

TC.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PRİMER İMMÜN YETMEZLİKLER-İŞLEVSEL  
ÇÖZÜMLEME

Dilan İNAN

İmmünoloji Programı  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANKARA

2023



TC.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PRİMER İMMÜN YETMEZLİKLER-İŞLEVSEL ÇÖZÜMLEME**

**Dilan İNAN**

**İmmünoloji Programı  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI  
Deniz Nazire ÇAĞDAŞ AYVAZ**

**İKİNCİ DANIŞMAN  
Sevil OSKAY HALAÇLI**

**ANKARA  
2023**

**ONAY SAYFASI****PRİMER İMMÜN YETMEZLİKLER-İŞLEVSEL ÇÖZÜMLEME****Öğrenci: Dilan İnan****Danışman: Prof. Dr. Deniz Nazire Çağdaş Ayvaz****İkinci Danışman: Doç. Dr. Sevil Oskay Halaçlı**

Bu tez çalışması 05/06/2023 tarihinde jürimiz tarafından "İmmünoloji Programı" nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

**Jüri Başkanı: Prof. Dr. Ayşe METİN**

Ankara Bilkent Şehir Hastanesi Çocuk Alerji İmmünoloji Bilim Dalı

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Deniz Nazire ÇAĞDAŞ AYVAZ**

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk İmmünoloji Bilim Dalı

**Üye: Doç Dr. Hande CANPINAR**

Hacettepe Üniversitesi Kanser Enstitüsü Temel Onkoloji Bilim Dalı

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

09 Haziran 2023

*Prof. Dr. Müge YEMİŞÇİ ÖZKAN***Enstitü Müdürü**

## YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/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, tezimin 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 tezimin 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 tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. <sup>(1)</sup>
- ✗ Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 6 ay ertelenmiştir. <sup>(2)</sup>
- Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. <sup>(3)</sup>

05 /06/2023

(İmza)

Dilan İNAN

<sup>i</sup>“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 tezlere 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 BEYANI

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, Prof. Dr. Deniz Nazire Çağdaş Ayvaz ve Doç. Dr. Sevil Oskay Halaçlı danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

(İmza)

Dilan İNAN

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana güvenen, her fikrimi önemseyen ve destekleyen, bilgi ve tecrübeleri ile bana yol gösteren, sadece akademik olarak değil her alanda kendimi geliştirmemi sağlayan danışmanlarım Prof. Dr. Deniz Nazire Çağdaş Ayvaz ve Doç. Dr. Sevil Oskay Halaçlı'ya bana kattıkları her şey için çok teşekkür ederim.

Tez çalışmam sırasında ne zaman yardıma ihtiyaç duysam yardım eden, hastalar ile ilgili verileri benimle paylaşan Dr. Hacer Neslihan Bildik, Uzm. Bio. Begüm Özbek Çiçek, Uzm. Bio. İsmail Yaz'a; hastalar ile ilgili takıldığım yerde bana yardımcı olan Uzm. Dr. Saliha Esenboğa'ya ve tüm Hacettepe Üniversitesi İhsan Doğramacı Çocuk Hastanesi İmmünoloji Bölümü doktor ve asistanlarına çok teşekkür ederim.

Yüksek lisans hayatımın başından beri yanımda olan, beraber güldüğümüz, beraber ağladığımız, her konuda arkamda duran, beni sonsuz destekleyen, bilgi ve birikimlerini aktaran ve hep beraber yol aldığımız arkadaşlarım Ceren Bozkurt ve Sidem Didar Tekeoğlu'na; bu yolda tanıdığım, ne zaman yorulsam bana el veren, beraber umutlandığımız manevi ablam Dr. Pınar Özge Avar Aydın'a ve son olarak yurtdışında bulunduğum süre boyunca tüm evrak işlerimde bana yardımcı olan teknisyen İsmail Kaya'ya bana olan inançları ve sonsuz destekleri için çok teşekkür ederim.

Bilim İnsanı Destekleme Programı (BİDEP) kapsamında, yüksek lisans hayatımda, beni 2210/A Yurtiçi Genel Yüksek Lisans Burs Programı ile destekleyen Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)'na teşekkür ederim.

Son olarak beni koşulsuz seven, her konuda desteklerini arkamda hissettiğim, her konuda beni destekleyen, aldığım tüm kararlarda arkamda duran ve buralara kadar gelmemi sağlayan canım ablam Dilek Kartal, annem Zahide İnan ve babam Doğan İnan'a sonsuz teşekkür ederim. Bu tez çalışmasını onlara ithaf ediyorum.

## ÖZET

**İnan, D. Primer İmmün Yetmezlikler-İşlevsel Çözümleme. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü İmmünoloji Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2023.** Primer İmmün Yetmezlik (PİY) hastalıkları geniş spektrumda seyreden, nadir hastalık olarak tanımlanan ve her geçen gün yeni mutasyonların tanımlanması ile değişen hastalık grubudur. Hastalığın tanısı için klinik ve laboratuvar verilerin yanı sıra kesin tanı, genetik analizler ile yapılmaktadır. Genetik tanının gecikmesi, tanı ve tedaviyi güçleştirmekle beraber hastalığın seyrini değiştirmektedir. Bu tez çalışmasında, varyanta ilişkin patojenitenin değerlendirilmesi ve klinik ve laboratuvar şüphesi olan hastalarda tanı koymaya yardımcı olmak amacıyla akım sitometri kullanılarak yolak, protein ve proliferasyon analizi yapılmıştır. Hacettepe Üniversitesi İhsan Doğramacı Çocuk Hastanesi İmmünoloji Bölümü'nde değerlendirilen *DOCK8*, *BTK*, *PIK3RI-PIK3CD* ve *LRBA/CTLA-4* eksikliği olan ve/veya şüphelenilen toplam 31 hasta ve 27 sağlıklı kontrol ile yapılan akım sitometri sonuçlarına göre; *DOCK8*, *BTK*, *LRBA/CTLA-4* gen mutasyonuna sahip hastalarda protein ekspresyonunun düşük olduğu gözlemlenmiştir. Hastalık şüphesi olan hastalarda protein ekspresyonunun bazı hastalarda düşük, bazı hastalarda sağlıklı kontrole benzer olduğu gözlemlenmiştir. *DOCK8* gen mutasyonu bilinen hasta grubu, sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında *DOCK8* protein ekspresyon düşüklüğünün istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür ( $p<0,05$ ). Diğer hastalık grupları için vaka sayısının yetersiz olmasından dolayı istatistiksel analiz yapılamamıştır. Yapılan akt/mTOR yolak çalışmasında, *PIK3CD* fonksiyon kazanım mutasyonu olan hastalarda artmış bir fosforilasyon ve proliferasyon yanıtı görülmüştür. Çalışmada ayrıca kemik iliği nakli olan iki hastada, nakil sonrası *DOCK8* ve *LRBA* protein ekspresyonu akım sitometri yöntemi ile inceledi ve ekspresyon sonuçlarının hastaların kimerizm sonuçları ile klinik sonuç için benzer değer gösterdiğini gözlemledik. Elde edilen sonuçlar, mutasyona sahip hastada ve hastalık şüphesi olan bir grup hastada akım sitometri yöntemi ile protein ekspresyonunun düşüklüğünün değerlendirilmesinin genetik bozukluğun patojenitesini anlamada yardımcı olduğunu, tanı ve tedavide erken teşhis için etkili bir yöntem olarak kullanılabileceğini göstermiştir. Ayrıca akım sitometrinin nakil sonrası engrafman ve naklin başarısı hakkında bilgi vermesi, klinik takipte kimerizm testi ile beraber kullanılabilmesine imkân sağlamaktadır.

**Anahtar kelimeler:** Fonksiyonel testler, akım sitometri, hücre proliferasyonu, Akt/mTOR yolağı, protein ekspresyonu.



## ABSTRACT

**INAN, D. Primary Immunodeficiencies-Functional Analysis. Hacettepe University, Graduate School of Health Science, Immunology Program, Master's Thesis, Ankara, 2023.** Primary immunodeficiency diseases are rare diseases with a wide spectrum due to the increasing the number of new mutations defined to cause these diseases. Besides the clinical and laboratory manifestations, the genetic analysis is performed for definitive diagnosis. Delay of genetic testing makes the diagnosis and treatment challenging and changes the disease course. In this thesis, pathway characterization, protein expression, and proliferation analyses were performed using flow cytometry to evaluate the pathogenicity of the variant and to help diagnose relevant diseases with clinical and laboratory suspicion. Flow cytometry studies were performed with a total of 31 patients having suspicion of or with *DOCK8*, *BTK*, *PIK3RI-PIK3CD*, and *LRBA/CTLA-4* deficiency and 27 healthy control individuals in the Immunology Department of Hacettepe University Ihsan Dogramaci Children's Hospital. We observed that protein expression is low in patients with *DOCK8*, *BTK*, *LRBA* gene mutations. We determined that protein expression in patients with suspected disease is low in some patients and normal in some similar to healthy controls. When the patient group with a *DOCK8* gene mutation was compared with the healthy control group, *DOCK8* protein expression was found to be statistically significantly low ( $p < 0.05$ ). The statistical test could not be done for other patient groups' protein analysis results as there was not adequate patient number. In the akt/mTOR pathway study, increased phosphorylation and proliferation were observed in the patients with *PIK3CD* gain of function mutation. In this study, *DOCK8* and *LRBA* protein expression after transplantation was also examined by flow cytometry in two patients who underwent bone marrow transplantation, and we observed that the expression results indicated similar value for clinical conclusion with the chimerism results of the patients. The results of this study showed the effectiveness of flow cytometric evaluation of low protein expression in patients with definitive or a suspicion of having a specific mutation to understand the pathogenicity of the genetic defect and for early diagnosis timely. In addition, the data showed that flow cytometry provides valuable information about the engraftment and the success of the transplantation, and that it might be possible to use with a chimerism test in clinical follow-up.

**Keywords:** Functional tests, flow cytometry, cell proliferation, Akt/mTOR pathway, protein expression.

## İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYANI	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR	xi
ŞEKİLLER	xiv
TABLolar	xvi
<b>1. GİRİŞ</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	<b>2</b>
2.1 Primer İmmün Yetmezlikler	2
2.1.1 Hüresel ve Hümorale Bağışıklığı Etkileyen İmmün Yetmezlikler	3
2.1.2 Antikor Eksikleri	5
2.1.3 İmmün Disregölasyon Hastalıkları	9
2.2 PİY Tanı ve Tedavisi	10
2.3 PİY Tanısı İçin Kullanılan Testler	11
2.3.1 PİY Tanısı İçin Kullanılan Genetik Testler	11
2.3.2 PİY Tanısında Patojenitenin Belirlenmesinde Akım Sitometri	13
2.3.3 Tanıda Akım Sitometri Çalışmaları	16
<b>3. BİREYLER VE YÖNTEM</b>	<b>19</b>
3.1 Hastalar	19
3.2 Yöntemler	19
3.2.1 Hasta Kanlarının Temini	19
3.2.2 Hücre İçi Protein Boyaması	19
3.2.3 Periferik Kan Mononükleer Hücrelerde Akt/mTOR Yolağının	
Değerlendirilmesi	20

B Hücrede Akt/mTOR Yolağının Değerlendirilmesi	22
3.2.5 Hücre Proliferasyonu	22
3.2.6 İstatistiksel Analizler	23
<b>4. BULGULAR</b>	<b>24</b>
4.1 DOCK8 Ekspresyonu Bakılan Hastaların Klinik ve Laboratuvar Özellikleri	24
4.2 BTK Ekspresyonu Bakılan Hastaların Klinik ve Laboratuvar Özellikleri	30
4.3 Akt/mTOR Yolak Proteinleri Bakılan Hastaların Klinik ve Laboratuvar Özellikleri	32
4.4 Proliferasyon Analizi Bakılan Hastaların Klinik ve Laboratuvar Özellikleri	37
4.5 LRBA-CTLA-4 Ekspresyonu Bakılan Hastaların Klinik ve Laboratuvar Özellikleri	44
<b>5. TARTIŞMA</b>	<b>52</b>
<b>6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER</b>	<b>57</b>
<b>7. KAYNAKLAR</b>	<b>59</b>
<b>8. EKLER</b>	<b>67</b>
<b>9. ÖZGEÇMİŞ</b>	<b>70</b>

## SİMGELER VE KISALTMALAR

Ac	Akciğer
ALPS	Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome
APDS	Activated PI3K Delta Syndrome
Bç	Baz çifti
BHR	B Hücre Reseptör
BSL	BioSafety Laminar
BTK	Bruton's tyrosine Kinase
CD	Cluster of Differentiation
CDC	Cell Division Cycle
CFSE	Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester
CHAI	Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome Due to CTLA-4 Haplo-insufficiency
CO <sub>2</sub>	Carbon Dioxide
CTLA-4	Cytotoxic T Lymphocyte Associated Protein4
CXCL	C-X-C Motif Chemokin Ligand
DHR	Dihydrorhodamine
DN	Double Negative
DNA	Deoxyribonucleic Acid
DOCK	Dedicator of Cytokinesis
FBS	Fetal Bovine Serum
FOX	Forkhead Box
GSK	Glycogen Synthase Kinase
HIES	Hyper Immunoglobulin E Syndrome
HLH	Hemophagocytic Lymphohistiocytosis
ICOS	Inducible T Cell Co-stimulator

Ig	İmmünglobulin
IL	İnterlökin
IPEX	Immune Dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-linked Syndrome
IUIS	International Union of Immunological Societies
İYE	İdrar Yolu Enfeksiyonu
KGH	Kronik Granüloamatöz Hastalık
KİY	Kombine İmmün Yetmezlik
KMP	Kardiyomiyopati
LRBA	Lipopolysaccharide Responsive and Beige-like Anchor protein
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin
Myd-	Myeloid Differentiation Primary Response-
NFAT	Nuclear Factor of Activated T Cells
NK	Natural Killer
PBS	Phosphate Buffered Saline
PHA	Phytohemagglutinin P
PI3K	Phosphoinositide-3 Kinase
PIK3CD	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3 Kinase Catalytic Subunit
PIK3R	Phosphoinositide-3 Kinase Regulatory Subunit
PİY	Primer İmmün Yetmezlik
PLT	Platelet
rSS	Sağlam (robust) Standart Sapma
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SCID	Severe Combined Immunodeficiency
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
TGP	Targeted Gene Panel
THR	T Hücre Reseptör
TİA	Trans İskemik Atak
TLR	Toll-Like Receptor

Treg	Regulatory T Cell
ÜSYE	Üst Solunum Yolu Enfeksiyonu
WES	Whole Exome Sequencing
WGS	Whole Genome Sequencing
XLA	X-linked Agammaglobulinemia

## ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa	
2.1.	Yıllara göre PİY; yıllara göre rapor edilen genetik bozukluklar	2
2.2.	Yıllara göre PİY dağılımı; yıllara göre eklenen genler	3
2.3.	DOCK8 proteininin hücre içi sinyal yolağı	5
2.4.	BTK proteini ile ilişkili yolaklar	6
2.5.	B hücre sinyali ve akt/mTOR yolağı	7
2.6.	T hücre sinyali ve akt/mTOR yolağı	8
2.7.	LRBA molekülü	9
2.8.	Sanger dizileme yöntemi	11
2.9.	Tüm genom dizileme, tüm ekzon dizileme ve hedeflenmiş panel karşılaştırması	12
2.10.	İkinci nesil (yeni nesil) dizileme yöntemi	13
2.11.	Akım sitometri temel prensibi	14
3.1.	Santrifüj sonrası kandaki hücrelerin lenfosit ayırma solüsyonu ile katmanlarına ayrılması	20
4.1.	<i>DOCK8</i> gen mutasyonuna sahip iki hastada <i>DOCK8</i> protein ekspresyon seviyeleri	28
4.2.	<i>DOCK8</i> protein ekspresyonu bakılan, <i>DOCK8</i> gen mutasyonuna sahip olan ve mutasyon şüphesi olan hastaların ve sağlıklı kontrollerin istatistiksel analiz sonuçları	29
4.3.	BTK mutasyonu olan ve ekspresyonu bakılan hasta ve sağlıklı kontrollerin analiz sonuçları	32
4.4.	B hücrelerde fosfo akt proteini bakılan hasta ve kontrol	35
4.5.	B hücrelerde fosfo S6 proteini bakılan hasta ve kontrol	36
4.6.	<i>PIK3CD</i> gen mutasyonu olan hastanın akt/mTOR yolağı akım sitometri analizi	37
4.7.	P31, kontrol 1 ve kontrol 2'ye ait proliferasyon görüntüleri	40
4.8.	Sırası ile P28 ve P30 hastalarına ait proliferasyon görüntüleri	41
4.9.	Sırası ile P27 ve P29 hastalarına ait proliferasyon görüntüleri	41
4.10.	P28 hastasının çakıştırmalı proliferasyon görüntüsü	42

- 4.11.** Hasta ve kontrol örneklerinin 3. popülasyonlarına ait hücre yüzdelerinin uyarımlı/uyarımsız (sti/unsti) oranı ile yapılan analiz grafiği 43
- 4.12.** Hasta ve kontrol örneklerinin 2. ve 3. popülasyonlarına ait hücre yüzdelerinin toplanması ile elde edilen uyarımlı / uyarımsız (sti / uns) oranları ile yapılan analiz grafiği 43
- 4.13.** LRBA ekspresyonu düşük çıkan hastaya ait akım sitometri görüntüsü 47
- 4.14.** CTLA-4 ekspresyonu normal çıkan hastaya ait akım sitometri görüntüsü 47
- 4.15.** Mutasyona sahip hasta, mutasyon şüphesi olan hasta ve kontrol grubundan bakılan LRBA ekspresyonu grafiği 48
- 4.16.** Mutasyon şüphesi olan hasta ve kontrol grubundan bakılan CTLA-4 ekspresyonu grafiği 48



## TABLOLAR

<b>Tablo</b>		<b>Sayfa</b>
<b>3.1.</b>	Hasta sayıları	19
<b>4.1.</b>	DOCK8 protein ekspresyonu bakılan hastaların cinsiyet, yaş ve klinik belirtileri	25
<b>4.2.</b>	DOCK8 ekspresyonu bakılan hastaların Ig ve lenfosit alt grup değerleri	26
<b>4.3.</b>	DOCK8 ekspresyonu bakılan hastaların tam kan sayım verileri	27
<b>4.4.</b>	BTK ekspresyonu bakılan hastaların cinsiyet, yaş ve klinik belirtileri	30
<b>4.5.</b>	BTK ekspresyonu bakılan hastaların Ig ve lenfosit alt grup değerleri	31
<b>4.6.</b>	Akt/mTOR yolak proteinleri bakılan hastaların cinsiyet, yaş ve klinik belirtileri	33
<b>4.7.</b>	Akt/mTOR yolak analizi bakılan hastaların Ig ve lenfosit alt grup değerleri	34
<b>4.8.</b>	Proliferasyon analizi bakılan hastaların cinsiyet, yaş ve klinik belirtileri	38
<b>4.9.</b>	Proliferasyon analizi bakılan hastaların Ig ve lenfosit alt grup değerleri	39
<b>4.10.</b>	LRBA/CTLA-4 protein ekspresyonu bakılan hastaların cinsiyet, yaş ve klinik belirtileri	45
<b>4.11.</b>	LRBA/CTLA-4 ekspresyonu bakılan hastaların Ig, lenfosit alt grup ve double negatif T hücre değerleri	46
<b>4.12.</b>	Hastaların genetik test sonuçları	50

## 1. GİRİŞ

Primer immün yetmezlikler (PİY), nadir hastalıklar olarak tanımlanan, bağışıklık (immün) sistem bileşenleri olan doğal ve adaptif sistemde görev alan hücrelerin veya moleküllerin eksik/bozulmuş/düzensiz aktivitesi sonucu, tekrarlayan ve hayatı tehdit eden enfeksiyonlara yatkınlık, otoimmünite, malignite, organ ve iskelet sistemini etkileyen bozuklukları içine alan klinik olarak geniş çaplı hastalık spektrumunu oluşturur (1,2).

Genellikle genetik geçişli hastalık kategorisinde değerlendirilen PİY, yeni genetik bozuklukların sınıflamaya eklenmiş olması nedeniyle moleküler çalışma gereksinimi duyulan bir hastalık grubudur. Gen ürünleri olan transkript ve proteinlerdeki değişikliklerin değerlendirilmesi yeni tanımlanan genetik hastalıklarda önemlidir. Her geçen gün, PİY-ilişkili yeni genlerin ve yeni varyantların keşfedilmesi ile gen-hastalık ilişkisi araştırılmakta ve genin/molekülün fonksiyonel etkilerinin bilinmesi, var olan tanı ve tedavi seçeneklerinin değerlendirilmesinde, tedavide yeni moleküler ajanların kullanılmasında ve hastalık ilerleyişinde büyük önem taşımaktadır. Hastalık-gen ilişkisinin bilinmesi erken tanı ve tedavi için hayati önem taşımaktadır (3).

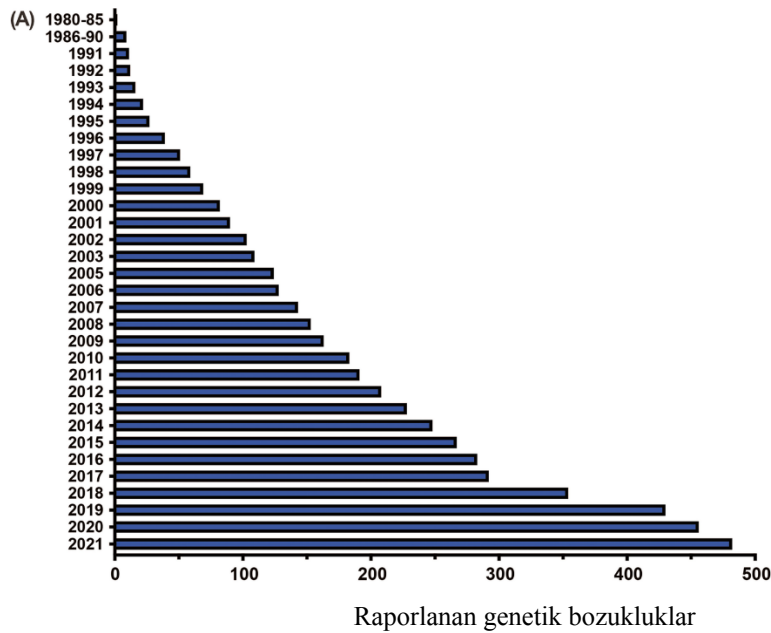
Bu bakımdan, klinik ve mutasyon bulgularının, moleküler ve fonksiyonel çalışma sonuçları ile de değerlendirilmesi gerekmektedir (4).

