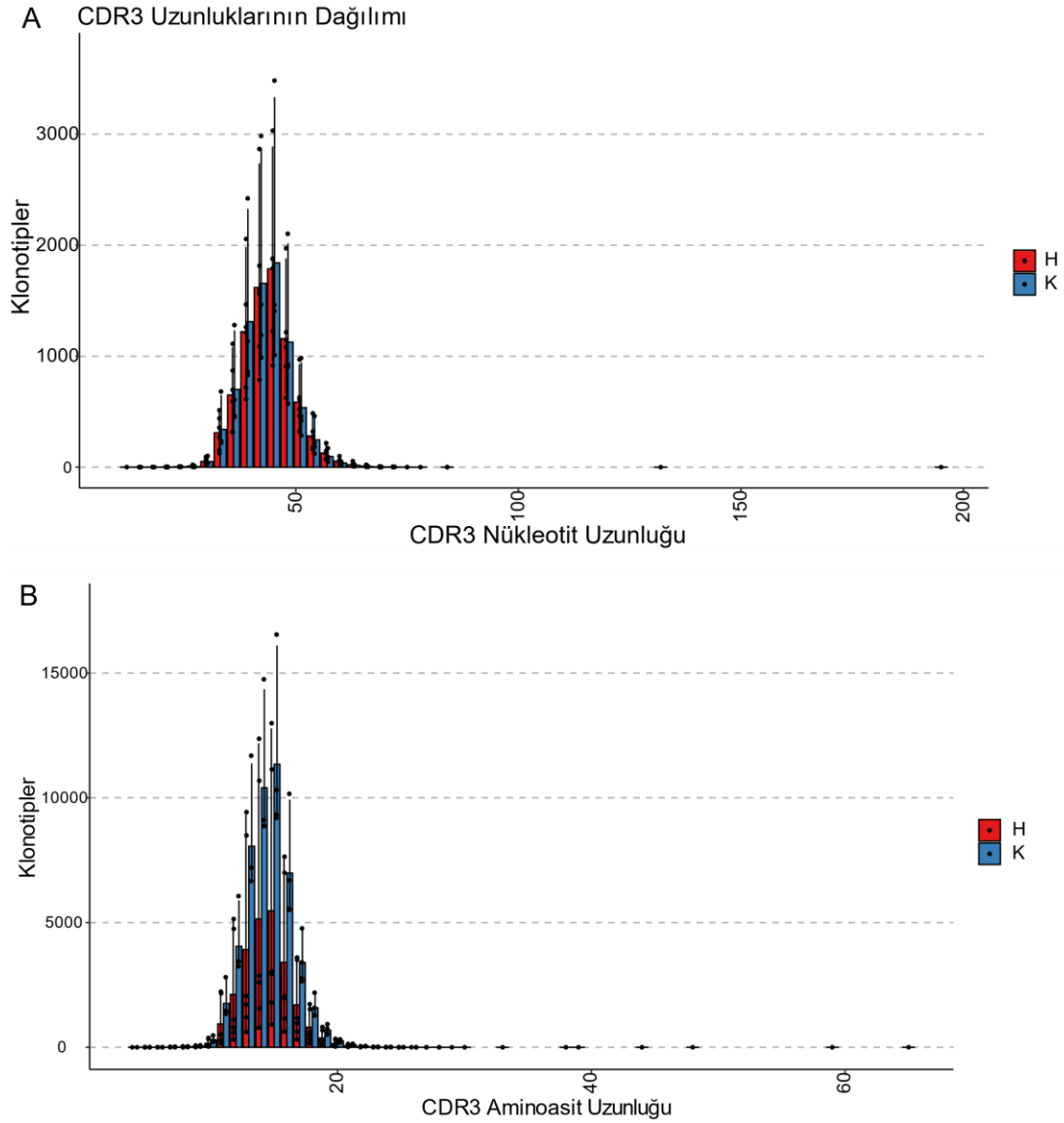
CD8+ T hücrelerin TCR β zincirinin repertuar çeşitliliği analizlerinde, Chao1 ve D50 çeşitlilik indekslerinin sonuçları, hasta ve kontrollerin eşsiz klonları ve klonotip sayıları şekil 4.8'de belirtilmiştir.

Şekil 4.8 A ve B'de Chao1 ve D50 çeşitlilik indeksleri kullanılarak kestirilen TCR β çeşitliliğinde, CD8+ T hücreler için hasta ve kontrol grupları arasında anlamlı farklılık gözlenmemiş olmasına rağmen belirgin bir fark elde edilmiştir. Şekil 4.8 C'de eşsiz klonotip sayısında hasta ve kontrol grupları arasında, istatistiksel olarak anlamlı olmamasına rağmen belirgin bir farklılık gözlemlenmiştir. Şekil 4.8 D'de 1 ve 4 numaralı hasta dışındaki hastaların eşsiz klonotip sayılarında kontrollere oranla belirgin bir düşüklük gözlemlenmiştir. Şekil 4.8 E'de 1 ve 4 numaralı hasta dışındaki hastaların belirli klonotiplerinin kapsadığı alan yüzdeliği kontrollere oranla daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Hasta grubunun eşsiz klonotip sayısı ortalama ve yaklaşık olarak 25.000, kontrol grubunun eşsiz klonotip sayısı ortalama ve yaklaşık olarak 50.000'dir (Şekil 4.8 C).



Şekil 4.8. CD8+ T hücrelerin TCR β zincirinin çeşitliliği.

A) Chao1 çeşitlilik indeksi kullanılarak kestirilen TCR β çeşitliliği. B) D50 çeşitlilik indeksi kullanılarak kestirilen TCR β çeşitliliği. C, D) Hasta ve kontrol gruplarının eşsiz klonotiplerinin sayısı. E) Belirlenen klonotip indeks aralıklarında hasta ve kontrol gruplarının repertuarlarındaki belirli klonların kapsadığı alan yüzdeleri. F) Klonotip indekslerinin hasta ve kontrol gruplarında kapsadığı alan yüzdeleri. Verilerin istatistiksel analizleri Wilcoxon ve Kruskal-Wallis testleri kullanılarak yapılmıştır ve Holm-Benferoni düzeltmesi uygulanmıştır. ($P < 0.05$)



Şekil 4.9. CD8+ T hücrelerin TCR β zincirinin CDR3 bölgelerinin nükleotit ve aminoasit uzunlukları.

CD8+ T hücrelerde hastaların CDR3 aminoasit uzunlukları kontrole oranla belirgin bir şekilde daha kısa elde edilmiştir.

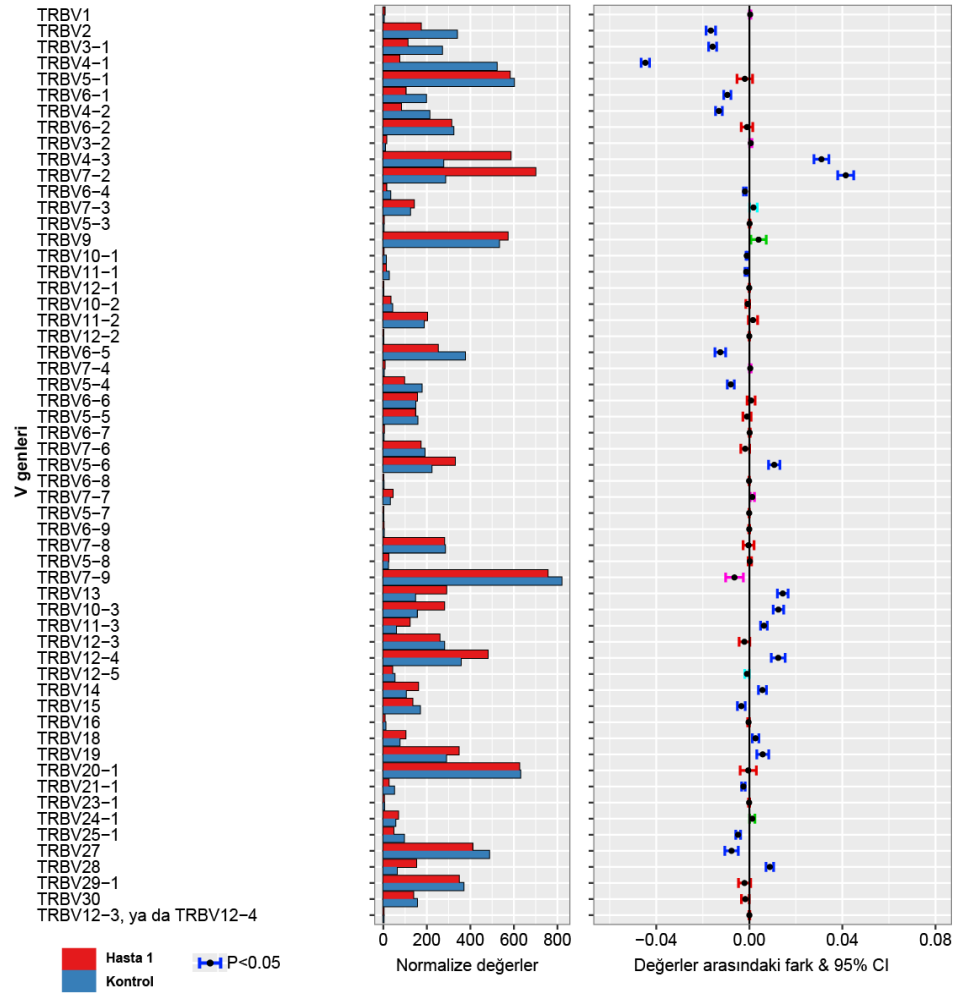
4.4.2. CD8+ T Hücrelerde V Zincirini Kodlayan Genlerin Kullanımı (*Gene Usage*)

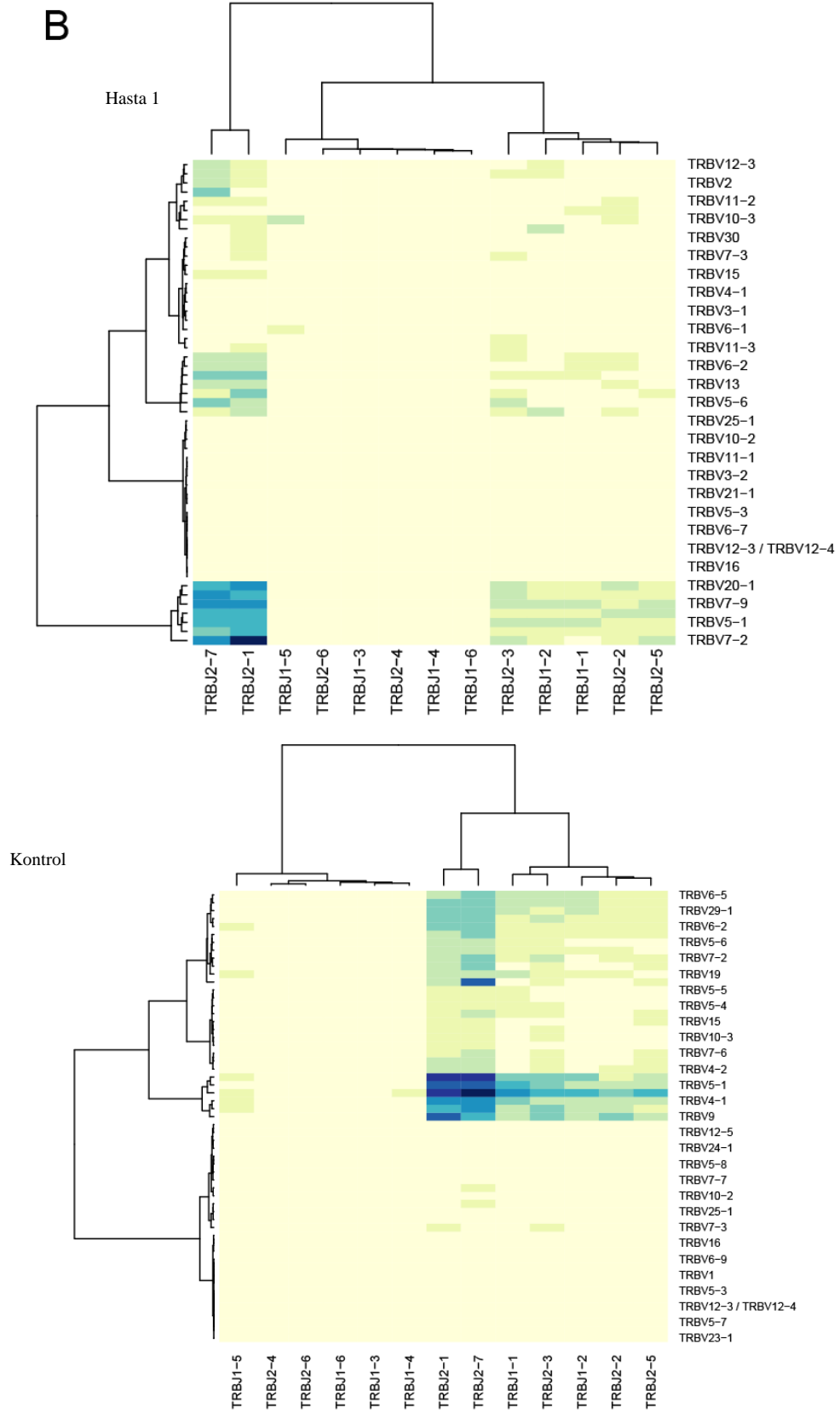
CD8+ T hücrelerin TCR β zincirini kodlayan V genlerinin kullanımının analizi toplamda 6 hasta ve 4 kontrol grubunda gerçekleştirilmiştir. 6 numaralı hastanın V-J genlerinin birlikte kullanımının analizi yapılmadığı için sonuç verilmemiştir. Hastaların V genlerinin kullanımını ve V-J zincirlerini kodlayan genlerin birlikte

kullanımı gösteren grafikler Şekil 4.10, 4.11, 4.12, 4.13, 4.14 ve 4.15'te belirtilmiştir. V gen kullanımı grafiklerindeki koyu mavi ile gösterilmiş hata çubukları, istatistiksel olarak anlamlı frekans farklılıklarını göstermektedir ($P < 0.05$).

A

"Hasta 1 CD8"