Bu tez kapsamında, varyanta ilişkin patojenite değerlendirmesi ve klinik ve laboratuvar şüphesi olan hastalarda protein ifade analizi, yolak analizi ve proliferasyon analizi yöntemleri kullanılarak hastaların tanılarına katkı sağlanması ve tedavilerinin yapılan fonksiyonel testlere göre şekillendirilmesi amaçlanmıştır, bu yöntemlerin etkin olup olmadığı verilere dayanılarak değerlendirilmiştir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1 Primer İmmün Yetmezlikler

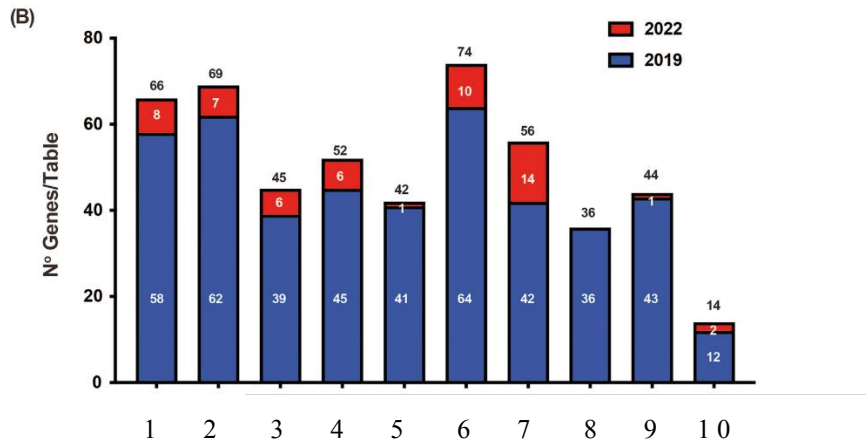
Primer immün yetmezlikler, nadir hastalıklar sınıfında yer alan ve immün sistemde görevli hücre ve moleküllerdeki bozukluklardan kaynaklanan hastalık grubudur. Hücre ve molekülleri etkileyen genlerdeki doğuştan gelen mutasyonlar, çeşitli hastalıklara sebep olmaktadır. Dünyada, PİY'den etkilenen yaklaşık 6 milyon vatandaşın olduğu ve bunların %70 ila 90'ının hala teşhis edilemediği veya yanlış teşhis yapıldığı bildirilmiştir. PİY görülme sıklığı ülkeden ülkeye değişmekle beraber, 10.000 kişide 1 etkilenen bireydir (5,6). Uluslararası İmmünolojik Dernekler Birliği (*The International Union of Immunological Societies, IUIS*)'nin 2022 yılında yaptığı insan doğuştan hastalık bozuklukları sınıflandırmasına göre, PİY olarak karakterize edilen 485 farklı hastalık olduğu raporlanmıştır (3). Enfeksiyonlar, kronikleşebilir ve hastalığın teşhis ve tedavisi gecikirse, kansere, otoimmün hastalıklara ve ölüme sebep olabilir. Hastalar, enfeksiyona yatkınlık, sık sık hastalanma, spesifik organ problemleri (akciğer, karaciğer vb.) gibi ortak semptomlar sergilemesinin yanında, hastalığa ve mutasyona bağlı olarak çeşitli, farklı semptomlar da gösterebilir.



**Şekil 2.1.** Yıllara göre PİY dağılımı; yıllara göre rapor edilen genetik bozukluklar (7).

PİY hastalıkları, 10 sınıfta incelenmektedir. Bunlar;

1. Hüresel ve Hümorale Bağışıklığı Etkileyen İmmün Yetmezlikler
2. İlişkili veya Sendromik Özelliklere Sahip Kombine İmmün Yetmezlikler
3. Ağırlıklı Olarak Antikor Eksiklikleri
4. İmmün Disregülasyon Hastalıkları
5. Fagosit Sayıları ve İşlevlerindeki Defektler
6. İntrinsik ve Doğal İmmün Sistem Defektleri
7. Otoinflamatuar Hastalıklar
8. Kompleman Eksiklikleri
9. Kemik İliği Yetmezliği
10. Primer İmmün Yetmezliklerde Fenokopiler'dir (3)



Şekil 2.2. Yıllara göre PİY dağılımı; yıllara göre eklenen genler (7).

### 2.1.1 Hüresel ve Hümorale Bağışıklığı Etkileyen İmmün Yetmezlikler

Hüresel ve hümorale immüniteyi etkileyen PİY hastalıkları, adaptif sistemde görev alan hüresel ve hümorale yanıtın ikisinin de etkilenmesi durumunda ortaya çıkan hastalık grubudur. Hüresel yanıt, T hücre aracılığı ile gerçekleşir ve B hücrelere yardım ederek, immün yanıtın kontrolünü sağlarken, hümorale yanıt, B hücreleri aracılığı ile gerçekleşir. B hücreleri, T hücrelere antijen sunulmasında görev alırken çeşitli immünoglobulinler (*Ig*) salgırlar. Hüresel ve hümorale bağışıklığı etkileyen

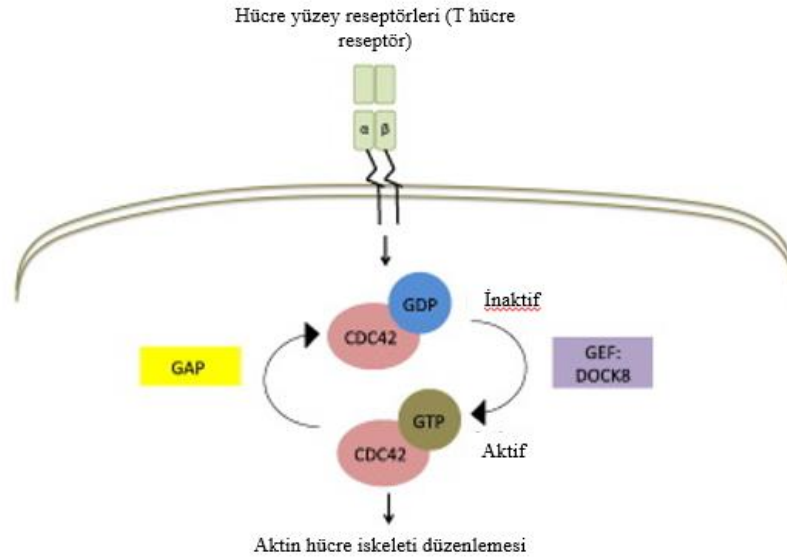
PİY, enfeksiyon, immün disregülasyon, otoimmünite, otoinflamasyon, lenfoproliferasyon ve malignite ile karakterizedir (8,9).

Genellikle otozomal çekinik modelde kalıtılan Hücresel ve Hümorale Bağışıklığı Etkileyen İmmün Yetmezlikler veya kombine immün yetmezlik hastalıkları hem T hem de B hücre fonksiyon eksikliği ile karakterizedir. T hücre gelişimi, T hücre reseptör (THR) sinyali, ko-stimulatör yolları, sitokin sinyali, adezyon, hücre göçü ve hücre iskeleti organizasyonu, apoptoz yolağı, DNA replikasyonu ve onarımında ve metabolik yollardaki bozukluklar kombine immün yetmezliğe neden olabilir. Ayrıca, B hücrelerine antikor üretimi için yardım eden T hücrelerdeki bozulmuş yanıtın dolayısıyla, Ig düşüklüğüne de sebep olmaktadır. Hastalarda, enfeksiyona yatkınlık, otoimmünite, inflamasyon, alerji ve malignite görülür (10,11).

Kombine immün yetmezliklere neden olan genlerden biri ***Dedicator of cytokinesis 8 (DOCK8)*** genidir. Bu genin ürünü olan DOCK8 molekülü, hücre bölünmesinde guanin nükleotit değişim faktörü olarak görev alan, DOCK8 süper ailesine ait bir proteindir. Hücre hareketliliği, hücre göçü, integrin aktivasyonu ve fagositozda görev alır. DOCK8 eksikliği, otozomal çekinik hiper immunoglobulin E (HIES)'ye neden olur. İlk olarak 2009 yılında tanımlanan bu hastalık, T hücre lenfoma, CD3 hücre proliferasyonu ve aktivasyonunda bozukluk, CD4 hücre sayısında azalma, düşük hafıza hücre yanıtı, artmış immunoglobulin E (IgE) seviyesi ve lenfomaya artmış eğilim ile karakterizedir. Laboratuvar bulgularının yanı sıra, hastalarda alerjik inflamasyon, tekrarlayan pnömoni, kutanöz viral, enfeksiyonlara yatkınlık ve otoimmünite görülür (12–14)

9. kromozomda bulunan ve 48 ekzona sahip *DOCK8* geni, temel olarak hematopoetik hücrelerde yüksek oranda eksprese edilir. Bunun yanı sıra, akciğer, plasenta, böbrek gibi immün olmayan dokularda da eksprese edilir. DOCK8 proteini, CDC42 (*cell division control protein 42*)'ye bağlanarak onun aktive olmasını sağlar ve bu sayede aktin polimerizasyonunda ve hücre iskeletinin düzenlenmesinde görev alır. Bunun yanı sıra, *signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3)'ün *Myeloid differentiation primary response 88* (Myd-88)'e bağlı *toll like receptor* (TLR)

aktivasyonunda görev alarak, B hücre proliferasyonu gibi doğal ve adaptif bağışıklıkta önemli rolü vardır (14).



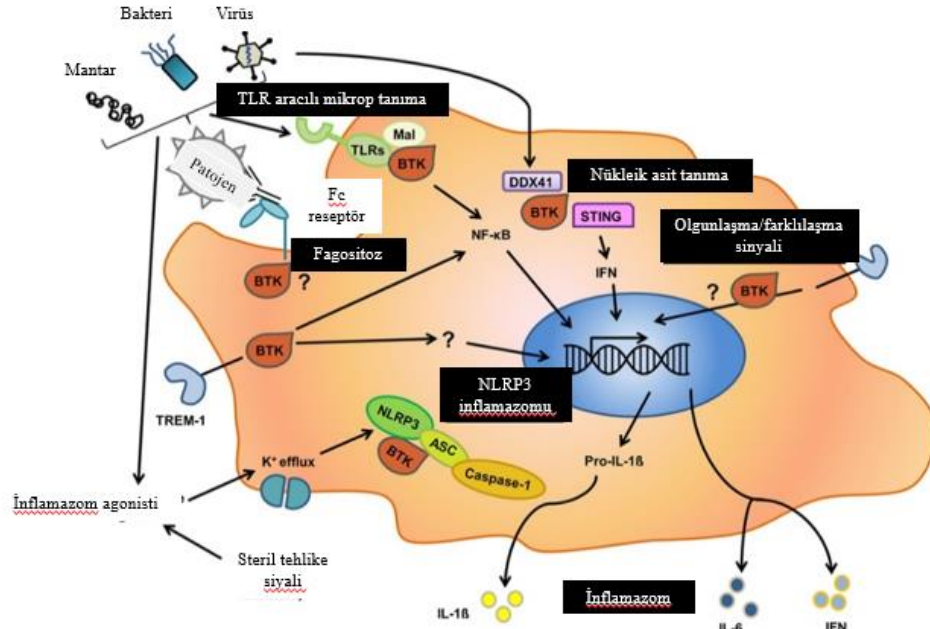
**Şekil 2.3.** DOCK8 proteininin hücre içi sinyal yolağı (14).

### 2.1.2 Antikor Eksikleri

Mutasyonun hangi gende olduğuna bağlı olarak, otozomal çekinik ve baskın modelde kalıtılan ağırlıklı olarak antikor eksiklikleri, ana olarak B hücrelerdeki moleküler bozukluklardan veya B ve T hücre arası etkileşimdeki bozukluktan kaynaklanır. Sonuç olarak antikor üretimi yetersizdir. Hastalarda, enfeksiyonlar, alerjik hastalıklar, otoimmünite, inflamasyon, lenfoproliferasyon ve malignite görülebilir (15).

Antikor eksikliklerine sebep olan PİY olan **Bruton's tirozin kinaz (BTK)** eksikliği, agammaglobulinemi ile seyreder. Bu gen ürünü olan BTK proteini, B hücre olgunlaşmasında görev alan bir moleküldür. BTK proteinini üreten *BTK* geni, X kromozomunda yer alır. Bu protein, kemik iliğinde olgunlaşmamış B hücre olan pro-B hücreden pre-B hücreye geçişte, B hücre olgunlaşmasının son aşamasını yürüten sinyal dönüştürücü olarak aktif rol oynar. Bu gendeki mutasyonlar, X'e bağlı agammaglobulinemi (XLA) olarak adlandırılan PİY'e neden olur. X geçişli olduğu için, daha çok erkekleri etkilediği bildirilmiştir. XLA'lı hastalarda, B hücre gelişmesinde bozukluk, periferde olgun B hücre azlığı ve Ig eksikliği görülmektedir.

T hücrelerin etkilenmediği bildirilmiştir. Hastalık, kapsüllü bakterilere karşı artmış hassasiyet, ciddi hipogammaglobulinemi ile karakterizedir. (16).

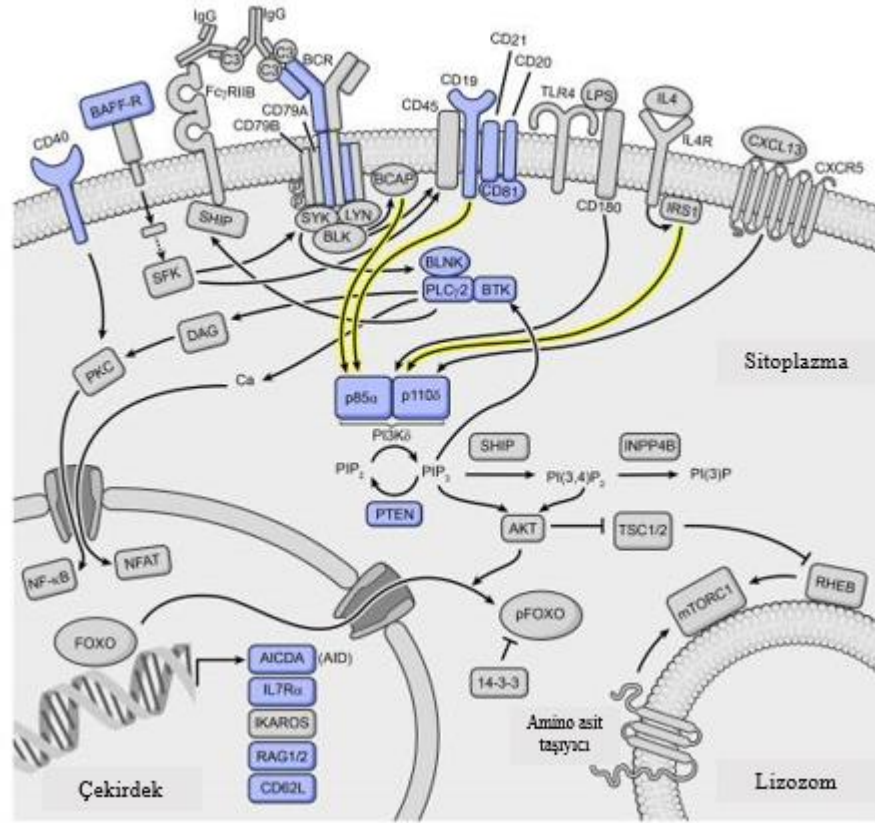


Şekil 2.4. BTK proteini ile ilişkili yollar (17)

Antikor eksiklerine neden olan diğer genler, *PIK3RI* ve *PIK3CD* genleridir. Bu genler, fosfoinositid-3 kinaz (PI3K) olarak adlandırılan heterodimerik proteinin sırasıyla düzenleyici ve katalitik alt birimlerini oluşturan genlere verilen isimdir. *PIK3CD* geni, p110δ katalitik alt birim proteinini, *PIK3RI* geni, p85α, p55α, p50α düzenleyici alt birim proteinlerini kodlamak için gerekli bilgiyi sağlar. Katalitik alt birim, üç düzenleyici alt birimden her biri ile de etkileşime girebilir ama günümüzde en çok anlaşılan p110δ katalitik alt biriminin p85α düzenleyici alt birimi ile etkileşimidir. Bu iki protein birleşerek, T ve B hücre reseptörleri, sitokin ve ko-stimülatör reseptörleri gibi bağışıklık sistemindeki çoklu reseptörler tarafından bağlanan heterodimerik lipid kinaz olan PI3Kδ proteinini oluşturur. P110δ, ağırlıklı olarak lökositlerde eksprese edilir (18).

B hücrelerde PI3Kδ proteinini, interlökin 4 (IL-4) veya *C-X-C motif chemokine ligand 13* (CXCL13) gibi kemokinler ile uyarıldığında, B hücre reseptörü (BHR) ile çapraz etkileşime girerek işlev kazanır. Aktifleşen protein, AKT yolu üzerinden *mammalian target of rapamycin* (mTOR) yolunun fosforilasyonunu sağlayarak,

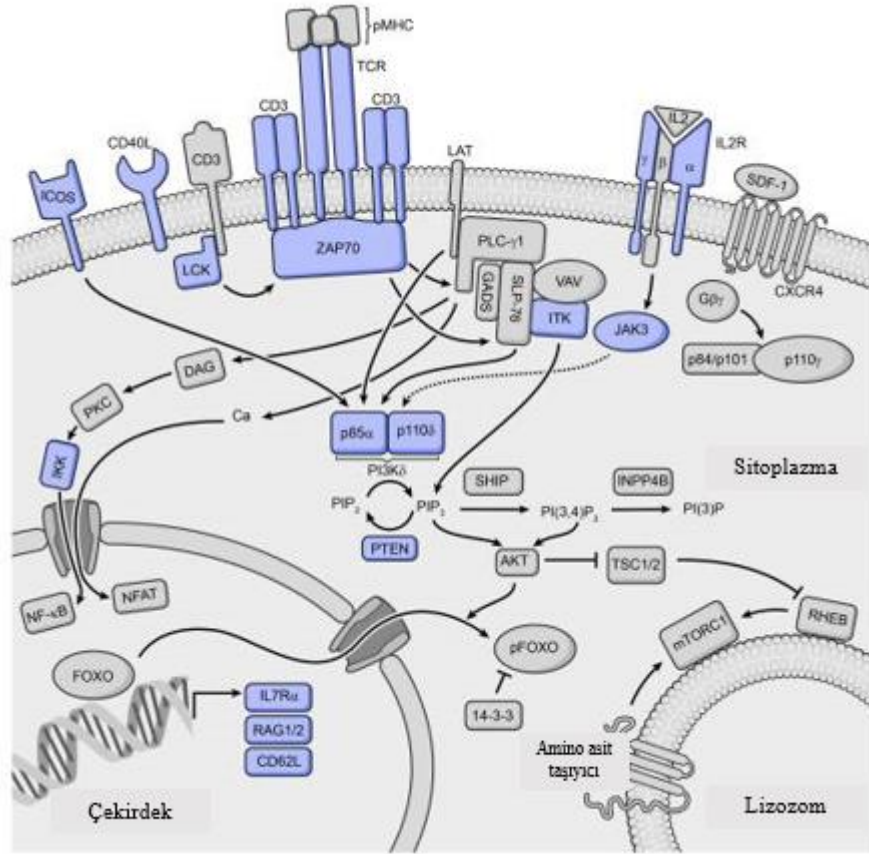
hücrelerin büyüme ve proliferasyonunu sağlar (18). Aynı zamanda mTOR yolağının aşağı yönde yer alan S6 kinaz proteininin de fosforilasyonu sağlanarak translasyon ve hücre büyümesine katkı sağlanır (19).



**Şekil 2.5.** B hücre sinyali ve akt/mTOR yolağı (18)

T hücrelerde PI3K $\delta$  proteini, *inducible costimulator* (ICOS) veya IL-2R ko-stimülatör reseptörler ile, PI3K $\delta$  proteini işlev kazanır. Aktifleşen protein, AKT'ın fosforilasyonunu sağlayarak, AKT aracılığı ile *forkhead box 1* (FOXO1) transkripsiyon faktörünün inaktifleşmesine ve sitoplazmada birikimini sağlar. Bu durumda, IL-7R $\alpha$  ve *cluster of differentiation 62 ligand* (CD62L)'in ekspresyonu azalır. Bu sayede, T hücreleri lenf nodlarını terk eder ve vasküler sistem ve organlara geçer (18).





**Şekil 2.6.** T hücre sinyali ve akt/mTOR yolağı (18)

Genlerindeki mutasyonlar, PI3K $\delta$  proteininin işlevselliğini bozarak, mutasyona bağlı, fonksiyon kazanması veya kaybetmesine bağlı olarak farklı şekillerde klinik tablo ile karşımıza çıkmaktadır.

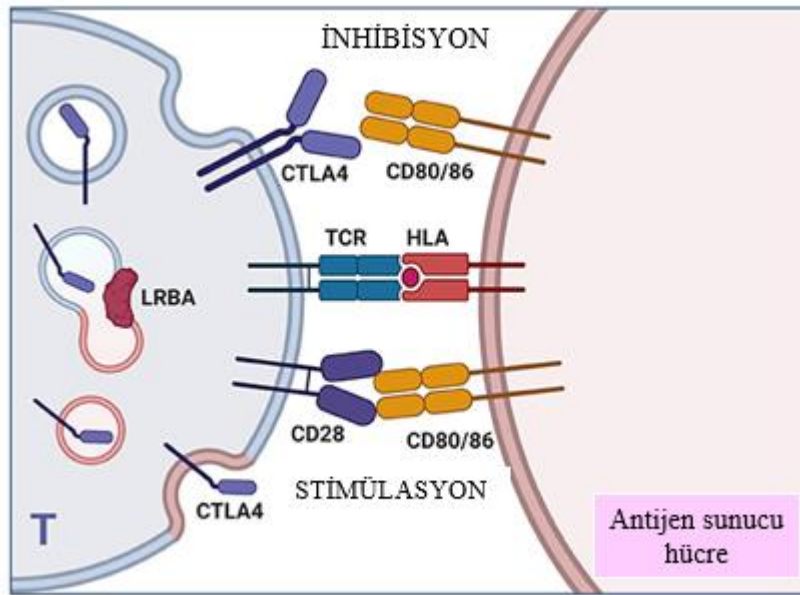
PI3K $\delta$  proteinin fonksiyon kazanması durumunda *activated PI3K delta syndrome* (APDS) olarak adlandırılan PİY tablosu oluşur. B ve T hücrelerde gelişimsel ve fonksiyonel bozukluklardan dolayı hastalarda, tekrarlayan bakteriyel ve viral enfeksiyon görülür. Hastalarda, tekrarlayan solunum yolu enfeksiyonu, bronşektazi, otoimmünite, lenfoproliferasyon olabilir B hücrelerin etkilenmesi nedeniyle antikor eksikliği görülebilir. T hücre bozukluklarından dolayı ciddi, tekrar eden veya ısrarcı *Herpes* virüs enfeksiyonları oluşur (18).