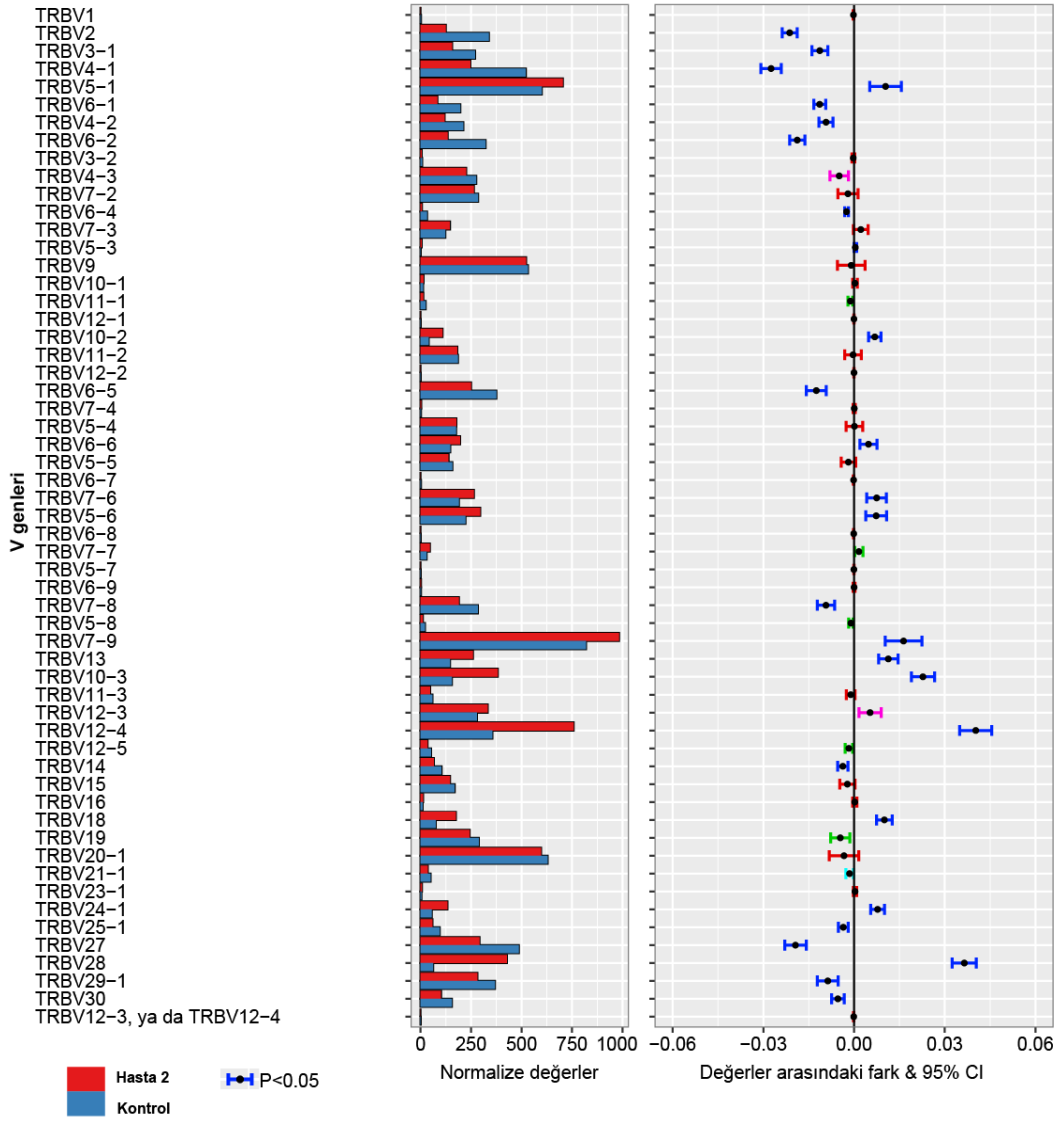


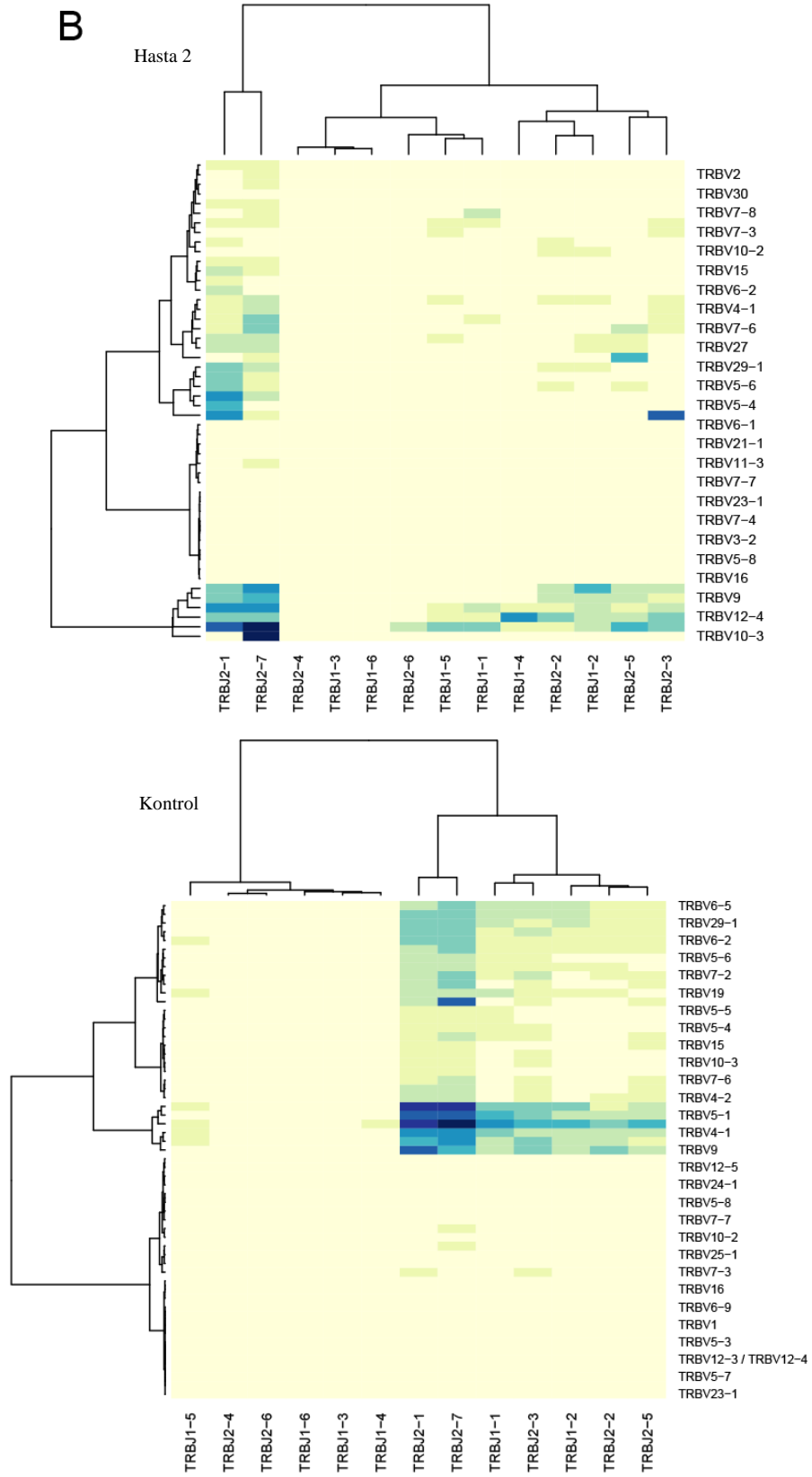


Şekil 4.10. 1 numaralı hastanın CD8⁺ T hücre reseptörlerinin V-J zincirlerini kodlayan genleri.

A

"Hasta 2 CD8"

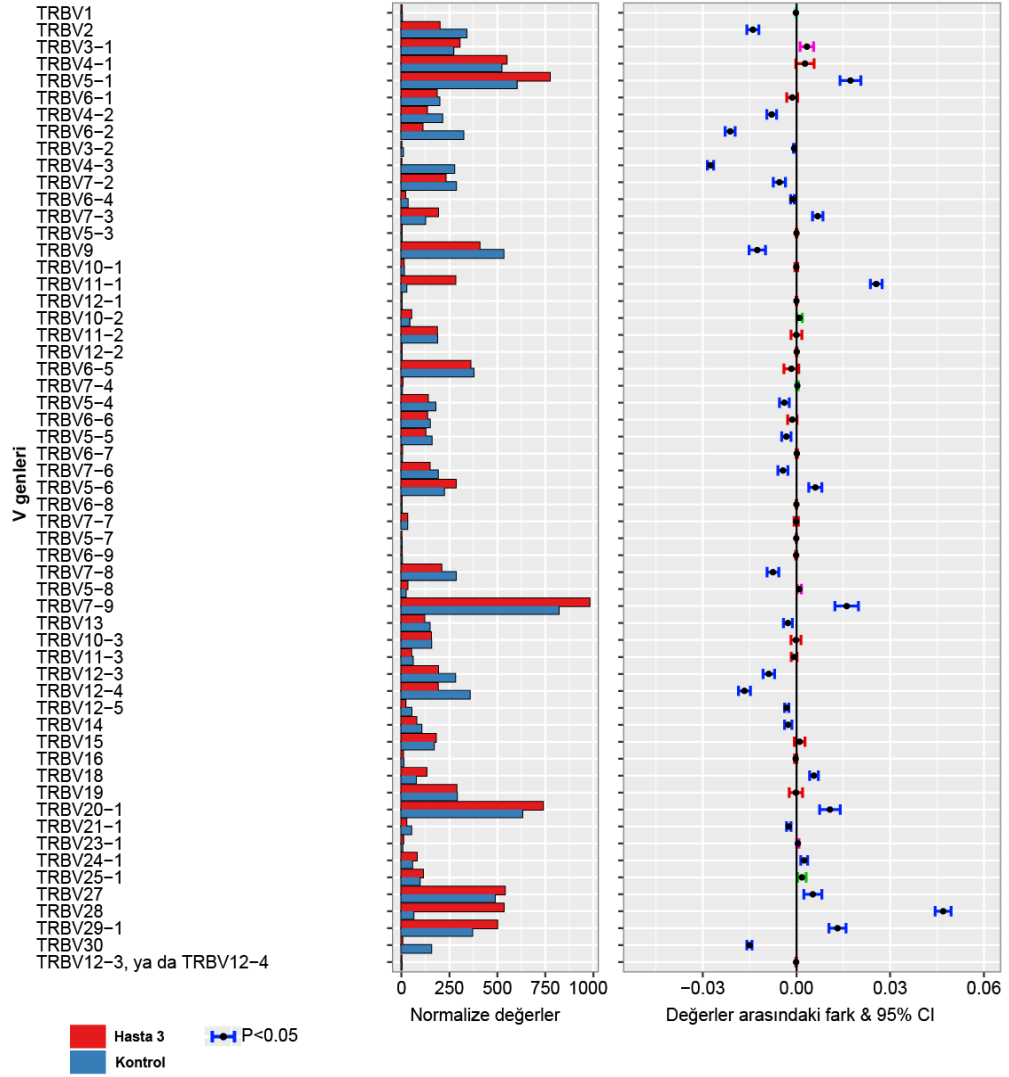


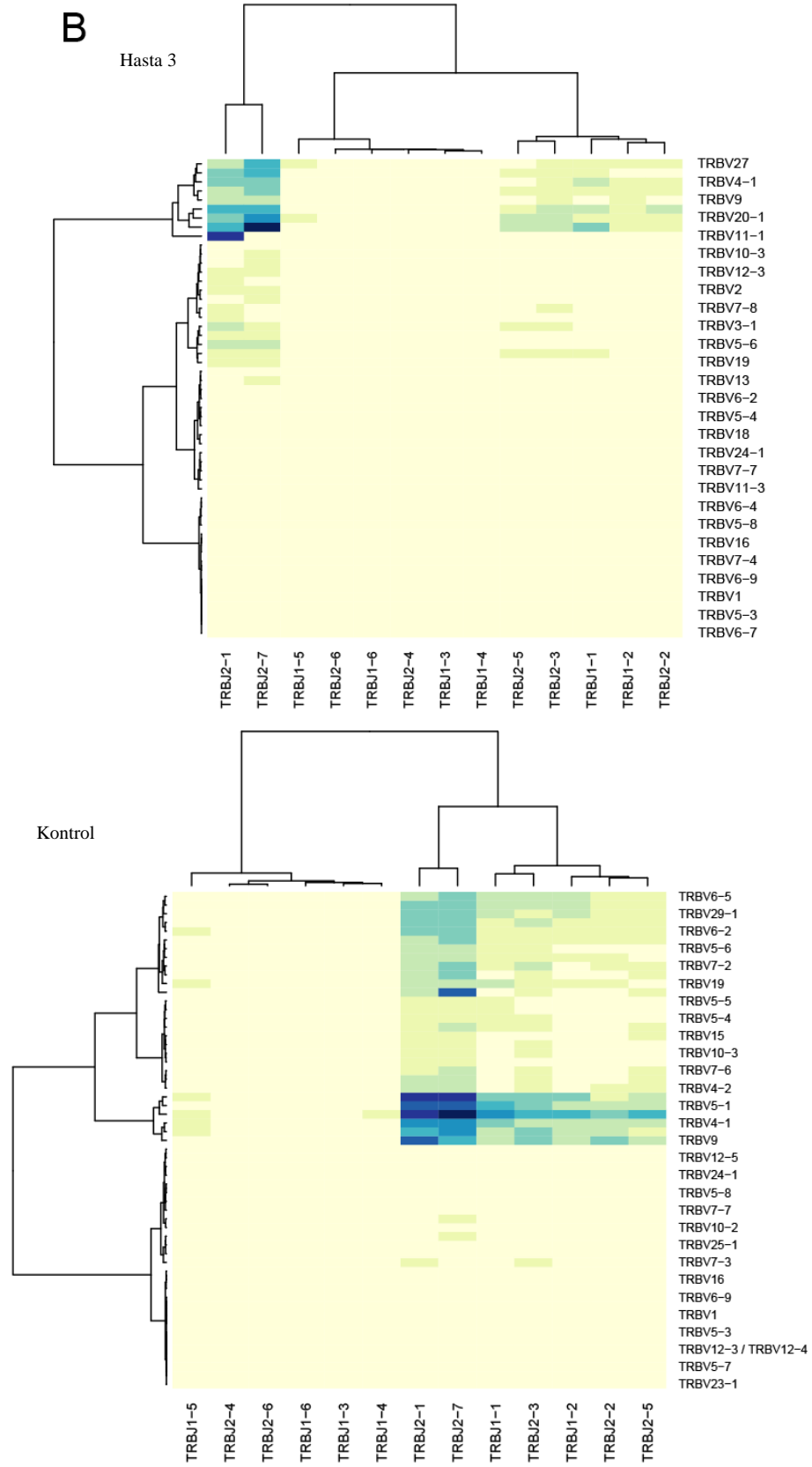


Şekil 4.11. 2 numaralı hastanın CD8⁺ T hücre reseptörlerinin V-J zincirlerini kodlayan genleri.

A

"Hasta 3 CD8"

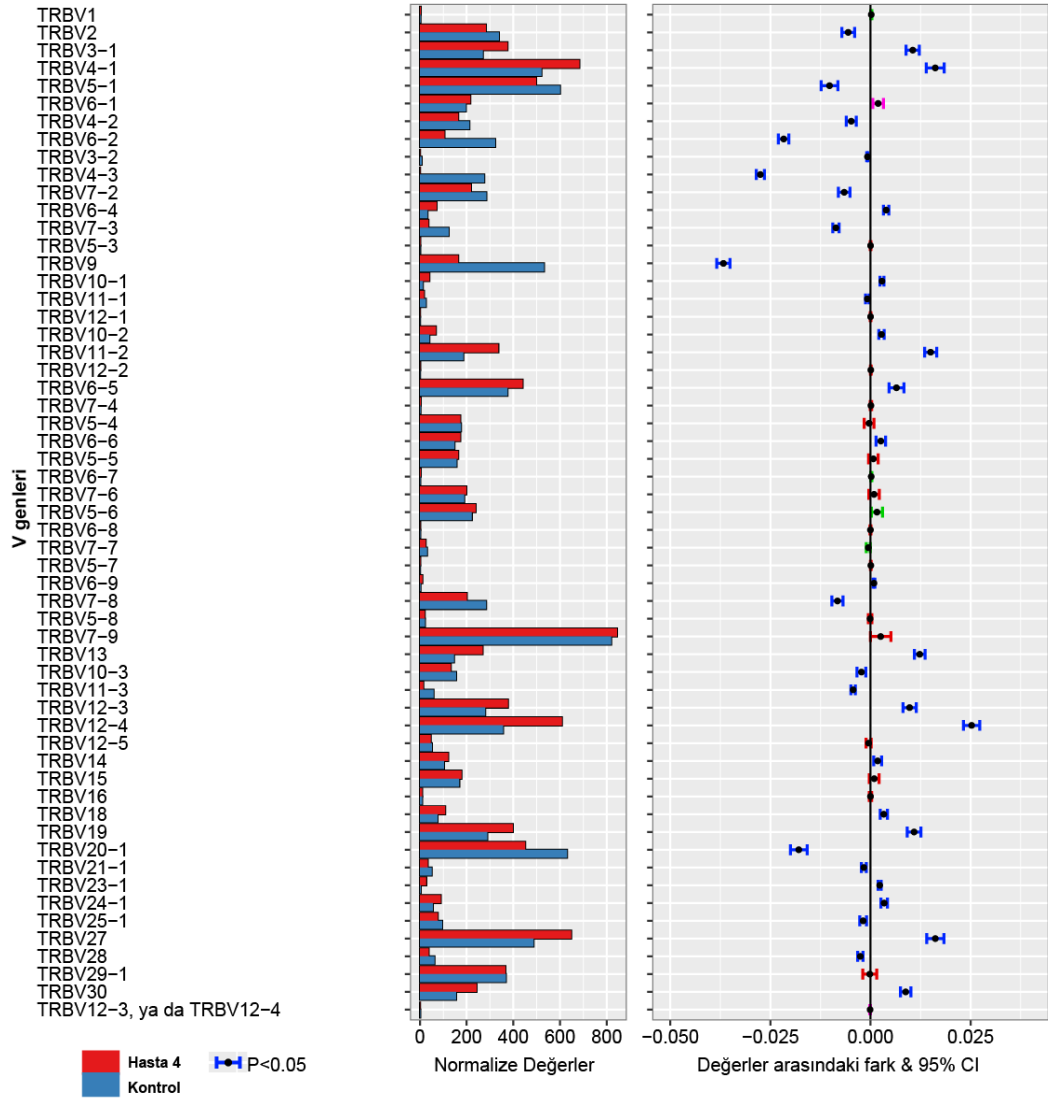


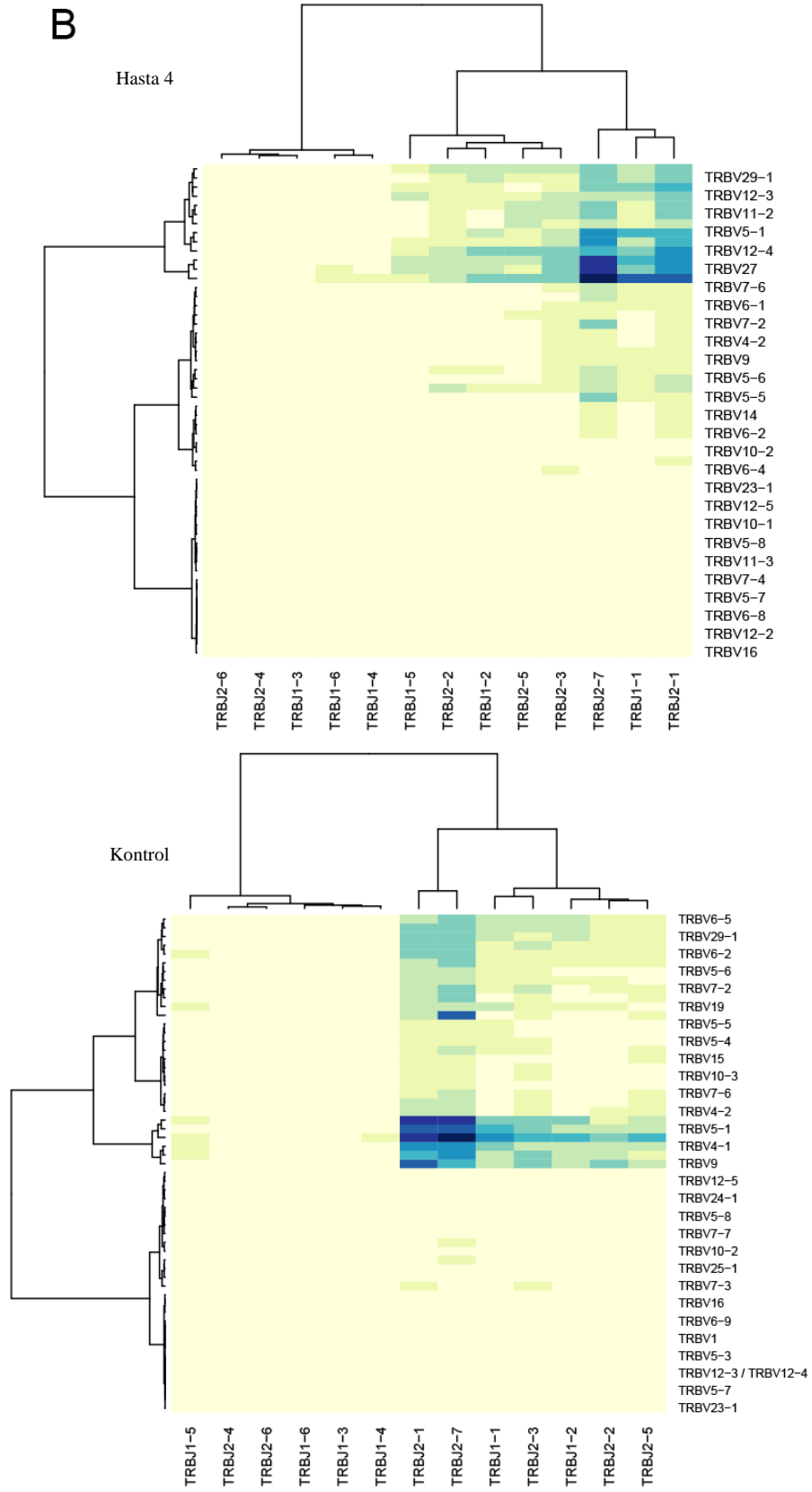


Şekil 4.12. 3 numaralı hastanın CD8⁺ T hücre reseptörlerinin V-J zincirlerini kodlayan genleri.