PI3K $\delta$  proteinin fonksiyon kaybetmesi ile T hücreler, IL-4 gibi etkili sitokin üretimini baskılar. Hastalarda erken B hücre gelişimindeki tıkanmadan dolayı ciddi B hücre lenfopenisi görülür. Ayrıca hastalarda, agammaglobulinemi ile ilişkili tekrarlayan pnömoni görülür (18).

### 2.1.3 İmmün Disregülasyon Hastalıkları

T hücre, B hücre ve doğal öldürücü (*natural killer*, NK) hücrelerdeki anormal sayı ve fonksiyondan kaynaklanan immün disregülasyon hastalıkları, immün bozukluk, otoimmünite, tekrarlayan inflamasyon ve lenfoproliferasyonla karakterize bir hastalık grubudur (20).

İmmün disregülasyona neden olan genlerden biri **Lipopolysaccharide-responsive beige-like-anchor protein (LRBA)** genidir. Bu gen ürünü olan LRBA proteini, T ve B gibi immün hücrelerde başta olmak üzere tüm hücrelerden üretilen sitozolik bir proteindir (21,22). Veziküler trafik, sinyal iletimi ve apoptozis gibi birçok hücrel süreçte rol alır. Bunların yanı sıra, *cytotoxic T-lymphocyte protein 4* (CTLA-4)'ün lizozomal degradasyonunu engelleyerek endozomal olarak hücre içi trafiğinin sağlanmasına ve hücre yüzeyine tekrar yönlendirilmesine yardımcı olur (21).



Şekil 2.7. LRBA molekülü (23)

LRBA eksikliği, 2012 yılında tanımlanan, otozomal çekinik modelde kalıtılan, düşük düzenleyici T (Treg) hücre sayısı, baskılayıcı kapasitede bozukluk, hafıza T hücre sayısında kontrol edilemez artış ve düşük hafıza B hücre sayısı, T hücre aktivasyonunda ve proliferasyonunda bozukluk, dolaşımda artmış foliküler yardımcı T hücreler, spesifik antikor yanıtında bozukluk ile karakterize bir PİY'dir. LRBA

eksikliği, enfeksiyona yatkınlık, otoimmünite, ısrarcı ishal, otoimmün sitopeni ile karakterizedir. (21,24).

LRBA eksikliği, yaygın değişken immün yetmezlik veya otoimmün lenfoproliferatif sendroma (ALPS) ve X geçişli immün disregülasyon, poliendokrinopati, enteropati sendromu (IPEX) benzeri hastalıklara sebep olur (24).

İmmün disregülasyona neden olan genlerden bir diğeri **CTLA-4** genidir. Bu gen ürünü, T hücre kontrol noktası inhibitörü olarak görev yapan ve *forkhead box protein p3* (FOXP3+) Treg hücrelerde çokça, CD4+ ve CD8+ T hücrelerin aktivasyonundan sonra kısa süreli eksprese edilen bir moleküldür. Periferal toleransın sağlanmasında önemli rol oynar. Proteinin %90'ı hücre içinde bulunup, LRBA proteini yardımı ile, çeşitli uyarılar sonucu hücre yüzeyine taşınır. CTLA-4 proteini, CD28 reseptörü ile, T hücre aktifleşmesi için gerekli ikinci sinyali sağlamaya yardımcı olan antijen sunan hücrelerin yüzeylerinde eksprese edilen CD80/86L reseptörlerine bağlanma konusunda yarışır ve daha yüksek afinite göstererek hücre inhibisyonunu sağlar (Bakınız şekil 2.7.) (21).

CTLA-4 eksikliği, otozomal baskın olarak kalıtılan, düşük Treg hücre sayısı, baskılayıcı kapasitede bozukluk, hafıza T hücre sayısında kontrol edilemez artış ve düşük hafıza B hücre sayısı ile karakterize bir PİY'dir. CTLA-4 eksikliği, *CTLA-4 haploinsufficiency with autoimmune infiltration* (CHAI) olarak adlandırılan ve lenfoproliferasyon, otoimmün sitopeni, enteropati, tekrarlayan enfeksiyon ve interstesyel akciğer hastalığı ile karakterizedir (21,25).

## 2.2 PİY Tanı ve Tedavisi

Primer immün yetmezlik belirti ve semptomları, mutasyona, mutasyonun yerine ve/veya epigenetik özelliklere göre değişmekle beraber, eğer Jeffrey Modell Merkezinin belirlediği on PİY belirtisinden iki veya daha fazlası hastada mevcut ise, hastalar, PİY ihtimali açısından değerlendirilmelidir (26–29).

Kesin tanının belirlenmesinde moleküler tanı yöntemi (akım sitometri) ve sekanslama stratejileri (yeni nesil dizileme ve Sanger dizileme) yaygın olarak kullanılan teknikler arasındadır. Hastaların tedavisinde kullanılacak biyolojik ajan, gen

tedavisi uygulamaları ve kemik iliği nakli gibi tedavi uygulamaları için erken tanı yapılması, hasta için hayati önem taşımaktadır.

## 2.3 PİY Tanısı İçin Kullanılan Testler

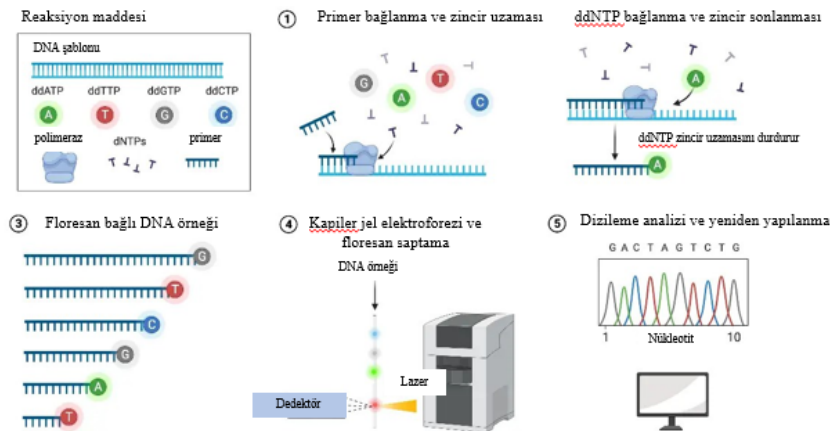
Hemogram, immünglobulinler, lenfosit alt grup analizleri, antikor yanıtları gibi testler ile PİY sınıfı değerlendirildikten sonra gerekli olduğu durumda moleküler ve genetik testler yapılır. Bu testlerden önce veya sonra işlevsel testler uygulamada kullanılabilir.

### 2.3.1 PİY Tanısı İçin Kullanılan Genetik Testler

#### Sanger Dizileme

Primer immün yetmezlik sınıflarında bulunan hastanın klinik tablosunu açıklayacağı düşünülen genin analizi için kullanılır.

Sanger dizileme, ilk nesil dizileme yöntemidir. Floresan bağlı dideoksinükleotit zincir sonlandırma yöntemine dayanan, bu nükleotitlerle DNA zincirinin uzamasını engelleyen bir yöntemdir. Oluşturulan farklı boyutlardaki DNA parçacıkları, boyutlarına göre ayrılarak kapiller elektroforezden geçirilerek dideoksinükleotitin yansıttığı ışık ile nükleotit dizisi sıralama yöntemidir. Tek seferde sadece bir dizileme reaksiyonunun analizi mümkündür. Günümüzde Sanger dizileme, yeni nesil dizileme ile bulunan mutasyonların doğrulaması için kullanılır (30,31).



Şekil 2.8. Sanger dizileme yöntemi (32).

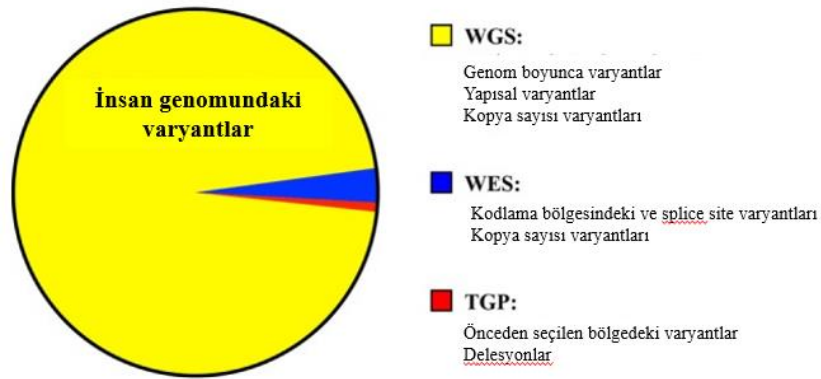
## Yeni Nesil Dizileme Analizleri

Üç temel yeni nesil dizileme yöntemi bulunmaktadır. Bunlar;

**Primer immün yetmezlik-hedeflenmiş panel:** Primer immün yetmezliğe neden olduğu belirlenen, sınıflamada yer alan belirli gen bölgeleri dizilenir.

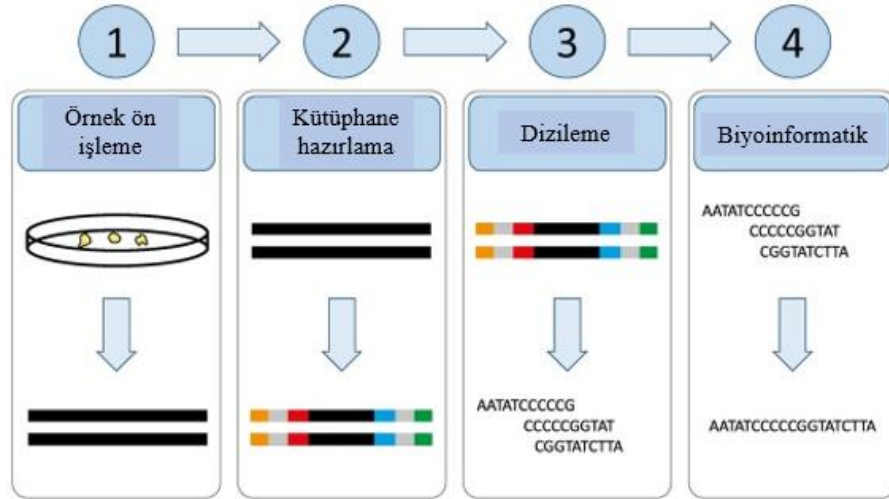
**Tüm ekzon dizileme:** Genomdaki protein kodlayan gen bölgeleri, yani ekzonlar dizilenir.

**Tüm genom dizileme:** Genomda bulunan tüm gen bölgeleri (intron ve ekzonlar) dizilenir (33,34).



**Şekil 2.9.** Tüm genom dizileme, tüm ekzon dizileme ve hedeflenmiş panel karşılaştırması (33) (*WGS: whole genome sequencing, WES: whole exome sequencing, TGP: targeted gene panels*).

Gelişen teknoloji ile her gün ilerleme kaydeden yeni nesil dizileme, ikinci nesil ve üçüncü nesil dizileme olarak ikiye ayrılmaktadır. İkinci nesil dizileme, kısa okuma dizileri olarak da bilinir ve 250-800 DNA baz çiftini (bç) klonal olarak çoğaltarak paralel olarak diziler. Kısa okuma dizileri, örnek hazırlama, kütüphane hazırlama, dizileme ve veri analizi olmak üzere üç ana aşamadan oluşur (Şekil 2.9). Üçüncü nesil dizileme veya uzun okuma dizileri 10 kilo bç'den daha uzun dizileri DNA'dan okur ve uzun okuma dizileri oluşturur. Üçüncü nesil dizileme yöntemi, ikinci nesil dizileme yöntemine kıyasla daha yüksek hata oranına sahiptir (31). Buna yönelik olarak çalışmalar devam etmektedir.



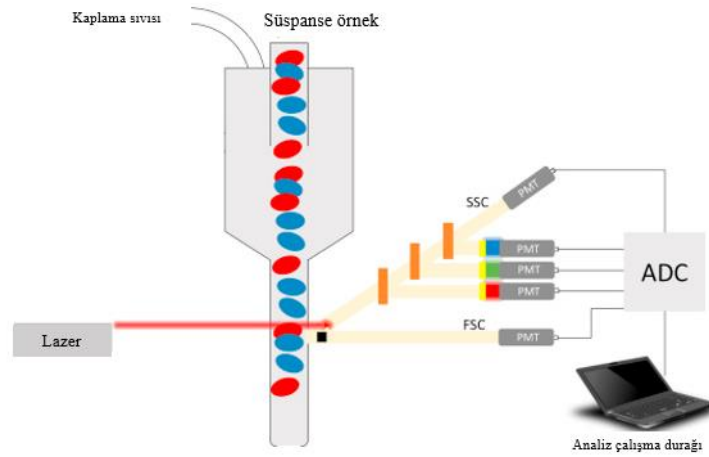
**Şekil 2.10.** İkinci nesil (yeni nesil) dizileme yöntemi (35).

### 2.3.2 PİY Tanısında Patojenitenin Belirlenmesinde Akım Sitometri

Akım sitometri, sıvı içerisindeki hücrelerin veya moleküllerin, yüzey veya içerisindeki moleküllerin özelliklerinin ölçülmesine dayanan, ışığın dağıtılması ve floresan emisyonuna dayanan bir yöntemdir. Bu yöntem hücre büyüklüğü, granül yapısı, yolak analizleri, protein miktarı ve yüzey reseptör veya molekül analizi yapar ve hücrelerin biyokimyasal, biyofiziksel ve moleküller özellikleri hakkında bilgi sağlamaktadır.

İzotonik bir sıvı içerisindeki hücrelerin tek tek lazer kaynağının önünden geçerken, floresan boya içeren monoklonal antikorun bağlandığı hücrenin yaydığı sinyaller, birçok filtre kaynağı tarafından yansıtılarak dedektöre ulaşır. Dedektör, gelen sinyali elektrik sinyaline dönüştürür ve bilgisayar ile incelendiğinde, hücrenin veya molekülün yapısal özellikleri hakkında bilgi verir.

İmmünolojik hastalıkların araştırılmasında sıklıkla kullanılan bu teknik, hücre yüzey molekülleri, hücre reseptör analizleri, hücre içi protein analizleri, hücre proliferasyonu ve yolak analizleri gibi hastalık tanı ve tedavisinde yardımcı olacak analizlerde başvurulan bir yöntemdir (36).



**Şekil 2.11.** Akım sitometri temel prensibi (37).

Akım sitometri, hücre temelli hastalıkların tanısı için sıklıkla başvurulan bir yöntemdir. Anabilim dalımızda, immünolojik temelli hastalıkların araştırılmasında ve rutin uygulamalarda da kullanılmaktadır. Nötrofil fonksiyon testi olan DHR testi, lenfosit alt grup analizleri, lenfosit aktivasyon-proliferasyon testleri, spesifik protein tayini gibi akım sitometri ile yapılan birçok test, hastalık araştırmasında aktif olarak kullanılmaktadır.

### **Hücre Proliferasyonu**

Hücre proliferasyonu, antijen, sitokin gibi çeşitli uyarılara karşı immün sistemin verdiği bir yanıttır. Birçok PİY hastasında immün hücrelerdeki bozukluklar, hücrelerin proliferasyon kapasitelerini etkilemektedir. Hasta kanlarından ayrıştırılan immün hücreler, çeşitli ajanlar sayesinde *in vitro* olarak uyarılarak, hücre proliferasyonları incelenebilmektedir. Hücre proliferasyonunun *in vitro* olarak analiz edilebilmesi için günümüzde *carboxyfluorecein diacetate succinimidyl ester* (CFSE) olarak adlandırılan ajan kullanılmaktadır. Günümüzde yaygın olarak kullanılan CFSE, hücre zarından geçebilen, hücre içi floresan boyadır. Sitoplazmik moleküllerde çokça bulunan amin gruplarına bağlanarak, hücre her bölündüğünde yavru hücreler eşit olarak dağılır. Azalan hücre floresan miktarı, akım sitometri yöntemi ile tayin edilir (38).

## **İmmün Fenotipleme**

Primer immün yetmezlikler, çoklu immün hücre grubunu etkileyen bir hastalıktır. Hastalarda, etkilenen hücre grubunu tayin etmek, hastalık gidişatı ve hastanın hayat kalitesi açısından önem teşkil etmektedir. Kandan veya dokudan elde edilen immün hücrelerin alt grup analizi, yıllardır hastalık teşhis ve tedavisinde önemli bilgiler sağlamaktadır. Floresan işaretli konjuge antikorlar ile, heterojen hücre grubu içerisinde hücre alt gruplarının tanımlanması, karakterizasyonu ve sayısal verileri, akım sitometri yöntemi ile elde edilebilir. Hücrelerden eksprese edilen, yüzey ve hücre içi proteinler, doğrudan veya dolaylı olarak boyama yapılarak hücre fenotiplemesi yapılmaktadır. CD3, CD4/8, CD19 gibi immün hücre gruplarına ve onların alt gruplarına spesifik antikorlar ile hücre karakterizasyonu yapılmaktadır (39).

## **Hücre Membran Proteinlerinin Tayini**

Bütün immün hücreleri, kendilerine özgü belirli yüzey belirteçlerine sahiptirler. PİY hastalarında, mutasyona bağlı olarak belirli tip hücreler etkilenmektedir ve bu hücrelerin analizi hastalık teşhisi, gidişatı ve tedavisi için hayati önem taşımaktadır. Bu hücreleri analiz etmek için, akım sitometri yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Kandan veya dokudan izole edilen immün hücreleri, daha sonra belirli yüzey belirteç antikorları ile boyanıp akım sitometri cihazında örnekler okunarak veriler toplanmaktadır.

## **Hücre İçi Protein Tayini**

Primer immün yetmezlik hastalarının sahip oldukları mutasyonlara bağlı olarak bazı genlerde fonksiyon kazanımı veya fonksiyon kaybı meydana gelir. Bu genlerden üretilen protein miktarlarının tayini hastalık tedavisi açısından önemlidir. Akım sitometri, hücre içi protein tayininde sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. İzole edilen hücreler, önce hücre fiksasyonu işleminden geçtikten sonra, hücre geçirgenliği artırılarak hücre içi antikorun, hücre içerisine girişi sağlanır. Örnekler, son olarak cihazda okunarak veriler toplanır.



## Hücre Sinyal Yolakları

Birçok uyarana cevap olarak tetiklenen hücre sinyali, özellikle fosforilasyon gibi karmaşık protein ağlarının post-translasyonel modifikasyonlarına bağlıdır ve uygun immün cevabı gerçekleştirmeyi amaçlar. Belirli PİY hastalarındaki mutasyon, immünolojik sinyal yolağındaki herhangi bir proteini etkileyebilmektedir. Etkilenen protein, sinyal iletimde aksaklıklara sebep olabilir ve bu da immünolojik yolağın düzgün çalışmamasına, hücrede işlevin aksamasına veya belirli moleküllerin birikimine neden olabilir. Buna bağlı olarak hastada çeşitli belirtiler görülebilir. Hücre sinyal analizi, immün sistemin biyolojisi ve patolojisini anlamak için önemlidir ve etkili biyobelirteç ve tedavi geliştirmek için gerekli bir adımdır (40).

### 2.3.3 Tanıda Akım Sitometri Çalışmaları

Mısır merkezli yapılan bir akım sitometri çalışmasında, son 10 yılda, 1019 PİY şüphesi bulunan hastaya akım sitometri tekniğini kullanarak, klinik fenotiplerine göre yapılan akım sitometri temelli testlerde, hastaların %73'ünün tanısının, akım sitometri yöntemi ile koyulduğu bildirilmiştir (42). 50 farklı PİY hastalığı ve 8 farklı kategoriden olan hastalara, genetik test yapılması beklenmeden tanı koyulmuş, tedavisine başlandığı belirtilmiştir. 271 (%28) hastanın tanısında akım sitometrinin yetersiz kaldığı ve DNA dizileme yöntemi yapıldığı bildirilmiştir. Ayrıca, akım sitometri kullanılarak yapılan moleküler tanı yönteminde optimizasyon yaparak, genetik test için yolladıkları örnek sayılarını azalttıkları belirtilmiştir. 7 yılda, 55 DOCK8 eksikliği hastası tanısı ve 99 immün disregülasyon hastasının 27'sini LRBA eksikliği tanısı altında tedaviye başlandığı bildirilmiştir. Makalede, akım sitometri temelli protein ekspresyonuna dayalı analizlerin, DOCK8 ve LRBA eksikliği gibi birçok hastalıkta kesin tanıya gidişteki spektrumu arttırdığı bildirilmiştir (41). Diğer bir makalede ise erken tanı alan ve tedavisine başlanan LRBA eksikliği tanımlanmış hastaların, hastalık seyrinin iyileşmesinde daha iyi yol kat ettikleri ve hayat kalitelerinin arttığı bildirilmiştir(42).

Ayrıca Mısır merkezli çalışmada, en yaygın tanı alan hastalıkların, ciddi kombine immün yetmezlik (SCID), kronik granülomatöz hastalık (KGH), DOCK8 eksikliği ve diğer kombine immün yetmezlikler olduğu bildirilirken (41), Hindistan

merkezli çalışmada, bu hastalıkların, hemofagositik lenfhistiyositoz (HLH), SCID, XLA ve KGH olduğu bildirilmiştir (45). Bu farklılığın sebebi olarak etnik köken ve kalıtım olabileceği belirtilerek, her merkezin kendi akım sitometri tekniğini optimize etmesi gerektiğinin önemi, PİY hasta tanısında akım sitometrinin kullanımından tam kapasite yarar sağlanmak için önemli olduğu vurgulanmıştır (42).

Kwon ve arkadaşlarının (43) yayınladığı makaleye göre, akım sitometrinin BTK, PIK3CD, CTLA-4 ve LRBA eksikliği olan hastalarda yararlı ve zaman kazandıran bir teknik olduğundan, klinik akıbetini iyileştirdiğinden bahsedilmiştir.