A

"Hasta 4 CD8"

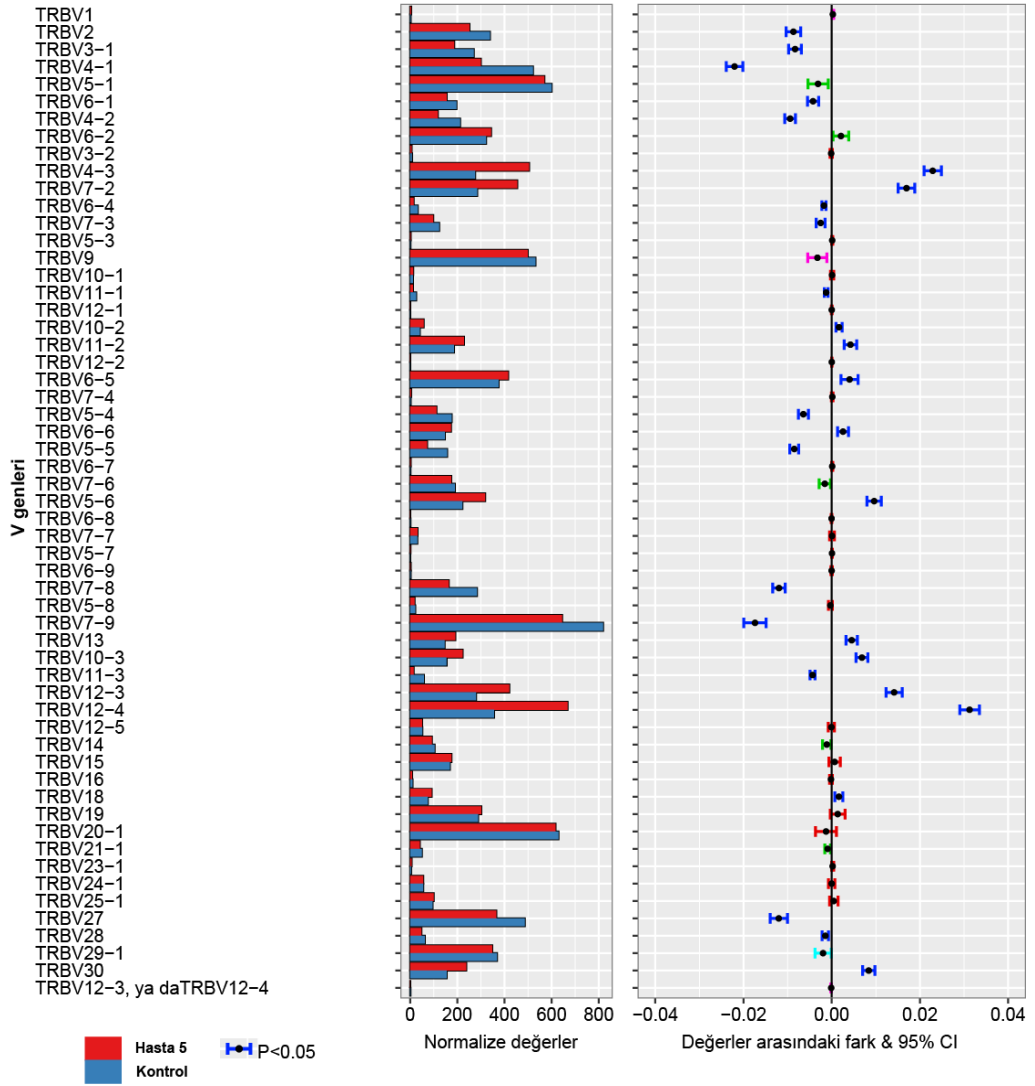


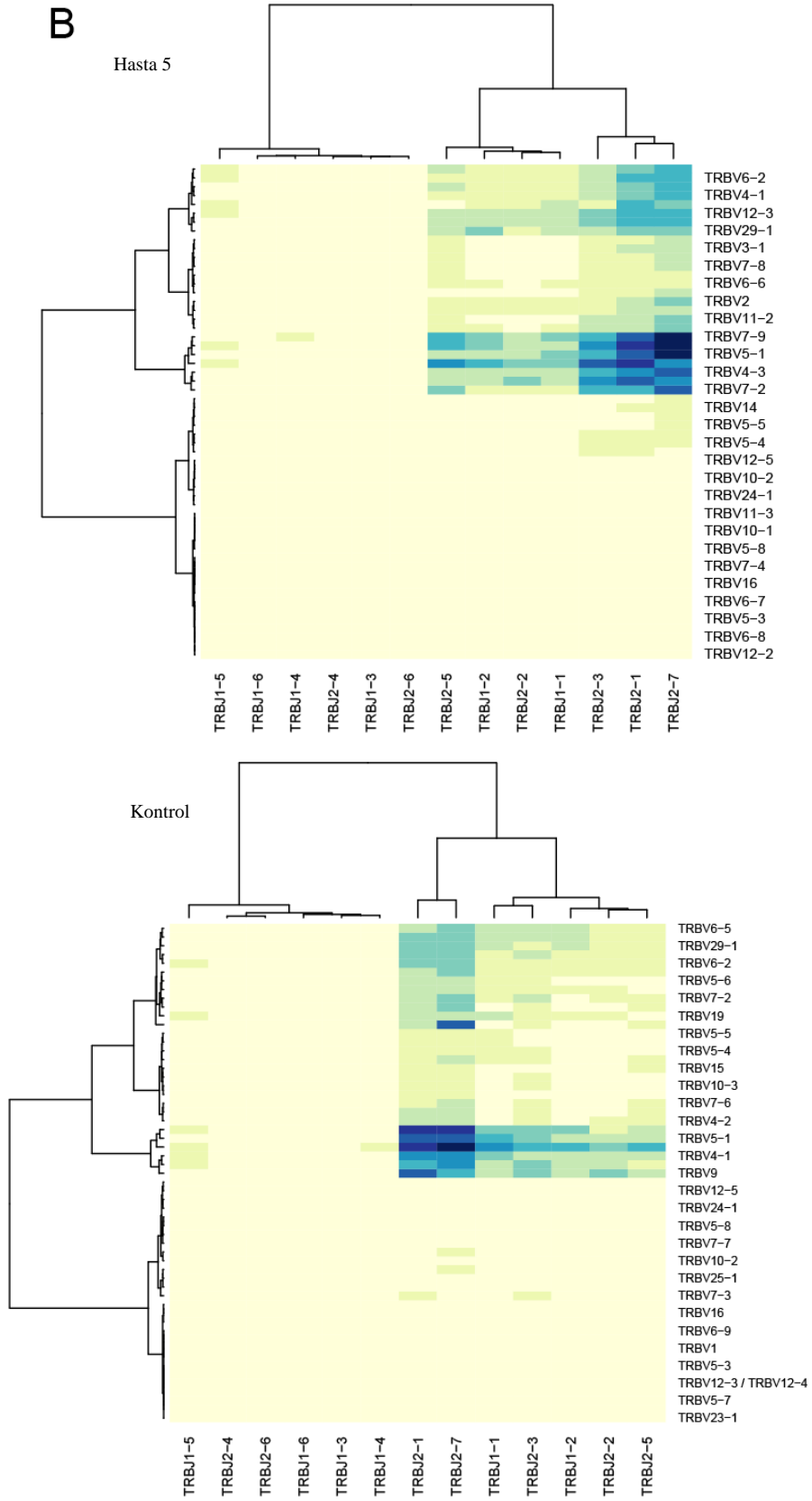


Şekil 4.13. 4 numaralı hastanın CD8⁺ T hücre reseptörlerinin V-J zincirlerini kodlayan genleri.