Hindistan merkezli bir çalışmada, son 10 yılda 753 PİY hastasına akım sitometri ile tanı koyulduğu belirtilmiştir (44). Aynı zamanda, akım sitometri bazlı analizlerle, 26 etkilenmiş aileye prenatal tanı konulmuştur. Makalede, akım sitometrinin, PİY değerlendirmelerinde, klinik tanı ve moleküler testlerde arasında bir köprü görevi gördüğü, patojenitenin belirlenmesinde ve tanı almamış hastalara tanı konmasında hızlı ve doğruluğu yüksek bir araç olduğu vurgulanmıştır.

LRBA protein ekspresyonu için, 57 LRBA eksikliği şüphesi bulunan hastalar ile yapılan akım sitometri çalışmasında, stimülasyon sonrası periferik kan mononükleer hücrelerden bakılan LRBA ekspresyonu verilerinin, LRBA eksikliği tanısında %94 sensitivite ve %80 spesifite gösterdiği bildirilmiştir ve akım sitometri yönteminin hızlı tarama ve tedavi uygulamalarını hızlandırdığı belirtilmiştir (45).

106 hipogamaglobulinemisi olan hasta (91 aile) üzerinde BTK protein analizi için yapılan akım sitometri çalışmasında, 78 ailede (93 hastada) BTK protein ekspresyonunun olmadığı tespit edilip, 76 ailede BTK gen mutasyonunun tespit edildiği bildirilmiştir (46). Bu çalışma ile, akım sitometri tekniğinin BTK protein miktar tayini ve hastalık tanısı için güvenilir bir yöntem olduğu vurgulanmıştır.

Mısır merkezli yapılan başka bir çalışmada, 15 DOCK8 eksikliği şüphesine sahip hastanın immün hücreleri ve DOCK8 protein ekspresyonları incelendiğinde, immün sistem hücrelerindeki ekspresyon analizinin tanının konmasında yardımcı olacağı belirtilmiştir (12). DOCK8 eksikliğinin, otozomal baskın HIES ile benzer klinik belirtilerinin olduğu ve genetik teste erişim imkânı olmayan merkezlerin akım sitometri ile DOCK8 protein ekspresyonuna bakılmasının, hastalık tanısının ve patojenitesinin belirlenmesinde ve kesin tedavinin kemik iliği nakli olduğu bu durum için hastanın tanı almasına imkân sağlayacağı vurgulanmıştır.

Primer immün yetmezlik tanısı alan hastaların yaklaşık 2/3'ü başlangıçta çocuk hekimine gönderildiği halde tanındaki gecikme ortalama 2 yıl olarak bulunmuştur (47). Bu durumun morbidite ve mortaliteyi önemli ölçüde arttırdığı göz önüne alınacak olursa, hastalara yapılan temel testlerin yanında yeni nesil dizileme tekniklerini içeren genetik testler hastalardan sıklıkla istenmekte, belirlenen genlerin değerlendirilmesi anlamında bazı işlevsel deneylere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu bakımdan, klinik bulguların laboratuvarda uygulanan ayırıcı moleküler çalışmaların sonuçları ile değerlendirilmesi gerekmektedir (4). Böylelikle bilinen gende yeni varyantın patojenitesinin ve klinik fenotipe etkisinin belirlenmesi önem taşımaktadır. Bu amaçla gen ürünlerinin (mRNA/protein) ifadelerinin ve fonksiyonlarının değerlendirilmesi gerekmektedir. Bu tez çalışmasında, DOCK8, LRBA, CTLA4 ve BTK genlerindeki varyantların patojenitelerinin belirlenmesinde ve klinik ve laboratuvar şüphesi olan hastalarda tanının yapılabilmesi amacıyla hücre içi protein tayini yapılacak, PIK3CD ve PIK3R1 (Akt/mTOR yolağı) genlerindeki varyantların patojenitelerinin belirlenmesinde sinyalin alt basamağında görev alan kinazlardan Akt, mTOR ve S6 proteinlerinin fosforilasyon düzeyleri incelenecektir. Ayrıca belirli hastalarda, yolak analizlerinin yanı sıra T hücre proliferasyonları değerlendirilecektir.

### 3. BİREYLER VE YÖNTEM

#### 3.1 Hastalar

Bu tez çalışmasına, DOCK8, LRBA, CTLA-4, BTK, PIK3CD ve PIK3RI eksikliği olan ve şüphe edilen hasta sayıları tablo 3.1.1 de gösterilen sayıda hasta ve kontrol dahil edilmiştir.

**Tablo 3.1.** Hasta sayıları

Kombine İmmün Yetmezlik	Ağırlıklı Olarak Antikor Eksiklikleri		İmmün Disregülasyon Hastalıkları		
DOCK8 Eksikliği	BTK Eksikliği	PIK3RI ve PIK3CD Eksikliği	LRBA Eksikliği	CTLA-4 Eksikliği	Proliferasyon
n=14	n=2	n=5	n=9	n=4	n=4
Kontrol n=15	Kontrol n=3	Kontrol n=2	Kontrol n=7	Kontrol n=2	Kontrol n=2

#### 3.2 Yöntemler

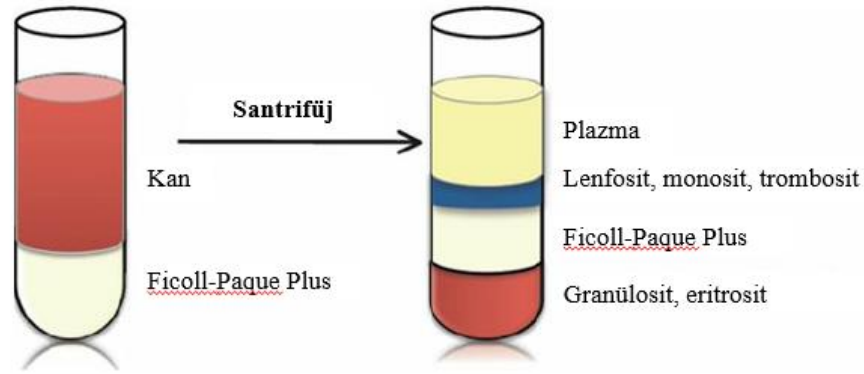
##### 3.2.1 Hasta Kanlarının Temini

Hastalara ve kontrollere ait kan örnekleri, GO 21/808 proje numaralı etik kurul onayınca Hacettepe Üniversitesi İhsan Doğramacı Çocuk Hastanesi İmmünoloji Bölümü'ne başvuran PİY hastası ve hasta bireylerin yanında gelen akraba olmayan sağlıklı bireylerden, onam formu alınmıştır. Kan örnekleri ile yapılan tüm testler Hacettepe Üniversitesi İhsan Doğramacı Çocuk Hastanesi İmmünoloji Bölümü Laboratuvarları'nda yapılmıştır.

##### 3.2.2 Hücre İçi Protein Boyaması

- Periferik kan mononükleer hücrelerin izolasyonu için her bir hasta ve kontrolden 2 cc kan, hemogram tüplerine alındı.
- Kanlar, 2 mL Ficoll üzerine dikkatli bir şekilde yayıldı.
- 2000 rpm'de 20 dakika frensiz santrifüj edildi.
- Lenfositlerin bulunduğu katman toplanarak yeni bir tüpe aktarıldı (Şekil 3.1).
- Üzerine 2 mL *phosphate-buffered saline* (PBS) eklenerek 500 g'de 5 dakika frenli şekilde hücreler yıkandı.

- Hücreler, 300  $\mu$ L PBS ile seyreltilip, 100  $\mu$ L hücre akım sitometri tüplerine eklendi.
- Üzerine 100  $\mu$ L fiksasyon solüsyonu eklenerek 15 dakika karanlıkta ve oda sıcaklığında inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrası, hücreler 1 mL PBS ile 500 g'de 5 dakika frenli santrifüj edilerek yıkandı.
- Yıkama sonrası süpernatant dökülerek, 500  $\mu$ L 1X permeabilizasyon solüsyonu eklendi ve 15 dakika karanlıkta ve oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
- Sonrasında 1 mL PBS ile yıkandı.
- Yıkama sonrası süpernatant dökülerek, hücre içi boyama hastalık bazında anti-human DOCK8 (2  $\mu$ g/mL), uL BTK (0,5 mg/mL), CTLA-4 (0,5 mg/mL) ve LRBA (1,5  $\mu$ g/mL) antikorları ile yapılip 30 dakika karanlıkta ve oda sıcaklığında inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrası, 1 mL PBS ile yıkanarak süpernatantı döküldü.
- Hücreler, 300  $\mu$ L PBS içerisinde çözündürülerek akım sitometri cihazında okuması yapıldı.



**Şekil 3.1.** Santrifüj sonrası kandaki hücrelerin lenfosit ayırma solüsyonu ile katmalara ayrılması (48).

### 3.2.3 Periferik Kan Mononükleer Hücrelerde Akt/mTOR Yolağının Değerlendirilmesi

- Periferik kan mononükleer hücrelerin izolasyonu için her bir hasta ve kontrolden alınan 2 cc kan, hemogram tüplerine alındı.

- Kanlar, *BioSafety Laminar-2* (BSL-2) kabininde, 2 mL steril Ficoll üzerine dikkatli bir şekilde yayıldı.
- 2000 rpm'de 20 dakika frensiz santrifüj edildi.
- Lenfositlerin bulunduğu katman toplanarak yeni bir tüpe aktarıldı ve üzerine 2 mL steril PBS eklenerek 500 g'de 5 dakika frenli şekilde hücreler yıkandı.
- Hasta ve kontrole ait  $2 \times 10^6$  hücreler, 1 mL %1 penisilin-streptomisin, %10 (FBS) *fetal bovine serum* ve 1% L-glutamat içeren steril RPMI medya (tam medya) ile sulandırıldı.
- 2 farklı 15 mL falkon tüplerine eşit olarak dağıtıldı.
- $1 \times 10^6$  hücreye tam RPMI medya (uyarılmayan hücreler olarak adlandırıldı) diğer  $1 \times 10^6$  hücreye *phyhemagglutinin* (PHA) (30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (uyarılan hücreler olarak adlandırıldı) eklenerek 72 saat boyunca  $37^\circ\text{C}$ 'de %5  $\text{CO}_2$  içeren inkübatörde inkübe edildi.
- 72 saat inkübasyon sonrası uyarılan hücrelere 1  $\mu\text{L}$  interlekin-2 eklenerek 72 saat daha aynı koşullarda inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrası hücreler, 2 mL PBS ile yıkandı.
- Yıkama sonrası, süpernatant döküldü ve üzerine 100  $\mu\text{L}$  fiksasyon solüsyonu eklenerek 15 dakika karanlıkta ve oda sıcaklığında inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrası, hücreler 1 mL PBS ile yıkandı.
- Yıkama sonrası süpernatant dökülerek, 500  $\mu\text{L}$  1X permeabilizasyon solüsyonu eklendi ve 15 dakika karanlıkta ve oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
- Sonrasında 1 mL PBS ile yıkandı.
- Yıkama sonrası süpernatant dökülerek, hücre içi boyama anti-human p-Akt (0,5 mg/mL) ve p-mTOR (0,3 mg/mL) antikorları ile yapıldı.
- Hücreler, 30 dakika karanlıkta ve oda sıcaklığında inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrası, 1 mL PBS ile yıkanarak süpernatantı döküldü.
- Hücreler, 300  $\mu\text{L}$  PBS içerisinde çözündürülerek akım sitometri cihazında okuması yapıldı.

### **B Hücrede Akt/mTOR Yolağının Değerlendirilmesi**

- Periferik kan mononükleer hücrelerin izolasyonu için her bir hasta ve kontrolden alınan 2 cc kan, hemogram tüplerine alındı.
- Kanlar, BSL-2 kabininde, 2 mL steril Ficoll üzerine dikkatli bir şekilde yayıldı.
- 2000 rpm'de 20 dakika frensiz santrifüj edildi.
- Lenfositlerin bulunduğu katman toplanarak yeni bir tüpe aktarıldı ve üzerine 2 mL steril PBS eklenerek 500 g'de 5 dakika frenli şekilde hücreler yıkandı.
- Hasta ve kontrollere ait hücreler tam medya ile sulandırıldı.
- Hasta ve kontrollere ait  $5 \times 10^5$  hücre, steril 96 kuyucuklu plate içine eklenerek son hacim 100  $\mu$ L'ye tamamlandı.
- Belirli kuyucuklara anti-human CD40L antikoru konsantrasyonu 1  $\mu$ g/ $\mu$ L olacak şekilde, aynı kuyucuklara anti-human IL-4 antikoru konsantrasyonu 20 ng/ $\mu$ L olacak şekilde ve diğer kuyucuklara anti-human IgM antikoru konsantrasyonu 15  $\mu$ g/mL olacak şekilde eklendi ve CD40L ve IL-4 30 dakika 37°C'de inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrası yukarıda anlatılan fiksasyon ve permeabilization basamakları uygulanarak anti-human p-S6 (0,5  $\mu$ g/mL) ve p-Akt (0,5  $\mu$ g/mL) antikoları ile boyanıp akım sitometrinde okuması yapıldı.

### **3.2.5 Hücre Proliferasyonu**

- Periferik kan mononükleer hücrelerin izolasyonu için her bir hasta ve kontrolden alınan 2 cc kan, hemogram tüplerine alındı.
- Kanlar, BSL-2 kabininde, 2 mL steril Ficoll üzerine dikkatli bir şekilde yayıldı.
- 2000 rpm'de 20 dakika frensiz santrifüj edildi.
- Lenfositlerin bulunduğu katman toplanarak yeni bir tüpe aktarıldı ve üzerine 2 mL steril PBS eklenerek 500 g'de 5 dakika frenli şekilde hücreler yıkandı.
- Hücreler, 1  $\mu$ L CFSE boya ile 5 dakika karalıktta muamele edilip, sonrasında 2 defa PBS ile aynı koşullarda yıkandı.
- Hasta ve kontrole ait  $2 \times 10^5$  hücre, 2 mL %1 penisilin-streptomisin, %10 FBS ve %1 L-glutamat içeren steril RPMI medya (tam medya) ile sulandırıldı ve 2 farklı 15 mL falkon tüpe eşit olarak dağıtıldı.

- $1 \times 10^5$  sayıdaki hücreye RPMI medya (uyarılmayan hücreler olarak adlandırıldı) diğer  $1 \times 10^5$  sayıda hücreye PHA (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (uyarılan hücreler olarak adlandırıldı) eklenerek 96 saat boyunca  $37^\circ\text{C}$ 'de %5  $\text{CO}_2$  içeren inkübatörde inkübe edildi.
- 96 saat inkübasyon sonrası, homojenize edilen hücreler, akım sitometri tüplerine alınarak 2 mL PBS ile yıkandı.
- Yıkama sonrası süpernatant dökülerek, hücreler 300  $\mu\text{L}$  PBS ile sulandırılıp, akım sitometri cihazında okuması yapıldı.

### 3.2.6 İstatistiksel Analizler

Hastaların tüm klinik ve immünolojik verileri Microsoft Excel programına kaydedilerek tablolaştırılmıştır. Hasta ve kontrol gruplarına ait boyama (stain) indeksi değerleri Microsoft Excel programına kaydedilip GraphPad Prism 9 programına aktarılmıştır. Parametrik olmayan verilerin analizi için Kruskal-Wallis ve Mann Whitney U testleri kullanılmıştır. p değeri  $<0,05$  anlamlı olarak kabul edilmiştir.

Boyama indeksi değerini bulmak için;

Kontrol grubu;

$$\frac{\text{Sağlıklı kontrol medyan değeri} - \text{negatif kontrol medyan değeri}}{2 * \text{negatif kontrol rSS değeri}}$$

Hasta grubu;

$$\frac{\text{Hasta medyan değeri} - \text{negatif kontrol medyan değeri}}{2 * \text{negatif kontrol rSD değeri}}$$

denklemleri kullanılmıştır (49).

rSS: sağlam standart sapma



## 4. BULGULAR

### 4.1 DOCK8 Ekspresyonu Bakılan Hastaların Klinik ve Laboratuvar Özellikleri

Sekiz *DOCK8* gen mutasyonu olan ve IgE yüksekliği, akraba evliliği, kardeş DOCK8 eksikliği öyküsü olan ve DOCK8 klinik ve laboratuvar şüphesi bulunan altı hasta ile toplam 14 hasta ve 15 sağlıklı kontrolden bakılan DOCK8 protein ekspresyonu akım sitometri yöntemi ile analiz edilmiştir. Hastaların klinik ve laboratuvar bilgileri aşağıda verilmiştir (Bakınız tablo 4.1).

**Tablo 4.1.** DOCK8 protein ekspresyonu bakılan hastaların cinsiyet, yaş ve klinik belirtileri.

Hasta Adı	Cinsiyeti	Yaşı (yıl)	Klinik Belirtiler
P1 (Ka.Öz.)	E	19	Tekrarlayan bronşit, pnömoni, Verruka vulgaris
P2 (Hi.Ay.)	K	5	Egzema, İYE, ÜSYE, tekrarlayan <i>Herpes simplex</i> enfeksiyonu
P3 (Mu.Es.Yı.)	E	9	Tekrarlayan pnömoni
P4 (Or.Çi.)	E	14	Tekrarlayan pnömoni, boy kısılgı, gecikmiş puberte, özefagus varisleri, bronşiektazi
P5 (Al.Gö.İş.)	E	3	Egzema
P6 (Du.Ac.)	K	19	ÜSYE, bronşit, pnömoni
P7 (Nu.De.)	E	43	Nefes darlığı, öksürük, yaygın ronküs, eozinofil ve IgE yüksekliği, kaşıntı, kızamık, döküntü, mantar enfeksiyonu, allerji
P8 (As.Me.)	K	9	Öksürük, tüberküloz, gece terlemesi, iştahsızlık, kilo kaybı, balgam, dirençli ateş, halsizlik, atelettazi, pnömoni
P9 (Do.Ko.)	K	2	Egzema, ÜSYE, ishal
P10 (Fu.Me.Ha.)	E	10	Karın ağrısı, öksürük, kusma, kilo kaybı, iştahsızlık, akut orta kulak enfeksiyonu, Verruka vulgaris, ishal, ateş
P11 (Ru.Sa.)	K	12	Öksürük, balgam, ateş, döküntü, pnömoni, kilo kaybı, kaşıntı, ÜSYE, burun içi <i>Herpes simplex</i> enfeksiyonu
P12 (Ha.Hü.Yı.)	E	16	Tekrarlayan pnömoni, bronşiektazi, migren, mevsimsel alerjik-konjüvit, yutma güçlüğü, karın ağrısı, ÜSYE, <i>Herpes simplex</i> enfeksiyonu
P13 (Ay.Be.)	E	6	Deri döküntüsü, viral ÜSYE, iştahsızlık, kilo kaybı
P14 (Öm.As.Ay.)	E	5	Geçirilmiş dilate KMP öyküsü, kardiyak trombus ve geçirilmiş TIA öyküsü, pnömoni, tekrarlayan enfeksiyon (otit, ÜSYE, İYE), tekrarlayan ateş

**Tablo 4.2** DOCK8 ekspresyonu bakılan hastaların Ig ve lenfosit alt grup değerleri.

Hasta Adı	IgA (mg/dL)	IgG (mg/dL)	IgM (mg/dL)	IgE (UI/mL)	CD3+ (%)	CD4+ (%)	CD8+ (%)	CD19+ (%)	CD16+56 (NK) (%)
P1 (Ka.Öz.)	<b>468 (82-453)</b>	<b>2270 (650-1600)</b>	<b>25,8 (46-304)</b>	<b>378 (1,31-165)</b>	70 (56-84)	42 (31-52)	28 (18-35)	15 (6-23)	<b>4 (6-27)</b>
P2 (Hi.Ay.)	273 (57-282)	1500 (745-1804)	<b>15,5 (78-261)</b>	<b>242 (1,31-165)</b>	<b>55 (56-75)</b>	29 (28-47)	20 (16-30)	31 (14-33)	7 (4-17)
P3 (Mu.Es.Yı)	175 (57-828)	975 (745-1804)	118 (87-261)	<b>5672 (1,31-165)</b>	<b>83 (60-76)</b>	<b>49 (31-47)</b>	30 (18-35)	<b>7 (13-27)</b>	10 (4-17)
P4 (Or.Çi.)	327 (49-437)	1200 (764-2134)	255 (69-387)	3,03 (1,31-165)	<b>58 (60-76)</b>	38 (31-47)	19 (18-35)	<b>31 (6-23)</b>	7 (4-17)
P5 (Al.Gö.İş.)	<b>176 (15-110)</b>	1020 (640-2010)	<b>33,4 (46-304)</b>	73,2 (1,31-165)	63 (56-75)	<b>18 (28-47)</b>	<b>43 (16-30)</b>	15 (14-33)	<b>20 (4-17)</b>
P6 (Du.Ac.)	350 (139-38)	1060 (913-1884)	66,2 (64-445)	61,4 (1,31-165)	<b>90 (56-84)</b>	37 (31-52)	<b>49(18-35)</b>	<b>2 (6-23)</b>	7 (3-22)
P7 (Nu.De.)	351 (139-378)	1170 (913-1884)	103 (64-445)	<b>2083 (1,31-165)</b>	84 (56-84)	41 (31-52)	<b>40 (18-35)</b>	8 (6-23)	5 (3-22)
P8 (As.Me.)	145 (62-390)	847 (842-1943)	95,7 (54-392)	13,1 (1,31-165)	75 (60-76)	36 (31-47)	30 (18-35)	20 (13-27)	5 (4-17)
P9 (Do.Ko.)	<6,67 (4 -250)	511 (304-1231)	<b>7,23 (46-304)</b>	<b>1,14 (1,31-165)</b>	<b>51 (53-75)</b>	43 (32-51)	<b>6 (14-30)</b>	<b>40 (16-35)</b>	6 (3-15)
P10 (Fu.Me.Ha.)	<b>236 (35-200)</b>	1050 (842-1943)	<b>20,3 (46-304)</b>	<b>1245 (1,31-165)</b>	<b>42 (60-76)</b>	<b>24 (31-47)</b>	18 (18-35)	27 (13-27)	<b>25 (4-17)</b>
P11 (Ru.Sa.)	<b>368 (45-250)</b>	1490 (835-2094)	<b>40,6 (46-304)</b>	<b>8579 (1,31-165)</b>	<b>57 (60-76)</b>	37 (31-47)	<b>15 (18-35)</b>	27 (13-27)	7 (4-17)
P12 (Ha.Hü.Yı.)	<b>75 (82-453)</b>	940 (913-1884)	269 (88-322)	<b>564 (1,31-165)</b>	63 (56-84)	<b>27 (31-52)</b>	30 (18-35)	18 (6-23)	20 (3-22)
P13 (Ay.Be.)	<b>13,2 (30-107)</b>	<b>568 (605-1430)</b>	<b>36,5 (66-228)</b>	<b>391 (1,31-165)</b>	66 (56-75)	39 (28-47)	23 (16-30)	19 (14-33)	14 (4-17)
P14 (Öm.As.Ay.)	<b>23,5 (44-244)</b>	1580 (45-1804)	<b>9,16 (52-297)</b>	<b>834 (1,31-165)</b>	<b>95 (56-75)</b>	<b>60 (28-47)</b>	<b>34 (16-30)</b>	<b>3 (14-33)</b>	<b>2 (4-17)</b>

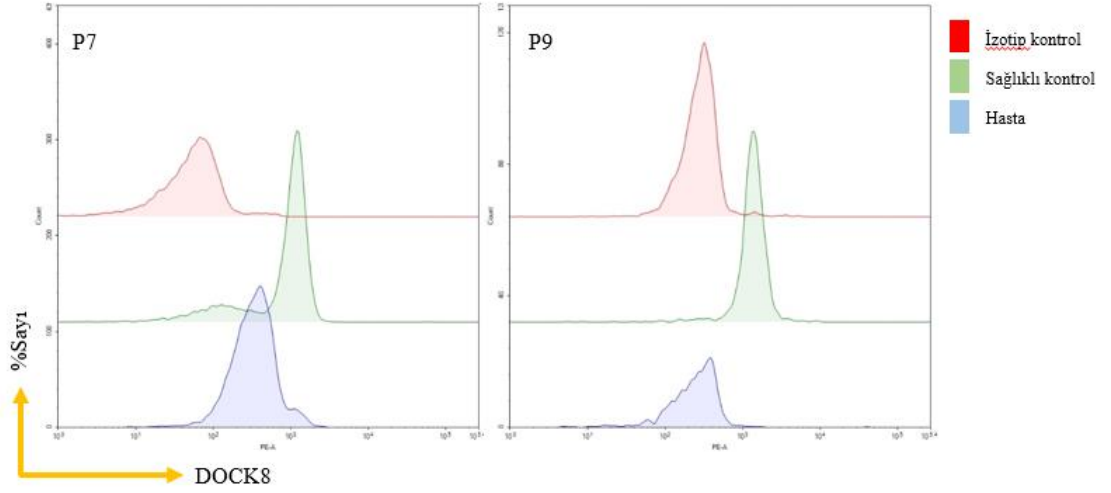
Referans aralığı dışındaki veriler koyu renk ile gösterilmiştir (50,51).

**Tablo 4.3.** DOCK8 ekspresyonu bakılan hastaların tam kan sayım verileri.

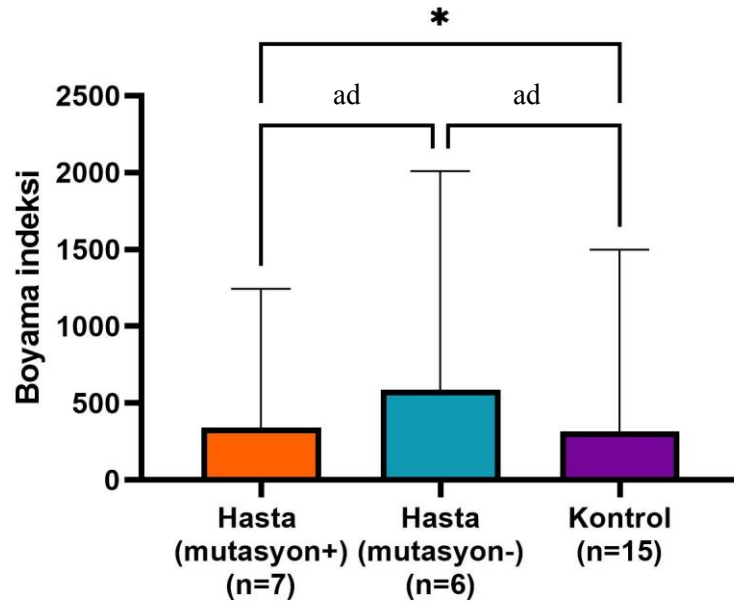
Hasta Adı	Hemoglobin (g/dL)	Lökosit (x10 <sup>3</sup> /uL)	Nötrofil# (x10 <sup>3</sup> /uL)	Lenfosit# (x10 <sup>3</sup> /uL)	Eozinofil# (x10 <sup>3</sup> /uL)	Trombosit (x10 <sup>3</sup> /uL)
P1 (Ka.Öz.)	<b>11,4 (13,6-17,2)</b>	<b>12,7 (4,3-10,3)</b>	<b>9,1 (2,1-6,1)</b>	1,9 (1,3-3,5)	<b>0,7 (0-0,5)</b>	297 (156-373)
P2 (Hi.Ay.)	12,3 (10,2-12,7)	9,55 (4,86-13,18)	6,27 (1,6-8,29)	2,19 (1,25-5,77)	0,28 (0,03-0,46)	368 (189-394)
P3 (Mu.Es.Yı)	11,8 (11-14)	12,2 (5-13)	<b>8,1 (2-8)</b>	2,5 (1-5)	0,8 (0,1-1)	270 (180-400)
P4 (Or.Çi.)	<b>9,4 (11-14,5)</b>	5,37	3,95	<b>0,85 (0,97-3,26)</b>	0,09	<b>104 (175-332)</b>
P5 (Al.Gö.İş.)	<b>9,2 (11,1-14,1)</b>	12,3 (6-16)	5,16 (1-7)	4,61 (3,5-11)	0,69 (0,1-1)	<b>20 (200-550)</b>
P6 (Du.Ac.)	12,3 (11,7-15,5)	8,8 (4,1-11,2)	5,3 (1,8-6,4)	2,4 (1,2-3,6)	0,2 (0,1-0,5)	188 (159-388)
P7 (Nu.De.)	16,2 (13,6-17,2)	7,4 (4,3-10,3)	5,4 (2,1-6,1)	1,5 (1,3-3,5)	0 (0-0,5)	216 (156-373)
P8 (As.Me.)	13 (10,6-13,2)	<b>4,26 (4,27-11,4)</b>	1,97 (1,64-7,87)	2,07 (1,16-4,28)	0 (0,03-0,47)	251 (199-367)
P9 (Do.Ko.)	12,6 (11,1-14,1)	13,7 (6-16)	2,4 (1-7)	6,2 (3,5-11)	<b>4 (0,1-1)</b>	402 (200-550)
P10 (Fu.Me.Ha.)	<b>9,7 (11-14)</b>	<b>27,2 (5-13)</b>	<b>23 (2-8)</b>	2,4 (1-5)	0,2 (0,1-1)	<b>1072 (180-400)</b>
P11 (Ru.Sa.)	12,3 (11-14)	11,1 (5-13)	7,7 (2-8)	1 (1-5)	<b>1,3 (0,1-1)</b>	373 (180-400)
P12 (Ha.Hü.Yı.)	14,9 (13,6-17,2)	7,1 (4,3-10,3)	4 (2,1-6,1)	2 (1,3-3,5)	0,5 (0-0,5)	234 (156-373)
P13 (Ay.Be.)	12 (11-14)	7,4 (5-15)	2,6 (1,5-8)	<b>3,7 (6-9)</b>	0,4 (0,1-1)	344 (200-450)
P14 (Öm.As.Ay.)	12 (11-14)	<b>3,3 (5-15)</b>	<b>1 (1,5-8)</b>	<b>2,2 (6-9)</b>	<b>0 (0,1-1)</b>	200 (200-450)

Referans aralığı dışındaki değerler koyu renk ile gösterilmiştir.

Dokuz erkek, beş kız olan hastaların ortalama yaşı 12.3 yaştır ( $\pm 10$  yıl). 14 hastanın yedisi üst solunum yolu şikayeti, yedisi pnömoni şikayeti ile başvurmuştur. Yapılan laboratuvar analizleri sonucu toplam on dört hastanın onunda IgE yüksekliği, sekizinde IgM düşüklüğü gözlemlenmiştir.



**Şekil 4.1.** *DOCK8* gen mutasyonuna sahip iki hastada *DOCK8* protein ekspresyon seviyeleri. (kırmızı: izotip kontrol; yeşil: sağlıklı kontrol; mavi: hasta).



**Şekil 4.2.** DOCK8 protein ekspresyonu bakılan, *DOCK8* gen mutasyonuna sahip olan ve mutasyon şüphesi olan hastaların ve sağlıklı kontrollerin istatistiksel analiz sonuçları (ad: anlamlı değil). Bir hastada (P4) DOCK8 protein ekspresyonu hasta kemik iliği nakli olduktan sonra bakıldığı için hastanın verileri istatistiksel analizde yer almamıştır.

Akım sitometri analizi yapılan, mutasyona sahip olan hasta grubu, hastalık şüphesi barındıran grup ve kontrol gruplarının medyan değerleri alınıp boyama indeksi değerleri belirtilen formüle göre hesaplanmıştır. Hesaplanan boyama indeksi değerleri ile yapılan istatistiksel analiz sonucunda mutasyona sahip olan hastalar ile sağlıklı kontrol grupları arasında istatistiksel olarak bir anlamlılık saptanmıştır ( $p < 0,04$ ). Mutasyona sahip hastalarının DOCK8 protein ekspresyonu kontrol grubuna göre düşüktür. Hastalık şüphesi bulunduran grup kendi içerisinde protein ifadeleri bakımından heterojen bir dağılım sergilediği için sağlıklı kontrol grubu ve mutasyonlu hasta grubu ile kıyaslandıklarında istatistiksel açıdan bir anlamlılık saptanamamıştır.

Bir hastada (P4) DOCK8 protein ekspresyonu hasta kemik iliği nakli olduktan sonra bakıldığı için hastanın verileri istatistiksel analizde yer almamıştır. Bu hastaya ait DOCK8 ekspresyonu nakil olmasına rağmen hala düşüktür.

## 4.2 BTK Ekspresyonu Bakılan Hastaların Klinik ve Laboratuvar Özellikleri

İki *BTK* gen mutasyonu olan hasta ve üç sağlıklı kontrolden bakılan BTK protein ekspresyonu, akım sitometri yöntemi ile analiz edilmiştir. Hastaların klinik ve laboratuvar bilgileri aşağıda verilmiştir (Bakınız tablo 4.4).

**Tablo 4.4.** BTK ekspresyonu bakılan hastalarının cinsiyet, yaş ve klinik belirtileri.

Hasta Adı	Cinsiyet	Yaşı (yıl)	Klinik Belirtiler
P24 (Yi.Ya.)	E	13	Geçirilmiş TBC, tekrarlayan solunum yolu enfeksiyonu, ateş, pnömoni, otit, nötropeni, öksürük, ÜSYE, bisitopeni, tüberküloz, Verruka vulgaris, sık enfeksiyon,
P25 (Em.As.Va.)	E	7	Enfeksiyon, tekrarlayan bronşit atakları, bronşiyolit, öksürük, larenjit, sinüzit, ÜSYE

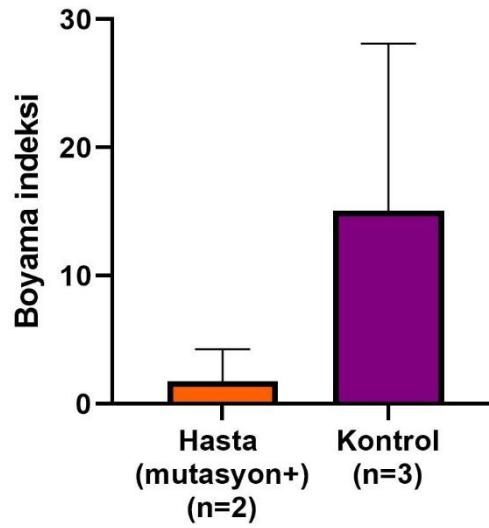
**Tablo 4.5.** BTK ekspresyonu bakılan hastaların Ig ve lenfosit alt grup değerleri.

Hasta Adı	IgA	IgG	IgM	IgE	CD3+	CD4+	CD8+	CD19	CD16+56 (NK)
P24 (Yi.Ya.)	<6,67 (96-465)	850 (907-1958)	<4,17 (83-292)	<1 (1,31-165)	95 (56-84)	50 (31-52)	39 (18-35)	0 (6-23)	2 (3-22)
P25 (Em.As.Va.)	<6,67 (70-303)	1140 (764-2134)	8,29 (69-387)	45,4 (1,31-165)	87 (60-76)	34 (31-47)	29 (18-35)	0 (13-27)	7 (4-17)

Referans aralığı dışındaki veriler koyu renk ile gösterilmiştir (50,51).



İki erkek hastanın ortalama yaşı 10 yaştır ( $\pm 4,2$  yıl). İki hasta da öksürük, üst solunum yolu enfeksiyonu, ve sık enfeksiyon şikayetleri ile bölümümüze başvurmuşlardır. Yapılan genetik testleri sonucu iki hastada da *BTK* gen mutasyonu saptanmıştır. Yapılan laboratuvar analizleri sonucu iki hastada da IgA ve IgM düşüklüğü görülmüştür. Lenfosit alt grupları için yapılan laboratuvar testlerinde CD3+ T hücre oranında artış saptanmış, CD19+ B hücre popülasyonu görülmemiştir.



**Şekil 4.3.** BTK mutasyonu olan ve ekspresyonu bakılan hasta ve sağlıklı kontrollerin analiz sonuçları.

İki *BTK* gen mutasyonuna sahip hasta verileri ve üç sağlıklı kontrol grubu ile yapılan akım sitometri değerlendirmesinde, hastaların BTK ekspresyonları düşük olduğu görülmüştür. İstatistiksel değerlendirme, vaka sayısının yetersiz olmasından dolayı yapılamamıştır.

### 4.3 Akt/mTOR Yolak Proteinleri Bakılan Hastaların Klinik ve Laboratuvar Özellikleri

Dört *PIK3CD* ve iki *PIK3RI* gen mutasyonu olan hasta ve iki sağlıklı kontrolden bakılan fosfo S6 (p-S6), fosfo akt (p-Akt) ve fosfo mTOR (p-mTOR) protein ekspresyonları analiz edilmiştir. Hastaların klinik ve laboratuvar bilgileri aşağıda verilmiştir (Bakınız tablo 4.6).

**Tablo 4.6.** Akt/mTOR yolak proteinleri bakılan hastalarının cinsiyet, yaş ve klinik belirtileri.

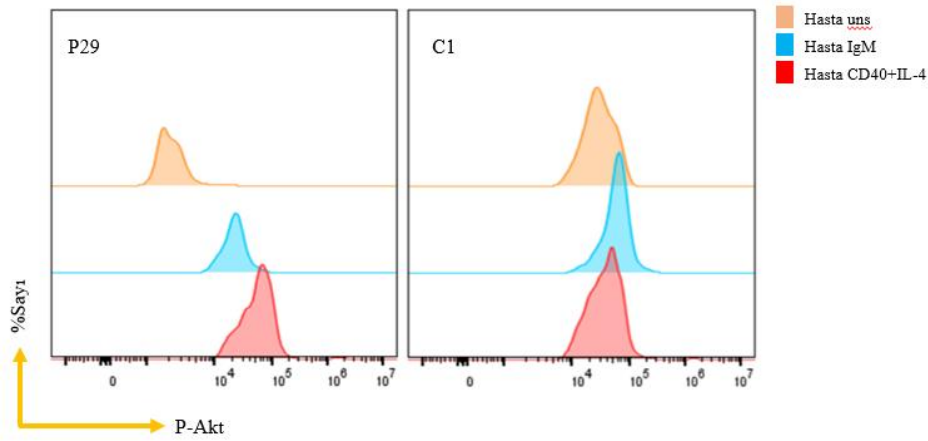
Hasta Adı	Cinsiyet	Yaşı (yıl)	Klinik Belirtiler
P26 (De.Ec.Se.)	K	6	Karın ağrısı, ishal, ateş, kusma, anal apse
P27 (Öm.Sü.Od.)	E	8	Pnömoni
P28 (Mu.Ka.Öz.)	E	25	-
P29 (Gi.Ün.)	K	26	-
P30 (Ay.Se)	K	38	Ateş, öksürük, nefes daralması, karın ağrısı, kusma, ishal, halsizlik, yorgunluk, aft, pnömoni, ÜSYE

**Tablo 4.7.** Akt/mTOR yolak analizi bakılan hastaların Ig ve lenfosit alt grup değerleri.

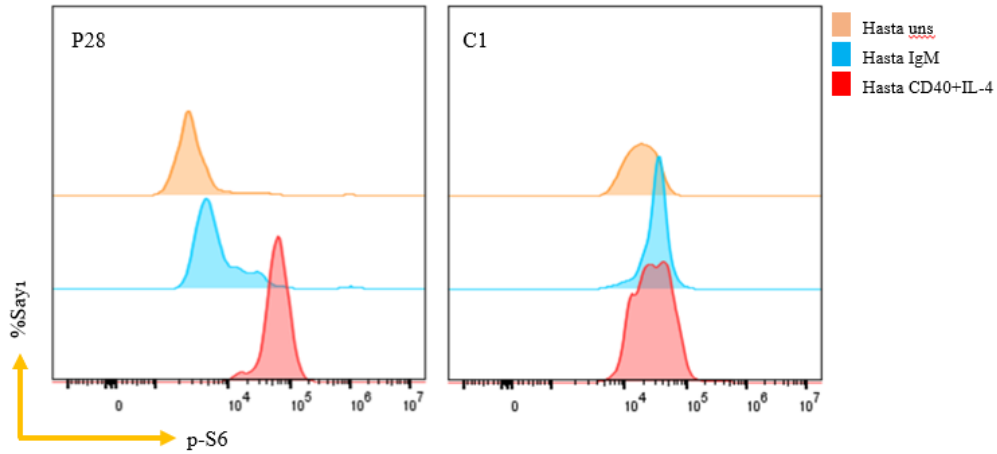
Hasta Adı	IgA	IgG	IgM	IgE	CD3+	CD4+	CD8+	CD19	CD16+56 (NK)
P26 (De.Ec.Se.)	<6,67 (25-160)	606 (598-2250)	5,29 (46-304)	<1(1,31-165)	85 (56-75)	50 (28-47)	30 (18-35)	0 (14-33)	13 (4-17)
P27 (Öm.Sü.Od.)	80,8 (70-303)	943 (764-2134)	326 (46-304)	7,89 (1,31-165)	62 (60-76)	33 (31-47)	26 (18-35)	3 (13-27)	31 (4-17)
P28 (Mu.Ka.Öz.)	<6,67 (139-378)	694(913-1884)	<4,17 (88-322)	<1 (1,31-165)	68 (56-84)	27 (31-52)	39 (18-35)	5 (6-23)	25 (3-22)
P29 (Gi.Ün.)	<6,67(139-378)	1040 (913-1884)	7,54 (88-322)	<1 (1,31-165)	88 (56-84)	28(31-52)	57 (18-35)	8 (6-23)	3 (3-22)
P30 (Ay.Se)	132 (139-378)	1250 (913-1884)	51,3 (88-322)	54,2 (1,31-165)	82 (56-84)	54 (31-52)	26 (18-35)	10 (6-23)	6 (3-22)

Referans aralığı dışındaki veriler koyu renk ile gösterilmiştir (50,51).

İki erkek ve üç kız hastadan oluşa hasta grubunun ortalama yaşı 20,6 yaşdır ( $\pm 13,4$  yıl). İki hasta ateş, kusma, karın ağrısı ve ishal şikayetleri ile bölümümüze başvurmuştur. Beş hastadan ikisinde herhangi bir klinik şikayet olmamış, iki hastada pnömoni şikayeti mevcuttur. Yapılan genetik testler sonucu üç hastada *PIK3CD*, iki hastada *PIK3RI* gen mutasyonu saptanmıştır. Yapılan laboratuvar testlerinde dört hastada IgA ve IgM değeri düşük, bir hastada IgM değeri yüksek olarak saptanmıştır. Lenfosit alt grubu analizi için yapılan testler sonucunda iki hastada CD16+56+ (NK) hücre oranı yüksek, üç hastada CD19+ B hücre oranı yaş aralıklarına göre düşük olarak bulunmuştur.



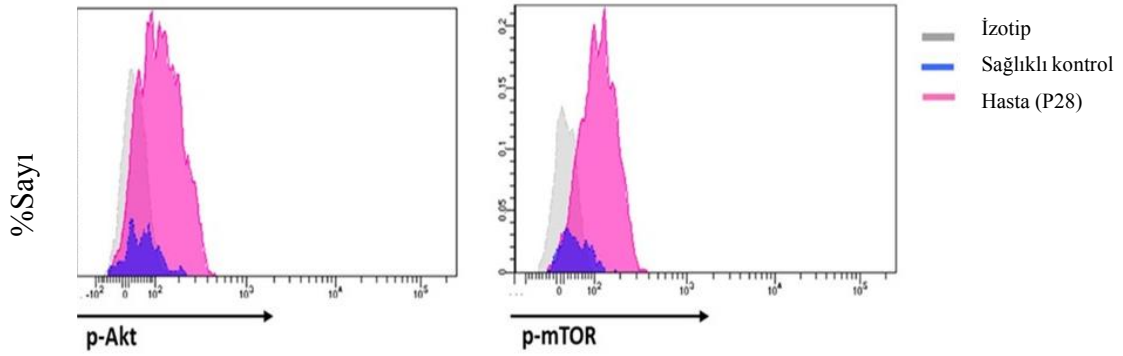
**Şekil 4.4.** B hücrelerde fosfo-Akt proteini bakılan hasta ve kontrol. (turuncu: uyarılmamış (unstimüle, uns); kırmızı: CD40 ve IL-4 ile uyarım; mavi: IgM ile uyarım; C: kontrol).



**Şekil 4. 5.** B hücrelerde fosfo S6 proteini bakılan hasta ve kontrol. (turuncu: uyarılmamış (unstimüle, uns); kırmızı: CD40, IL-4 ile uyarım; mavi: IgM ile uyarım; C: kontrol).

B hücrelerde uyarım sonrası Akt/mTOR yolağının alt yolunda yer alan fosfo akt ve fosfo S6 moleküllerine akım sitometri ile bakılmıştır. Sonuçlara göre, hastalar, kendi uyarılmamış (unstimüle) hücreleri ile karşılaştırıldığında, P26 hastasının IgM ile uyarım yapılan tüpündeki hücreler uyarılmamış (unstimüle) tüpündeki hücreler ile bezer fosforile akt ve S6 aktivitesi gösterdi. CD40+IL-4 uyarımı yapılan tüpteki hücreler ise uyarılmamış (unstimüle) tüpteki hücelere göre artmış fosforile akt ve S6 molekül aktivitesi gösterdi.