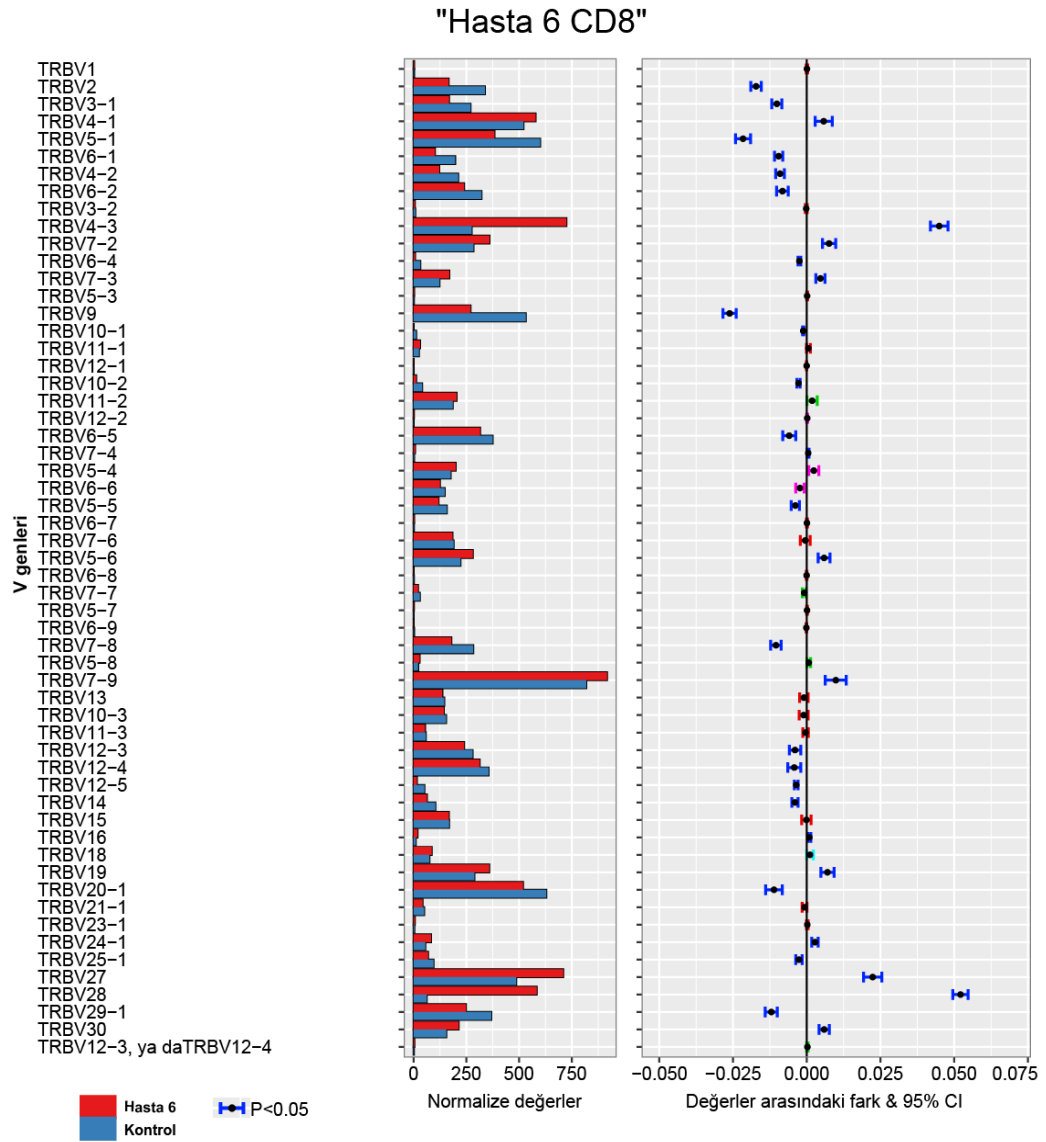
A

"Hasta 5 CD8"





Şekil 4.14. 5 numaralı hastanın CD8⁺ T hücre reseptörlerinin V-J zincirlerini kodlayan genleri.



Şekil 4.15. 6 numaralı hastanın CD8⁺ T hücre reseptörlerinin V zincirini kodlayan genleri.

5. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında, DOCK8 eksikliği olan hastalarda TRB repertuarını karşılaştırmak için dolaşımdaki T hücrelerden NGS ile repertuar analizi gerçekleştirilmiştir. DOCK8 eksikliği olan hastalar ve sağlıklı kontrollerin repertuar çeşitliliği ve eşsiz klonotip sayıları CD4+ ve CD8+ T hücre alt grupları için tanımlanmıştır. CD4+ T hücrelerin eşsiz klonotip sayılarında, hasta ve kontrol grupları arasında belirgin bir farklılık gözlenmemiştir (Şekil 4.1 C). CD8+ T hücrelerin eşsiz klonotip sayılarında, kontrol grubuna oranla hastalarda belirgin bir düşüklük gözlemlenmiştir.

Repertuar çeşitliliğine ilişkin daha nicel ölçüler sağlamak için yaygın olarak kullanılan D50 ve Chao1 çeşitlilik indekslerinden yararlanıldı. Yüksek Chao1 indeks değeri çeşitliliğin fazla olduğunu ifade etmektedir [21]. CD8+ T hücre alt grubunda, sağlıklı kontroller ile karşılaştırıldığında, hastalarda daha düşük Chao1 indeks değeri elde edilmiştir (Şekil 4.8 A). CD4+ T hücre alt grubunda sağlıklı kontroller ve hastalar arasında anlamlı ve belirgin bir farklılık gözlenmemiştir (Şekil 4.1 A). Çeşitli primer immün yetmezlik hastalıklarında daha önce yapılan TCR repertuarı çalışmalarında, hasta gruplarında repertuar çeşitliliğinin ve klonalitenin düşük olduğu gösterilmiştir [17, 18, 22, 23]. Genel olarak primer immün yetmezliklerde görülen repertuar çeşitliliği ve klonalitedeki çarpıklık bizim sonuçlarımızda CD8+ T hücre grubunda gözlemlenmiştir.

Klonotipik genişlemelerin varlığını dahi iyi analiz edebilmek amacıyla, gözlemlenen toplam dizi sayısının %50'sini oluşturan eşsiz CDR3 dizilerin yüzdesine karşılık gelen D50 çeşitlilik indeksi kullanılabilir [18]. CD8+ T hücre alt grubu için, hastalarda belirgin şekilde azalmış D50 ile sonuçlanan klonotipik genişlemeler gözlemlenmiştir (Şekil 4.8 B). Bu sonuçlar DOCK8 hastalarının CD8+ T hücrelerinin klonal çeşitliliğinde düşüklük olduğunu işaret etmektedir. Repertuar çeşitliliği zenginlik (*richness*) kavramı üzerinden açıklanmaktadır. Repertuar zenginliği, eşsiz klonların sayısı ve bireysel klonların genişlemesi ile ifade edilmektedir [24]. Bu sonuçlar üzerinden DOCK8 hastalarının CD8+ T hücre repertuar zenginliğinin düşük olduğu yorumu yapılabilmektedir. Bu tez çalışması kapsamında DOCK8 hastalarının B hücre repertuarları incelenmemiştir fakat daha önce yapılan bir çalışmada DOCK8

hastalarının B hücre repertuarında çarpıklık olduğu gösterilmiştir [20]. DOCK8 eksikliğinin patogenezinin anlaşılması açısından farklı hücre ve hücre alt gruplarında repertuar çalışmasının yapılmasının gerekli olduğu sonucu çıkarılmaktadır.

CD8+ T hücrelerin CDR3 uzunluklarının CD4+ hücrelere oranla daha düşük olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.2, Şekil 4.9). En bol bulunan TRB CDR3 klonotipi (*top clonal proportion*) sağlıklı kontrollerin CD8+ T hücrelerindeki tüm transkriptlerin %10'undan azını oluşturuyorken hastalarda bu oran yaklaşık %18 olarak gözlemlenmiştir (Şekil 4.8 F). En bol görülen ilk 100 TRB CDR3 klonotipi yine hastaların CD8+ T hücrelerinde kontrollere oranla daha yüksek gözlemlenmiştir (Şekil 4.8 F). CD4+ T hücre alt grubu için en çok görülen ilk 1000, 3000 ve 10000 TRB CDR3 klonotipinde hastalarda kontrollere oranla yüksek yüzdeler elde edilmiş olmasına karşın en çok görülen ilk 10 ve 100 TRB CDR3 klonotipinde hasta ve kontroller arasında bir farklılık gözlenmemiştir (Şekil 4.1 E-F). RAG eksikliği görülen hastalarda yapılan bir çalışmada hem *TRB* hem de *IGH* repertuarında, repertuarda kısıtlama ve klonotipik genişlemeler olduğu gösterilmiştir [18]. Benzer sonuçlar bizim çalışmamızda da CD8+ T hücre repertuarı için elde edilmiştir. İstatistiksel olarak anlamlılık elde edilmemesi, örneklem büyüklüğünün az olması ile açıklanabilir. Daha geniş bir örneklem büyüklüğü ile yapılacak çalışmada, CD8+ T hücrelerde görülen farklılıkların daha belirgin olacağı düşünülmektedir.

TRB repertuarının eşsiz dizileri arasında bireysel V-J gen kullanım sıklığı, V-J gen kullanımı haritalarında her bir hasta için gösterilmiştir (Şekil 4.3-7, Şekil 4.10-14) Her iki hücre alt grubunda da V-J gen kullanım sıklığının, hasta ve kontroller arasında farklılık göstermiştir. Örneğin hastalarda CD4+ T hücrelerde en sık kullanılan TRBV geni *TRBV20-1* ve *TRBV7-2* iken kontrollerde *TRBV5-1* geni en sık kullanılmıştır. Başka bir çalışmada V genlerinin kullanımına bakıldığında en çok kullanılan genin *TRBV20-1* ve *TRBV7-2* olduğu gösterilmiş ve *TRBV20-1* geni konakçı yanıtı ve sağkalım ile ilişkilendirilmiş [24]. 3 numaralı hastanın hem CD4+ hem de CD8+ T hücrelerinde farklı V-J genlerinin kullanımı, kontrole oranla belirgin düşüklük göstermiştir (Şekil 4.5 B, Şekil 4.12 B). Benzer şekilde 2 numaralı hasta da farklı V-J genlerinin kullanımının kontrole oranla düşük olduğu gösterilmiştir (Şekil 4.4 B, Şekil 4.11 B). Hasta 1'in CD4+ T hücrelerinde farklı V-j genlerinin

kullanımında kontrole oranla belirgin bir düşüklük gözlemlenmiştir (Şekil 4.3 B). 3 numaralı hastanın geçirdiği enfeksiyonlar içinde Herpes keratiti olması bu hastanın klinik fenotipinin diğer hastalara oranla daha ağır olduğuna işaret etmektedir (Tablo 4.1) [25]. Hastada gözlemlenen farklı V-J genlerinin kullanımındaki düşüklük ve CD8+ T hücrelerinin klonotip sayısındaki düşüklük (Şekil 4.8 D), klinikte görülen ağır fenotipin altında yatan sebep olabileceğini akla getirmektedir. Bu savın desteklenmesi için DOCK8 hastalarında daha ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. TCR repertuarının T hücre alt gruplarındaki farklılığının araştırıldığı, naif ve hafıza hücre repertuarlarının belirlendiği çalışmalara bakıldığında, çalışmaların sonuçlarının birbirleri ile tutarlılık göstermediği görülmektedir [26-28]. Oakes T. ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada hafıza T hücrelerin naif hücrelerden daha fazla benzer TCR dizileri içerdiği ve repertuarın daha kısıtlı olduğu gösterilmiştir [28]. Robins H.S. ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise hafıza hücrelerin naif hücrelere oranla daha fazla klon sayısına ve daha düşük bir klonal genişlemeye sahip olduğu rapor edilmiştir [26]. CD8+ T hücrelerde repertuarın düşük olması dolaşımdaki hafıza hücrelerin sayısı ile ilişkilendirilmek istense de bu tez çalışmasında hafıza ve naif hücrelerin repertuarı hakkında yorum yapabilmek için yeterli veri yoktur. Bununla birlikte tez çalışmasına dahil edilen hastalarda, dolaşımdaki CD4+ T hücre popülasyonu düşük gözlemlenmiştir (Tablo 4.3). Fakat hücre alt grupları ile ilgili yeterli veri bulunmamaktadır.