P27 hastasının IgM ve CD40+IL-4 ile uyarımı sonucunda uyarılmamış (unstimüle) tüpüne göre artmış fosforile akt ve S6 molekülü görüldü. P28 ve P29 hastalarının IgM ve CD40+IL-4 ile uyarımı unstimüle tüpü ile kıyaslandığında fosforile olan akt ve S6 moleküllerinin arttığı görülmektedir. P30 hastasının IgM ve CD40+IL-4 uyarımı kendi uyarılmamış (unstimüle) tüpü gibi görünmektedir. Hastanın bazal fosforile molekül miktarı fazladır.



**Şekil 4.6.** *PIK3CD* gen mutasyonu olan hastanın (P28) Akt/mTOR yolağı akım sitometri analizi (gri: izotip kontrol; mavi: sağlıklı kontrol; pembe: hasta).

P28 hastasında akt ve mTOR molekülleri sağlıklı kontrole kıyasla uyarılma sonrası daha fazla fosforilasyona uğramıştır.

#### 4.4 Proliferasyon Analizi Bakılan Hastaların Klinik ve Laboratuvar Özellikleri

Bir hastada tanıda kombine immün yetmezlik düşünüldüğü için proliferasyon yanıtına bakıldı. Bu hastada düşük bulundu (Bakınız şekil 4.7 a) ve yapılan genetik analiz sonucunda *PIK3RI* geninde homozigot mutasyona rastlandı.

mTOR yolağında bozukluk saptanan hastada proliferasyon düşüklüğü bulunması nedeniyle aynı yolakta bozukluk olan hastaların değerlendirilmesi amacıyla dört *PIK3CD* ve bir *PIK3RI* gen mutasyonu olan hasta ve iki sağlıklı kontrolde hücre proliferasyonu analiz edilmiştir. Hastaların klinik ve laboratuvar bilgileri aşağıda verilmiştir (Bakınız tablo 4.8).

**Tablo 4.8.** Proliferasyon analizi bakılan hastalarının cinsiyet, yaş ve klinik belirtileri.

<b>Hasta Adı</b>	<b>Cinsiyet</b>	<b>Yaşı (yıl)</b>	<b>Klinik Belirtiler</b>
P26 (De.Ec.Se.)	K	6	Karın ağrısı, ishal, ateş, kusma, anal apse
P27 (Öm.Sü.Od.)	E	8	Pnömoni
P29 (Gi.Ün.)	K	26	-
P30 (Ay.Se)	K	38	Ateş, öksürük, nefes daralması, karın ağrısı, kusma, ishal, halsizlik, yorgunluk, aft, pnömoni, ÜS YE
P31 (Du.El.Ca)	K	4 ay	Sık enfeksiyon geçirme, cilt dökütüsü, bcg aşısı yerinde kabarıklık, tekrarlayan pnömoni, idrar yolu enfeksiyonu

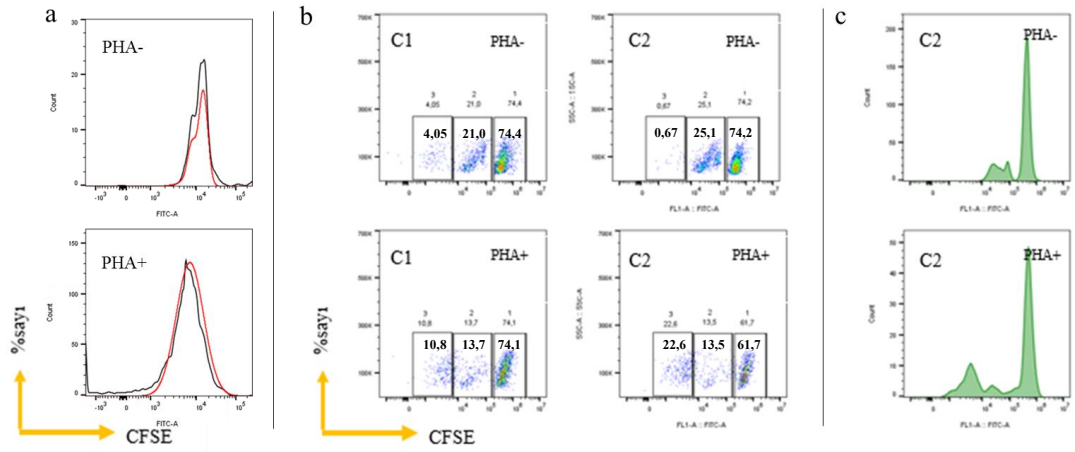
**Tablo 4.9.** Proliferasyon bakılan hastaların Ig ve lenfosit alt grup verileri.

Hasta Adı	IgA	IgG	IgM	IgE	CD3+	CD4+	CD8+	CD19	CD16+56 (NK)
P26 (De.Ec.Se.)	< <b>6,67 (25-160)</b>	606 (598-2250)	<b>5,29 (46-304)</b>	< <b>1(1,31-165)</b>	<b>85 (56-75)</b>	<b>50 (28-47)</b>	30 (18-35)	<b>0 (14-33)</b>	13 (4-17)
P27 (Öm.Sü.Od.)	80,8 (70-303)	943 (764-2134)	<b>326 (46-304)</b>	7,89 (1,31-165)	62 (60-76)	33 (31-47)	26 (18-35)	<b>3 (13-27)</b>	<b>31 (4-17)</b>
P29 (Gi.Ün.)	< <b>6,67(139-378)</b>	1040 (913-1884)	<b>7,54 (88-322)</b>	< <b>1 (1,31-165)</b>	<b>88 (56-84)</b>	<b>28(31-52)</b>	<b>57 (18-35)</b>	8 (6-23)	3 (3-22)
P30 (Ay.Se)	<b>132 (139-378)</b>	1250 (913-1884)	<b>51,3 (88-322)</b>	54,2 (1,31-165)	82 (56-84)	<b>54 (31-52)</b>	26 (18-35)	10 (6-23)	6 (3-22)
P31 (Du. El. Ca.)	43,5 (17-69)	<b>2860 (463-1006)</b>	<b>12,8 (46-159)</b>	< <b>1 (1,31-165)</b>	52,5 (49-76)	<b>5 (31-56)</b>	<b>50 (12-24)</b>	<b>2 (14-37)</b>	<b>22 (3-15)</b>

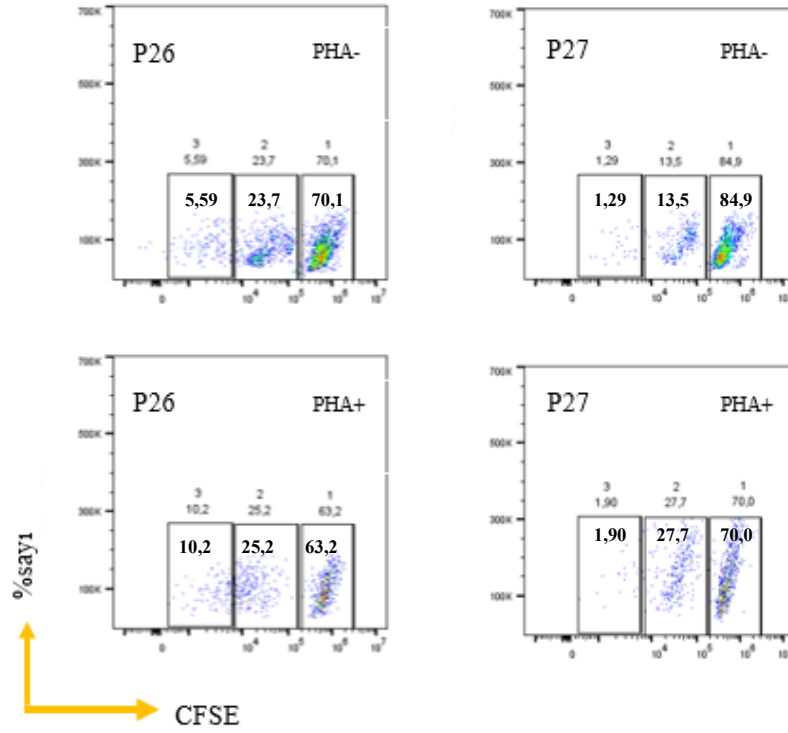
Referans değerleri dışında kalan veriler koyu renk ile gösterilmiştir (50,51).



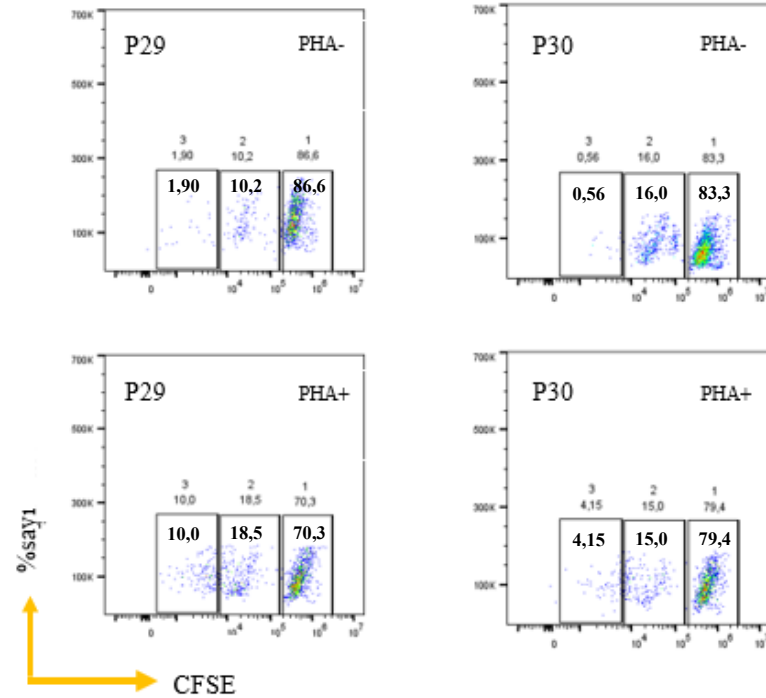
Dört kız ve bir erkek hastadan oluşan hasta grubunda hastaların ortalama yaşı 15,65 yaşdır ( $\pm 15.76$  yıl). İki hasta ateş, kusma, öksürük ve ishal şikayetleri ile bölümümüze başvurmuştur. Beş hastadan birinde herhangi bir klinik şikayet olmamış, üç hastada pnömoni şikayeti mevcuttur. Yapılan genetik testler sonucunda üç hastada *PIK3CD*, iki hastada *PIK3RI* gen mutasyonu saptanmıştır. Yapılan laboratuvar testlerinde üç hastada IgA, dört hastada IgM değeri düşük, bir hastada IgM değeri yüksek olarak saptanmıştır. Lenfosit alt grubu analizi için yapılan testler sonucunda iki hastada CD3+ T hücre ve CD4+ T hücre oranı yüksek, üç hastada CD19+ B hücre oranı düşük olarak bulunmuştur.



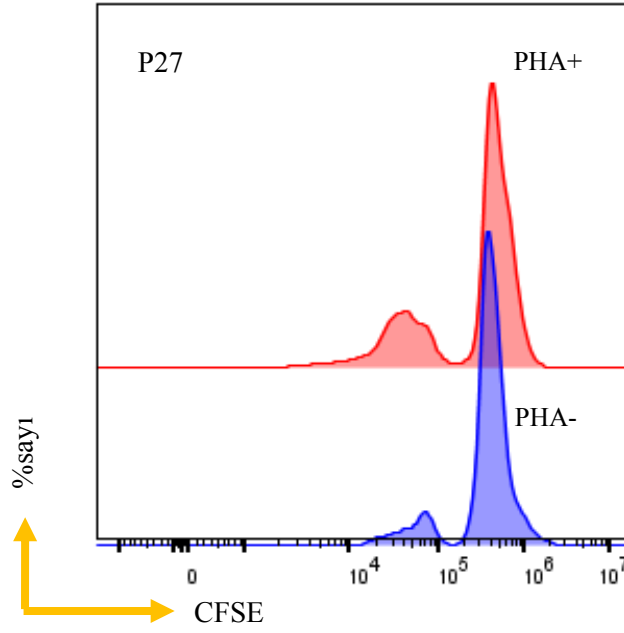
**Şekil 4.7.** P31, kontrol 1 ve kontrol 2'ye ait proliferasyon görüntüleri (a) P31 hastası histogram görüntüsü, b) kontrol 1, kontrol 2 dot plot görüntü; c) Kontrol 2 histogram görüntüsü, (PHA-: uyarılmamış (unstimüle); PHA+: uyarılmış (stimüle); C: kontrol).



**Şekil 4.8.** P26 ve P27 hastalarına ait proliferasyon görüntüsü (PHA-: uyarılmamış (unstimüle); PHA+: uyarılmış (stimüle)).

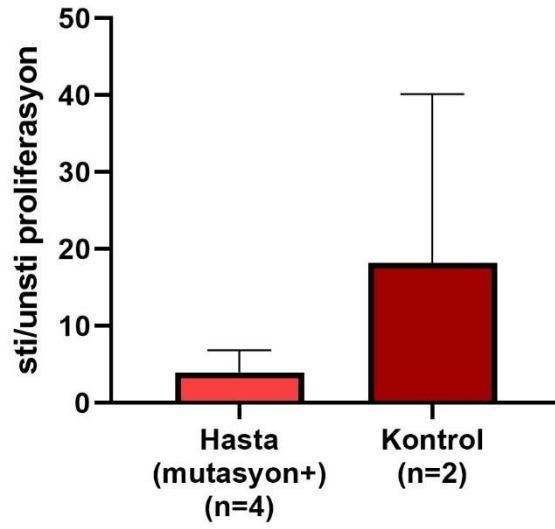


**Şekil 4.9.** P29 ve P30 hastalarına ait proliferasyon görüntüsü (PHA-: uyarılmamış (unstimüle); PHA+: uyarılmış (stimüle)).



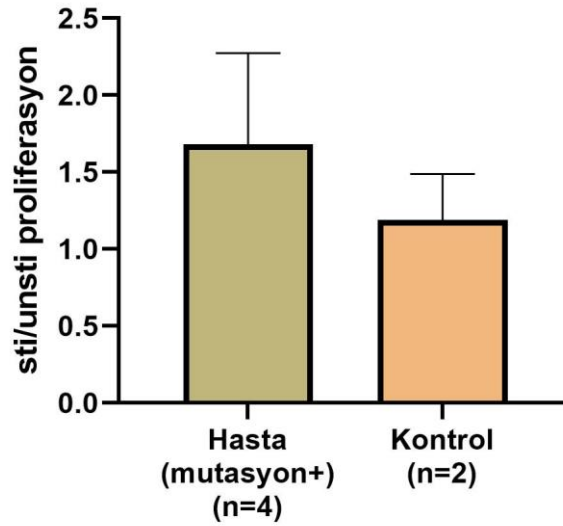
**Şekil 4.10.** P27 hastasının çakıştırmalı proliferasyon görüntüsü (kırmızı: uyalmış (stimüle); mavi: uyarılmamış (unstimüle)).

Hasta ve kontrollerden alınan kan örneklerinden elde edilen periferik kan mononükleer hücrelerin PHA ile uyarılması sonucu uyarılmamış ve uyarılmış tüplerde inkübasyon süresi boyunca üç farklı popülasyon mevcuttur (Şekil 4.7, 4.8 ve 4.9). Bu da 3 tur bölünme gerçekleştiği anlamına gelmektedir. Hasta ve kontrol örnekleri kendi içlerinde uyarımlı-uyarımsız karşılaştırmasında P27 hastasına ait örnek haricinde geri kalan tüm örneklerde 3. tur bölünmede artış olduğu, 2. popülasyondan 3. popülasyona geçişin varlığı gözlemlenmektedir. P27 hastasına ait deney sonuçlarında hücreler inkübasyon süresi boyunca 1. turdan 2. tur proliferasyona geçiş meydana gelmiş ama hücreler 3. tur bölünmeyi gerçekleştirememiştir.



**Şekil 4.11.** Hasta ve kontrol örneklerinin 3. popülasyonlarına ait hücre yüzdelerinin uyarılmış/uyarılmamış (sti/uns) oranı ile yapılan analiz grafiği.

İstatistiksel değerlendirme, vaka sayısının yetersiz olmasından dolayı yapılamamıştır.



**Şekil 4.12.** Hasta ve kontrol örneklerinin 2. ve 3. popülasyonlarına ait hücre yüzdelerinin toplanması ile elde edilen uyarılmış/uyarılmamış (sti/uns) oranı ile yapılan analiz grafiği.

İstatistiksel değerlendirme, vaka sayısının yetersizliğinden dolayı yapılamamıştır.

#### **4.5 LRBA-CTLA-4 Ekspresyonu Bakılan Hastaların Klinik ve Laboratuvar Özellikleri**

İki *LRBA* gen mutasyonu olan ve otoimmünite ve inflamasyon bulunması nedeni ile yedi LRBA, dört CTLA-4 klinik ve laboratuvar şüphesi bulunan toplam dokuz hasta ve yedi sağlıklı kontrolden bakılan LRBA/CTLA-4 protein ekspresyonu akım sitometri yöntemi ile analiz edilmiştir. Hastaların klinik ve laboratuvar bilgileri aşağıda verilmiştir (Bakınız tablo 4.10).

**Tablo 4.10.** LRBA-CTLA-4 ekspresyonu bakılan hastalarının cinsiyet, yaş ve klinik belirtileri.

Hasta Adı	Cinsiyet	Yaşı (yıl)	Klinik Belirtiler
P15 (Em.Öz.)	E	18	Kızarıklık, halsizlik, ateş, <i>Herpes simplex</i> enfeksiyonu, ÜS YE, ağız içi aft
P16 (Sı.Öz.)	K	20	Baş ağrısı, ateş, eklem ağrısı, döküntü, yorgunluk, karın ve omuz ağrısı, ishal, çarpıntı
P17 (Se.Ka.)	K	7	Hepatosplenomegali, atipik yüz, karın şişliği, ishal, kusma, akciğer pnömoni, İYE
P18 (Be.Su.Ya.)	K	11	Ağız içi yaralar, ÜS YE,
P19 (Ay.Ak.)	K	16	Pnömoni, otit, burun akıntısı, öksürük, sık boğaz ve kulak enfeksiyonu, kilo kaybı
P20 (Çı.Se.)	E	2	İshal, döküntü, iştahsızlık, kilo kaybı, allerji, kusma
P21 (Gü.Ze.)	K	5	Döküntü, bacak ağrısı, tekrarlayan trombositopeni, ÜS YE
P22 (Öz.Co.)	K	15	Allerji, bulantı
P23 (Ah.Sa.)	E	16	Sağ ac lobektomi öyküsü, pnömoni, ÜS YE, ishal, öksürük

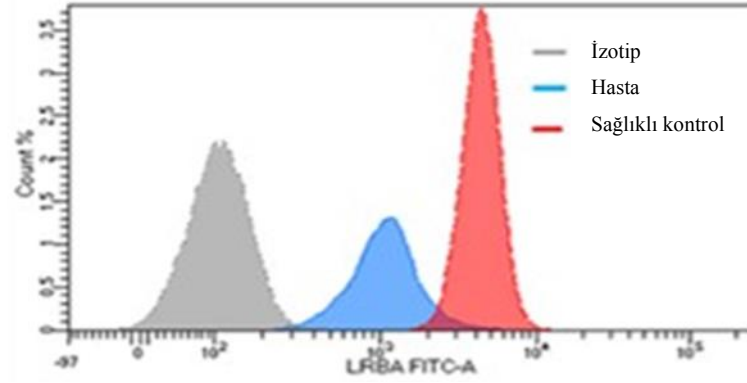
\*ac: akciğer

**Tablo 4.11.** LRBA/CTLA-4 ekspresyonu bakılan hastaların Ig, lenfosit alt grup ve double negatif T hücre değerleri.

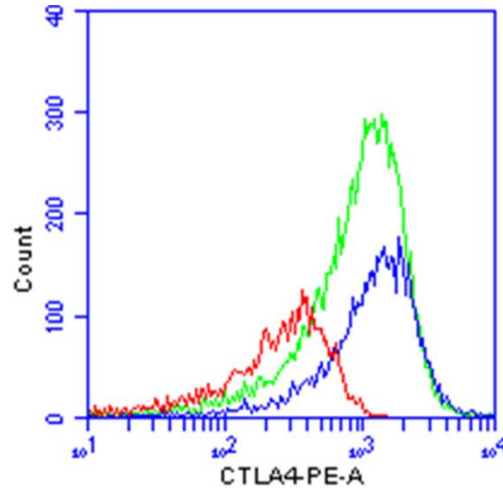
Hasta Adı	IgA (mg/dL)	IgG (mg/dL)	IgM (mg/dL)	IgE (UI/mL)	CD3+ (%)	CD4+ (%)	CD8+ (%)	CD19+ (%)	CD16+56 (NK) (%)	Double negatif (DN) T hücre (%)
P15 (Em.Öz.)	262 (139-378)	1600 (913-1884)	<b>60,6 (88-322)</b>	<b>1855 (1,31-165)</b>	70 (56-84)	39 (31-52)	<b>45(18-35)</b>	9 (6-23)	16 (3-22)	4
P16 (Si.Öz.)	105 (139-378)	1350 (913-1884)	250 (88-322)	<b>557 (1,31-165)</b>	<b>89 (56-84)</b>	51 (31-52)	<b>36 (18-35)</b>	7 (6-23)	3 (3-22)	-
P17 (Se.Ka.)	65,8	1070 (764-2134)	<b>76,5 (78-261)</b>	5,94 (1,31-165)	<b>83 (56-75)</b>	36 (28-47)	<b>42 (16-30)</b>	<b>9 (14-33)</b>	7 (4-17)	8
P18 (Be.Su.Ya.)	<b>&lt;6,67 (45-250)</b>	1200 (835-2094)	211 (47-484)	5,91 (1,31-165)	75 (60-76)	41 (31-47)	31 (18-35)	20 (13-27)	5 (4-17)	2
P19 (Ay.Ak.)	<b>17,5 (82-453)</b>	991 (913-1884)	<b>36,6 (46-304)</b>	24 (1,31-165)	56 (56-84)	33 (31-52)	22 (18-35)	<b>29(6-23)</b>	10 (3-22)	2
P20 (Çi.Se.)	<b>687 (15-90)</b>	<b>1290 (290-1070)</b>	106 (66-228)	36,4 (1,31-165)	59 (49-76)	53 (31-56)	14 (12-24)	<b>39 (14-37)</b>	<b>2 (3-15)</b>	-
P21 (Gü.Ze.)	142 (57-282)	<b>1380 (420-1200)</b>	216 (78-261)	8,83 (1,31-165)	<b>76 (56-75)</b>	40 (28-47)	30 (16-30)	<b>12 (14-33)</b>	9 (4-17)	3
P22 (Öz.Co.)	142 (100-447)	878 (876-2197)	<b>10,5 (75-448)</b>	<b>&lt;1 (1,31-165)</b>	80 (56-84)	<b>20 (31-52)</b>	<b>58 (18-35)</b>	15 (6-23)	4 (3-22)	3
P23 (Ah.Sa.)	<b>&lt;6,67 (45-250)</b>	696 (913-1884)	<b>19,7 (46-304)</b>	<b>&lt;1 (1,31-165)</b>	71 (56-84)	22 (31-52)	<b>48 (18-35)</b>	14 (6-23)	12 (3-22)	23

Referans aralığı dışındaki veriler koyu renk ile gösterilmiştir(51) (50).