Bu tez çalışmasında, DOCK8 hastalarının CD8+ T hücre TRB repertuarlarında belirgin şekilde azalmış çeşitlilik olduğunu ve çarpık V-J gen kullanımı ile TRB repertuar çeşitliliğinin kısıtlanmış olduğunu gösterdik. Bu veriler, DOCK8 mutasyonlarının CD4+ ve CD8+ T hücre repertuarının oluşumunda etkisinin olabileceğini göstermektedir. Özellikle CD8+ T hücre repertuarının etkilenmesinin, hücre içi patojenlere verilen yanıtta baskın bir etkisi olabileceğini ve DOCK8 hastalarının kutanöz enfeksiyonlara ve hücre içi patojenlere sıkça yakalanmasında etkisinin olabileceğini göstermektedir. Ancak DOCK8 eksikliğinde genotip-fenotip korelasyonu mutlak değildir. Huie Jing ve arkadaşların tarafından 2014 yılında DOCK8 eksikliği ile ilgili yayımlanan bir çalışmada, hücre alt gruplarında somatik geri dönüşüm (*somatic reversion*) olmasının, hastalığın fenotipini etkileyebileceği gösterilmiştir. [29] Somatik geri dönüşüm ile hücrelerde mozaizm görülmesi,

hastalığın fenotipini ve klinik progresyonunu değiştirebilmektedir. DOCK8 eksikliği olan hastalarda somatik geri dönüşüm olgusu gen terapisi yaklaşımlarına da ışık tutmaktadır [30]. Bu tez çalışmasında yer alan DOCK8 hastalarının CD4+ T hücrelerinde çeşitliliğin kontroller ile benzer olması, CD4+ T hücrelerde somatik geri dönüşüm gerçekleşmiş olabileceği fikrini akla getirmektedir. Bu savı desteklemek için ileri çalışmalar gerekmektedir. Bethany A. Pillay ve arkadaşları tarafından 2021’de yayımlanan çalışmada, DOCK8’in CD4+ ve CD8+ T hücre farklılaşmasında rolü olabileceği düşüncesi ortaya atılmıştır [30]. Bu tez çalışmasında CD4+ ve CD8+ hücrelerin repertuar analizlerinde, iki hücre grubu arasında farklı sonuçlar elde edilmesi sebebiyle, DOCK8’in hücre farklılaşmasında rolü olabileceği savı desteklenmektedir.

Son zamanlarda yapılan repertuar çalışmaları, tek hücre dizileme ve hücre alt gruplarının ayrı ayrı dizilenmesi ile gerçekleştirilmektedir [17, 31, 32]. TCR repertuarının farklı immün hücrelerdeki gelişimi ve fonksiyonu tam olarak bilinmemektedir [33]. Bu sebeple hem hastalık patogenezinin aydınlatılması hem de reseptör repertuarının hücre çeşitliliğine etkisinin anlaşılması için farklı hastalık gruplarında ve ayrı hücre alt gruplarında repertuar çalışmasının yapılması gerekmektedir.

Bu tez çalışmasında örneklem büyüklüğünün az olması, DOCK8 hastalarının tanı sonrasında uygun donör bulunması dahilinde, hızlı bir şekilde kemik iliği nakline gönderilmesi, bazı biyoinformatik analizlerin gerçekleştirilememesi gibi limitasyonlar mevcuttur.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Hastaların CD8+ T hücre repertuar çeşitliliğinde kontrole oranla belirgin bir azalma gözlemlenmiştir.
2. CD8+ T hücrelerin CDR3 uzunlukları CD4+ T hücelere oranla daha kısa olduğu sonucu elde edilmiştir.
3. CD8+ T hücrelerde hastaların eşsiz klonotip sayısı, kontrole oranla belirgin bir düşüklük göstermiştir.
4. Hastaların CD4+ T hücrelerinde V-J gen kullanım profilleri birbirleri ile benzerlik göstermiştir. Hastaların CD8+ T hücrelerinde V-J gen kullanım profilleri arasında tutarlı bir benzerlik gözlemlenmemiştir.
5. CD4+ ve CD8+ T hücrelerin, repertuar çeşitliliğinde ve gen kullanım profillerinde farklılık göstermesi sebebiyle DOCK8 proteininin, hücre farklılaşmasında rolü olup olmadığına dair ileri çalışmalar önerilmektedir.
6. *DOCK8* mutasyonlarının CD8+ T hücre repertuarının oluşumunda etkisinin olabileceği düşünülmektedir.
7. *DOCK8* eksikliği olan hastaların CD4+ T hücre repertuarlarında belirgin bir çarpıklık gözlemlenmemesi sebebi ile CD4+ T hücrelerde somatik geri dönüşüm olup olmadığı ve CD8+ ve CD4+ hücreler arasındaki repertuar çeşitliliği farkının somatik geri dönüşüm kaynaklı oluşup oluşmadığı araştırılmalıdır.
8. *DOCK8* eksikliği olan hastaların kutanöz viral enfeksiyonlara ve hücre içi patojenlere yatkınlık göstermesinin, CD8+ T hücre repertuarında oluşan çarpıklık sebebi ile olabileceği düşünülmektedir.
9. Hastalarda görülen enfeksiyonların repertuar çeşitliliği ile ilgili olabileceği düşünülmektedir. *DOCK8* eksikliğinde görülen çeşitli enfeksiyonların varlığında, hücre alt gruplarında repertuar çeşitliliğinin araştırılması için ileri çalışmalar önerilmektedir.

10. Bu tez çalışması, DOCK8 eksikliği olan hastaların klinik fenotiplerindeki değişimlerin açıklanması için ve gen terapisi gibi alternatif tedavi yöntemleri geliştirilmesi için yapılacak yeni çalışmalara ışık tutmaktadır.

7. KAYNAKLAR

1. Abul K. Abbas, A.H.L., Shiv Pillai, *Cellular and Molecular Immunology 9th Edition*. 2018, Elsevier.
2. Chen, R., *Primary Immunodeficiency* 2019.
3. Notarangelo, L.D., et al., *Human inborn errors of immunity: An expanding universe*. *Sci Immunol*, 2020. **5**(49).
4. Tangye, S.G., et al., *The Ever-Increasing Array of Novel Inborn Errors of Immunity: an Interim Update by the IUIS Committee*. *J Clin Immunol*, 2021. **41**(3): p. 666-679.
5. Engelhardt, K.R., et al., *Large deletions and point mutations involving the dedicator of cytokinesis 8 (DOCK8) in the autosomal-recessive form of hyper-IgE syndrome*. *J Allergy Clin Immunol*, 2009. **124**(6): p. 1289-302 e4.
6. Meshaal, S.S., et al., *Diagnosis of DOCK8 deficiency using Flow cytometry Biomarkers: an Egyptian Center experience*. *Clin Immunol*, 2018. **195**: p. 36-44.
7. Kearney, C.J., K.L. Randall, and J. Oliaro, *DOCK8 regulates signal transduction events to control immunity*. *Cell Mol Immunol*, 2017. **14**(5): p. 406-411.
8. Biggs, C.M., S. Keles, and T.A. Chatila, *DOCK8 deficiency: Insights into pathophysiology, clinical features and management*. *Clin Immunol*, 2017. **181**: p. 75-82.
9. Randall, K.L., et al., *Dock8 mutations cripple B cell immunological synapses, germinal centers and long-lived antibody production*. *Nat Immunol*, 2009. **10**(12): p. 1283-91.
10. Tak W. Mak, M.E.S., Bradley D. Jett, *Primer To The Immune Response 2nd Edition*. 2014, Elsevier.
11. Kenneth Murphy, C.W., *Janeways Immunobiology 9th Edition*. 2017: Garland Science.
12. Zhang, Y., et al., *Tools for fundamental analysis functions of TCR repertoires: a systematic comparison*. *Brief Bioinform*, 2020. **21**(5): p. 1706-1716.
13. Liu, X. and J. Wu, *History, applications, and challenges of immune repertoire research*. *Cell Biol Toxicol*, 2018. **34**(6): p. 441-457.
14. Weinstein, J.A., et al., *High-throughput sequencing of the zebrafish antibody repertoire*. *Science*, 2009. **324**(5928): p. 807-10.
15. Freeman, J.D., et al., *Profiling the T-cell receptor beta-chain repertoire by massively parallel sequencing*. *Genome Res*, 2009. **19**(10): p. 1817-24.
16. Wong, G.K., et al., *Immune dysregulation in immunodeficiency disorders: The role of T-cell receptor sequencing*. *J Autoimmun*, 2017. **80**: p. 1-9.
17. Savola, P., et al., *Somatic mutations and T-cell clonality in patients with immunodeficiency*. *Haematologica*, 2020. **105**(12): p. 2757-2768.
18. Lee, Y.N., et al., *Characterization of T and B cell repertoire diversity in patients with RAG deficiency*. *Sci Immunol*, 2016. **1**(6).
19. Fang, M., et al., *T Cell Repertoire Abnormality in Immunodeficiency Patients with DNA Repair and Methylation Defects*. *J Clin Immunol*, 2022. **42**(2): p. 375-393.

20. Tang, W., et al., *Skewed B cell receptor repertoire and reduced antibody avidity in patients with DOCK8 deficiency*. Scand J Immunol, 2019. **89**(6): p. e12759.
21. Izraelson, M., et al., *Comparative analysis of murine T-cell receptor repertoires*. Immunology, 2018. **153**(2): p. 133-144.
22. Delmonte, O.M., et al., *Poor T-cell receptor beta repertoire diversity early posttransplant for severe combined immunodeficiency predicts failure of immune reconstitution*. J Allergy Clin Immunol, 2022. **149**(3): p. 1113-1119.
23. Wong, G.K., et al., *Accelerated Loss of TCR Repertoire Diversity in Common Variable Immunodeficiency*. J Immunol, 2016. **197**(5): p. 1642-9.
24. Dong, N., et al., *Characterization of Circulating T Cell Receptor Repertoire Provides Information about Clinical Outcome after PD-1 Blockade in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer Patients*. Cancers (Basel), 2021. **13**(12).
25. Al Shekaili, L., et al., *Novel mutation in DOCK8-HIES with severe phenotype and successful transplantation*. Clin Immunol, 2017. **178**: p. 39-44.
26. Robins, H.S., et al., *Comprehensive assessment of T-cell receptor beta-chain diversity in alphabeta T cells*. Blood, 2009. **114**(19): p. 4099-107.
27. Qi, Q., et al., *Diversity and clonal selection in the human T-cell repertoire*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(36): p. 13139-44.
28. Oakes, T., et al., *Quantitative Characterization of the T Cell Receptor Repertoire of Naive and Memory Subsets Using an Integrated Experimental and Computational Pipeline Which Is Robust, Economical, and Versatile*. Front Immunol, 2017. **8**: p. 1267.
29. Jing, H., et al., *Somatic reversion in dedicator of cytokinesis 8 immunodeficiency modulates disease phenotype*. J Allergy Clin Immunol, 2014. **133**(6): p. 1667-75.
30. Pillay, B.A., et al., *Somatic reversion of pathogenic DOCK8 variants alters lymphocyte differentiation and function to effectively cure DOCK8 deficiency*. J Clin Invest, 2021. **131**(3).
31. Golumbeanu, M., et al., *Single-Cell RNA-Seq Reveals Transcriptional Heterogeneity in Latent and Reactivated HIV-Infected Cells*. Cell Rep, 2018. **23**(4): p. 942-950.
32. Lagattuta, K.A., et al., *Repertoire analyses reveal T cell antigen receptor sequence features that influence T cell fate*. Nat Immunol, 2022. **23**(3): p. 446-457.
33. Hou, X., et al., *Preselection TCR repertoire predicts CD4(+) and CD8(+) T-cell differentiation state*. Immunology, 2020. **161**(4): p. 354-363.

8. EKLER

EK-1: Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzni



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

Sayı : 16969557-2050

Konu :

ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

Toplantı Tarihi : 07 EYLÜL 2021 SALI
Toplantı No : 2021/14
Proje No : GO 21/801(Onay Tarihi: 29.06.2021)
Karar No : 2021/14-79

Kurulumuzun 29.06.2021 tarihli toplantısında GO 21/801 kayıt numarası ile onaylanmış olan, Üniversitemiz Çocuk Sağlığı Enstitüsü öğretim üyelerinden Dr. Öğr. Üyesi Baran ERMAN'ın sorumlu araştırmacı olduğu, Prof. Dr. F. İlhan TEZCAN, Prof. Dr. Deniz Çağdaş AYVAZ, Dr. Öğr. Gör. Merve Gülşah KILINÇ, Dr. Öğr. Üyesi Saliha ESENBOĞA ile birlikte çalışacakları, GO 21/801 kayıt numaralı "**DOCK8 Eksikliği Olan Hastalarda İmmün Repertuarın Belirlenmesi**" başlıklı proje için vermiş olduğunuz 31.08.2021 tarihli araştırmanın niteliği ile ilgili dilekçe talebiniz Kurulumuzun 07.09.2021 tarihli toplantısında görüşülmüş ve çalışmanın bireysel araştırma projesi kapsamında çıkarılarak Ceren BOZKURT'un yüksek lisans tezi kapsamına alınması **uygun bulunmuş** ve kayıtlarımıza eklenmiştir. Çalışma tamamlandığında sonuçlarını içeren bir rapor örneğinin Etik Kurulumuza gönderilmesi gerekmektedir.

1. Prof. Dr. Ayşe Lale DOĞAN	(Başkan)	8. Doç. Dr. Betül Çelebi SALTIK	(Üye)
2. Prof. Dr. G. Burça AYDIN	(Üye)	9. Doç. Dr. Hande Güney DENİZ	(Üye)
3. Prof. Dr. M. Özgür UYANIK	(Üye)	YATILMADI 10. Doç. Dr. Tolga YILDIRIM	(Üye)
4. Prof. Dr. Ayşe Kin İŞLER	(Üye)	11. Doç. Dr. Merve BATUK	(Üye)
5. Prof. Dr. Sibel PEHLİVAN	(Üye)	12. Doç. Dr. Gülten KOÇ	(Üye)
6. Doç. Dr. H. Tuna Çak ESEN	(Üye)	13. Dr. Öğr. Üyesi Müge DEMİR	(Üye)
7. Doç. Dr. Nüket Paksoy ERBAYDAR	(Üye)	İZİNLİ 14. Av. Serap MORALIOĞLU	(Üye)

EK-2: Yüksek Lisans Tez Çalışması Orijinallik Raporu Ekran Görüntüsü

DOCK8 EKSİKLİĞİ OLAN HASTALARDA T HÜCRE RESEPTÖR REPERTUVARININ YENİ NESİL DİZİLEME İLE BELİRLENMESİ

ORIJINALLİK RAPORU

% **5**

BENZERLİK ENDEKSİ

% **5**

İNTERNET KAYNAKLARI

% **2**

YAYINLAR

% **2**

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	% 1
2	www.condalab.com İnternet Kaynağı	<% 1
3	iji.sums.ac.ir İnternet Kaynağı	<% 1
4	livrepository.liverpool.ac.uk İnternet Kaynağı	<% 1
5	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	<% 1
6	ZORLU, Pelin, UÇAR, Şit, YARALI, Neşe and DEMİRÇEKEN, Fulya. "Niemann-Pick hastalığı tip A ve tip B: İki olgu sunumu", Marmara Üniversitesi, 2014. Yayın	<% 1
7	Submitted to South Dakota Board of Regents Öğrenci Ödevi	<% 1
8	psychiatry-psychopharmacology.com İnternet Kaynağı	

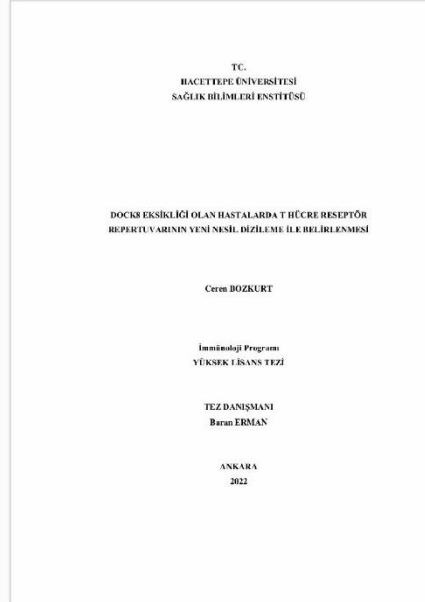
EK-3: Orijinallik Dijital Makbuz

Dijital Makbuz

Bu makbuz ödevinizin Turnitin'e ulaştığını bildirmektedir. Gönderiminize dair bilgiler şöyledir:

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: Ceren Bozkurt
Ödev başlığı: Ceren Bozkurt Tez
Gönderi Başlığı: DOCK8 EKSİKLİĞİ OLAN HASTALARDA T HÜCRE RESEPTÖR RE...
Dosya adı: Tez-Turnitin.docx
Dosya boyutu: 10,27M
Sayfa sayısı: 69
Kelime sayısı: 9,204
Karakter sayısı: 64,277
Gönderim Tarihi: 10-Eyl-2022 04:26ÖS (UTC+0300)
Gönderim Numarası: 1896492420



9. ÖZGEÇMİŞ