Altı kız, üç erkek olan hastaların ortalama yaşı 12,2 yaştır ( $\pm 6$  yıl). Dokuz hastanın dördü üst solunum yolu enfeksiyonu ve ishal şikayeti ile başvurmuşlardır. Yapılan laboratuvar analizleri sonucu, dokuz hastanın beşinde IgM değeri düşük bulunmuştur. Lenfosit alt grup analizlerinde beş hastada CD8+ T hücre oranı ve üç hastada CD3+ T hücre oranı yüksek olarak saptanmıştır.

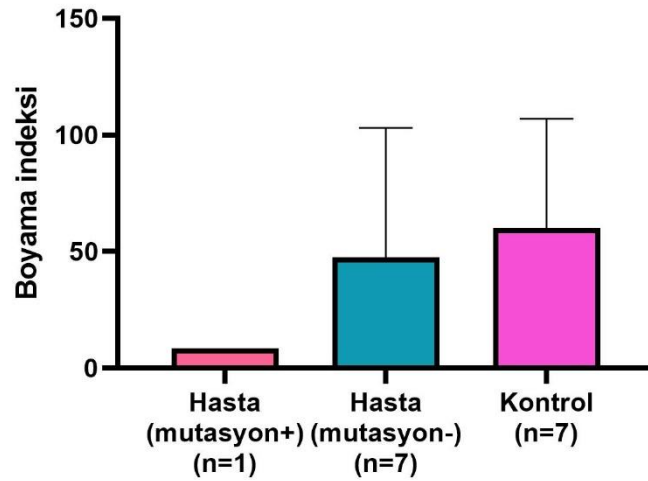


**Şekil 4.13.** LRBA ekspresyonu düşük çıkan hastaya ait akım sitometri görüntüsü. (gri:izotip kontrol; kırmızı: sağlıklı kontrol; mavi: hasta).



**Şekil 4.14.** CTLA-4 ekspresyonu normal çıkan hastaya ait akım sitometri görüntüsü. (kırmızı:izotip kontrol; mavi: sağlıklı kontrol; yeşil: hasta).

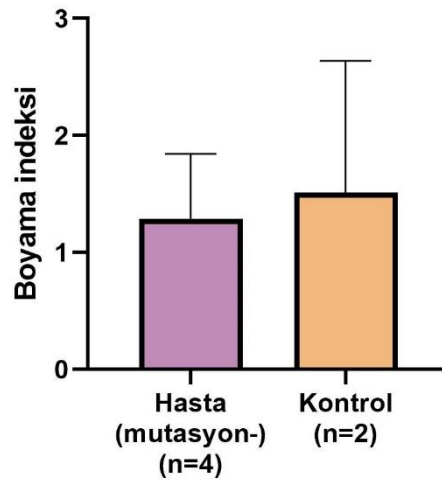




**Şekil 4.15.** Mutasyona sahip hasta, mutasyon şüphesi olan hasta ve kontrol grubundan bakılan LRBA ekspresyonu grafiği.

Mutasyona sahip bir hastada LRBA proteini kontrol grubuna kıyasla medyan değeri yaklaşık olarak dört kat düşük bulunmuştur. İstatistiksel değerlendirme, vaka sayısının yetersiz olmasından dolayı yapılamamıştır.

LRBA mutasyonu olan bir hastada LRBA protein ekspresyonu kemik iliği nakli sonrası bakıldığı için hastaya ait veriler grafiğinde yer almamıştır. Bu hastaya ait protein ekspresyonu nakil sonrasında kontrol grubuna benzerdir.



**Şekil 4.16.** Mutasyon şüphesi olan hasta ve kontrol grubundan bakılan CTLA-4 ekspresyonu grafiği.

CTLA-4 şüphesi olan dört hastadan bakılan protein ekspresyonu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında benzer boyama indeksi değerlerine sahiptir. Vaka sayısı yetersizliğinden dolayı istatistiksel analiz yapılamamıştır.



**Tablo 4.12 (Devamı).** Hastaların genetik test sonuçları.

Hasta Adı	<i>DOCK8</i>	<i>LRBA</i>	<i>CTLA-4</i>	<i>BTK</i>	<i>PIK3RI</i>	<i>PIK3CD</i>	Diğer
P16 (Sı.Öz.)	-	-	-	-	-	-	CARD14 15. ekzon c.211G>A (het) NLRP12 3. ekzon c.629C>T (het)
P17 (Se.Ka.)	-	c.3811C>T p.R1271*	-	-	-	-	
P18 (Be.Su.Ya.)	-	-	-	-	-	-	DSC2 exon 1 (het)
P19 (Ay.Ak.)	-	-	-	-	-	-	
P20 (Çı.Se.)	-	-	-	-	-	-	FOXP3 c.-23+5G>A
P21 (Gü.Ze.)	-	-	-	-	-	-	
P22 (Öz.Co.)	-	-	-	-	-	-	ADA c.1143A>T p. 381S (hom)
P23 (Ah.Sa.)	-	c.3811C>T p.R1271*	-	-	-	-	-
P24 (Yi.Ya.)	-	-	-	c.1603G>T, p.Val535Phe (hemizigot)	-	-	-
P25 (Em.As.Va.)	-	-	-	c.86c>T, p.R288W	-	-	-
P26 (De.Ec.Se.)	-	-	-	-	c.837-1G>A (hom)	-	-
P27 (Öm.Sü.Od.)	-	-	-	-	-	c.1574A>G p.Glu525Gly	-
P28 (Mu.Ka.Öz.)	-	-	-	-	c.712C>T p.Leu238Phe (het)	-	-
P29 (Gi.Ün.)	-	-	-	-	-	c.2705G>A p.Arg902Gln	-
P30 (Ay.Se)	-	-	-	-	-	c.2705G>A p.Arg902Gln	-
P31 (Du.El.Ca)	-	-	-	-	c.716C>T p. Thr239Met (hom)	-	-

## 5. TARTIŞMA

Primer immün yetmezlikler, immün hücre ve bileşenlerinin üretiminde görev alan çeşitli genlerde meydana gelen mutasyonlardan kaynaklanan çoklu hastalık grubudur. Hastalığın teşhisi için klinik belirtilerin yanı sıra, laboratuvar bulguları da gerekmektedir. Tam kan sayımı, Ig serolojik testleri, aşı titreleri ve kanda kompleman seviyeleri hastalık şüphesi hakkında bilgi verirken kesin tanı için yeterli bilgi sağlamamaktadır. Kesin tanının sağlanması için yeni nesil dizileme teknikleri ve moleküler analiz yöntemleri kullanılmaktadır. Yeni nesil dizileme yönteminin pahalı olması, uzun sürmesi ve her merkezde bulunmaması hastalık teşhis ve tedavisinde gecikmelere neden olmaktadır. Akım sitometrinin yeni nesil dizileme yöntemine göre kolay, ucuz ve ulaşılabilir olması, bazı PİY gruplarında erken tanının sağlanmasında yardımcı olduğu yapılan pek çok çalışmada gösterilmiştir (41,44). Akım sitometri yöntemi ile doğal öldürücü hücre sitotoksitesisi, hücre içi sitokin üretimi, hücre içi sinyal yolları ve hücre yüzey ve içi protein üretimi gibi alanlarda veri elde edilmektedir (52).

Bu tez çalışmasında, PİY hastalığına sebep olacak bir mutasyona sahip olan hastalarda patojeniteyi belirlemek için klinik ve laboratuvar incelemelerinde spesifik molekülü işaret eden PİY şüphesi duyulan hastalarda ise genetik testten önce akım sitometri ile tanı konulabilmesi için akım sitometri yönteminden yararlanılmıştır. Yapılan akım sitometri analizlerinde mutasyona sahip hasta grubunda sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ciddi azalmış bir protein miktarı mevcut iken, hastalık şüphesi olan hastalarda azalmış, artmış ve normal ifadeler görülmektedir.

DOCK8 mutasyonuna sahip hasta grubunda hücre içi DOCK8 molekül miktarı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hasta grubunda molekül ekspresyonunun daha az olduğu istatistiksel olarak saptanmıştır ( $p < 0,05$ ). Klinikte DOCK8 eksikliği ile benzer fenotipte olan ve immünolojik sonuçlarında yüksek IgE değerine sahip olan hastalarda *DOCK8* gen mutasyonu olabileceği düşünülmüş ve hastalar genetik analizden önce akım sitometri yöntemi ile çalışılmıştır. Bakılan hastalar içerisinde DOCK8 ekspresyonu düşük olan hastaların olmasına rağmen, popülasyondaki molekül ekspresyonunda farklı ifade düzeylerinden dolayı istatistiksel bir anlamlılık saptanamamıştır. Mısır merkezli yapılan bir çalışmada incelenen DOCK8 eksikliği şüphesi olan hastalarda protein ekspresyonu akım sitometri yöntemi ile bakılmış ve bu

hastalarda protein ekspresyonunun düşük olduğu saptanmıştır. Bu hastalara sonradan yapılan genetik analizde *DOCK8* gen mutasyonuna sahip oldukları anlaşılmış ve akım sitometrinin *DOCK8* eksikliği şüphesi olan hastalarda erken tanı ve tedavi için kullanılabilir bir yöntem olduğu vurgulanmıştır (41). Mısır merkezli yapılan diğer bir çalışmada, 15 *DOCK8* eksikliği şüphesi olan hasta incelenmiş ve bu hastalara tanı akım sitometri yöntemi ile koyulmuştur. Aynı makalede *DOCK8* eksikliğinin, otozomal baskın HIES'e benzer klinik belirtiler göstermesinden dolayı genetik analize erişimin olmadığı yerlerde akım sitometrinin tanı koymada yeterli olduğu savunulmuştur (12). Sadece genetik analiz erişimi olmayan ülkelerde değil, daha hızlı sonuç vermesi nedeniyle genetik analiz erişimi mümkün iken de yardımcı olabilmektedir. *DOCK8* mutasyon varlığı olan yedi hastanın yedisinde de *DOCK8* ekspresyonu düşük bulunmuş ve akım sitometrinin *DOCK8* tanısında %100 oranında tanıya yardımcı olduğu görülmüştür.

*DOCK8* gen mutasyonuna sahip bir hastamıza (P4) 2017 yılında kemik iliği nakli yapılmış, nakilden birkaç yıl sonra *DOCK8* ekspresyonu akım sitometri yöntemi ile analiz edilmiştir. Nakil sonrası analizlerinde hala düşük *DOCK8* ekspresyonu olan hastanın kimerizm sonuçlarına bakıldığında, düşük bulunmuştur (%37). *DOCK8* protein ekspresyon düşüklüğü ve kimerizm değeri arasında pozitif bir korelasyon mevcut olduğu görülmektedir.

*BTK* gen mutasyonuna sahip iki hastada yapılan akım sitometri değerlendirmesi ile hastalarda protein ekspresyonunun kontrol grubu ile karşılaştırıldığında düşük olduğu saptanmış, fakat hasta sayısının yetersiz olmasından dolayı istatistiksel analiz yapılamamıştır. Literatürde, istatistiksel değerlendirmenin yapılmadığı 106 hipogamaglobulinemisi olan hastalarda genetik testten önce *BTK* ekspresyonuna akım sitometri ile bakılan 91 ailenin 78'inde protein ekspresyonunun olmadığı ve sonradan yapılan genetik analizlerde 76 ailede *BTK* gen mutasyonu saptandığı bildirilmiştir. Akım sitometrinin, *BTK* eksikliğinde tanı için güvenilir bir araç olduğu vurgulanmıştır (46).

Kombine immün yetmezlik düşünülen ve lenfosit proliferasyon testi düşük bulunan bir hastada (P31) *PIK3R1* geninde homozigot mutasyon saptandı. Hastanın kaybedilmesi nedeniyle mTOR yolak analizi yapılamasa da proliferasyon yanıtı düşük bulundu. Hastada fonksiyon kaybı ile giden bir mutasyon mevcut olabileceği

düşünüldü. Bu durum daha önce literatürde rapor edilmediği için orijinal bir bulgu olabilir. Bazen de hastalarda ağır enfeksiyon ve immün disregülasyon durumunda lenfosit proliferasyon yanıtında düşüklük görülebilir (klinik tecrübe (DÇA)). Bu nedenle, bu hastalıkta düşük lenfosit proliferasyon olduğunu bir hastadaki değerlendirme sonucuna dayanarak söylemek mümkün değildir. Bu gende (*PIK3RI*) homozigot mutasyon bulunan hastalarda ileride bu açıdan değerlendirme yapılması planlandı. Ayrıca aynı yolakta bozukluk olan birkaç hastaya da lenfosit proliferasyon testi yapılması planlandı. Dört *PIK3CD* ve iki *PIK3RI* gen mutasyonuna sahip altı hastada yapılan akt/mTOR yolak analizinde dört hastada *PIK3CD* fonksiyon kazanım mutasyonu, iki hastada *PIK3RI* fonksiyon kaybı mutasyonu olduğu saptanmıştır. Yolak analizi, hastalığın patojenesini anlamada önemli bir veri sağlamıştır. Fonksiyon kazanım mutasyonu olan hastaların uyarılmamış (unstimüle) tüplerindeki hücrelerin uyarımdan sonra fosforile molekül oranı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında daha fazla artış göstermiştir. Fonksiyon kaybı olan hastalarda ise fosforile molekül oranı kontrolden daha düşüktür. P27 hastası fonksiyon kazanım mutasyonuna sahiptir. Buna rağmen bazal fosforile molekül miktarı ile karşılaştırıldığında uyarım sonrası fosforile olan molekül miktarındaki artış azdır. Bunun sebebi mutasyonun özelliğinden veya değerlendirmenin B hücrelerde yapılması nedeniyle düşük B hücre oranından kaynaklanıyor olabilir. P28 hastasının mutasyonu düzenleyici alt birimde bulunmasından dolayı hastanın uyarılara yanıtı, fonksiyon kazanım hastaları ile benzerdir.

Yine akt/mTOR yolağı etkilenen hastalarda bakılan hücre proliferasyonunda, hastalara ait hücreler (P28 hariç) kontrole benzer çoğalma sağlamıştır. Hücreler PHA ile uyarılmıştır. PHA, hücre yüzeyindeki glikoproteinlere bağlanarak  $Ca^{+2}$  bağımlı yolağı uyararak *nuclear factor of activated T cells* (NFAT) transkripsiyon faktörünü aktifleştirerek hücre bölünmesini teşvik eder (53). Akt/mTOR yolağının aktifleşmesi ile *glycogen synthase kinase 3 $\beta$*  (GSK-3 $\beta$ ) inaktifleşerek NFAT yolağı aktifleştirilir (54). Bu yolakta mutasyona sahip hastalarda hücre proliferasyonu çalışıldığında. fonksiyon kazanımı olan hastalarda hücre proliferasyonu artmış olarak gözlemlenmiştir.

LRBA ve CTLA-4 ekspresyonu bakılan hastalardan, mutasyona sahip hastaların LRBA ekspresyonu düşük iken, mutasyon şüphesi olan LRBA ve CTLA-4

hastalarında ekspresyon, sağlıklı kontrol grubu ile benzerdi. Her iki grupta da hasta sayısının yetersizliğinden dolayı istatistiksel analiz yapılamamıştır.

Kwon ve arkadaşlarının (43) yaptığı ve 57 LRBA eksikliği şüphesi olan hastaların tanısında akım sitometrinin %94 sensitivite sağladığı kaydedilmiştir. Mısır merkezli yapılan çalışmada ise, 99 immüendisregülasyon şüphesi olan hastanın yirmi yedisinin akım sitometri ile tanı aldığı belirtilmiştir (41,42). Bizde de *LRBA* mutasyon varlığı olan 1 hastada LRBA ekspresyonu düşük bulunmuştur.

LRBA eksikliği nedeni ile nakil yapılan bir hastamızda (P23), nakil sonrası bakılan LRBA ekspresyonu, sağlıklı kontrol ile benzerdir. Bu hastanın testin yapıldığı tarihteki kimerizm değeri %95'tir. Hastanın nakil sonrası protein ekspresyonu ile kimerizm sonucu pozitif korelasyon göstermiştir.

Moleküler analizler ile azalmış protein ekspresyonu gösterilse bile büyük delesyonlar ve gen eklenmesi veya çıkarılmasından kaynaklanan mutasyonlar, yeni nesil dizileme analizlerinde yanlış filtreleme yüzünden tanımlanamamaktadır (55). Bu nedenle genetik testin yanında hastalığın patojenitesini anlamak için fonksiyonel testlerin yapılması hastalık tanı ve tedavisinde önem arz etmektedir. Sevil Oskay Halaçlı tarafından yapılan bir meta analiz sonucuna göre protein ekspresyon seviyesinin ve etkilenen protein-hastalık şiddeti arasında ilişki olduğunu ortaya koymuştur (55).

Yapılan bazı çalışmalar, akım sitometrinin, immün hücre gruplarının ve alt gruplarının, fonksiyonlarının ve hücre içi protein ekspresyon seviyelerinin belirlenmesinde, değerlendirilmesinde, hastalıkların sınıflandırılmasında ve tanı koymayı arttırmada, yeni nesil dizileme tekniklerine kıyasla daha hesaplı, daha hızlı, klinik karara yardımcı olan ve kolay bir araç olduğu belirtilmiştir (43), (45).

Dört DOCK8 eksikliği ve üç LRBA eksikliği hastasının nakil öncesi protein ekspresyonlarının düşük olduğu saptanmıştır. Daha sonra bu hastalara kemik iliği nakli yapılmıştır. Nakilden sonra değerlendirme yapıp nakil öncesi ile karşılaştırılmalı olarak değerlendirilmesi planlanmıştır. Nakil öncesi ekspresyonun düşük olduğu bilinen hastalarda nakil sonrası yüksek çıkması engrafmanın yeterli olduğunu göstermektedir. Nakil sonrası yapılacak olan protein ekspresyonu analizi ile ekspresyon miktarının sağlıklı kontrol grubuna göre düşük oluşu kimerizm analizi yapılmadan önce nakil başarısı hakkında yorum yapmamıza olanak sağlayacaktır. Bu



nedenle akım sitometri yöntemi ile bakılan protein ekspresyonları nakil sonrası hastalarda engrafman açısından yol göstericidir.

Nakil yapılmış iki hastada DOCK8 ve LRBA ekspresyonu bakılmıştır ve sonuçlar hastaların kimerizm değerleri ile benzer değer taşıyan klinik sonuca götürdüğü dikkati çekmiştir. Bu iki hasta örneğinde olduğu gibi akım sitometri sonuçları ile kimerizm arasında pozitif bir korelasyon vardır. Akım sitometri yöntemi, protein ifade düzeyinin etkilendiği mutasyona sahip hastalarda nakilden sonra kimerizm testi yerine kullanılacak alternatif bir yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır.

Bu tez çalışmasında örneklem büyüklüğünün az olmasından dolayı mutasyona sahip hasta grubu ile kontrol grubu karşılaştırmasında istatistiksel analiz sonucu bir anlamlılık bulunmamıştır. Yedi hastanın kemik iliği naklini yakın zamanda olması ve/veya il dışında yaşamalarından dolayı nakil sonrası ekspresyon analizi bakılamamıştır. PİY şüphesi bulunan bazı hastaların genetik analiz sonuçlarının olmaması karşılaştırmayı zorlaştırmıştır. Bu durumlar, çalışmanın kısıtlılıklarıdır.

Akım sitometri ile protein ekspresyon analizinin farklı gen bozukluklarında daha yüksek oranda tanıya yardımcı olduğu görülmektedir. Buna rağmen, hızlı, pratik bir yöntem olarak klinik uygulamada erken tanıya yarar sağlamaktadır.

Ekspresyon testleri yanında yolak analizleri de yine erken tanıya genetik testlerden önce, buna ek olarak immünsüpresif tedavi planlamasında tedaviye yönelik fayda sağlamaktadır.

Genetik bozuklukların dizileme analizleri ile saptandığı fakat yeni tanımlanan varyantların varlığında varyantın patojenitesinin belirlenmesi yapılacak ileri moleküler analizlerle mümkündür. Bu tezde gerçekleştirilen çalışmalar bu analizlerde önemli yer alan çalışmalardır.

## 6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

1. Genetik teste erişim imkanı olmayan merkezlerin protein ifadesini etkileyen mutasyonlar için hastalığın tanı ve tedavisinde akım sitometri yöntemi kullanımı güvenilirdir.
2. *DOCK8* mutasyonuna sahip hastalarda protein ekspresyonu sağlıklı kontrol grubuna göre düşük olduğu tespit edilmiştir ( $p<0,05$ ). Yedi *DOCK8* gen mutasyonu olan hastanın yedisinde de düşük olarak saptanmıştır.
3. *LRBA* mutasyonuna sahip bir hasta protein ekspresyonu sağlıklı kontrol grubuna göre düşük olduğu tespit edilmiştir.
4. *BTK* mutasyonuna sahip hastalarda protein ekspresyonu sağlıklı kontrol grubuna göre düşük olduğu tespit edilmiştir. İki *BTK* mutasyonuna sahip hastanın ikisinde de düşük olarak saptanmıştır.
5. *PIK3CD* ve *PIK3RI* genlerinde mutasyonu olan hastaların akt/mTOR yolağı uyarımsız durumlarına göre fonksiyon kazanımı olan hastalarda p-akt ve p-S6 artmıştır.
6. *PIK3RI* geninde homozigot mutasyon saptanan hastada lenfosit proliferasyon yanıtı düşük iken *PIK3CD* ve *PIK3RI* genlerinde fonksiyon kazanımı olan hastalarda hücre proliferasyonunun, fonksiyon kaybı olan hastalara oranla üç kat daha fazla arttığı görülmüştür.
7. Protein düşüklüğü ile seyreden mutasyonlarda akım sitometri yöntemi ile protein varlığının ölçümü erken tanı yaklaşımını desteklemektedir.
8. Yolak analizleri, fonksiyon kaybı ve kazanımı ile ilişkili mutasyonun varlığının doğrulanmasında kullanılabileceği gibi inflamatuvar hastalıklarda tedavi planlamasında da fayda sağlayabilmektedir.
9. Nakil sonrası bakılan protein ekspresyonu nakil öncesi ile karşılaştırılarak engrafman ve naklin başarısı hakkında bilgi vermektedir.
10. Nakil sonrası bakılan protein ekspresyonu hastanın kimerizm değeri ile örtüşmektedir. Bu nedenle nakil sonrası bakılan protein ekspresyonu nakil öncesi ile karşılaştırılarak engrafman ve naklin başarısı hakkında bilgi verebilmektedir. Protein düşüklüğü olduğunu bildiğimiz gen bozukluğu olan hastalarda kemik iliği nakli sonrası protein artışının görülmesi kimerizm analizi ile benzer olması, klinik açıdan önemlidir. Protein ekspresyonunun

olmaması ise bu hastalarda kemik iliği reddini düşündürebilmekte, tekrar nakil ihtiyacını ortaya koymada kimerizm analizini destekleyici parametre olarak kullanılabilir.

11. Akım sitometri, hastalık tanı ve tedavisinde klinisyenlere hızlı bir yaklaşım sunmaktadır.

## 7. KAYNAKLAR

1. Sanal O, Tezcan I. Thirty years of primary immunodeficiencies in Turkey. *Ann N Y Acad Sci* [Internet]. 01 Kasım 2011 [a.yer 23 Mart 2023];1238(1):15-23. Erişim adresi: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1749-6632.2011.06242.x>
2. Meyts I, Bousfiha A, Duff C, Singh S, Lau YL, Condino-Neto A, vd. Primary Immunodeficiencies: A Decade of Progress and a Promising Future. *Front Immunol*. 18 Şubat 2021;11:3904.
3. Bousfiha A, Moundir A, Tangye SG, Picard C, Jeddane L, Al-Herz W, vd. The 2022 Update of IUIS Phenotypical Classification for Human Inborn Errors of Immunity. *J Clin Immunol* [Internet]. 01 Ekim 2022 [a.yer 08 Mart 2023];42(7):1508-20. Erişim adresi: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10875-022-01352-z>
4. Casanova JL, Conley ME, Seligman SJ, Abel L, Notarangelo LD. Guidelines for genetic studies in single patients: lessons from primary immunodeficiencies. *Journal of Experimental Medicine* [Internet]. 20 Ekim 2014 [a.yer 23 Mart 2023];211(11):2137-49. Erişim adresi: [www.jem.org/cgi/doi/10.1084/jem.20140520](http://www.jem.org/cgi/doi/10.1084/jem.20140520)
5. Meyts I, Bousfiha A, Duff C, Singh S, Lau YL, Condino-Neto A, vd. Primary Immunodeficiencies: A Decade of Progress and a Promising Future. *Front Immunol*. 18 Şubat 2021;11:3904.
6. Bousfiha AA, Jeddane L, Ailal F, Benhsaien I, Mahlaoui N, Casanova JL, vd. Primary immunodeficiency diseases worldwide: More common than generally thought. *J Clin Immunol* [Internet]. 01 Ocak 2013 [a.yer 28 Mayıs 2023];33(1):1-7. Erişim adresi: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10875-012-9751-7>
7. Tangye SG, Al-Herz W, Bousfiha A, Cunningham-Rundles C, Franco JL, Holland SM, vd. Human Inborn Errors of Immunity: 2022 Update on the Classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee. *Journal of Clinical Immunology* 2022 42:7 [Internet].

- 24 Haziran 2022 [a.yer 25 Mart 2023];42(7):1473-507. Erişim adresi: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10875-022-01289-3>
8. Al-Herz W, Ziyab AH, Adeli M, Al Farsi T, Al-Hammadi S, Al Kuwaiti AA, vd. Predictors of early death risk among untransplanted patients with combined immunodeficiencies affecting cellular and humoral immunity: A multicenter report. *Pediatric Allergy and Immunology* [Internet]. 01 Aralık 2022 [a.yer 29 Mart 2023];33(12):e13901. Erişim adresi: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/pai.13901>
  9. Chavoshzadeh Z, Darougar S, Momen T, Esmailzadeh H, Abolhassani H, Cheraghi T, vd. Immunodeficiencies affecting cellular and humoral immunity. *Inborn Errors of Immunity: A Practical Guide*. 01 Ocak 2021;9-39.
  10. Al-Herz W, Al-Mousa H. Combined immunodeficiency: The Middle East experience. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 01 Mart 2013;131(3):658-60.
  11. Aranda CS, Guimarães RR, de Gouveia-Pereira Pimentel M. Combined immunodeficiencies. *J Pediatr (Rio J)*. 01 Mart 2021;97:S39-48.
  12. Meshaal SS, El Hawary RE, Eldash A, Grimbacher B, Camacho-Ordóñez N, Abd Elaziz DS, vd. Diagnosis of DOCK8 deficiency using Flow cytometry Biomarkers: an Egyptian Center experience. *Clinical Immunology*. 01 Ekim 2018;195:36-44.
  13. Engelhardt KR, McGhee S, Winkler S, Sassi A, Woellner C, Lopez-Herrera G, vd. Large deletions and point mutations involving the dedicator of cytokinesis 8 (DOCK8) in the autosomal-recessive form of hyper-IgE syndrome. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 01 Aralık 2009;124(6):1289-1302.e4.
  14. Biggs CM, Keles S, Chatila TA. DOCK8 deficiency: Insights into pathophysiology, clinical features and management. *Clinical Immunology*. 01 Ağustos 2017;181:75-82.
  15. Vilela MM dos S. Human Inborn Errors of Immunity (HIEI): predominantly antibody deficiencies (PADs): if you suspect it, you can detect it. *J Pediatr (Rio J)*. 01 Mart 2021;97:S67-74.

16. Lackey AE, Ahmad F. X-linked Agammaglobulinemia. StatPearls [Internet]. 04 Temmuz 2022 [a.yer 16 Mart 2023]; Erişim adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK549865/>
17. Weber ANR, Bittner Z, Liu X, Dang TM, Radsak MP, Brunner C. Bruton's tyrosine kinase: An emerging key player in innate immunity. *Front Immunol*. 08 Kasım 2017;8(NOV):1454.
18. Lucas CL, Chandra A, Nejentsev S, Condliffe AM, Okkenhaug K. PI3K $\delta$  and primary immunodeficiencies. *Nature Reviews Immunology* 2016 16:11 [Internet]. 12 Eylül 2016 [a.yer 16 Mart 2023];16(11):702-14. Erişim adresi: <https://www.nature.com/articles/nri.2016.93>
19. Ching CB, Hansel DE. Expanding therapeutic targets in bladder cancer: the PI3K/Akt/mTOR pathway. *Laboratory Investigation*. 01 Ekim 2010;90(10):1406-14.
20. Ren A, Yin W, Miller H, Westerberg LS, Candotti F, Park CS, vd. Novel Discoveries in Immune Dysregulation in Inborn Errors of Immunity. *Front Immunol*. 27 Ağustos 2021;12:3245.
21. Catak MC, Akcam B, Bilgic Eltan S, Babayeva R, Karakus IS, Akgun G, vd. Comparing the levels of CTLA-4-dependent biological defects in patients with LRBA deficiency and CTLA-4 insufficiency. *Allergy* [Internet]. 01 Ekim 2022 [a.yer 17 Mart 2023];77(10):3108-23. Erişim adresi: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/all.15331>
22. Cabral-Marques O, Schimke LF, de Oliveira EB, El Khawanky N, Ramos RN, Al-Ramadi BK, vd. Flow Cytometry Contributions for the Diagnosis and Immunopathological Characterization of Primary Immunodeficiency Diseases With Immune Dysregulation. *Front Immunol*. 26 Kasım 2019;10:2742.
23. Boz V, Valencic E, Girardelli M, Pin A, Gàmez-Díaz L, Tommasini A, vd. Case Report: Refractory Autoimmune Gastritis Responsive to Abatacept in LRBA Deficiency. *Front Immunol* [Internet]. 26 Şubat 2021 [a.yer 21 Mart 2023];12:619246. Erişim adresi: [/pmc/articles/PMC7952427/](https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimm.2021.619246/full)
24. Cagdas D, Halaçlı SO, Tan Ç, Lo B, Çetinkaya PG, Esenboğa S, vd. A Spectrum of Clinical Findings from ALPS to CVID: Several Novel LRBA

- Defects. *J Clin Immunol* [Internet]. 01 Ekim 2019 [a.yer 17 Mart 2023];39(7):726-38. Erişim adresi: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10875-019-00677-6>
25. Jamee M, Hosseinzadeh S, Sharifinejad N, Zaki-Dizaji M, Matloubi M, Hasani M, vd. Comprehensive comparison between 222 CTLA-4 haploinsufficiency and 212 LRBA deficiency patients: a systematic review. *Clin Exp Immunol* [Internet]. 17 Haziran 2021 [a.yer 29 Mart 2023];205(1):28-43. Erişim adresi: <https://academic.oup.com/cei/article/205/1/28/6431095>
26. Quinn J, Modell V, Orange JS, Modell F. Growth in diagnosis and treatment of primary immunodeficiency within the global Jeffrey Modell Centers Network. *Allergy, Asthma and Clinical Immunology* [Internet]. 01 Aralık 2022 [a.yer 08 Mart 2023];18(1):1-19. Erişim adresi: <https://aacijournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13223-022-00662-6>
27. Lu M, Gu W, Sheng Y, Wang J, Xu X. Case Report: Activating PIK3CD Mutation in Patients Presenting With Granulomatosis With Polyangiitis. *Front Immunol*. 28 Nisan 2021;12:1437.
28. Luo Y, Xia Y, Wang W, Li Z, Jin Y, Gong Y, vd. Identification of a novel de novo gain-of-function mutation of PIK3CD in a patient with activated phosphoinositide 3-kinase  $\delta$  syndrome. *Clinical Immunology*. 01 Aralık 2018;197:60-7.
29. Derpoorter C, Bordon V, Laureys G, Haerynck F, Lammens T. Genes at the crossroad of primary immunodeficiencies and cancer. *Front Immunol*. 01 Kasım 2018;9(NOV):2544.
30. Børsting C, Morling N. Next generation sequencing and its applications in forensic genetics. *Forensic Sci Int Genet*. 01 Eylül 2015;18:78-89.
31. Hu T, Chitnis N, Monos D, Dinh A. Next-generation sequencing technologies: An overview. *Hum Immunol*. 01 Kasım 2021;82(11):801-11.
32. DNA Sequencing - Sanger Sequencing Method • Microbe Online [Internet]. [a.yer 26 Mart 2023]. Erişim adresi:

<https://microbeonline.com/dna-sequencing-sanger-sequencing-method/>

33. Seleman M, Hoyos-Bachilloglu R, Geha RS, Chou J. Uses of next-generation sequencing technologies for the diagnosis of primary immunodeficiencies. *Front Immunol*. 24 Temmuz 2017;8(JUL):847.
34. Rawat A, Sharma M, Vignesh P, Jindal AK, Suri D, Das J, vd. Utility of targeted next generation sequencing for inborn errors of immunity at a tertiary care centre in North India. *Scientific Reports* 2022 12:1 [Internet]. 21 Haziran 2022 [a.yer 21 Mart 2023];12(1):1-12. Erişim adresi: <https://www.nature.com/articles/s41598-022-14522-1>
35. Hess JF, Kohl TA, Kotrová M, Rönsch K, Paprotka T, Mohr V, vd. Library preparation for next generation sequencing: A review of automation strategies. *Biotechnol Adv*. 01 Temmuz 2020;41:107537.
36. Adan A, Alizada G, Kiraz Y, Baran Y, Nalbant A. Flow cytometry: basic principles and applications. <https://doi.org/10.3109/0738855120151128876> [Internet]. 17 Şubat 2016 [a.yer 14 Mart 2023];37(2):163-76. Erişim adresi: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/07388551.2015.1128876>
37. McKinnon KM. Flow Cytometry: An Overview. *Curr Protoc Immunol* [Internet]. 01 Ocak 2018 [a.yer 21 Mart 2023];120(1):5.1.1-5.1.11. Erişim adresi: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/cpim.40>
38. Terrén I, Orrantia A, Vitallé J, Zenarruzabeitia O, Borrego F. CFSE dilution to study human T and NK cell proliferation in vitro. *Methods Enzymol*. 01 Ocak 2020;631:239-55.
39. Pockley AG, Foulds GA, Oughton JA, Kerkvliet NI, Multhoff G. Immune Cell Phenotyping Using Flow Cytometry. *Curr Protoc Toxicol* [Internet]. 01 Kasım 2015 [a.yer 26 Mart 2023];66(1):18.8.1-18.8.34. Erişim adresi: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/0471140856.tx1808s66>
40. Koenig A, Charmetant X, Barba T, Sicard A, Espi M, Dussurgey S, vd. Improved cell signaling analysis by biofunctionalized nanospheres and




- imaging flow cytometry. *Cytometry Part A* [Internet]. 01 Kasım 2021 [a.yer 26 Mart 2023];99(11):1079-90. Erişim adresi: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/cyto.a.24354>
41. Meshaal S, El Hawary R, Eldash A, Erfan A, Abd Elaziz D, Alkady R, vd. Flow cytometry optimizing the diagnostic approach in inborn errors of immunity: experience from Egypt. *Allergy, Asthma and Clinical Immunology* [Internet]. 01 Aralık 2022 [a.yer 19 Mart 2023];18(1):1-12. Erişim adresi: <https://aacijournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13223-022-00688-w>
  42. Gámez-Díaz L, Sigmund EC, Reiser V, Vach W, Jung S, Grimbacher B. Rapid flow cytometry-based test for the diagnosis of lipopolysaccharide responsive beige-like anchor (LRBA) deficiency. *Front Immunol*. 23 Nisan 2018;9(APR):720.
  43. Kwon WK, Choi SI, Kim HJ, Huh HJ, Kang JM, Kim YJ, vd. Flow Cytometry for the Diagnosis of Primary Immunodeficiency Diseases: A Single Center Experience. *Allergy Asthma Immunol Res* [Internet]. 01 Mart 2020 [a.yer 19 Mart 2023];12(2):292-305. Erişim adresi: <https://doi.org/10.4168/aair.2020.12.2.292>
  44. Madkaikar MR, Shabrish S, Kulkarni M, Aluri J, Dalvi A, Kelkar M, vd. Application of flow cytometry in primary immunodeficiencies: Experience from India. *Front Immunol*. 11 Haziran 2019;10(JUN):1248.
  45. Gámez-Díaz L, Sigmund EC, Reiser V, Vach W, Jung S, Grimbacher B. Rapid flow cytometry-based test for the diagnosis of lipopolysaccharide responsive beige-like anchor (LRBA) deficiency. *Front Immunol*. 23 Nisan 2018;9(APR):720.
  46. Kanegane H, Futatani T, Wang Y, Nomura K, Shinozaki K, Matsukura H, vd. Clinical and mutational characteristics of X-linked agammaglobulinemia and its carrier identified by flow cytometric assessment combined with genetic analysis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 01 Aralık 2001;108(6):1012-20.

47. Seymour B, Miles J, Haeney M. Primary antibody deficiency and diagnostic delay. *J Clin Pathol* [Internet]. 01 Mayıs 2005 [a.yer 28 Mayıs 2023];58(5):546-7. Erişim adresi: <https://jcp.bmj.com/content/58/5/546>
48. Bharadwaj M, Mifsud NA, McCluskey J. Detection and characterisation of alloreactive t cells. *Methods in Molecular Biology* [Internet]. 2012 [a.yer 15 Nisan 2023];882:309-37. Erişim adresi: [https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-61779-842-9\\_18](https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-61779-842-9_18)
49. Maciorowski Z, Chattopadhyay PK, Jain P. Basic Multicolor Flow Cytometry. *Curr Protoc Immunol* [Internet]. 01 Nisan 2017 [a.yer 09 Mayıs 2023];117(1):5.4.1-5.4.38. Erişim adresi: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/cpim.26>
50. Shearer WT, Rosenblatt HM, Gelman RS, Oyomopito R, Plaeger S, Stiehm ER, vd. Lymphocyte subsets in healthy children from birth through 18 years of age: The Pediatric AIDS Clinical Trials Group P1009 study. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* [Internet]. 01 Kasım 2003 [a.yer 29 Mayıs 2023];112(5):973-80. Erişim adresi: <http://www.jacionline.org/article/S009167490302030X/fulltext>
51. Aksu G, Genel F, Koturoglu G, ... ZKTJ of, 2006 undefined. Serum immunoglobulin (IgG, IgM, IgA) and IgG subclass concentrations in healthy children: a study using nephelometric technique. *academia.edu* [Internet]. 2005 [a.yer 29 Mayıs 2023];47:19-24. Erişim adresi: [https://www.academia.edu/download/42223921/pdf\\_TJP\\_297.pdf](https://www.academia.edu/download/42223921/pdf_TJP_297.pdf)
52. Locke BA, Dasu T, Verbsky JW. Laboratory diagnosis of primary immunodeficiencies. *Clin Rev Allergy Immunol* [Internet]. 26 Şubat 2014 [a.yer 16 Nisan 2023];46(2):154-68. Erişim adresi: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12016-014-8412-4>
53. Kinoshita S, Su L, Amano M, Timmerman LA, Kaneshima H, Nolan GP. The T Cell Activation Factor NF-ATc Positively Regulates HIV-1 Replication and Gene Expression in T Cells. *Immunity*. 01 Mart 1997;6(3):235-44.

54. Saravia J, Raynor JL, Chapman NM, Lim SA, Chi H. Signaling networks in immunometabolism. *Cell Research* 2020 30:4 [Internet]. 20 Mart 2020 [a.yer 10 Mayıs 2023];30(4):328-42. Erişim adresi: <https://www.nature.com/articles/s41422-020-0301-1>
55. Halacli SO. The effect of mutatio-type on proteo-phenotype and clinico-phenotype in selected primary immunodeficiencies. *Immunol Res* [Internet]. 01 Şubat 2022 [a.yer 16 Nisan 2023];70(1):56-66. Erişim adresi: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12026-021-09239-8>

## 8. EKLER

### EK-1: Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzni.



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

Sayı : 16969557 - 2024  
Konu :

**ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU**

**Toplantı Tarihi** : 02 KASIM 2021 SALI  
**Toplantı No** : 2021/18  
**Proje No** : GO 21/808 (Değerlendirme Tarihi: 29.06.2021)  
**Karar No** : 2021/18-36

Üniversitemiz Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Deniz Çağdaş AYVAZ'ın sorumlu araştırmacı olduğu, Öğr. Gör. Sevil Oskay HALAÇLI, Uzm. Dr. Hacer Neslihan BİLDİK, Dr. Öğr. Üyesi Saliha ESENBÖĞA, Arş. Gör. Hamdullah YANIK, Arş. Gör. Begüm ÖZBEK, Arş. Gör. İsmail YAZ, Dilan İNAN, Prof. Dr. Güneş ESENDAĞLI, Prof. Dr. İlhan TEZCAN ile birlikte çalışacakları, GO 21/808 kayıt numaralı "*Primer İmmün Yetmezlikler-İşlevsel Çözümleme*" başlıklı proje önerisi araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş olup, 03 Kasım 2021-30 Kasım 2023 tarihleri arasında geçerli olmak üzere etik açıdan **uygun bulunmuştur**. Çalışma tamamlandığında sonuçlarını içeren bir rapor örneğinin Etik Kurulumuza gönderilmesi gerekmektedir.

1. Prof. Dr. G. Burça AYDIN	(Başkan)	İZİNLI	8. Doç. Dr. Betül Çelebi SALTIK	(Üye)
2. Prof. Dr. Ayşe Lale DOĞAN	(Üye)	İZİNLI	9. Doç. Dr. Hande Güney DENİZ	(Üye)
3. Prof. Dr. M. Özgür UYANIK	(Üye)		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)	İZİNLI	14. Av. Serap MORALIOĞLU	(Üye)

Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu  
06100 Sıhhiye-Ankara  
Telefon: 0 (312) 305 1082 • Faks: 0 (312) 310 0580 • E-posta: goetik@hacettepe.edu.tr

Ayrıntılı Bilgi için:

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

## Primer İmmün Yetmezlikler-İşlevsel Çözümleme yüksek lisans tezi

## ORJİNALLİK RAPORU

%4

BENZERLİK ENDEKSİ

%4

İNTERNET KAYNAKLARI

%1

YAYINLAR

%1

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

## BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	% 1
2	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 1
3	pdffox.com İnternet Kaynağı	<% 1
4	Submitted to Hacettepe University Öğrenci Ödevi	<% 1
5	openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<% 1
6	acikerisim.deu.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
7	jag.journalagent.com İnternet Kaynağı	<% 1
8	"Poster Özetleri / Poster Abstracts", Turkish Journal of Biochemistry, 2015 Yayın	<% 1

books.akademisyen.net



**EK-3: Orijinallik Dijital Makbuzu.****Dijital Makbuz**

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

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: Dilan Inan  
Ödev başlığı: Primer İmmün Yetmezlik İşlevsel Çözümleme  
Gönderi Başlığı: Primer İmmün Yetmezlikler-İşlevsel Çözümleme yüksek lisan...  
Dosya adı: tez\_turnitin.docx  
Dosya boyutu: 3.04M  
Sayfa sayısı: 74  
Kelime sayısı: 9,235  
Karakter sayısı: 63,351  
Gönderim Tarihi: 05-Haz-2023 12:40ÖÖ (UTC+0300)  
Gönderim Numarası: 2108809325

YIL  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PRİMER İMMÜN YETMEZLİK-İŞLEVSEL ÇÖZÜMLEME

DİLAN İNAN

İmmünoloji Programı  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANKARA  
2023

## 9. ÖZGEÇMİŞ

### I. Bireysel Bilgiler

Adı-Soyadı: Dilan İNAN

Doğum Yeri:

Doğum Tarihi:

Uyruđu:

İletişim Adresi:

Telefon: