

T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İMMÜN DİSREGÜLASYON BULGULARI OLAN  
HASTALARDA İLİŞKİLİ YOLAKLARIN RT-PCR ile  
DEĞERLENDİRİLMESİ

Dr. Hacer Neslihan BİLDİK

İmmünoloji Programı  
DOKTORA TEZİ

ANKARA  
2024



T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İMMÜN DİSREGÜLASYON BULGULARI OLAN  
HASTALARDA İLİŞKİLİ YOLAKLARIN RT-PCR ile  
DEĞERLENDİRİLMESİ

Dr. Hacer Neslihan BİLDİK

İmmünoloji Programı  
DOKTORA TEZİ

TEZ DANIŞMANI  
Prof. Dr. Deniz Çağdaş AYVAZ

ANKARA

2024

**İMMÜN DİSREGÜLASYON BULGULARI OLAN HASTALARDA İLİŞKİLİ YOLAKLARIN  
RT-PCR ile DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Hacer Neslihan Bildik**

**Danışman: Prof. Dr. Deniz Nazire Çağdaş Ayvaz**

Bu tez çalışması 18.11.2024 tarihinde jürimiz tarafından "İmmünoloji-Doktora Programı" nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

**Jüri Başkanı:** Prof. Dr. Cemalettin Aybay  
Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi/ Temel Tıp Bilimleri, İmmünoloji B.D.

**Üye:** Prof. Dr. Güneş Esendağlı  
Hacettepe Üniversitesi Kanser Enstitüsü/Temel Onkoloji A.B.D

**Üye:** Doç. Dr. Şule Haskoloğlu  
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi/Çocuk İmmünoloji B.D.

**Üye:** Doç. Dr. Fatima Susanna Aerts Kaya  
Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü/ Kök Hücre Bilimleri A.B.D

**Üye:** Doç. Dr. Hilal Susam Şen  
Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi/Çocuk Onkoloji B.D.

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

11.8 Kasım 2024

*Prof. Dr. Müge YEMİŞCİ 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 haricinde 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 ... ay ertelenmiştir. <sup>(2)</sup>
- Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. <sup>(3)</sup>

18/11/2024

Dr. Hacer Neslihan BİLDİK

“*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 ve 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 güvenliği, 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 BEYAN**

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

Dr. Hacer Neslihan BİLDİK

## TEŞEKKÜR

Pediatric ihtisasımdan bu yana bilgi ve tecrübeleriyle her zaman yanımda olan, doktora tez çalışmamızı birlikte yürüttüğümüz danışmanım, Çocuk İmmünoloji Bilim Dalı Başkanı Sn. Prof. Dr. Deniz Çağdaş Ayvaz'a, İmmünoloji adına kendisinden çok şey öğrendiğim Sn. Prof. Dr. İlhan Tezcan'a, tez çalışmalarında her anımda yanımda olan ve tez çalışmalarını birlikte yaptığımız arkadaşlarım İsmail Yaz ve Doç. Dr. Saliha Esenboğa'ya, tez dönemim boyunca immünoloji kliniğinde birlikte çalıştığım arkadaşlarım Doç. Dr. Melike Ocak, Uzm. Dr. Ayşegül Akarsu'ya ve klinikteki doktor arkadaşlarıma, hemşiremiz Meliha Erol'a ve sekreterlerimiz Güllü Coşkun ve Aysu Demirhan'a, immünoloji laboratuvarında birlikte olmaktan ve çalışmaktan çok mutlu olduğum Begüm Çiçek, Mehtap Sönmez, Menekşe Koçak, Baran Erman, Özlem Karapınar ve Barış Ulum'a, hep desteğini hissettiğim her zaman yanımda olan anneme, babama ve kardeşlerime teşekkür ederim.

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

## ÖZET

**Bildik, H.N., İmmün Disregülasyon Bulguları Olan Hastalarda İlişkili Yolakların RT-PCR ile Değerlendirilmesi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü İmmünoloji Programı Doktora Tezi, Ankara, 2024.** İmmün yolakların kontrolsüz aktivasyonu, yani immün disregülasyon, otoimmünite, lenfoproliferasyon ve maligniteye yol açabilir. Apoptozis, nükleer faktör- $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) ve fosfoinositid 3-kinaz (PI3K) yolakları, immün disregülasyonda rol oynayan başlıca yolaklardır. Bu çalışmanın amacı, immün disregülasyon bulguları olan hastaları, seçilmiş inflamatuvar genlerin ekspresyon analizleriyle değerlendirmektir. Bu nedenle, literatürde immün disregülasyon ile ilişkili olduğu daha önce bildirilen yolaklardan bazı moleküller seçilerek, gen ifadeleri kontrollerle karşılaştırılmıştır. İmmün disregülasyon bulguları olan hastalar, otoimmün lenfoproliferatif sendrom, immün sitopeni ve EBV ile ilişkili lenfoproliferasyon hastaları olarak gruplandırılarak değerlendirilmiştir. İnflamatuvar yolaklardaki seçili genler (CASP8, CASP10, FAS, FASL, AKT, MAP3K7, MAP3K14, mTOR, NFKB1, NFKB2, NFKBIA, TRAF3) için gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (RT-qPCR) analizi yapılmıştır. Gen ekspresyonundaki kat değişiklikleri logaritmik Delta-Delta Ct ( $2^{(-\text{delta delta CT})}$ ) yöntemi kullanılarak değerlendirilmiştir. Tüm hedef genlerin ekspresyonlarının rölatif kantifikasyon değerleri açısından hasta ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur. Hedef gen ekspresyonları açısından farklı hasta grupları arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir. ROC eğrisi analizine göre hasta ve kontrolleri ayırt etme açısından en yüksek tanı oranına sahip hedef genler NFKB2, MAP3K7, AKT, mTOR, NFKB1 ve FAS'tır. Bu çalışma ile özellikle immün sitopeni ve lenfoproliferasyonu olan immün disregülasyon hastaları için, NFKB1, NFKB2, MAP3K7, AKT, mTOR ve FAS kullanılarak bir immün disregülasyon skoru/imzası oluşturulabileceği ve bu skorun hasta tanı ve takibinde kullanılabileceği düşünülebilir.

**Anahtar kelimeler:** apoptoz, fosfoinositid 3-kinaz, immün disregülasyon, nükleer faktör- $\kappa$ B, RT-PCR

Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: THD-2023-20395).



## ABSTRACT

**Bildik, H.N., Evaluation of Related Pathways in Patients with Immune Dysregulation Findings by RT-PCR, Hacettepe University Graduate School Health Sciences, Immunology Program PhD Thesis, Ankara, 2024.** Uncontrolled activation of immune pathways, so called immune dysregulation may result in autoimmunity, lymphoproliferation, and malignancy. Apoptosis, nuclear factor- $\kappa$ B (NF $\kappa$ B), and phosphoinositide 3-kinase (PI3K) pathways are the major pathways involved in immune dysregulation. The aim of this study was to evaluate the patients with immune dysregulation with selected inflammatory genes' expression analyses. For this reason, some molecules from pathways previously reported to be associated with immune dysregulation in the literature will be selected and their gene expressions will be compared with controls. We evaluated the patients with immune dysregulation, grouped them as those with autoimmune lymphoproliferative syndrome, immune cytopenia, and patients with EBV-associated lymphoproliferation. Real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) analysis was conducted for the selected genes (CASP8, CASP10, FAS, FASL, AKT, MAP3K7, MAP3K14, mTOR, NFKB1, NFKB2, NFKBIA, TRAF3) in inflammatory pathways. The fold changes in gene expression were evaluated using the logarithmic Delta-Delta Ct ( $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ ) method. A statistically significant difference was found comparing the total patient and control groups for relative quantification values of all target genes. No significant difference was observed between the patient groups in terms of target gene expression. According to ROC curve analysis, the target genes with the highest diagnostic rate in terms of distinguishing patients and controls are NFKB2, MAP3K7, AKT, mTOR, NFKB1 and FAS. With this study, we designed an immune dysregulation score/signature by using NFKB1, NFKB2, MAP3K7, AKT, mTOR and FAS for patients suffering from immunological dysregulation, particularly those with immune cytopenia and lymphoproliferation, and can be used in patient diagnosis and follow-up.

**Keywords:** apoptosis, immune dysregulation, nuclear factor- $\kappa$ B, phosphoinositide 3-kinase, RT-PCR

## İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iii
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR	xi
ŞEKİLLER	xv
TABLolar	xvi
<b>1. GİRİŞ</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	<b>3</b>
2.1. Primer İmmün Yetmezlikler	3
2.2. İmmün Disregülasyonla İlişkili Yolaklar	7
2.2.1. Apoptoz Yolağı	7
2.2.2. Nükleer Faktör- $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) Yolağı	10
2.2.3. Fosfoinositid 3-kinaz (PI3K) Yolağı	16
<b>3. BİREYLER ve YÖNTEM</b>	<b>18</b>
3.1. Bireyler	18
3.2. Yöntem	18
3.2.1. Hastalardan Ayrıntılı Öykü Alınması, Fizik Muayene Yapılması ve Bazal İmmünolojik Tetkiklerinin Değerlendirilmesi (Hasta Değerlendirmesi)	19
3.2.2. RNA İzolasyonu ve Kantifikasyonu	19
3.2.3. Revers Transkripsiyon ve Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu/RT-qPCR	20
3.2.4 Verilerin Analizi	21
<b>4. BULGULAR</b>	<b>23</b>
4.1. Klinik Bulgular	24
4.2. Laboratuvar Bulguları	27
4.3. Genetik Analiz Sonuçları	30
4.4. Hedef gen RT-PCR analizleri	33

4.5. Tedaviler ve Prognoz	45
<b>5. TARTIŞMA</b>	<b>48</b>
<b>6. SONUÇ ve ÖNERİLER</b>	<b>64</b>
<b>7. KAYNAKLAR</b>	<b>65</b>
<b>8. EKLER</b>	<b>74</b>
EK-1. Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzinleri	74
EK-2. Turnitin Ekran Görüntüsü	75
EK-3. Dijital Makbuz	76
<b>9. ÖZGEÇMİŞ</b>	<b>77</b>

## SİMGELER ve KISALTMALAR

<b>A20</b>	: TNF alpha induced protein 3
<b>ACMG</b>	: The American College of Medical Genetics and Genomics
<b>AKT</b>	: AKT serine/threonine kinase 1(RAC-alpha serine/threonine protein kinase)
<b>ALPS</b>	: Autoimmune lymphoproliferative syndrome/Otoimmün lenfoproliferatif sendrom
<b>Anti-TG</b>	: Anti-tiroglobulin antikor
<b>Anti-TPO</b>	: Anti-tiroid peroksidaz antikor
<b>APDS</b>	: Aktive fosfoinozimid 3-kinaz delta sendromu
<b>BAFF</b>	: B-hücreleri aktive edici faktör
<b>BAFF-R</b>	: B-hücreleri aktive edici faktör reseptörü
<b>BCL10</b>	: B-cell lymphoma/leukemia 10
<b>CARD11</b>	: Caspase recruitment domain containing protein 11
<b>CASP8</b>	: Caspase 8/Kaspaz 8
<b>CASP10</b>	: Caspase 10/Kaspaz 10
<b>CBM</b>	: CARD11:BCL10:MALT1
<b>cFLIP</b>	: FLICE-like inhibitory protein, CASP8 and FADD-like apoptosis regülatör
<b>cIAP</b>	: Cellular inhibitor of apoptosis protein
<b>CMV</b>	: Cytomegalovirus/Sitomegalovirüs
<b>CYLD</b>	: CYLD lysine 63 deubiquitinase
<b>DED</b>	: Death effector domain-Ölüm efektör alanı
<b>DISC</b>	: Death-inducing signaling complex, Ölüm indükleyici sinyal kompleksi
<b>DM</b>	: Diabetes mellitus
<b>DNT</b>	: Double negative T cell/Çift negatif T hücreleri
<b>EBER</b>	: Epstein-Barr virüs -encoded small RNAs/ Epstein-Barr virüsü tarafından kodlanan küçük RNA'lar
<b>EBV</b>	: Epstein-Barr virüsü
<b>FADD</b>	: Fas associated death domain

<b>FAS</b>	: Fas cell surface death receptor (Apoptosis-mediating surface antigen FAS)
<b>FASL</b>	: Fas ligand (CD95 ligand)
<b>Foxp3</b>	: Forkhead box P3
<b>HIV</b>	: Human immunodeficiency viruses (HIV)-İnsan bağışıklık yetmezliği virüsü
<b>HKHN</b>	: Hematopoetik kök hücre nakli
<b>HL</b>	: Hodgkin lenfoma
<b>HOIL</b>	: Haem-oxidized IRP2 ubiquitin ligase-1
<b>HOIP</b>	: HOIL-1 interacting protein, E3 ligaz
<b>HPRT1</b>	: Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1/ Hipoksantin fosforibosiltransferaz 1
<b>Ig</b>	: İmmünoglobulin
<b>IκB</b>	: Inhibitor of κB
<b>IKK</b>	: IκB kinaz kompleksi
<b>IL1R</b>	: İnterlökin 1 reseptörü
<b>IL-10</b>	: İnterlökin 10
<b>IL21</b>	: İnterlökin 21
<b>IL21R</b>	: İnterlökin 21 reseptörü
<b>IQR</b>	: Interquartile range /Çeyrekler açıklığı
<b>IRAK</b>	: Interleukin-1 receptor associated kinase
<b>IVIG</b>	: İntravenöz immünglobulin
<b>LA</b>	: Lupus antikoagülan
<b>LMP1</b>	: Epstein–Barr virus latent membrane protein 1
<b>LMP2a</b>	: Epstein–Barr virus latent membrane protein 2a
<b>LTβ</b>	: Lenfotoksin β
<b>LTβR</b>	: Lenfotoksin β reseptörü
<b>LUBAC</b>	: Linear ubiquitination assembly complex
<b>MALT1</b>	: Mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation protein 1
<b>MAP3K7</b>	: Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7
<b>MAP3K14</b>	: Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 14

<b>MHC</b>	: Major histocompatibility complex- Temel doku uyumluluk kompleksi
<b>mTOR</b>	: Mechanistic target of rapamycin (Mammalian target of rapamycin)
<b>NFκB</b>	: Nükleer faktör- κB
<b>NF-κB1</b>	: Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells 1
<b>NF-κB2</b>	: Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells 2
<b>NFKBIA</b>	: NF-Kappa-B inhibitor alpha
<b>NIK</b>	: NFKB inducing kinase
<b>OTULIN</b>	: OTU deubiquitinase with linear linkage specificity
<b>PCR</b>	: Polymerase chain reaction/polimeraz zincir reaksiyonu
<b>PDK1</b>	: Phosphoinositide-dependent kinase 1
<b>PH</b>	: Pleckstrin homology
<b>PI3K</b>	: Fosfatidilinositol 3-kinaz
<b>PİY</b>	: Primer immün yetmezlik
<b>PKCθ</b>	: Protein kinaz C-θ
<b>PKCβ</b>	: Protein kinaz C-β
<b>PRR</b>	: Patern tanıma reseptörü
<b>PTEN</b>	: Phosphatase and tensin homolog
<b>RANK</b>	: Receptor activator of NFκB, NFκB reseptör aktivatörü
<b>RHD</b>	: Rel homology domain
<b>RIP-1</b>	: Receptor-interacting protein kinase 1
<b>RIPK1</b>	: Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1
<b>RIPK3</b>	: Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 3
<b>RT-qPCR</b>	: Real time quantitative polymerase chain reaction- Gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu
<b>SHARPIN</b>	: SHANK-associated RH domain interacting protein
<b>TAB</b>	: Transforming growth factor-beta activated kinase binding protein
<b>TAD</b>	: Transaktivasyon domainine
<b>TAK1</b>	: Transforming growth factor beta-activated kinase 1
<b>TEMRA</b>	: Terminally differentiated effector memory/Son derece farklılaşmış efektör hafıza (memory)
<b>TGF-β</b>	: Transforming growth factor beta

<b>TLR</b>	: Toll-like reseptör
<b>TNF</b>	: Tümör nekroz faktörü
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	: Tümör nekroz faktörü $\alpha$
<b>TNFAIP3</b>	: TNF alpha induced protein 3
<b>TNFR</b>	: Tümör nekrozis faktör reseptörü
<b>TNFRSF12A</b>	: Tumor necrosis factor receptor superfamily member 12A, Tweak reseptörü
<b>TRADD</b>	: Tumor necrosis factor receptor type 1 associated death domain protein
<b>TRAF2</b>	: TNF receptor associated factor 2
<b>TRAF3</b>	: Tumor necrosis factor receptor associated factor 3
<b>TRAF6</b>	: TNF receptor associated factor 6
<b>TRAIL</b>	: TNF-related apoptosis-inducing ligand
<b>TREC</b>	: T-cell receptor excision circle/T hücre reseptörü eksizyon halkaları
<b>Treg</b>	: Regülatör (düzenleyici) T hücre
<b>TWEAK</b>	: TNF benzeri zayıf apoptoz indükleyicisi
<b>VUS</b>	: Variant of uncertain significance/ klinik önemi bilinmeyen varyant

## ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Ekstrinsik ve intrinsik apoptoz yolakları	8
2.2. NF-κB proteinleri ve domainleri	11
2.3. Kanonik ve kanonik olmayan NF-κB yolakları	13
4.1. Çalışmaya dahil edilen hasta grupları-kontrol grubu ve sayısal dağılım	23
4.2. Hastalarda görülen başvuruya neden olan ilk semptom ve bulgular	25
4.3. Hasta gruplarında görülen klinik bulgular (grup 1: ALPS, grup 2: immün sitopeni, grup 3: EBV ilişkili lenfoproliferasyon)	27
4.4. Hasta gruplarında görülen laboratuvar bulgular (grup 1: ALPS, grup 2: immün sitopeni, grup 3: EBV ilişkili lenfoproliferasyon)	30
4.5. Hasta ve kontrol hedef gen rölatif kantifikasyon karşılaştırma grafikleri (**** p<0,0001)	36
4.6. Hasta ve kontrol hedef gen rölatif kantifikasyon karşılaştırma grafikleri (**** p<0,0001)	37
4.7. Hasta grupları ve kontrol hedef gen rölatif kantifikasyon karşılaştırma grafikleri (Grup 1 (ALPS) n:10, Grup 2 (immün sitopeni) n:12, Grup 3 (EBV ilişkili lenfoproliferasyon) n:10) (****p<0,0001)	39
4.8. Hasta grupları ve kontrol hedef gen rölatif kantifikasyon karşılaştırma grafikleri (Grup 1 (ALPS) n:10, Grup 2 (immün sitopeni) n:12, Grup 3 (EBV ilişkili lenfoproliferasyon) n:10) (**** p<0,0001)	40
4.9. Hasta grupları ve kontrol hedef gen rölatif kantifikasyon karşılaştırma grafikleri (Grup 1 (ALPS) n:10, Grup 2 (immün sitopeni) n:12, Grup 3 (EBV ilişkili lenfoproliferasyon) n:10) (**** p<0,0001)	41
4.10. ROC eğrisi analizi	42
4.11. Bütün hedef genler için hasta ve kontroller için oluşturulmuş ısı haritası (heat map) H: hasta, K: kontrol, A: ALPS-grup 1, S: immün sitopeni-grup 2, E: EBV ilişkili lenfoproliferasyon-grup 3	46
4.12. Seçilmiş altı hedef gen için hasta ve kontroller için oluşturulmuş ısı haritası (heat map) H: hasta, K: kontrol, A: ALPS-grup 1, S: immün sitopeni-grup 2, E: EBV ilişkili lenfoproliferasyon-grup 3	47



## TABLULAR

<b>Tablo</b>	<b>Sayfa</b>
2.1. İmmün disregölasyon hastalıkları ve altgrupları	6
4.1. Kontrolle karşılaştırmalı olarak grupların demografik bulguları (grup 1: ALPS, grup 2: immün sitopeni, grup 3: EBV ilişkili lenfoproliferasyon)	24
4.2. Hastalarda saptanan genetik defektler ve özellikleri	31
4.3. Hastaların klinik özellikleri	32
4.4. Hasta grubu hedef gen ekspresyonları kat farkları (rölatif kantifikasyon) ortanca, IQR ve minimum-maksimum değerleri	35
4.5. Kontrol grubu hedef gen ekspresyonları kat farkları (rölatif kantifikasyon) ortanca, IQR ve minimum-maksimum değerleri	35
4.6. Hasta gruplarının kendi arasında ve kontrol grubuna göre karşılaştırma sonuçları ve p değerleri	38
4.7. Hedef genler için AUC (area under curve) değerleri ve cut-off değerler	43

## 1. GİRİŞ

Primer immün yetmezlikler (PİY) enfeksiyonlara yatkınlık, otoimmün bulgular, otoinflamatuvar hastalıklar, alerji ve/veya malignensi gelişimi ile seyredebilir (1, 2). İmmün sistemin regülasyon mekanizmalarında bozukluk sonucu ortaya çıkan immün disregülasyon hastalıklarının bulguları olan otoimmünite, otoinflamasyon, lenfoproliferasyon ve malignite durumları esasen tüm PİY’lerde görülebilir (3). İmmün disregülasyon fenotipi görülen hastaların klinik ve laboratuvar bulguları oldukça çeşitlidir.

Apoptoz yolağı, Nükleer faktör-  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) ve Fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K) yolağı; daha önce literatürde immün disregülasyon ile ilişkilendirilmiştir. Bu nedenle bu yollarda yer alan moleküllerin hastalarda ve kontrollerde ifadesinin karşılaştırılması yapılması planlanmıştır.

Gereksiz veya hasarlı hücrelerin ortadan kaldırılması tüm organizmada homeostazın sürdürülmesini sağlar. Apoptoz, hücre içi (intrinsik) veya hücre dışı (ekstrinsik) kaynaklı ölüm sinyalleri aracılığıyla başlatılabilir. Apoptoz sürecindeki herhangi bir defekt otoimmün hastalıklar ve kanser gibi çeşitli klinik durumlara ve otoimmün lenfoproliferatif sendroma (ALPS; autoimmune lymphoproliferative syndrome) neden olabilir (4-6). Bu yolda yer alan FAS (Fas cell surface death receptor), FASL (Fas ligand-CD95 ligand), kaspaz 8 (CASP 8) ve 10 (CASP 10) molekülleri ALPS ile en sık ilişkilendirilen moleküllerdir (6-8).

Nükleer faktör-  $\kappa$ B bir transkripsiyon faktörleri ailesidir ve immün sistem hücrelerinde immün yanıtta görev alan genleri regüle eder. NF- $\kappa$ B hedef genleri arasında sitokin/kemokinler, immün sistem reseptörleri, antijen sunumunda görevli proteinler, apoptoz regülatörleri ve büyüme faktörleri bulunmaktadır. NF- $\kappa$ B, hücre proliferasyonu, apoptozu ve farklılaşmasını düzenler. NF $\kappa$ B kanonik ve nonkanonik yolda yer alan birçok molekül daha önce otoimmünite ve lenfoproliferatif süreçlerle ilişkilendirilmiştir (9-12). Bu yolağın ana efektör molekülleri “Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells 1” (NF $\kappa$ B1) ve “Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells 2” (NF $\kappa$ B2), aktivatör molekülleri “Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7” (MAP3K7) ve “Mitogen-activated protein

kinase kinase kinase 14” (MAP3K14) ve ana inhibitör molekülleri “NF-Kappa-B inhibitor alpha” (NFKBIA) ve “Tumor necrosis factor receptor associated factor 3” (TRAF3)’tür ve bu moleküllerin immün disregülasyon bulguları olan hastalarda ifadesinin arttığı gösterilmiştir (13-17).

Fosfatidilinositol 3-kinaz yolağı; büyüme, farklılaşma, çoğalma ve hayatta kalma dahil olmak üzere birçok hücrenel süreçte yer alır. PI3K $\delta$  ise özellikle immün sistem hücrelerinde bulunur. PI3K $\delta$ 'nin hem aşırı aktivasyonu hem de yetersiz aktivasyonu primer immün yetmezliğe neden olabilir. PI3K $\delta$ 'nin kontrolsüz aktivasyonu immün sistemin regülasyonun bozulmasına yol açar ve bu durumda hastalarda otoimmün bulgular, lenfoproliferasyon ve kanser görülebilir (18-20). Yolağın ana efektörleri “AKT serine/threonine kinase” (AKT) ve “Mechanistic target of rapamycin” (mTOR)’dur ve bu moleküllerin artmış ekspresyonu immün disregülasyon ile ilişkilendirilmiştir (21-23).

Bizim hipotezimiz otoimmün bulgular ve/veya lenfoproliferasyon saptanan hastalarda yapılacak olan çalışma sonuçları ile risk analizi yapılabileceği ve etkili olabileceği düşünülen yolaklardaki moleküllerin değerlendirilmesi ile saptanacak sonuçların klinik öngörü, hızlı tanı konulması, iyi hasta takibi ve hedeflenmiş tedaviye olanak sağlayabileceğidir. Bu çalışma ile hastaların klinik bulguları (semptom başlama yaşı, hangi semptomların görüldüğü ve şiddeti, komplikasyonlar), laboratuvar bulguları (bazal ve ileri immünolojik tetkikler) karakterize edilerek; RT-PCR ile immün disregülasyon ile ilişkili yolaklar incelenecek ve özellikle klinik penetransa katkı sağlayan yolaklar ve moleküller aydınlatılmaya çalışılacaktır. Bu hastalarda tanıya ya da klinik takipte yardımcı olabilecek bir fikir birliğine henüz varılamamıştır. Bu çalışma ile otoimmün bulgusu ve/veya lenfoproliferasyonu olan hastalarda tanıya ve klinik takipte yol gösterici olabilecek biyobelirteçlerin belirlenmesi amaçlanmıştır ve bu nedenle literatürde daha önce immün disregülasyon ile ilişkili olduğu bildirilen yolaklardan bazı moleküller seçilerek, kontrollere göre gen ifadeleri karşılaştırılacaktır. Hangi bulguların bize primer immün yetmezlikler açısından yol gösterici olabileceği belirlenecektir. Klinik takip için bir algoritma oluşturulması planlanmaktadır. Hastalarda kontrollere göre anlamlı bir farklılık gösteren gen ifadeleri bize tanı, takip ve tedavi etkinliğini değerlendirmede yardımcı olabilir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Primer İmmün Yetmezlikler

Primer immün yetmezlikler (PİY) immün sistemin herhangi bir bileşeninde eksiklik ve/veya fonksiyon bozukluğuna bağlı olarak ortaya çıkan, enfeksiyonlara yatkınlık, otoimmünite, otoinflamatuvar hastalıklar, alerji ve/veya malignensi gelişimi ile karakterize olabilen hastalıklardır (1-3). PİY hastalıkları, immün sistemdeki doğuştan gelen kusurlardan dolayı ortaya çıkar ve bugüne kadar 500'e yakın genetik defekt tanımlanmıştır (3, 24). Çoğu PİY hastalığı, immün sistem gelişimi ve/veya işlevlerindeki kalıtsal kusurlardan kaynaklansa da, somatik mutasyonların ya da nötralize edici otoantikörlerin neden olduğu edinilmiş formlar da tanımlanmıştır ve IUIS (The International Union of Immunological Societies; Uluslararası İmmünoloji Dernekleri Birliği) sınıflamasında yerini almıştır (3, 25). Bunların yanında viral veya bakteriyel enfeksiyonlar (insan bağışıklık yetmezliği virüsü-HIV, kızamık, Epstein Barr virüsü-EBV, ağır sepsis, milier tüberküloz), malnutrisyon, lenfosit ya da immünoglobulin (Ig) kaybı (nefrotik sendrom, protein kaybettirici enteropati, ağır yanıklar), metabolik hastalıklar (diabetes mellitus-DM, ağır karaciğer hastalığı, sarkoidoz, orak hücreli anemi, hipoadrenalizm), kollajen vasküler hastalıklar (sistemik lupus eritamatozus), malignensi (lenfoma, lösemi, myelom), radyasyon ya da immünsupresif tedavilere bağlı olarak gelişebilen sekonder immün yetmezlikler de benzer klinik bulgulara neden olabilir. Tüm doğuştan gelen bağışıklık hastalıkları göz önünde bulundurulduğunda, küresel nüfusun %1'i primer immün yetmezliğe sahip olabilir (26). Dünyada PİY sıklığının, selektif immunoglobulin A (IgA) eksikliği hariç tutulduğunda, 1-5/10.000 arasında olduğu tahmin edilmektedir (27, 28). Türkiye'de yapılan bir çalışmada sıklığı 3/10.000 olarak bildirilmiştir (29). PİY' ler, süt çocukluğunda erkek cinsiyette daha sık (5/1), ergen ve erişkinlerde ise erkek ve kızda eşit oranda görülmektedir (27, 28, 30).

İmmün yetmezlik hastalıklarının bulguları, hastalığa ve hastaya göre değişiklik göstermektedir. Antikor eksikliklerine bağlı immün yetmezlikler, anneden bebeğe geçen antikörlerin etkisi ile ilk 6 ayda bulgu vermeyebilirken; ağır kombine immün yetmezlik (AKİY) ve kombine immün yetmezlik hastalarında (KİY) daha

erken aylarda/yaşlarda ve daha ciddi bulgular görülebilmektedir. Hastanın öyküsünde özellikle tekrarlayan ya da normalden daha ciddi seyreden ya da fırsatçı enfeksiyon öyküsü dikkate alınmalıdır (28, 31). Jeffrey Modell Vakfı'nın yaptığı çalışmalar ve yayınladığı uyarıcı işaretler, bir hasta değerlendirilirken ne zaman immün yetmezlik şüphesi duyulması gerektiğine dair hekimlere yol göstermektedir (26). Buna göre bir yılda dört ya da daha fazla otitis media, bir yılda iki ya da daha fazla sinüzit, iki aydan daha uzun antibiyotik kullanılmasını gerektiren enfeksiyonlar, bir yılda iki ya da daha fazla pnömoni, büyümede gerilik/yavaşlama, tekrarlayan/derin cilt ya da organ absesi, ağızda ya da ciltte persistan mantar enfeksiyonu, intravenöz antibiyotik ihtiyacı olması, iki ya da daha fazla derin yerleşimli enfeksiyon (septisemi dahil) ve ailede primer immün yetmezlik öyküsü olması, 10 uyarıcı işaret olarak bildirilmiştir. Bazı tekrarlayan spesifik viral (Enterovirüs, Herpes vb.) ya da bakteriyel (Meningokok, Serratia vb.) enfeksiyonlar da yol gösterici olabilir. Normalden sık/ağır/nadir etkenler ile olan enfeksiyonlar dışında, ağır atopik dermatit/egzema ve immünglobulin E yüksekliği, birkaç otoimmün bulgu/hastalığın bir arada bulunması, ya da çok erken yaşlarda ortaya çıkan otoimmün hastalıklar (DM), enteropati, sınırlandırılmayan otoinflamasyon, uzun süreli/kontrol edilemeyen lenfoproliferasyon varlığı ya da malignensi gelişimi ile seyreden immün yetmezlikler de son dönemlerde tanımlanmaya ve bildirilmeye başlanmıştır (1, 3, 32, 33).

İmmün sistemin regülasyonunda bozukluk, yani immün sistemin dengede (homeostaz) tutulamaması ve durdurulamayan aktivasyonu; organizmanın kendi hücre ve dokularına zarar vermesi ya da hücrelerin kontrolsüz çoğalması ile sonuçlanır. Sağlıklı bireylerde immün sistemin dış etkenlere gerekli yanıtı verirken, kendi antijenlerine cevapsızlığı ve etkinleşen immün cevabın durdurulması ile ilgili mekanizmalarla, immün tolerans gerçekleşir (34). Hem B, hem de T lenfositler “santral” ve “periferik” tolerans mekanizmaları ile immünolojik açıdan organizmanın kendi hücrelerine cevapsız hale gelirler (35). Santral tolerans'ın ilk adımı T hücreleri için timusta ve B hücreleri için kemik iliğinde ve dalakta gerçekleşen pozitif veya negatif seleksiyondur. Pozitif seleksiyon ile timik kortekste, kortikal timik epitelyal hücrelerin “major histocompatibility complex” (MHC) molekülleri ile birlikte sunduğu antijeni tanıyabilen T hücre reseptörleri taşıyan hücreler olgunlaşmaya devam ederken, timik medullada negatif seleksiyon ile organizmanın kendisine karşı

reaksiyon veren (self-reaktif, MHC ile sunulan organizmanın kendi peptidlerini kuvvetle tanıyan) hücreler ortadan kaldırılır (delesyon, apoptoz) (36, 37). Organizmanın kendi antijenlerini tanıyan bazı CD4<sup>+</sup> T hücreler delesyona uğramaz, bunun yerine regülatör (düzenleyici) T hücreye (Treg) farklılaşır. Periferik toleransta önemli rol oynayan regülatör T hücreler (Treg) CD4<sup>+</sup>T hücrelerin bir alt grubudur; bu hücrelerin gelişimleri ve supresör fonksiyonları için mutlaka “forkhead box P3” (Foxp3) proteini gerekir. Regülatör T hücreler inhibitör sitokinler olan interlökin 10 (IL-10) ve “Transforming growth factor beta” (TGF- $\beta$ ) aracılığıyla otoreaktif hücreleri baskılayarak periferik toleransı sağlar. Kendi antijenlerine karşı cevap verebilecek şekilde gelişip timustan ayrılan T hücreler için immünolojik tolerans, periferik tolerans mekanizmaları (klonal delesyon, fonksiyonel cevapsızlık ve supresyon) ile sağlanmaktadır. B hücreleri için de periferik tolerans, anerji, supresyon, reseptör düzenlenmesi (receptor editing, spesifisite değişikliği) gibi mekanizmalar ile sağlanır. İmmün regülasyon mekanizmalarında meydana gelen bozukluklar sonucu hastalarda otoimmünite, lenfoproliferasyon ve malignensilere yatkınlık gibi immün disregülasyon bulguları gelişebilir. Uluslararası İmmün Yetmezlik Birliği (International Union of Immunodeficiency Societies (IUIS)) tarafından ayrı olarak sınıflandırılan immün disregülasyon hastalıkları otoimmünite, lenfoproliferasyon ve malignensilere yatkınlık ile karakterizedir; ancak diğer PİY’lerde de hastalık seyrinde bu bulgular gelişebilir (3). İmmün disregülasyon hastalıklarının altgrupları ve kalıtım şekilleri Tablo 2.1’ de verilmiştir.

**Tablo 2.1.** İmmün disregülasyon hastalıkları ve altgrupları\*

<b>a. Familial hemofagositik lenfohistiyozis (FHL)</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Perforin eksikliği (FHL2), <i>PRF1</i>, OR</li> <li>2. UNC13D/Munc13-4 eksikliği (FHL3), <i>UNC13D</i>, OR</li> <li>3. Sintaksin 11 eksikliği (FHL4), <i>STX11</i>, OR</li> <li>4. STXBP2/Munc18-2 eksikliği (FHL5), <i>STXBP2</i>, OD/OR</li> <li>5. FAAP24 eksikliği, <i>FAAP24</i>, OR</li> <li>6. SLC7A7 eksikliği, <i>SLC7A7</i>, OR</li> <li>7. RHOG eksikliği, <i>RHOG</i>, OR</li> </ol>
<b>b. Hipopigmentasyonla giden FHL sendromları</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Chediak-Higashi sendromu, <i>LYST</i>, OR</li> <li>2. Griscelli sendromu tip2, <i>RAB27A</i>, OR</li> <li>3. Hermansky-Pudlak sendromu tip2, <i>AP3B1</i>, OR</li> <li>4. Hermansky-Pudlak sendromu tip10, <i>AP3D1</i>, OR</li> <li>5. CEBPE neofonksiyonu, <i>CEBPE</i>, OR fonksiyon kazanımı</li> </ol>
<b>c. Regülatör T hücre defektleri</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. IPEX sendromu, <i>FOXP3</i>, XL</li> <li>2. CD25 eksikliği, <i>IL2RA</i>, OR</li> <li>3. CD122 eksikliği, <i>IL2RB</i>, OR</li> <li>4. CTLA4 haployetmezliği, <i>CTLA4</i>, OD</li> <li>5. LRBA eksikliği, <i>LRBA</i>, OR</li> <li>6. DEF6 eksikliği, <i>DEF6</i>, OR</li> <li>7. STAT3 mutasyonu, <i>STAT3</i>, OD fonksiyon kazanımı</li> <li>8. BACH2 eksikliği, <i>BACH2</i>, OD</li> <li>9. FERMT1 eksikliği, <i>FERMT1</i>, OR</li> <li>10. IKAROS mutasyonu, <i>IKZF1</i>, OD fonksiyon kazanımı</li> </ol>
<b>d. Otoimmünite, lenfoproliferasyon ile birlikte ya da değil</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. APECED, <i>AIRE</i>, OR/OD</li> <li>2. ITCH eksikliği, <i>ITCH</i>, OR</li> <li>3. Tripeptidil peptidaz 2 eksikliği, <i>TPP2</i>, OR</li> <li>4. JAK1 mutasyonu, <i>JAK1</i>, OD fonksiyon kazanımı</li> <li>5. Prolidaz eksikliği, <i>PEPD</i>, OR</li> <li>6. SOCS1 haplo-yetersizliği, <i>SOCS1</i>, OD</li> <li>7. PD-1 eksikliği, <i>PDCD1</i>, OR</li> </ol>
<b>e. Kolitle seyreden immün disregülasyon</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. IL10 eksikliği, <i>IL10</i>, OR</li> <li>2. IL10R eksikliği, <i>IL10RA-IL10RB</i>, OR</li> <li>3. NFAT5 haployetmezliği, <i>NFAT5</i>, OD</li> <li>4. TGFB1 eksikliği, <i>TGFB1</i>, OR</li> <li>5. RIPK1 eksikliği, <i>RIPK1</i>, OR</li> <li>6. ELF4 eksikliği, <i>ELF4</i>, XL</li> </ol>
<b>f. Otoimmün lenfoproliferatif sendrom</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. ALPS FAS, <i>TNFRSF6</i>, OD/OR</li> <li>2. ALPS FASLG, <i>TNFSF6</i>, OR</li> <li>3. ALPS kaspaz 10, <i>CASP10</i>, OD</li> <li>4. ALPS kaspaz 8, <i>CASP8</i>, OR</li> <li>5. FADD eksikliği, <i>FADD</i>, OR</li> </ol>
<b>g. EBV ve lenfoproliferasyona yatkınlık</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. SAP eksikliği (XLP1), <i>SH2D1A</i>, XL</li> <li>2. XIAP eksikliği (XLP2), <i>XIAP</i>, XL</li> <li>3. CD27 eksikliği, <i>CD27</i>, OR</li> <li>4. CD70 eksikliği, <i>CD70</i>, OR</li> <li>5. CTPS1 eksikliği, <i>CTPS1</i>, OR</li> <li>6. CD137 eksikliği, <i>TNFRSF9</i>, OR</li> <li>7. RASGRP1 eksikliği, <i>RASGRP1</i>, OR</li> <li>8. RLTPR eksikliği, <i>CARMIL2</i>, OR</li> <li>9. XMEN, <i>MAGT1</i>, XL</li> <li>10. PRKCD eksikliği, <i>PRKCD</i>, OR</li> <li>11. TET2 eksikliği, <i>TET2</i>, OR</li> </ol>

OD: otozomal dominant, OR: otozomal resesif, XL: X'e bağlı kalıtılan (X linked),

GOF: fonksiyon kazandırıcı (gain of function), CTLA4: cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4, LRBA: lipopolysaccharide -responsive and beige-like anchor protein, ALPS: otoimmün lenfoproliferatif sendrom, XLP: X' bağlı lenfoproliferatif hastalık, XMEN: X'e bağlı immün yetmezlik, magnezyum defekti, Epstein-Barr virüs enfeksiyonu, ve neoplazi, IPEX: immüendisregülasyon, poliendokrinopati, enteropati, X'e bağlı, APECED: otoimmün poliendokrinopati, kandidiazis, ektodermal distrofi

\*IUS 2022 sınıflamasına göre düzenlenmiştir.

Literatürde immün disregülasyonla ilişkili olabilecek birçok yolak ve molekül tanımlanmıştır. Bazı yolakların kontrolsüz aktivasyonu otoimmünite ve lenfoproliferasyon bulgularının ön planda olduğu klinik durumlar ile sonuçlanabilmektedir. İyi bilinen apoptoz yolağı, nükleer faktör-  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) ve fosfoinositid 3-kinaz (PI3K) yolaklarında yer alan bazı moleküllerin ekspresyonunun artması immün disregülasyon bulguları ile ilişkilendirilmiştir (9, 18, 34, 38, 39).

## **2.2. İmmün Disregülasyonla İlişkili Yolaklar**

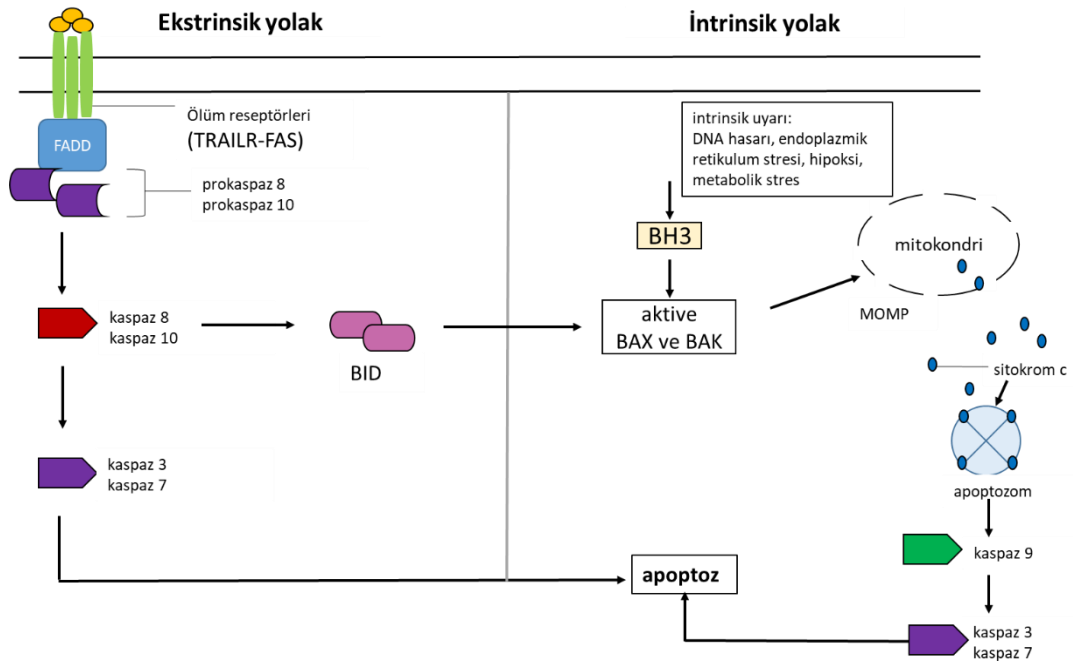
### **2.2.1. Apoptoz Yolağı**

Hücre sel canlılığın devam ettirilmesi kadar, gereksiz veya hasarlı hücrelerin ortadan kaldırılması da dokularda, organlarda ve tüm organizmada homeostazın sürdürülmesi için gereklidir. Bir tür hücre ölüm mekanizması olan apoptoz (programlanmış hücre ölümü), çeşitli moleküller arasındaki etkileşimler tarafından kontrol edilir ve istenmeyen hücrelerin vücuttan uzaklaştırılmasından sorumludur. Apoptoz, bir organizmada hücre sayısını sabit tutmak için doğal homeostatik mekanizmanın bir unsurudur ve dokunun, gelişim, büyüme veya yaşlanma sırasında hasar gören veya artık yönetilemeyen istenmeyen/gereksiz hücreleri ortadan kaldırmasına yardımcı olur. Apoptoz, hücre içinden (intrinsik) veya hücre dışından (ekstrinsik) gelen ölüm sinyalleri aracılığıyla tetiklenebilir. Apoptoz sürecindeki herhangi bir defekt otoimmün hastalıklar ve kanser gibi çeşitli klinik durumlara neden olabilir. Kaspazlar, apoptozis proteinlerinin inhibitörü, B hücre lenfoma (Bcl)-2 gen ailesi, tümör nekroz faktörü (TNF) reseptör gen süper ailesi veya p53 geni gibi farklı gen aileleri apoptozis sürecinde yer alır ve/veya işbirliği yapar.

Ekstrinsik veya intrinsik uyarılar, apoptotik sinyalizasyon kaskadını başlatabilir. “Fas ligand” (FASL-CD95L) veya “TNF-related apoptosis-inducing ligand” (TRAIL) gibi hücre dışı ölüm ligandları, önceden oluşturulmuş reseptör trimerlerine bağlanır (40). Ligand bağlandıktan sonra, adaptör protein “Fas associated death domain” (FADD), ölüm efektör alanı (DED: death effector domain) aracılığıyla reseptöre bağlanır. Kaspaz-8 daha sonra iki ölüm efektör alanı aracılığıyla, FADD'nin DED'ine bağlanır (41). Reseptör aktivasyonu sonucu bir araya gelen proteinler membrana bağlı ölüm indükleyici sinyal kompleksi (DISC: death-inducing signaling



complex) oluşturur (42). DISC'nin oluşumundan sonra, kaspaz-8 homodimerinin büyük ve küçük katalitik alt birimleri ayrılarak, diğer efektör kaspazları aktive eder ve aktif kaspaz-8 de Bid gibi substratları parçalayarak ekstrinsik ve intrinsik apoptotik yolu birbirine bağlar. DISC aracılı kaspaz-8 bölünmesi, proteaz aktivitesi olmayan DED içeren kaspaz benzeri bir protein olan “FLICE-like inhibitory protein CASP8 and FADD-like apoptosis regulator” (cFLIP) tarafından düzenlenir (43). DISC oluşumu aynı zamanda NF- $\kappa$ B aktivasyonuna ve sitokin gen indüksiyonuna yol açar (44). Kaspaz 10 da DISC'e gelir ve buradaki çeşitli süreçler sonucunda aktifleşir. Başlatıcı kaspazlardan 8 ve 10 yapısal ve işlevsel olarak homologdur. Birbirlerinden bağımsız olarak aktive edilebilir ve apoptozu indükleyebilirler (45). İki enzimin substrat özgülüğü genelde örtüşürken, birbirlerinden bağımsız farklı proteinlerde de etkileşime girdikleri bilinmektedir. Örneğin, hem kaspaz 8 hem de 10 in vivo kaspaz 3'ü, ancak sadece kaspaz 8 TNF aracılı NF- $\kappa$ B aktivasyonu için kritik bir kinaz olan reseptör etkileşimli proteini (RIP) keser ve böler. Şekil 2.1'de ekstrinsik ve intrinsik apoptoz yolları ve yer alan moleküller alıntılanmıştır (46).



**Şekil 2.1.** Ekstrinsik ve intrinsik apoptoz yolları

46 numaralı kaynaktan düzenlenerek alınmıştır (46).

Ekstrinsik yolak tarafından tetiklenen apoptoz sırasında, öncelikle tümör nekroz faktörü (TNF) gen süper ailesine ait membrana bağlı ölüm reseptörleri

aracılığıyla sinyalizasyon başlatılır. İlk sinyal, ligandlar ile Fas ligand/FasR, TNF/TNFR1, Apo2L/DR4 veya TNF-ilişkili apoptoz indükleyici ligand (TRAIL)R1 gibi hücre zarı ölüm reseptörleri arasındaki etkileşimlerle sağlanır (38, 47). Fas ligandının reseptörüne bağlanması adaptör protein olan Fas associated death domain'in (FADD) bağlanmasına neden olurken, TNF/tümör nekroz faktörü reseptörü (TNFR) etkileşimi TNFR-associated death domain'in (TRADD) bağlanmasına neden olur ve bu da pro-kaspaz-8 aktivasyonu ile sonuçlanır. Pro-kaspaz-8, ölüm indükleyici sinyal kompleksi yardımıyla otokatalitik olarak aktive edilir. Pro-kaspaz-8, dimerizasyon veya trimerizasyon yoluyla pro-kaspaz-8 aktivasyonunu tetikler. Kaspaz-8 de kaspaz-3, kaspaz 7, Bid ve ayrıca NF- $\kappa$ B'yi aktive eder. Fas-Fas ligand etkileşimi, lenfosit apoptozunda yer alan önemli bir ekstrinsik yoldur ve adaptör protein Fas-Associated Death Domain'in birleşmesi ve procaspaz 8 ve 10'un aktivasyonu ile sonuçlanır.

ALPS kronik, benign, enfeksiyöz olmayan lenfoproliferasyon, otoimmün belirtiler ve lenfomaya yatkınlık ile karakterizedir. Otoimmün belirtiler genelde kan hücrelerini hedef alır ve Coombs testi pozitif olan otoimmün hemolitik anemi, nötrofil ve trombosit antikorlarıyla ilişkili immün aracılı trombositopeni ve otoimmün nötropeni içerir (7, 48). ALPS hastalarında immünolojik özellikler temel olarak TCR $\alpha/\beta^+$ CD4 $^-$ CD8 $^-$  T hücre (DNT: double negative T cell/çift negatif T hücre) toplam lenfositlerin %1,5'una veya CD3 $^+$  T lenfositlerin %2,5'una eşit veya daha yüksek oranda artmasıyla karakterizedir. ALPS hastalarında sıklıkla poliklonal hipergamaglobulinemi görülür. Serum IL-10, IL-18, çözümlü FasL ve vitamin B12 seviyeleri FAS mutasyonu olan ALPS hastalarında artar ve bu hastaların tanısı için yararlı biyobelirteçler olabilir.

Fas-FasL apoptoz yolağının bileşenlerini kodlayan genlerdeki mutasyonlar (FAS, FASL, FADD, CASP8 ve CASP10) ALPS'ye yol açar (49). En sık FAS mutasyonları ALPS kliniğine neden olmakla birlikte, sadece birkaç hastada, Fas yolunun diğer bileşenlerinde hastalığa neden olan mutasyonlar tanımlanmıştır. FAS ligand eksikliği klinik olarak FAS eksikliğine birebir benzerken, FADD eksikliğinin klinik fenotipi daha karmaşıktır. Bu hastalarda değişken lenfoproliferasyon/splenomegali görülsa de, tekrarlayan ensefalopati, invaziv pnömokok hastalığı atakları ve ciddi viral enfeksiyonlar bildirilmiştir (50). Benzer

şekilde, CASP8 mutasyonları daha karmaşık bir kombine bağışıklık yetmezliğine neden olur.

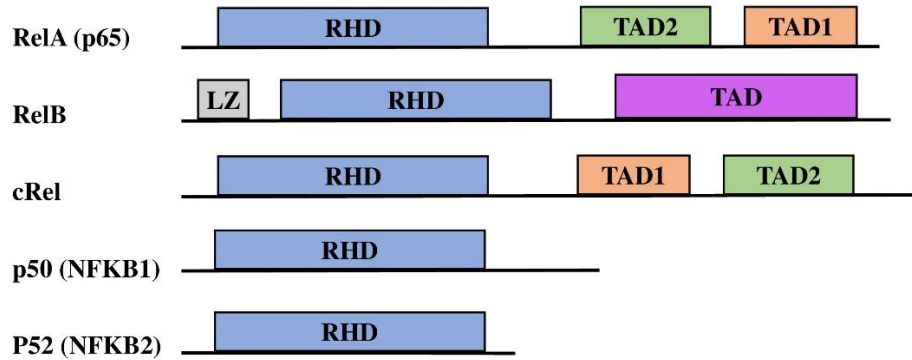
### 2.2.2. Nükleer Faktör- $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) Yolağı

Nükleer faktör-  $\kappa$ B, organizmada birçok hücrede ve özellikle immün sistem hücrelerinde bulunur. İmmün yanıtın oluşması, devam etmesi ve zamanında durdurulmasında rol alan genleri regüle eden bir uyarılabilir transkripsiyon faktörleri ailesidir. NF $\kappa$ B adını, aktive B lenfositlerin çekirdeklerinde, kappa hafif zincir geninin yakınına bağlanan bir transkripsiyon faktörü (nükleer faktör) olarak tanımlanmasından dolayı almıştır (51). Yapılan araştırmalar glia hücreleri, epitel ve endotel hücreleri, platelet ve hepatosit gibi hücre gruplarında da NF $\kappa$ B ifade edildiğini göstermiştir. NF $\kappa$ B hücre canlılığının devam ettirilmesi, büyüme, proliferasyon, apoptoz, anjiyogenez, immün yanıt, inflamasyon, hücre adezyonu ve farklılaşması gibi biyolojik süreçlerden sorumlu çeşitli genlerin ifadesini düzenler.

NF- $\kappa$ B ailesi üyeleri olan proteinler, hücre içinde beklemede (latens) inaktif olarak tutulan ve uyarı geldikten sonra genelde hızlı yanıt verilmesini sağlayan transkripsiyon faktörleridir. Uyarı ortadan kalktığında tekrar bekleme haline geri dönerler. İmmün yanıt sırasında B lenfositler ve doğal immün sistem hücreleri NF- $\kappa$ B aracılığı ile ilk aktive edilen hücrelerdir ve sonra T lenfositler uyarılarak aktive olması sağlanır. NF- $\kappa$ B hedef genleri sitokin/kemokinler ve reseptörleri, immün yanıtta rol alan diğer reseptörler, antijen sunumunda görevli proteinler, hücre adezyon molekülleri, apoptoz regülatörleri ve büyüme faktörleridir (52, 53). NF- $\kappa$ B, hem immün yanıtta rol alan sitokinlerin, kemokinlerin ve adezyon moleküllerinin üretimini artırır, hem de hücre proliferasyonu, apoptozu ve farklılaşmasını da kontrol ederek inflamasyon başlaması ve ilerlemesinde görev alır. Dolayısı ile NF- $\kappa$ B organizma için yaşamsal bir süreç olan sinyal iletiminde önemli roller oynamaktadır.

NF- $\kappa$ B ailesinin, yapısal olarak benzerlik gösteren beş üyesi bulunmaktadır. NF- $\kappa$ B1 (p50), NF- $\kappa$ B2 (p52), RelA (p65), RelB ve c-Rel, çeşitli hetero- veya homo-dimerler oluşturarak, belirli genlerin transkripsiyonunu regüle ederler (54). Bu proteinlerden oluşan dimerler gen transkripsiyonunu pozitif ya da negatif olarak düzenleyebilirler. Dimerlerin hangi hücre çeşidinde, inflamasyonun hangi evresinde

ve hangi miktarda oluştuğu immün cevabı şekillendirir. Beş proteinde ortak olarak “Rel homology domain” (RHD) vardır ve DNA bağlanması, dimerizasyon ve inhibitör proteinlerin bağlanmasını sağlar. RelA (p65), RelB, and c-Rel, C terminalde direkt gen transkripsiyonunu indükleyebilen transaktivasyon domainine (TAD) sahiptir. TAD domaini p50 ve p52’de bulunmaz ve bu moleküller homodimer oluşturduklarında DNA’daki spesifik bölgelere bağlanma için transkripsiyonel olarak aktif dimerlerle rekabete gireceklerinden, supresor olarak da sınıflandırılabilirler. Ancak TAD domaini içeren bir protein ile heterodimer oluşturduklarında transkripsiyonu pozitif yönde etkileyebilirler. NF- $\kappa$ B dimerleri sitoplazmada, “inhibitor of  $\kappa$ B” (I $\kappa$ B) ailesi üyelerinin de dahil olduğu inhibitör proteinler tarafından inaktif olarak tutulur. I $\kappa$ B protein ailesi, I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , I $\kappa$ B $\epsilon$ , Bcl-3, I $\kappa$ B $\zeta$ , I $\kappa$ BNS, I $\kappa$ B $\eta$  ve NF- $\kappa$ B öncülleri p100 (I $\kappa$ B $\delta$ ) ve p105 (I $\kappa$ B $\gamma$ )’i içermektedir. NF- $\kappa$ B1 ve NF- $\kappa$ B2’nin öncülleri olan p105 ve p100, yapısal olarak ve görev açısından I $\kappa$ B proteinlerine benzer. I $\kappa$ B ve I $\kappa$ B benzeri proteinler C terminal ankyrin tekrarlarına sahiptir ve bu şekilde NF- $\kappa$ B dimerleri ile etkileşime geçerler. p100 ve p105’in ankyrin içeren kısımları kısmi proteolize uğradıktan sonra oluşan p52 ve p50, homo/hetero-dimerler oluşturarak fonksiyon göstermeye başlar.



RHD: Rel homology domain, TAD: transactivation domain, LZ: leucine zipper

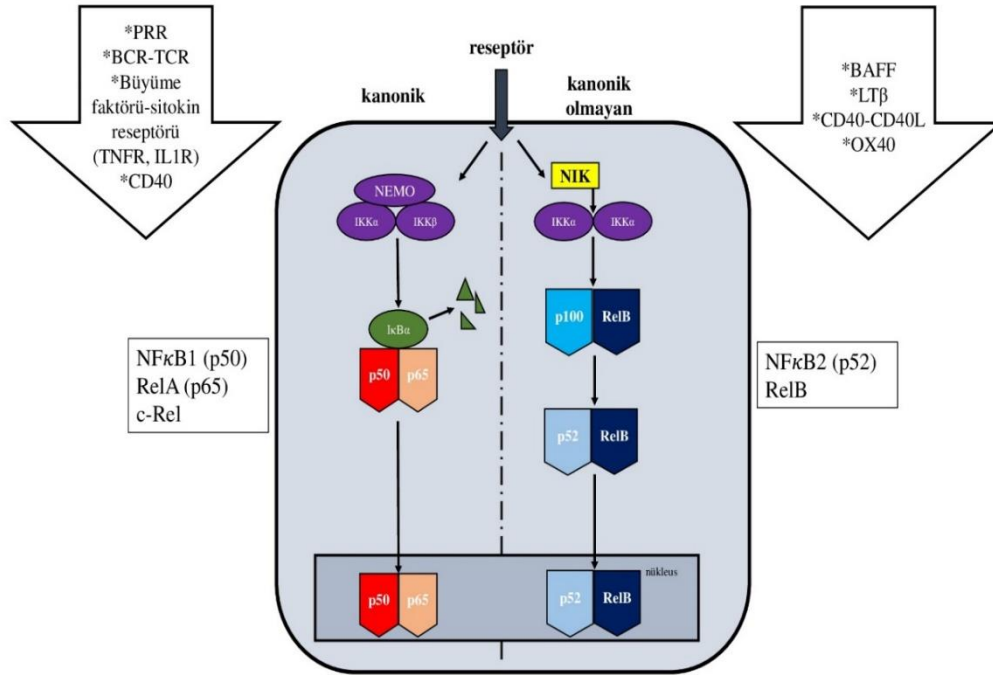
## Şekil 2.2. NF- $\kappa$ B proteinleri ve domainleri

Dinlenme halindeki hücrelerde, NF- $\kappa$ B dimerleri, I $\kappa$ B proteinleri tarafından inaktif halde tutulur. Hücre yüzeyinde bulunan ilgili reseptörlerin uyarılması ile, NF $\kappa$ B dimerleri serbest kalır ve dimerlerin çekirdeğe translokasyonu gerçekleşir. NF $\kappa$ B dimerleri, spesifik dizilere bağlanarak NF- $\kappa$ B hedef genlerinin transkripsiyonunu

düzenler. Farklı uyarılarla çeşitli hücre yüzeyi reseptörlerinin uyarılması sonucu, NF- $\kappa$ B'nin kanonik ve non-kanonik yollar aracılığı ile aktifleşmesi, çeşitli biyolojik süreçleri bütünleştirir.

I $\kappa$ B kinaz kompleksi (IKK), I $\kappa$ B proteinlerinin yıkımı için gerekli fosforilasyonunu gerçekleştirerek NF- $\kappa$ B yolağının aktivasyonunu sağlar. Aktivasyon sinyali hücre reseptörlerinden iletdikten sonra, I $\kappa$ B kinaz kompleksi I $\kappa$ B proteinlerini fosforile eder ve bunun sonucunda işaretlenmiş olan I $\kappa$ B'nin 48. pozisyondaki lizin (K48) rezidüsünden başlayarak poli-ubikitinasyonu gerçekleştirir ve I $\kappa$ B'nin proteozomal yıkımı sonucu NF- $\kappa$ B dimerleri serbestleşerek nükleusa geçerler. IKK kompleksi IKK $\alpha$  veya IKK $\beta$  kinazları ile non-katalitik düzenleyici altbirim "NF $\kappa$ B esansiyel modülatörü" (NEMO-IKK $\gamma$ )' dan oluşur.

I $\kappa$ B'nin, kanonik (klasik) ve kanonik olmayan (alternatif) yollardan posttranslasyonel modifikasyonu, aslında NF- $\kappa$ B aktivasyonunun ilk basamağıdır (51, 55). Kanonik NF- $\kappa$ B yolağı, sitokin-büyüme faktörü reseptörleri (TNFR: tümör nekrozis faktör reseptörü, IL1R: interlökin 1 reseptörü), patern tanıma reseptörleri (PRR), özellikle TLR (Toll-like reseptörler) ve B ve T hücre reseptörlerinin uyarılması sonrası aktifleşir. Kanonik yolak aktive olduğunda, I $\kappa$ B $\alpha$  öncelikle IKK $\beta$  tarafından fosforillenir ve ubikitinasyonu başlar, sonra da yıkıma uğrar ve NF- $\kappa$ B dimerleri p65:p50 nükleusa geçerek DNA hedef bölgelerine bağlanır. Kanonik olmayan yolak CD40-CD40L, B lenfosit aktivasyon faktörü (BAFF) ve lenfotoksin  $\beta$  (LT $\beta$ ) tarafından uyarılabilir ve IKK $\alpha$  aracılı p100:RelB fosforilasyonundan sonra, p100'ün kısmi yıkımı gerçekleşir ve p52:RelB dimerinin aktif hale gelerek nükleusa yer değiştirmesi sağlanır. Genelde kanonik yolak aracılığı ile p65:p50, kanonik olmayan yolak aracılığı ile p52:RelB dimerlerinin aktivasyonu sağlanır. p50 molekülü p65, RelB veya c-Rel ile heterodimerler oluşturarak transkripsiyonel bir aktivatör olarak görev yapabilir; p50 homodimerleri ve p50/p52 heterodimerleri ise aktivatör olarak fonksiyon gösteremez. Klasik yolak hızlı bir immün yanıttır ve inflamasyonda görev alır; alternatif yolak yeni protein yapımı gerçekleştiği göz önünde bulundurulursa daha yavaş ve kalıcı bir yanıttır ve lenfogeneizde rol oynar.



**Şekil 2.3.** Kanonik ve kanonik olmayan NF-κB yolları

Kanonik NF-κB yolağını aktive eden sitokinlerden en iyi bilineni tümör nekroz faktörü  $\alpha$  (TNF $\alpha$ )'dır. TNF molekülünün TNF reseptörüne bağlanması ile, "Receptor-interacting protein kinase 1" (RIPK1), "Tumor necrosis factor receptor type 1 associated death domain protein" (TRADD), "TNF receptor associated factor 2" (TRAF2), "cellular inhibitor of apoptosis protein" (cIAP), "Transforming growth factor-beta activated kinase binding protein" (TAB) ve "Transforming growth factor-beta activated kinase 1" (TAK1) ve "linear ubiquitination assembly complex" (LUBAC) ile birlikte bir megakompleks meydana getirir (56). İmmün yanıt sırasında NEMO, IκB, p100, MALT1, BCL10 gibi birçok protein görev düzenleyici ya da yıkımsal ubiquitinasyona uğrayabilir (57). Kanonik yolda LUBAC tarafından başlatılan lineer ubiquitinasyon süreçleri yolağın aktivasyonunun sağlanabilmesi için gereklidir. LUBAC kompleksi "Haem-oxidized IRP2 ubiquitin ligase-1" (HOIL), "HOIL-1 interacting protein, E3 ligaz" (HOIP) ve "SHANK-associated RH domain interacting protein" (SHARPIN) olmak üzere üç proteinden meydana gelir. "CYLD lysine 63 deubiquitinase" (CYLD), "OTU deubiquitinase with linear linkage specificity" (OTULIN) ve "TNF alpha induced protein 3" (A20/TNFAIP3) deubikitinazları ise, NF-κB negatif feedback mekanizmasının ana bileşenleridir (58). TNF reseptörüne yakın yerleşen megakompleks ile, IKK fosforilasyonu ile IKK'nın

kinaz aktivitesi uyarılır ve NEMO'nun ubiquitinasyonu sağlanarak, I $\kappa$ B yıkımı sonrası NF- $\kappa$ B aktif hale gelir.

B ve T hücrelerinde “Caspase recruitment domain containing protein 11” (CARD11): “B-cell lymphoma/leukemia 10” (BCL10): “Mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation protein 1” (MALT1) yani CBM (CARD11:BCL10:MALT1) kompleksi ile NF- $\kappa$ B indüklenir ve aktifleşir (55). B ya da T hücre reseptörü uyarıldıktan sonra CARD11 reseptöre yakın bir konuma yerleşir ve T hücrelerde “protein kinaz C- $\theta$ ” (PKC $\theta$ )-B hücrelerde “protein kinaz C- $\beta$ ” (PKC $\beta$ ) aracılığı ile fosforillenerek oligomerizasyonu başlatılır ve CARD11, BCL10 ve MALT1 bir araya getirilir. CBM kompleksi aracılığı ile “TNF receptor associated factor 6” (TRAF6), TAK1, TAB2/3 ve LUBAC yakın konumlanır ve IKK $\alpha$ - $\beta$  fosforilasyonu ve NEMO ubiquitinasyonu gerçekleştirilerek, B ve T lenfositlerde yolak aktivasyonu sağlanır.

Alternatif NF $\kappa$ B yolağı lenfoid organogenez için önemlidir. Non-kanonik NF- $\kappa$ B yolağı aktivasyonu sonucunda RelB-p52 heterodimerleri nükleusa yer değiştirerek görev yapar. Alternatif yolak “Tumor necrosis factor receptor superfamily member 12A” (TNFRSF12A-Tweak reseptörü), lenfotoksin  $\beta$  reseptörü (LT $\beta$ R), B-hücresi aktive edici faktör reseptörü (BAFF-R), NF- $\kappa$ B reseptör aktivatörü (RANK; Receptor activator of NF $\kappa$ B), CD40 ve CD27 reseptörleri aracılığı ile uyarılır. Bu yolak IKK $\alpha$ 'ya bağımlı, IKK $\beta$  ve NEMO'dan ise bağımsızdır. Non-kanonik NF $\kappa$ B yolağında en önemli süreç, NF $\kappa$ B2'nin öncül proteini p100'ün modifikasyonudur. p100, kanonik olmayan yolağın ana negatif regülatörüdür. Alternatif yolağın aktivasyonunun en önemli unsuru olan “NF $\kappa$ B inducing kinase” (NIK) aktivitesinin düzenlenmesi de post-translasyonel mekanizmalarla gerçekleştirilir. İstirahat halindeki hücrelerde NIK, tümör nekroz faktörü reseptörüyle ilişkili faktör 2 ve 3'e (TRAF2/3) ve apoptoz proteini 1 ve 2 hücrel inhibitörüne (cIAP1/2) bağlıdır ve NIK'in sürekli devam eden şekilde ubiquitinasyonu ve sonuçta degradasyonu sağlanır. CD40L, TNF benzeri zayıf apoptoz indükleyicisi (TWEAK), lenfotoksin alfa/beta (LT $\alpha$ / $\beta$ ), endotoksin lipopolisakkarit (LPS) aracılığı ile uyarı geldiğinde TRAF2/3, cIAP1 tarafından ubiquitinasyon için hücre zarında tutulur; TRAF3 ubiquitinasyonu gerçekleşerek yıkıma uğrar ve NIK'in hücre içinde artmasına olanak sağlanır (59). Hücreler uyarıldıktan

sonra TRAF2/3, cIAP aracılığı ile NIK stabilizasyonu sağlanır ve böylece NIK aktifleşir (60). NIK aracılığı ile fosforilasyon sonrası aktifleşen IKK $\alpha$  da p100'ü fosforilleyerek yıkılmasına ve p52 oluşmasına neden olur. Serbestleşen RelB:p52 dimeri nükleusa yer değiştirir. NIK ve non-kanonik yolak ayrıca B-T-hücreleri, makrofajlar ve dendritik hücrelerin işlevlerinde kritik roller oynar.

TLR'ler, B ve T hücre reseptörleri üzerinden NF $\kappa$ B kanonik yolağın kontrolsüz aktivasyonu aynı zamanda otoimmüniteden sorumlu süreçleri de başlatmaktadır (9). B hücrelerinde, apoptotik hücre artıklarının yetersiz temizlenmesi, endozomal TLR7 ve TLR9'u uyarabilen nükleik asitleri serbest bırakır. TLR7 ve TLR9 aracılı NF $\kappa$ B aktivasyonu MyD88, "interleukin-1 receptor associated kinase" (IRAK) kinaz ailesi ve TRAF6'ya bağlıdır. Bu TLR reseptörleri, antikor üretimini artırmak amacıyla NF- $\kappa$ B'yi aktive etmek için B hücre reseptörü ile birlikte çalışabilir. Dendritik hücreler, antijene özgü T hücrelerinin kaderini değiştirerek ya da yönlendirerek periferik toleransın oluşmasına katkıda bulunur. Dendritik hücreler T hücrelerine kendi antijenlerini sunarak, bu T hücrelerinin anerjisine veya silinmesine yol açabilen geçici T hücresi aktivasyonu sağlar. Dolayısıyla dendritik hücre aracılı tolerans, T hücre reseptörü aracılı NF $\kappa$ B sinyalizasyonu gerektiren aktif bir süreçtir. TNFR ve IL1R inflamasyonun başlatılması için önemli reseptörlerdir (9). IL-1'in, otoinflamasyon hastalıklarının patogeneziindeki rolü iyi bilinmektedir. IL-1, çeşitli pro-inflamatuar sitokinlerin ekspresyonunda kilit rol oynar. TNF $\alpha$ , inflamatuvar süreçleri modüle eden güçlü bir proinflamatuvar sitokindir ve hızlı indüksiyonu immün yanıtın düzenlenmesi için temel mekanizmalardan biridir. Monositler ve makrofajlar TNF aracılı sinyal iletiminin önemli hücresel araçlarıdır. Kronik TNF uyarımı, otoimmünite gibi NF $\kappa$ B'nin kontrolsüz aktive olduğu hastalıklara yol açar.

NF- $\kappa$ B yolağında yer alan çeşitli moleküllerin fonksiyon kaybı ya da kazanımları primer immün yetmezlik hastalıklarına neden olmaktadır. Hastalık tabloları çok geniş bir yelpazede karşımıza çıkmaktadır. CARD9, CARD11, NEMO, IKK $\alpha$  eksikliğine bağlı gelişen durumlarda enfeksiyonların ön planda olduğu immün hastalıklar görülürken; sinyal yolağının regülasyonunda görev alan OTULIN, A20, RELA eksikliğinde otoinflamasyonun dikkat çektiği klinik durumlar görülür. Yolakta görev yapan BCL10, MALT1, RIPK1, HOIL1, HOIP, NFKB1, NFKB2 gibi pek çok



molekölün eksikliğinde/fonksiyon kazanımında oimmünite, otoinflamasyon, lenfoproliferasyon, malignensilere yatkınlık ve atopi gibi bulgular görülebilmektedir (9, 61).

Bu bilgiler ışığında yolağın ana efektör molekülleri “Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells 1” (NFkB1) ve “Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells 2” (NFkB2), aktivator molekülleri “Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7” (MAP3K7) ve “Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 14” (MAP3K14) ve ana inhibitör molekülleri “NF-Kappa-B inhibitor alpha” (NFkBIA) ve “Tumor necrosis factor receptor associated factor 3” (TRAF3)’tür.

### 2.2.3. Fosfoinositid 3-kinaz (PI3K) Yolağı

Fosfoinositid 3 kinazlar (PI3K), lipid kinazlardır ve hücre sel büyüme, farklılaşma, proliferasyon, hücre hareketliliğı ve kemotaksis üzerinde etkileri mevcuttur (62). Üç PI3K sınıfı arasında özellikle PI3K $\delta$  (sınıf IA) lenfositlerde ve miyeloid hücrelerde ifade edilir (63). PI3K $\delta$ , p110 $\delta$  katalitik alt biriminden (*PIK3CD* geni tarafından kodlanır) ve p85 $\alpha$  düzenleyici alt biriminden (*PIK3RI* geni tarafından kodlanır) oluşan heterodimerik bir yapıya sahiptir (39). Sınıf I PI3K'lar, fosfatidilinositol-4,5-bisfosfatın (PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>) fosforilasyonunu katalize ederek fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfat (PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>) üretilmesini sağlar ve bu da “pleckstrin homology” (PH) domainine sahip hücre sinyal proteinleri için bir membran bağlayıcısı görevi görür. PH domainine sahip proteinler arasında öne çıkanlar, “phosphoinositide-dependent kinase 1” (PDK1) ve “RAC-alpha serine/threonine-protein kinase” (AKT)’tir. PDK1 ve AKT fosforilasyonu ve aktivasyonu sonucu FOXO transkripsiyon faktörleri ve “mechanistic target of rapamycin” (mTOR) kompleksi 1’in fosforilasyonu gerçekleşir (39, 64). Bu fosforilasyon FOXO transkripsiyon faktörlerini etkisiz hale getirirken, mTOR’u etkin hale getirir. Dolayısı ile sınıf I PI3K'ların aktivasyonu, FOXO transkripsiyon faktörlerinin inaktivasyonuna ancak mTOR'un aktivasyonuna neden olur. AKT ve mTOR yolağın ana efektörleridir. Lipid fosfataz “Phosphatase and tensin homolog” (PTEN), PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>’ü PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>'ye geri dönüştürür.

*PIK3CD* veya *PIK3RI* genlerindeki fonksiyon kazanımı ile sonuçlanan mutasyonlardan dolayı mTOR yolu aşırı aktivasyonu gerçekleşir. PI3K yolağı kontrolsüz aktivasyonu sonucu otozomal dominant kalıtmı kombine primer immün yetmezlik olan aktive fosfoinozimid 3-kinaz delta sendromu (APDS) görülür (65). APDS esas olarak enfeksiyonlar, otoimmünite ve lenfoproliferasyon ile karakterizedir. Aktive fosfoinozimid 3-kinaz- $\delta$  (PI3K $\delta$ ) sendromunun klinik belirtileri çeşitli ve heterojendir, ancak hastaların çoğunluğunda genellikle hava yolu kronik değişiklikleri (bronşektazi) ve kulak ve sinüs hasarıyla sonuçlanan tekrarlayan solunum yolu enfeksiyonları görülür; bu da antikör (ve dolayısıyla B hücresi) eksikliğini ya da fonksiyon kaybını düşündürür. Herpes ailesi virüsleriyle şiddetli, tekrarlayan veya kalıcı enfeksiyonlar, defektif T hücresi fonksiyonunu gösterir. Çoğu hastada genellikle hepatosplenomegalinin eşlik ettiği benign lenfadenopati gelişir ve APDS ile ilişkili B hücreli lenfoma riski önemli ölçüde artar. PI3K/AKT/mTOR yolu hastalıklarının klinik presentasyonları ve immünolojik fenotipleri çeşitlidir. Hastalarda enfeksiyonları önlemek ve tedavi etmek için immünoglobulin replasman tedavisi (IgRT) ve profilaktik antibiyotikler, otoimmünite ve lenfoproliferasyonu kontrol etmek için immünosüpresif/immünomodülatör tedaviler kullanılır. Özellikle tedaviye dirençli veya genç hastalarda hematopoetik kök hücre nakli (HKHN) uygun bir seçenektir. Hedeflenmiş tedavi olarak daha az yan etkiye sahip mTOR inhibitörleri (rapamisin) ya da PI3K $\delta$  inhibitörleri hastalar için avantajlıdır (66).

### 3. BİREYLER ve YÖNTEM

#### 3.1. Bireyler

Çalışmaya 32 hasta ve 21 sağlıklı birey aydınlatılmış onamları alınarak dahil edilmiştir. Dahil edilen hastalar toplamda üç grup olarak alınmıştır. Birinci gruba otoimmün lenfoproliferatif sendrom kliniği olan 10 hasta, ikinci gruba nedeni belli olmayan immün sitopeni (otoimmün hemolitik anemi ve/veya lökopeni ve/veya idiyoPATİK-immün trombositopeni) nedeni ile başvuran 12 hasta, üçüncü gruba EBV ilişkili lenfoproliferasyon (lenfadenopati ve/veya splenomegali) kliniği olan 10 hasta alınmıştır. Bu hastaların yaş ve cinsiyet dağılımına uygun 21 sağlıklı kontrol, kontrol grubunu oluşturmuştur. Hastaların çalışmaya alınma esnasında moleküler tanısının bulunmamasına dikkat edilmiştir. Hastalar 1 Eylül 2022 ve 1 Eylül 2023 tarihleri arasında Hacettepe Üniversitesi İhsan Doğramacı Çocuk Hastanesi Çocuk İmmünoloji bölümüne başvuran çocuk ve erişkin hastalar arasından seçilmiştir. Sağlıklı kontroller ve hasta bireyler aynı yaş grubunda olup Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi'ne başvuran ve immün yetmezliği ya da herhangi bir hastalığı olmayan bireyler arasından seçilmiştir. Tüm hastalar aydınlatılmış onamları alınarak çalışmaya dahil edilmiştir.

#### 3.2. Yöntem

Otoimmünite ve lenfoproliferasyon bulguları ile giden immün disregülasyon hastalıklarında rol aldığını bildiğimiz yolların değerlendirmesi amacıyla belirlenmiş olan genler için RT-PCR analizi yapılmıştır. Hastalardan ve kontrollerden alınan örneklerden izole edilen RNA ile hedef genler (CASP8, CASP10, FAS, FASL, AKT, MAP3K7 (TAK1), MAP3K14 (NIK), mTOR, NFKB1, NFKB2, NFKBIA, TRAF3) için gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (real time quantitative polymerase chain reaction/RT-qPCR) analizi yapılmıştır. Hastalardan ve kontrollerden alınan kandan RNA izole edilerek, cDNA sentez kiti ile cDNA elde edilmiş, -80°C'de saklanmış ve bütün hasta ve kontroller için örnek toplama işlemi tamamlandığında RT-PCR çalışması gerçekleştirilmiştir. Tüm çalışmalar Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı İmmünoloji Bilim Dalında ve Pediatrik İmmünoloji Laboratuvarında yapılmıştır. İstatistiksel analizler için SPSS 23.0 yazılımı kullanılmıştır.

### **3.2.1. Hastalardan Ayrıntılı Öykü Alınması, Fizik Muayene Yapılması ve Bazal İmmünolojik Tetkiklerinin Değerlendirilmesi (Hasta Değerlendirmesi)**

Hacettepe Üniversitesi İhsan Doğramacı Çocuk Hastanesi Çocuk İmmünoloji bölümüne, otoimmün lenfoproliferatif sendrom kliniği ya da nedeni belli olmayan immün sitopeni (otoimmün hemolitik anemi ve/veya lökopeni ve/veya idiyopatik-immün trombositopeni) ya da EBV ilişkili lenfoproliferasyon (lenfadenopati ve/veya splenomegali) ile başvuran ve moleküler tanısı olmayan hastalar arasından toplam 32 çalışma hastası seçilerek onam formları imzalatılmış ve hasta verileri buna göre kayıt edilmiştir. Enfeksiyon profili, otoimmün bulgular, lenfoproliferasyon açısından ayrıntılı öyküleri alınmış, aile öyküleri-ebeveynler arası akrabalık sorgulanmış, fizik muayeneleri yapılmış ve bazal immünolojik-otoimmünite tetkikleri (tam kan sayımı, kantitatif immünglobulinler (IgA-G-M-E), anti HBs, anti A/B antikoları (hasta 2 yaşında ya da daha büyükse), lenfosit alt grup analizi, nitroblue tetrazolium testi, lenfosit aktivasyon testi, T-B hücre alt grup analizi, TCR $\alpha\beta$ + CD4-CD8- T hücre oranı, direkt coombs, anti-nükleer antikor, anti dsDNA ve diğer otoantikolar, EBV DNA, parvovirus PCR) değerlendirilmiştir (67, 68). Daha önce yapılmış olan muayeneleri, tetkikleri ve uygulanmış olan tedaviler hasta dosyasından ya da Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi nucleus sisteminden kaydedilmiştir.

### **3.2.2. RNA İzolasyonu ve Kantifikasyonu**

Hastalar ve sağlıklı kontrollerden alınan maksimum 1.5 cc tam kandan (tercihen mikrolitre başına 4000-7000 lökosit) RNA izole edilmiştir. Eritrositlerin uzaklaştırılmasının RNA izolasyonunu kolaylaştırması nedeni ile eritrositlerin seçici lizisi yapılmıştır. 1 hacim tam kan 5 hacim eritrosit lizis tamponu ile karıştırılarak, buz üzerinde 10-15 dakika, aralıklı vorteks ile karıştırılarak, inkübe edilmiştir. İnkübasyon sırasında eritrositler parçalandığı için yarı saydam hale gelen süspansiyon, 4°C'de 10 dakika boyunca 400 x g'de santrifüjlenerek, süpernatant tamamen çıkarılıp atılmıştır. Daha sonra tekrar eritrosit lizis tamponu ekleyip (tam kan hacmi başına 2 hacim eritrosit lizis tamponu), kısa bir süre vortekslenerek hücreler tekrar süspansiyon edilmiştir. Tekrar 4°C'de 10 dakika boyunca 400 x g'de santrifüjlenerek, oluşan süpernatant çıkarılıp atılmıştır. Başlangıçta 1.5 ml tam kan kullanıldığı için, peletlenmiş lökositlere 600 µl RLT (guanidin tiyosiyanat) tamponu eklenmiştir ve

vortekslenerek karıştırılmıştır. Lizat doğrudan 2 ml toplama tüpü içindeki QIAshredder döndürme kolonuna pipetlenmiştir ve homojenleştirmek için maksimum hızda 2 dakika santrifüjlenmiştir. QIAshredder döndürme kolonu atılarak, homojenize lizat alınmıştır. Homojenize edilmiş lizata 1 hacim (600 µl) %70 etanol eklenmiş ve pipetlenerek karıştırılmıştır. Numune, yeni bir QIAamp döndürme kolonuna pipetlenmiştir. 8000 x g'de ( $\geq 10.000$  rpm) 15 saniye santrifüjlenmiştir. Altaki toplama tüpü atılıp, QIAamp döndürme kolonu yeni bir 2 ml toplama tüpüne aktararak, QIAamp döndürme kolonuna 700 µl Tampon RW1 (az miktarda guanidin tiyosiyanat) uygulanmış ve yıkamak için  $\geq 8000$  x g'de ( $\geq 10.000$  rpm) 15 saniye santrifüjlenmiştir. Toplama tüpü atıldıktan sonra, QIAamp döndürme kolonu yeni bir 2 ml toplama tüpüne yerleştirilerek, QIAamp döndürme kolonuna 500 µl RPE tamponu (membrana bağlı RNA'nın yıkanması amacıyla) eklenmiş ve  $\geq 8000$  x g'de ( $\geq 10.000$  rpm) 15 saniye santrifüjlenmiştir. Toplama tüpü atılıp, QIAamp döndürme kolonuna 500 µl RPE tamponu eklenerek 3 dakika 20.000 x g'de (14.000 rpm) santrifüjlenmiştir. Son olarak QIAamp döndürme kolonu 1,5 ml'lik bir mikrosantrifüj tüpüne aktararak, 30-50 µl RNaz içermeyen su, doğrudan QIAamp membranı üzerine pipetlenerek,  $\geq 8000$  x g'de ( $\geq 10.000$  rpm) 1 dakika santrifüjlenmiştir ve RNA izolasyonu tamamlanarak ölçüme hazır hale getirilmiştir. RNA konsantrasyonları NanoDrop ND-1000 spektrofotometresi ile ölçülmüştür ve RNA'nın saflığını değerlendirmek için 260 nm ve 280 nm'deki absorbans oranı kullanılarak, 260/280 oranları kayıt altına alınmıştır. Ardından cDNA sentez aşamasına geçilerek RT-qPCR çalışması gerçekleştirilmiştir.

### **3.2.3. Revers Transkripsiyon ve Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu/RT-qPCR**

RNA buz üzerinde çözdürüldükten sonra, gDNA Wipeout tamponu, Quantiscript revers transkriptaz, Quantiscript RT tamponu, RT primer miks ve RNase içermeyen su oda sıcaklığında (15-25°C) çözdürülmüştür. Genomik DNA eliminasyon reaksiyonunu (gDNA Wipeout tamponu, RNA, RNaz içermeyen su) buz üzerinde hazırlanarak, uygun hacimdeki ana karışım (master mix) her bir RNA örneğinin ardından ayrı ayrı tüplere dağıtılmıştır. Tüpleri buz üzerinde tutularak deneye devam edilmiş ve 42°C'de 2 dakika inkübe edildikten sonra, hemen buz üzerine yerleştirilerek, hazırlanan revers transkripsiyon ana karışımı (Quantiscript revers

transkriptaz, Quantiscript RT tamponu, RT primer miks) tüplere dağıtılmış ve RNA içeren karışım bu tüplerin üzerine eklenerek, buz üzerinde karıştırılmıştır. 42°C'de 15 dakika inkübe edildikten sonra, Quantiscript revers transkriptazı inaktive etmek için 95°C'de 3 dakika tekrar inkübe edilmiştir. Tamamlanan her revers transkripsiyon reaksiyonundan bir alikot gerçek zamanlı PCR karışımına eklenmiştir. 2x QuantiNova SYBR Green Master Mix, template cDNA, QuantiNova LNA PCR Assay ve RNaz içermeyen su kullanılarak kit protokolüne göre karışımları hazırlanmıştır. Hedef genler ve housekeeping gen olarak HPRT1 (hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1/ Hipoksantin Fosforibosiltransferaz 1) gen bölgelerine özel primerler kullanılmıştır. Reaksiyon karışımı protokole göre hazırlanmıştır. Bu amaçla, 10 µL 2xQuantiNova SYBR Green Master Mix, 2 µL QuantiNova LNA PCR Assay, 2 µL template cDNA, 6 µL RNaz içermeyen su konularak total karışım volümü 20 µL olarak belirlenmiştir. Tüm pipetlemeler soğuk blok üzerinde gerçekleştirilmiştir. Tüm örnekler iki kuyucukta çalışılmıştır. Belirlenen miktarda reaksiyon karışımı PCR tüplerine aktarılmıştır. Reaksiyon karışımı (2x QuantiNova SYBR Green Master Mix, QuantiNova LNA PCR Assay ve RNaz içermeyen su) içeren PCR tüplerine template cDNA eklenmiştir. PCR tüpleri real-time cycler'a konulup ve program başlangıç ısıtma aktivasyonu (95°C, 2 dakika) ve ardından 40 siklus olacak şekilde denatürasyon (95°C, 5 sn) ile kombine annealing/uzatma fazı (60°C, 10 sn) olarak belirlenmiştir. Eşik değeri daha hassas değerlendirme sağlaması nedeniyle  $10^{-3}$  olarak kabul edilmiştir. Eşik döngüsü (Ct) ise PCR'da sistemin ürünün miktarındaki artışı floresan miktarındaki artışla fark ettiği ve ürünün eksponensiyel olarak artmaya başladığı zaman olarak belirlenmiştir. 40 döngünün üzerindeki Ct değeri hesaba katılmamıştır. Sağlıklı kontrol grubunun medyanına kıyasla HPRT1'in medyan kat değişimi, her hasta için hedef genlerin ifade seviyesinin değerlendirilmesinde kullanılmıştır. Hasta ve sağlıklı kontrollerden elde edilen her örnek duplike çalışılmıştır. Gen ifadesindeki kat değişikliği logaritmik Delta-Delta Ct ( $2^{(-\text{delta delta CT})}$ ) metodu kullanılarak değerlendirilmiştir.

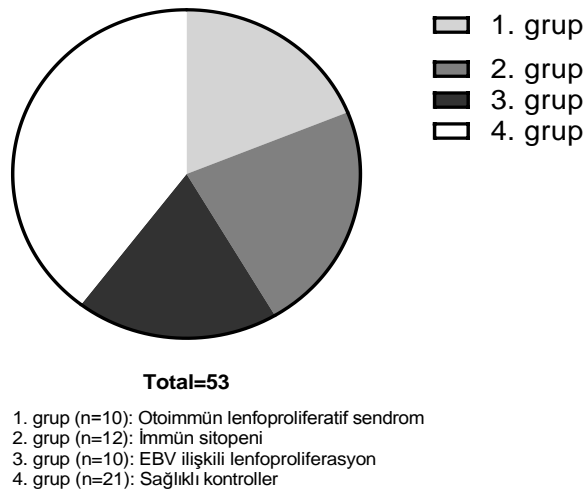
### 3.2.4 Verilerin Analizi

Her bir hastanın ve sağlıklı kontrolün klinik ve laboratuvar verileri Excel tablosuna kaydedilmiştir. Ardından bu veriler SPSS 23.0 yazılımına aktarılmıştır.

Normallik varsayımının sınanmasında Shapiro-Wilk veya Kolmogorov Smirnov testi kullanılmıştır. Verilerin normal dağılması durumunda parametrik testler, normal dağılmaması durumunda ise parametrik olmayan testler kullanılmıştır. Parametrik test varsayımlarının sağlandığı durumda, iki bağımsız grubun karşılaştırılmasında İki Ortalama Arasındaki Farkın Anlamlılık Testi (Independent Samples t Test), ikiden fazla bağımsız grubun karşılaştırılmasında Tek Yönlü Varyans Analizi (One-way ANOVA) kullanılmıştır. Normal dağılmayan verilerde Mann Whitney U testi ile Kruskal Wallis H testi kullanılmıştır. Korelasyon analizinde normal olan seriler için Pearson korelasyonu, normal dağılmayan verilerde Spearman Brown korelasyonu kullanılmıştır. Normal dağılan veriler için ortalama ve standart sapma, normal dağılmayan veriler için ortanca, çeyrekler açıklığı (IQR: interquartile range) ve minimum-maksimum değerleri verilmiştir.

## 4. BULGULAR

Çalışmaya kriterleri karşılayan toplam 32 hasta ve 21 sağlıklı kontrol dahil edilmiştir. Hasta grubu toplamda üç grup olarak alınmıştır. Otoimmün lenfoproliferatif sendrom kliniği olan 10 hasta (%31,3) birinci grubu, nedeni belli olmayan immün sitopeni (otoimmün hemolitik anemi ve/veya lökopeni ve/veya idiyopatik-immün trombositopeni) nedeni ile başvuran 12 hasta (%37,5) ikinci grubu, EBV ilişkili lenfoproliferasyon (lenfadenopati ve/veya splenomegali) kliniği olan 10 hasta (%31,3) üçüncü grubu oluşturmaktadır. Bu hastaların yaş ve cinsiyet dağılımına uygun 21 sağlıklı birey ise kontrol grubunu oluşturmaktadır. Hasta grubundaki bireylerin ortalama yaşı 16,7 yıl (IQR: 10,9-35,5 yıl, minimum-maksimum: 4,4-58 yıl) olarak hesaplanmıştır. Kontrol grubundaki bireylerin ortalama yaşı 10 yıl (IQR: 7,5-22,5 yıl, min-maks: 3-45 yıl)'dır. Çalışmaya dahil edilen hasta ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı yaş farkı bulunmamaktadır ( $p>0,05$ ). Hasta grubunda 13 kız (%40,6), 19 erkek (%59,4) bulunmaktadır. Kontrol grubunda 12 kız (%57,1), dokuz erkek (42,9) bulunmaktadır. Cinsiyet açısından hasta ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamaktadır ( $p>0,05$ ). Hasta grubundaki bireylerin semptom başlama ortalama yaşı 11 yıl (IQR: 3,1-22,9 yıl, min-maks: 0,5-45 yıl)'tır. Hastaların hastaneye başvuru ortalama yaşı 12 yıl (IQR: 6,9-34,1 yıl, min-maks: 0,9-54,7 yıl) olarak belirlenmiştir. Hastaların 11 tanesinin (34,4) anne babası arasında akrabalık mevcuttur ve bir hastanın (%3,1) soygeçmişinde nedeni belli olmayan kronik böbrek yetmezliği nedeni ile kardeş ölüm öyküsü mevcuttur.



**Şekil 4.1.** Çalışmaya dahil edilen hasta grupları-kontrol grubu ve sayısal dağılım



İlk grup olan ALPS grubundaki hastalarda semptomların başlangıç yaşı medyan değeri 9,3 yıl (min-maks: 0,5-38,7 yıl) ve hastane başvurusu sırasında medyan yaş 12 yıl (min-maks: 1,9-38,7 yıl) olarak bulunmuştur. İkinci grup olan immün sitopeni hastalarında semptomların başlangıç yaşı medyan değeri 5,7 yıl (0,7-19 yıl) ve hastane başvurusundaki medyan yaş 9,4 yıl (2,3-35 yıl) olarak hesaplanmıştır. Üçüncü grup olan EBV ilişkili lenfoproliferasyon grubundaki hastalarda semptomların başlangıç yaşı medyan değeri 22,5 yıl (0,7-45 yıl) ve hastaneye başvuru anındaki medyan yaş 34,8 yıl (0,9-54,7 yıl) olarak bulunmuştur. Hasta grupları arasında semptom başlama yaşı açısından istatistiksel açıdan anlamlı fark bulunmamaktadır ( $p>0,05$ ). Hasta grupları arasında başvuru yaşı açısından istatistiksel açıdan anlamlı fark bulunmamaktadır ( $p>0,05$ ).

**Tablo 4.1.** Kontrolle karşılaştırmalı olarak grupların demografik bulguları (grup 1: ALPS, grup 2: immün sitopeni, grup 3: EBV ilişkili lenfoproliferasyon)

	<b>Grup 1</b>	<b>Grup 2</b>	<b>Grup 3</b>	<b>Toplam hasta</b>	<b>Kontrol</b>
<b>n</b>	10	12	10	32	21
<b>Yaş (yıl)*</b>	16,7 (4,9-39)	13,2 (4,4-36)	36 (9,5-58)	16,7 (4,4-58)	10 (3-45)
<b>K/E</b>	1/9	7/5	5/5	13/19	12/9
<b>Akrabalık</b>	3 (30%)	3 (25%)	5 (50%)	11 (34,4%)	
<b>Semptom yaşı (yıl)*</b>	9,3 (0,5-38,7)	5,7 (0,7-19)	22,5 (0,7-45)	11 (0,5-45)	
<b>Başvuru yaşı (yıl)*</b>	12 (1,9-38,7)	9,4 (2,3-35)	34,8 (0,9-54,7)	12 (0,9-54,7)	

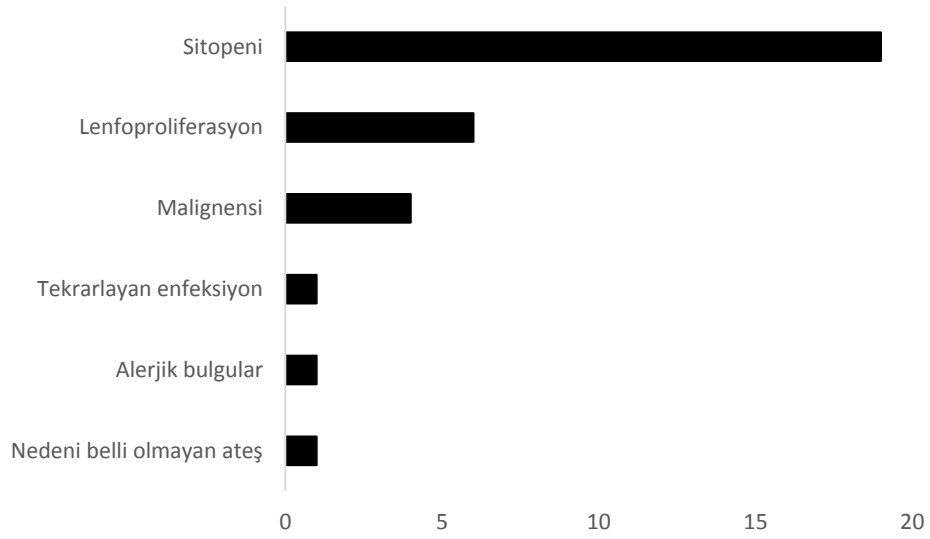
\*Yaş değerleri grubun ortanca yaşı ve minimum-maksimum değerler olarak verilmiştir.

Hasta grupları ile kontrol grubu arasında ve hasta gruplarının birbiri ile karşılaştırılmasında, yaş açısından istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur ( $p>0,05$ ).

n: gruplardaki toplam hasta sayısı, K/E: kız/erkek, Grup 1: ALPS, Grup 2: sitopeni, Grup 3: EBV ilişkili lenfoproliferasyon

#### 4.1. Klinik Bulgular

Hasta grubunun klinik bulguları incelendiğinde, başvuruya neden olan ilk semptom ve bulgular öncelikle değerlendirilmiş; ilk semptomun 19 hastada (%59,4) sitopeni, altı hastada (%18,8) lenfoproliferasyon bulguları, dört hastada (%12,5) malignensi, bir hastada (%3,1) tekrarlayan enfeksiyon, bir hastada (%3,1) alerjik bulgu olduğu görülmüştür. Bir hastada ise enfeksiyon nedeni olmayan tekrarlayan ateş ilk başvuru semptomu ya da bulgusu olarak karşımıza çıkmaktadır.



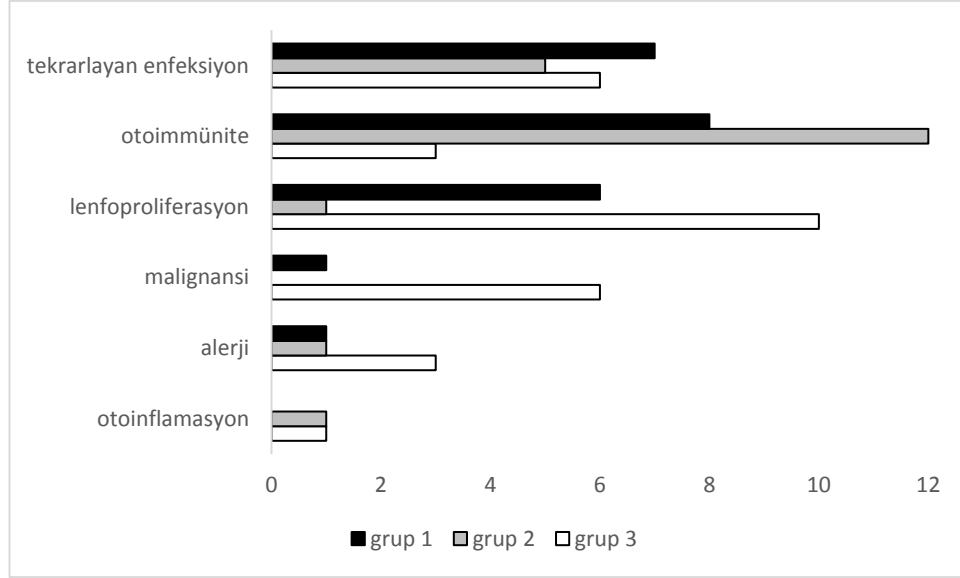
**Şekil 4.2.** Hastalarda görülen başvuruya neden olan ilk semptom ve bulgular

Çalışmadaki 18 hastada (%56,3) tekrarlayan enfeksiyon olduğu görülmüştür; 16 hastada (%50) üst solunum yolu enfeksiyonu (altı hastada (%18,8) rekürren otitis media ve iki (%6,3) hastada rekürren sinüzit), 10 hastada (%31,3) tekrarlayan akciğer enfeksiyonu, dört hastada (%12,5) vücudun çeşitli bölgelerinde siğil, üç hastada (%9,4) mukokutanöz herpes enfeksiyonu, iki hastada (%6,3) tekrarlayan yüzeysel abseler, iki hastada (%6,3) mukokütanöz kandidiyazis, bir hastada (%3,1) tekrarlayan idrar yolu enfeksiyonu, bir hastada (%3,1) geçirilmiş menenjit ve 11 hastada (%34,4) enfeksiyon nedeni ile hastaneye yatış öyküsü mevcuttu. Tekrarlayan enfeksiyonlardan dolayı dört hastanın (%12,5) akciğer bilgisayarlı tomografisinde kronik değişiklik bulgusu; iki hastada (%6,3) bronşiektazi ve atelektazi, iki hastada (%6,3) ise atelektazi mevcuttu. Herhangi bir alerjik bulgu bulunan hasta sayısı beş (%15,6) olarak bulunmuştur; iki hastada (%6,3) egzema, iki hastada (%6,3) besin alerjisi, bir hastada (%3,1) atopik dermatit, bir hastada (%3,1) astım mevcuttu.

Hasta grubunda 23 hastada (%71,9) klinik ya da laboratuvar otoimmün bulgu ve iki hastada (%6,3) otoinflamasyon bulgusu saptanmıştır. Otoimmün bulgu saptanan hastaların 21'inde (%65,6) otoimmün sitopeni, 15'inde (%46,9) antinükleer antikor (ANA) pozitifliği ( $>1/100$ ), ikisinde (%6,3) otoimmün tiroidit ve birinde (%3,1) otoimmün hepatit olduğu görülmüştür. Otoinflamasyon saptanan bir hastada Behçet hastalığı, diğer hastada ailevi akdeniz ateşi tanısı mevcuttu.

Lenfoproliferasyon 17 hastada (%53,1), EBV ilişkili lenfoproliferasyon ise 12 hastada (%37,5) saptanmıştır. Üçüncü grup olan EBV ilişkili lenfoproliferasyon (lenfadenopati ve/veya splenomegali) kliniği olan 10 hastada ve birinci grup olan otoimmün lenfoproliferatif sendrom kliniği olan hastaların ikisinde yani toplam 12 hastada EBV ilişkili lenfoproliferasyon görülmüştür. Toplamda yedi hastada (%21,9) malignite olduğu görülmüştür; bir hastada foliküler yardımcı T hücre kökenli lenfoma, Non-Hodgkin lenfoma (NHL) ve medüller tiroid kanseri, bir hastada sol testis yolk sac tümörü, bir hastada NHL, bir hastada NHL ve Kaposi sarkomu, bir hastada difüz büyük B hücreli lenfoma, bir hastada Klasik Hodgkin Lenfoma (HL), bir hastada da HL (EBER pozitif) ve Burkitt lenfoma (EBER negatif) tanıları mevcuttu. Bazı hastanın farklı zamanlarda ortaya çıkan birden çok malignitesi mevcuttu. Hastaların ek sistemik hastalıkları incelendiğinde bir hastanın boy kısalığı nedeni ile tetkik edildiği, üç hastanın dirençli trombositopeni nedeni ile splenektomize olduğu, bir hastada vezikoüreteral reflü ve bir hastada sitomegalovirüs (CMV-cytomegalovirus) koliti olduğu görülmüştür.

Hasta grupları ayrı ayrı incelendiğinde ALPS grubunda ilk semptom/bulgu altı hastada (%60) sitopeni ve dört hastada (%40) lenfoproliferasyondu. İkinci gruptaki 12 hastanın tamamında (%100) ilk semptom/bulgu sitopeniydi. Üçüncü gruptaki dört hasta (%40) malignite gelişimi, iki hasta (%20) lenfoproliferasyon, bir hasta (%10) sitopeni, bir hasta (%10) tekrarlayan enfeksiyon, bir hasta (%10) enfeksiyöz olmayan ateş ve bir hasta (%10) alerji semptomları nedeniyle başvurmuştu. Hasta gruplarında görülen klinik bulgular ve hasta sayıları Şekil 4.3'de verilmiştir.



**Şekil 4.3.** Hasta gruplarında görülen klinik bulgular (grup 1: ALPS, grup 2: immün sitopeni, grup 3: EBV ilişkili lenfoproliferasyon)

Hastaların fizik muayene bulguları incelendiğinde 17 hastanın lenfadenopatisi (%53,1), 14 hastanın (%43,8) splenomegalisi, 13 hastanın (%40,6) hepatomegalisi olduğu görülmüştür.

#### 4.2. Laboratuvar Bulguları

Hastaların laboratuvar bulguları incelendiğinde; sitopeni grubu (ikinci grup) dışındaki hastalarda da sitopeni görülmüştür. Tüm hasta grubu içinde 12 hastada (%37,5) lenfopeni, 12 hastada (%37,5) trombositopeni, sekiz hastada (%25) lökopeni, altı hastada (%18,8) anemi, altı hastada (%18,8) nötropeni, bir hastada (%3,1) eozinofili ve üç hastada (%9,4) pansitopeni saptanmıştır. 10 hastada (%31,3) birden fazla seriye ait sitopeni saptanmıştır. Hastaların hemoglobin değeri ortalaması  $11,9 \pm 2,3$  gr/dL, lökosit değeri ortalaması  $7,2 \pm 4 \times 10^3/\mu\text{L}$ , mutlak nötrofil değeri ortalaması  $3,4 \pm 1,9 \times 10^3/\mu\text{L}$ , mutlak lenfosit değeri ortancası 2,3 (IQR: 1,3-3,9 / min-maks: 0,3-8,8)  $\times 10^3/\mu\text{L}$ , trombosit değeri ortancası 173,5 (IQR: 47,5-274,5 / min-maks: 3-645)  $\times 10^3/\mu\text{L}$  idi. İmmünglobulin değerlerinin yaşa göre referans aralıkları baz alınarak; immünglobulin A değeri 17 hastada (%53,1) normal, 14 hastada (%43,8) düşük ve bir hastada (%3,1) yüksek, immünglobulin G değeri 20 hastada (%62,5) normal, dokuz hastada (%28,1) düşük ve üç hastada (%9,4) yüksek, immünglobulin M değeri 18 hastada (%56,3) normal ve 14 hastada (%43,8) düşük, immünglobulin E

değeri dört hastada (%12,5) 150 IU/mL'den yüksek ve bir hastada (%3,1) 1000 IU/mL'den yüksek bulunmuştur. Tüm hasta grubunda IgA değerleri ortalaması  $100 \pm 90$  mg/dL, IgG değerleri ortancası 977,5 (IQR: 795-1450 / min-maks: 86,7-2710) mg/dL, IgM değerleri ortancası 74,3 (IQR: 52,7-124 / min-maks: 11,6-288) mg/dL ve IgE değerleri ortancası 11,1 (IQR: 2,9-65,1 / min-maks: 1-1454) mg/dL olarak hesaplanmıştır. Anti-Hbs (anti-hepatit B yüzey antijeni) antikorunun 24 hastada (%75) pozitif, altı hastada (%18,8) negatif ve iki hastada (%6,3) bakılmadığı görülmüştür. Anti A/B değerinin ise 1/16 değeri sınır alınarak, 16 hastada (%50) normal, dört hastada (%12,5) düşük ve 12 hastada bakılmamış olduğu görülmüştür. ANA antikor titresi değerlendirilmiş; 17 hastada (%53,1) negatif ve 15 hastada (%46,9) pozitif olduğu ve 10 hastada (%31,3) 1/100, dört hastada (%12,5) 1/320 ve bir hastada (%3,1) 1/1000 olduğu saptanmıştır. Hastalarda bakılmış olan diğer otoantikolar değerlendirildiğinde, altı hastada (%18,8) anti-tiroid peroksidaz antikor (Anti-TPO) pozitifliği, dört hastada (%12,5) anti-tiroglobulin antikor (Anti-TG) pozitifliği, dört hastada (%12,5) lupus antikoagülan (LA) pozitifliği, birer (%3,1) hastada anti-deamine gliadin peptid antikor ve Anti-DFS70 antikor pozitifliği olduğu görülmüştür.

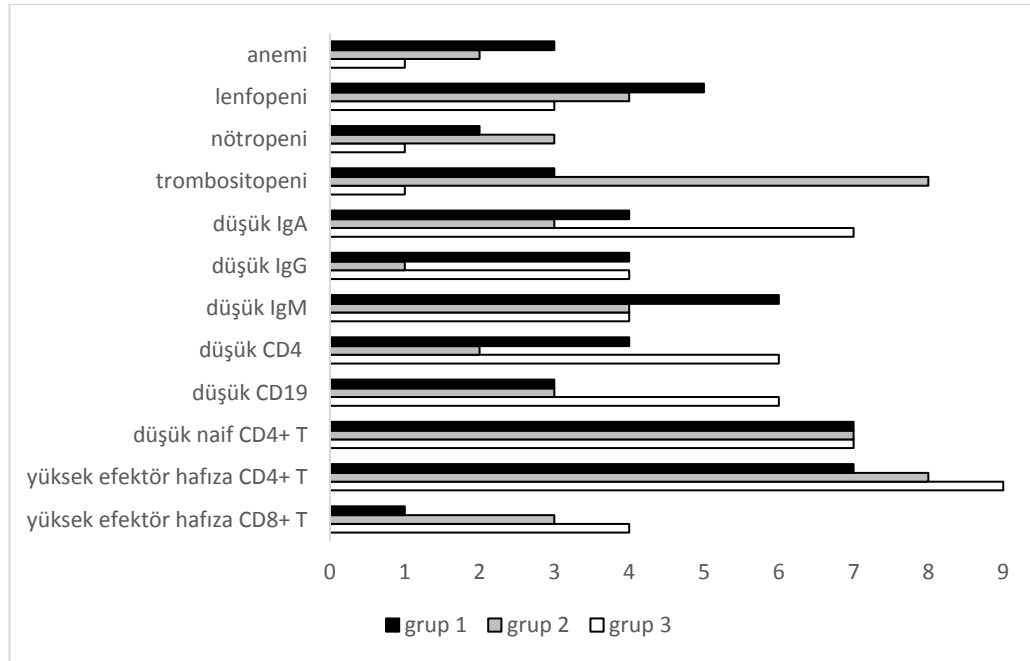
Lenfosit altgrup analizlerinde 12 hastada (%37,5) CD4<sup>+</sup> yardımcı T lenfosit, 12 hastada (%37,5) CD19<sup>+</sup> B lenfosit, dört hastada (%12,5) CD16/56<sup>+</sup> doğal öldürücü (natural killer/NK) hücre, iki hastada (%6,2) CD3<sup>+</sup> T lenfosit ve bir hastada (%3,1) CD8<sup>+</sup> sitotoksik T lenfosit yüzde ve mutlak değerlerinde düşme saptanmıştır. Hasta grubunda CD3<sup>+</sup> T lenfosit yüzde ve mutlak değerleri 23 hastada (%71,9) normal ve yedi hastada (%21,9) yüksek, CD4<sup>+</sup> yardımcı T lenfosit 16 hastada (%50) normal ve dört hastada (%12,5) yüksek, CD8<sup>+</sup> sitotoksik T lenfosit 19 hastada (%59,4) normal ve 12 hastada (%37,5) yüksek, CD16/56<sup>+</sup> doğal öldürücü hücre 25 hastada (%78,1) normal ve üç hastada (%9,4) yüksek, CD19<sup>+</sup> B lenfosit 19 hastada (%59,4) normal ve bir hastada (%3,1) yüksek bulunmuştur. CD3<sup>+</sup> T lenfosit yüzde değerleri ortancası 77 (IQR:72-82, min-maks: 29-95), CD4<sup>+</sup> yardımcı T lenfosit ortalaması  $36 \pm 13$ , CD8<sup>+</sup> sitotoksik T lenfosit ortalaması  $35 \pm 12$ , CD16/56<sup>+</sup> doğal öldürücü hücre ortancası 7,5 (IQR: 4,5-14,5 / min-maks: 0,5-60), CD19<sup>+</sup> B lenfosit ortalaması  $12 \pm 8$  olarak hesaplanmıştır. TCR $\alpha/\beta^+$ CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> T hücre (DNT: double negative T cell/çift negatif T hücre) düzeyi %6'dan yüksek olan altı hasta (%18,8) olduğu görülmüştür ve DNT değerleri ortancası 4 (IQR: 2-6, min-maks: 0-75)'tür. Otoimmün lenfoproliferatif

sendrom grubundaki 10 hastadan üçünde (%30), immün sitopeni grubundaki 12 hastadan ikisinde (%16,7) ve EBV ilişkili lenfoproliferasyon grubundaki 10 hastadan birinde (%10) TCR $\alpha/\beta^+$ CD4 $^-$ CD8 $^-$  T hücre düzeyi %6'dan yüksektir. Lenfosit aktivasyon testi dört hastada (%12,5) referans değerlere göre düşük olarak değerlendirildi. T hücre altgrup analizleri değerlendirilmiştir ve naif yardımcı T hücre (CD3 $^+$ CD4 $^+$ CD27 $^+$ CD45RA $^+$ ) düzeyinin 21 hastada (%65,6) düşük ve 11 hastada (%34,4) normal, santral hafıza (santral memory) yardımcı T hücre (CD3 $^+$ CD4 $^+$ CD27 $^+$ CD45RA $^-$ ) düzeyinin 24 hastada (%75) normal, beş hastada (%15,6) yüksek ve üç hastada (%9,4) düşük, efektör hafıza (memory) yardımcı T hücre (CD3 $^+$ CD4 $^+$ CD27 $^-$ CD45RA $^-$ ) düzeyinin 24 hastada (%75) yüksek ve sekiz hastada (%25) normal, son derece farklılaşmış efektör hafıza (memory) yardımcı T hücre (CD3 $^+$ CD4 $^+$ CD45RA $^+$ CD27 $^-$ /TEMRA: terminally differentiated effector memory) düzeyinin 16 hastada (%50) normal ve 16 hastada (%50) yüksek, TREC (T-cell receptor excision circle/T hücre reseptörü eksizyon halkaları) düzeyinin 23 hastada (%71,9) normal ve dokuz hastada (%28,1) düşük, naif sitotoksik T hücre (CD3 $^+$ CD8 $^+$ CD45RA $^+$ CD197 $^+$ ) düzeyinin 24 hastada (%75) normal, altı hastada (%18,8) düşük ve iki hastada (%6,2) yüksek, santral hafıza (santral memory) sitotoksik T hücre (CD3 $^+$ CD8 $^+$ CD45RA $^-$ CD197 $^+$ ) düzeyinin 16 hastada (%50) normal, 11 hastada (%34,4) düşük ve beş hastada (%15,6) yüksek, efektör hafıza (memory) sitotoksik T hücre (CD3 $^+$ CD8 $^+$ CD45RA $^-$ CD197 $^-$ ) düzeyinin 16 hastada (%50) normal, sekiz hastada (%25) düşük ve sekiz hastada (%25) yüksek, son derece farklılaşmış efektör hafıza (memory) sitotoksik T hücre (CD3 $^+$ CD8 $^+$ CD45RA $^+$ CD197 $^-$ /TEMRA: terminally differentiated effector memory) düzeyinin 27 hastada (%84,4) normal, üç hastada (%9,4) yüksek ve iki hastada (%6,2) düşük olduğu belirlenmiştir. B hücre altgrup analizleri değerlendirilmiştir ve naif B hücre (CD19 $^+$ CD27 $^-$ IgM $^+$ IgD $^+$ ) düzeylerinin 18 hastada (%56,3) normal, 13 hastada (%40,6) yüksek ve bir hastada (%3,1) düşük, hafıza (memory) B hücre (CD19 $^+$ CD27 $^+$ IgM $^+$ IgD $^-$ ) düzeyinin 19 hastada (%59,4) düşük, 12 hastada (%37,5) normal ve bir hastada (%3,1) yüksek, switch hafıza (memory) B hücre (CD19 $^+$ CD27 $^+$ IgM $^-$ IgD $^-$ ) düzeyinin 19 hastada (%59,4) düşük, 12 hastada (%37,5) normal ve bir hastada (%3,1) yüksek, marjinal zon B hücre (CD19 $^+$ CD27 $^+$ CD21 $^{hi}$ IgM $^{hi}$ IgD $^+$ ) düzeyi 18 hastada (%56,2) normal ve 14 hastada (%43,8) düşük, aktive B hücre (CD19 $^+$ CD38 $^-$ CD21 $^{low}$ ) düzeyinin 25 hastada

(%78,1) normal, beş hastada (%15,6) yüksek ve iki hastada (%6,3) düşük, transizyonel B hücre (CD19<sup>+</sup>CD38<sup>hi</sup>IgM<sup>hi</sup>CD24<sup>hi</sup>) düzeyinin 22 hastada (%68,7) normal, yedi hastada (%21,9) düşük ve üç hastada (%9,4) yüksek olduğu belirlenmiştir.

EBV DNA pozitifliği sekiz hastada (%25) saptanmıştır ve bu hastalar arasında (n=8), EBV DNA düzeyleri bir hastada (%12,5) 500 kopya/ml değerinin altında, iki hastada (%25) 500-10000 kopya/ml değerleri arasında ve beş hastada (%62,5) 10000 kopya/ml değerinin üzerinde saptanmıştır. Sitopenisi olan hastaların tamamına parvovirüs PCR (polymerase chain reaction/polimeraz zincir reaksiyonu) bakılmış ve hepsinde negatif bulunmuştur.

Hasta gruplarında görülen laboratuvar bulguları Şekil 4.4’de verilmiştir.



**Şekil 4.4.** Hasta gruplarında görülen laboratuvar bulgular (grup 1: ALPS, grup 2: immün sitopeni, grup 3: EBV ilişkili lenfoproliferasyon)

### 4.3. Genetik Analiz Sonuçları

Çalışmada değerlendirilen sekiz hastada (%25), çalışma yürütüldüğü sırada genetik defekt saptanmıştır. Saptanan genetik defektler Tablo 4.1’de verilmiştir.

**Tablo 4.2.** Hastalarda saptanan genetik defektler ve özellikleri

Grup	Hasta	Defekt	Özellikler
1	H2	<i>FAS</i> heterozigot	c.776T>C p.Ile259Thr ACMG: patojenik
1	H8	<i>FASL</i> heterozigot	c.259T>C p.Phe87Leu ACMG: klinik önemi bilinmeyen varyant (VUS*)
1	H20	<i>IL21R</i> homozigot	c.209C>T p.Ser70Leu ACMG: klinik önemi bilinmeyen varyant
2	H25	<i>SRP72</i> heterozigot	c.1164G>T p.Leu388Phe ACMG: klinik önemi bilinmeyen varyant
3	H14	<i>PIK3CD</i> heterozigot	c.1574A>G p.Glu525Gly ACMG: patojenik
3	H16	<i>SKIV2L</i> homozigot	c.1732C>T p.Arg578Cys ACMG: klinik önemi bilinmeyen varyant
3	H19	<i>UNC13D</i> birleşik heterozigot	c.1829G>A, Arg610His ACMG: klinik önemi bilinmeyen varyant  c.2917A>G, Lys973Glu ACMG: klinik önemi bilinmeyen varyant
3	H31	<i>UBA1</i> hemizigot	c.2667G>T p.Lys889Asn ACMG: klinik önemi bilinmeyen varyant

ACMG: The American College of Medical Genetics and Genomics, \*VUS: variant of uncertain significance



**Tablo 4.3.** Hastaların klinik özellikleri

Hasta grubu	Hasta	Cinsiyet	Semptom yaşı (yıl)	Başyuru yaşı (yıl)	İlk semptom	Tekrarlayan enfeksiyon	Otoimmünite	Lenfoproliferasyon	EBV- Lenfoproliferasyon	Malignite	Genetik defekt
ALPS	1	Erkek	26,8	26,8	sitopeni	+	sitopeni, ANA+	+	-	-	-
ALPS	2	Erkek	0,5	4,2	lenfoproliferasyon	+		+	+	-	FAS heterozigot
ALPS	8	Erkek	1,4	1,9	sitopeni	+	sitopeni	-	-	-	FASL heterozigot
ALPS	11	Erkek	7	8,9	sitopeni	-	sitopeni	-	-	-	-
ALPS	13	Erkek	29,4	37,5	sitopeni	+	sitopeni	+	-	-	-
ALPS	15	Kız	11,8	12,3	sitopeni	-	sitopeni	-	-	-	-
ALPS	20	Erkek	1,5	7,2	sitopeni	+	sitopeni	+	-	-	IL21R homozigot
ALPS	22	Erkek	3	12,3	lenfoproliferasyon	-	sitopeni, ANA+	-	-	-	-
ALPS	24	Erkek	11,7	11,7	lenfoproliferasyon	+	sitopeni, ANA+	+	-	-	-
ALPS	29	Erkek	38,7	38,8	lenfoproliferasyon	+	-	+	+	Difüz büyük B hücreli lenfoma	-
sitopeni	3	Erkek	15,2	16	sitopeni	+	sitopeni, ANA+	-	-	-	-
sitopeni	4	Erkek	3,3	3,5	sitopeni	-	sitopeni, ANA+	-	-	-	-
sitopeni	5	Kız	4,3	7,8	sitopeni	-	sitopeni, ANA+	-	-	-	-
sitopeni	6	Kız	5	10,6	sitopeni	+	sitopeni, ANA+	-	-	-	-
sitopeni	9	Kız	10,4	10,8	sitopeni	-	sitopeni	-	-	-	-
sitopeni	17	Erkek	15,3	16,6	sitopeni	-	sitopeni, ANA+	-	-	-	-
sitopeni	18	Kız	15,5	16,5	sitopeni	-	sitopeni, ANA+	-	-	-	-
sitopeni	21	Kız	0,8	8,3	sitopeni	-	sitopeni	-	-	-	-
sitopeni	23	Erkek	6,3	6,6	sitopeni	-	sitopeni, ANA+, otoimmün hepatit	-	-	-	-
sitopeni	25	Kız	0,7	2,3	sitopeni	+	sitopeni	-	-	-	SRP72 heterozigot
sitopeni	26	Kız	19	35	sitopeni	+	sitopeni, ANA+	+	-	-	-
sitopeni	27	Erkek	4,3	5,4	sitopeni	+	sitopeni, ANA+	-	-	-	-
EBV ilişkili lenfoproliferasyon	7	Kız	13	33,2	sitopeni	-	sitopeni, ANA+, otoimmün tiroidit	+	+	-	-
EBV ilişkili lenfoproliferasyon	10	Kız	8	9,2	tekrarlayan enfeksiyon	+	-	+	+	-	-
EBV ilişkili lenfoproliferasyon	12	Kız	45	54,7	lenfoproliferasyon	-	-	+	+	Foliküler yardımcı T hücre kökenli lenfoma, NHL, medüller tiroid kanseri	-

Tablo 4.3. (devamı)

Hasta grubu	Hasta	Cinsiyet	Semptom yaşı (yıl)	Başvuru yaşı (yıl)	İlk semptom	Tekrarlayan enfeksiyon	Otoimmünite	Lenfoproliferasyon	EBV- Lenfoproliferasyon	Malignite	Genetik defekt
EBV ilişkili lenfoproliferasyon	14	Erkek	1,8	5,3	malignite	+	-	+	+	sol testis yolak sac tümörü	PIK3CD heterozigot
EBV ilişkili lenfoproliferasyon	16	Erkek	36	36,5	malignite	+	-	+	+	NHL	SKIV2L homozigot
EBV ilişkili lenfoproliferasyon	19	Erkek	32	48	malignite	+	-	+	+	NHL, Kaposi sarkom	UNC13D compound heterozigot
EBV ilişkili lenfoproliferasyon	28	Kız	43,5	43,8	lenfoproliferasyon	+	ANA+	+	+	-	-
EBV ilişkili lenfoproliferasyon	30	Kız	0,7	0,9	besin alerjisi	+	ANA+	+	+	Klasik HL	-
EBV ilişkili lenfoproliferasyon	31	Erkek	33	39,5	malignite	-	-	+	+	2016 HL (EBER pozitif), 2022 Burkitt lenfoma (EBER negatif)	UBA1 hemizigot
EBV ilişkili lenfoproliferasyon	32	Erkek	12,5	12,9	tekrarlayan ateş	-	-	+	+	-	-

#### 4.4. Hedef gen RT-PCR analizleri

Hasta ve kontrol grubu hedef gen ekspresyonları kat farkları ( $2^{-(\Delta\Delta CT)}$ ) yani rölatif kantifikasyon değerleri karşılaştırılmıştır. Veriler normal dağılım varsayımını sağlamamış ve bu nedenle Mann Whitney U testi kullanılarak karşılaştırma yapılmıştır. Hasta ve kontroller için hesaplanan ortanca, IQR ve minimum-maksimum değerleri Tablo 4.2 ve 4.3’de verilmiştir. Her gen için hasta ve kontrol rölatif kantifikasyon karşılaştırma grafikleri Şekil 4.5 ve 4.6’da verilmiştir.

Kontrol grubundaki bireyler cinsiyete göre bütün hedef genler açısından Mann Whitney U testi ile karşılaştırılmış ve hedef gen rölatif kantifikasyon değerleri arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır ( $p>0,05$ ). Kontrol grubundaki bireyler yaşa göre bütün hedef genler açısından Spearman korelasyon analizi ile karşılaştırılmış ve hedef gen rölatif kantifikasyon değerleri arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır ( $p>0,05$ ).

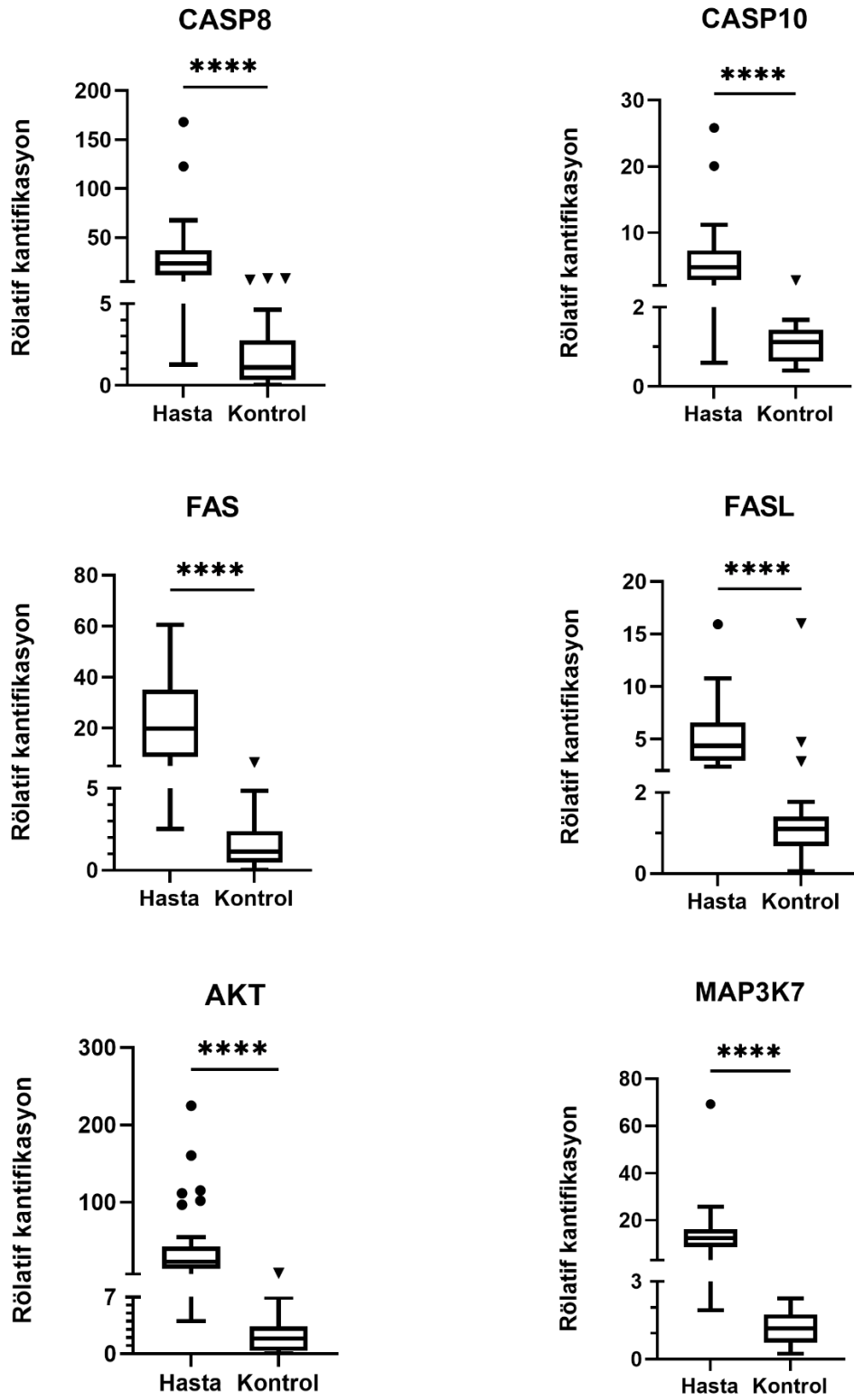
CASP8 hedef geni açısından rölâtif kantifikasyon ortancası hasta grubunda 23,6 (IQR: 11,5-36,6) ve kontrol grubunda 1,09 (IQR: 0,35-1,96) olup, hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı fark saptanmıştır ( $p<0,001$ ). CASP10 hedef geni açısından rölâtif kantifikasyon ortancası hasta grubunda 4,79 (IQR: 2,89-7,12) ve kontrol grubunda 1,11 (IQR: 0,66-1,42) olup, hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı fark saptanmıştır ( $p<0,001$ ). FAS hedef geni açısından rölâtif kantifikasyon ortancası hasta grubunda 19,8 (IQR: 8,99-34,83) ve kontrol grubunda 1,13 (IQR: 0,49-2,34) olup, hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı fark saptanmıştır ( $p<0,001$ ). FASL hedef geni açısından rölâtif kantifikasyon ortancası hasta grubunda 4,37 (IQR: 2,95-6,52) ve kontrol grubunda 1,09 (IQR: 0,69-1,39) olup, hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı fark saptanmıştır ( $p<0,001$ ). AKT hedef geni açısından rölâtif kantifikasyon ortancası hasta grubunda 22,9 (IQR: 13,79-42,05) ve kontrol grubunda 1,88 (IQR: 0,46-3,34) olup, hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı fark saptanmıştır ( $p<0,001$ ). MAP3K7 hedef geni açısından rölâtif kantifikasyon ortancası hasta grubunda 12,44 (IQR: 8,77-15,95) ve kontrol grubunda 1,19 (IQR: 0,69-1,7) olup, hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı fark saptanmıştır ( $p<0,001$ ). MAP3K14 hedef geni açısından rölâtif kantifikasyon ortancası hasta grubunda 53,19 (IQR: 19,39-74,16) ve kontrol grubunda 0,89 (IQR: 0,64-2,26) olup, hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı fark saptanmıştır ( $p<0,001$ ). mTOR hedef geni açısından rölâtif kantifikasyon ortancası hasta grubunda 14,31 (IQR: 8,48-23,03) ve kontrol grubunda 1,01 (IQR: 0,49-1,94) olup, hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı fark saptanmıştır ( $p<0,001$ ). NFKB1 hedef geni açısından rölâtif kantifikasyon ortancası hasta grubunda 21,35 (IQR: 12,06-33,03) ve kontrol grubunda 1,06 (IQR: 0,5-2) olup, hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı fark saptanmıştır ( $p<0,001$ ). NFKB2 hedef geni açısından rölâtif kantifikasyon ortancası hasta grubunda 49,08 (IQR: 35,77-68,52) ve kontrol grubunda 0,93 (IQR: 0,69-1,8) olup, hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı fark saptanmıştır ( $p<0,001$ ). NFKBIA hedef geni açısından rölâtif kantifikasyon ortancası hasta grubunda 11,64 (IQR: 5,99-19,12) ve kontrol grubunda 1,1 (IQR: 0,6-2,23) olup, hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı fark saptanmıştır ( $p<0,001$ ). TRAF3 hedef geni açısından rölâtif kantifikasyon ortancası hasta grubunda 6,75 (IQR: 1,16-13,11) ve kontrol grubunda 1,2 (IQR: 0,45-2,98) olup, hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı fark saptanmıştır ( $p=0,002$ ).

**Tablo 4.4.** Hasta grubu hedef gen ekspresyonları kat farkları (rölatif kantifikasyon) ortanca, IQR ve minimum-maksimum değerleri

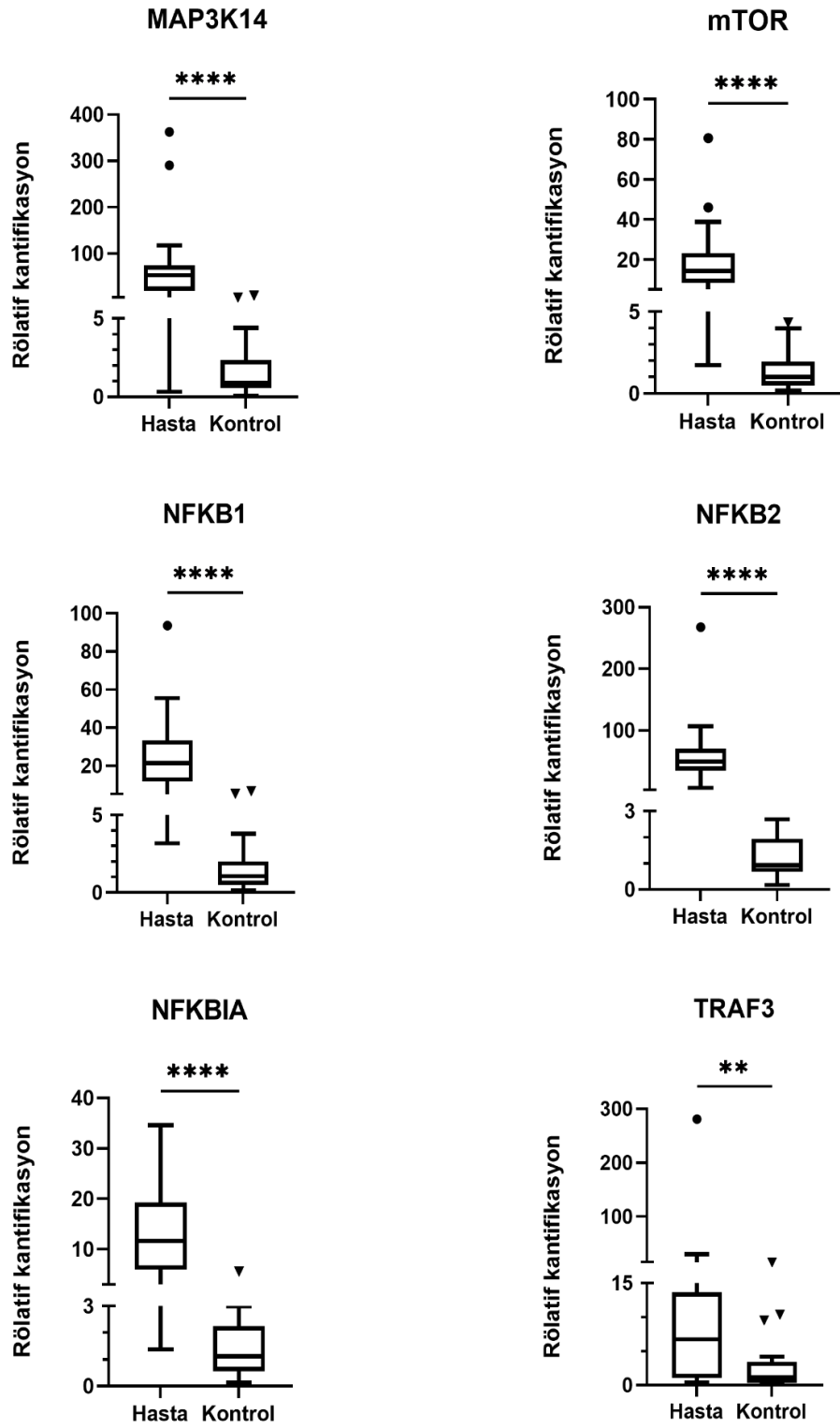
Hedef Gen	Ortanca	IQR-25. persentil	IQR-75. persentil	Minimum	Maksimum
CASP8	23,58	11,51	36,56	1,29	167,97
CASP10	4,79	2,89	7,12	0,6	25,85
FAS	19,8	8,99	34,83	2,51	60,53
FASL	4,37	2,95	6,52	2,36	15,93
AKT	22,9	13,79	42,05	4,01	224,48
MAP3K7	12,44	8,77	15,95	1,88	69,19
MAP3K14	53,19	19,39	74,16	0,32	362,69
mTOR	14,31	8,48	23,03	1,73	80,6
NFKB1	21,35	12,06	33,03	3,17	93,59
NFKB2	49,08	35,77	68,52	6,34	267,75
NFKBIA	11,64	5,99	19,12	1,38	34,58
TRAF3	6,75	1,16	13,11	0,38	280,87

**Tablo 4.5.** Kontrol grubu hedef gen ekspresyonları kat farkları (rölatif kantifikasyon) ortanca, IQR ve minimum-maksimum değerleri

Hedef Gen	Ortanca	IQR-25. persentil	IQR-75. persentil	Minimum	Maksimum
CASP8	1,09	0,35	1,96	0,02	8,49
CASP10	1,11	0,66	1,42	0,4	2,85
FAS	1,13	0,49	2,34	0,02	6,61
FASL	1,09	0,69	1,39	0,05	16,02
AKT	1,88	0,46	3,34	0,01	8,45
MAP3K7	1,19	0,69	1,7	0,21	2,34
MAP3K14	0,89	0,64	2,26	0,05	9,56
mTOR	1,01	0,49	1,94	0,15	4,34
NFKB1	1,06	0,5	2	0,13	6,69
NFKB2	0,93	0,69	1,8	0,17	2,69
NFKBIA	1,1	0,6	2,23	0,12	5,64
TRAF3	1,2	0,45	2,98	0,07	15,17



Şekil 4.5. Hasta ve kontrol hedef gen rölatif kantifikasyon karşılaştırma grafikleri (\*\*\*\* p<0,0001)

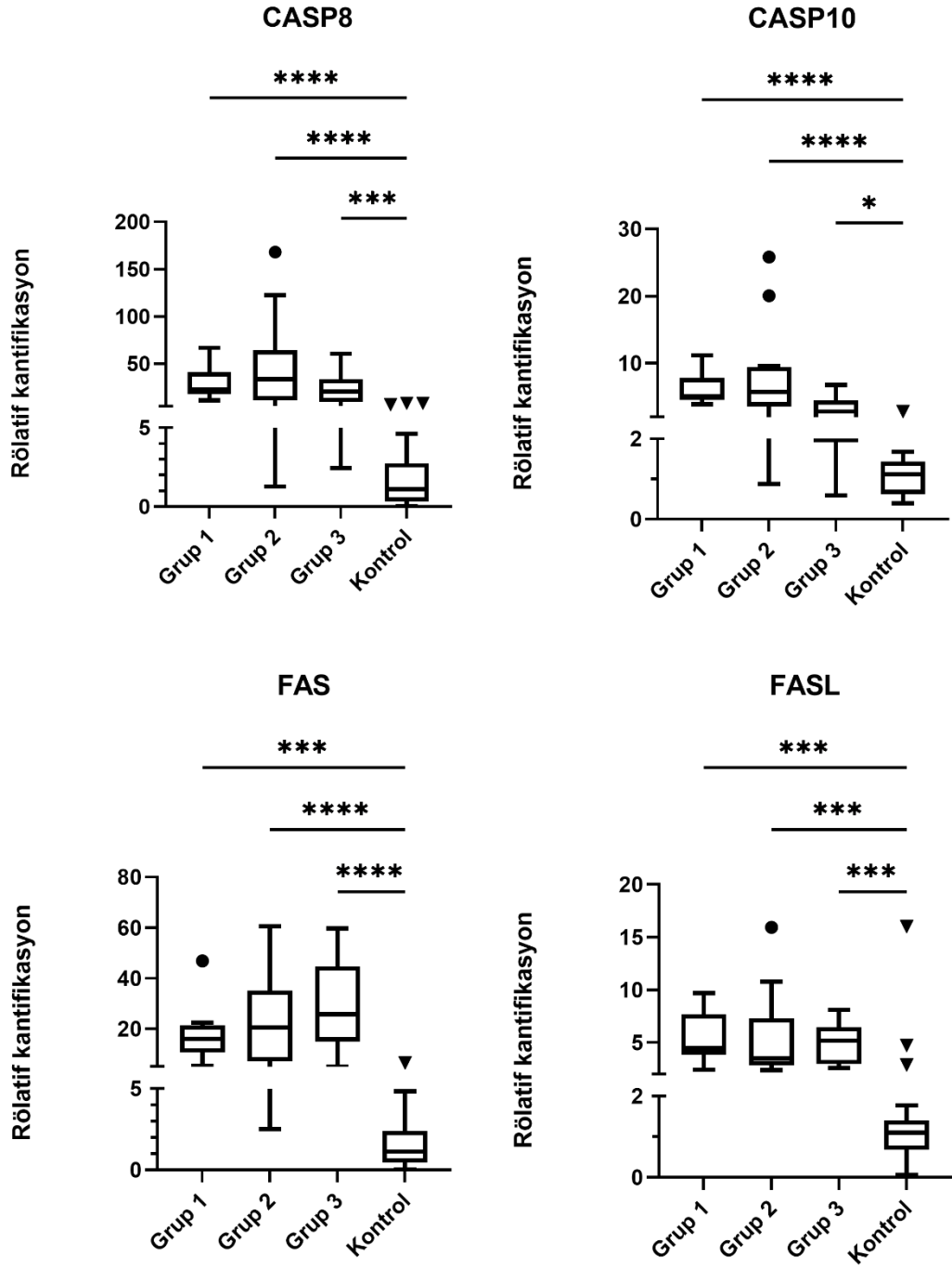


**Şekil 4.6.** Hasta ve kontrol hedef gen rölatif kantifikasyon karşılaştırma grafikleri  
(\*\*\*\* p<0,0001)

Hasta grupları (otoimmün lenfoproliferatif sendrom kliniği olan 10 hasta: ALPS, nedeni belli olmayan immün sitopeni nedeni ile başvuran 12 hasta: sitopeni, EBV ilişkili lenfoproliferasyon kliniği olan 10 hasta: lenfoproliferasyon) ve kontrol grubu hedef gen ekspresyonları kat farkları ( $2^{(-\Delta\Delta CT)}$ ) yani rölatif kantifikasyon değerleri karşılaştırılmıştır. Veriler normal dağılım varsayımını sağlamamış ve bu nedenle Kruskal Wallis H testi kullanılarak karşılaştırma yapılmıştır. Farklılığın hangi grup ya da gruplardan kaynaklandığını bulmak için Post-Hoc testlerden Bonferroni metodu uygulanmıştır. Hasta grupları kendi arasında ve kontrol grubuna göre karşılaştırılarak analiz edilmiş ve p değerleri Tablo 4.6'de verilmiştir. Her gen için hasta grupları ve kontrol arasındaki rölatif kantifikasyon karşılaştırma grafikleri Şekil 4.7, 4.8 ve 4.9'da verilmiştir. Hiçbir hedef gen ekspresyonu açısından farklı hasta grupları arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır. Diğer taraftan CASP10 geni açısından lenfoproliferasyon-kontrol karşılaştırması, TRAF3 geni açısından da sitopeni-kontrol ve lenfoproliferasyon-kontrol karşılaştırması hariç, diğer bütün hasta grupları ve kontrol karşılaştırmaları arasında anlamlı farklılık saptanmıştır.

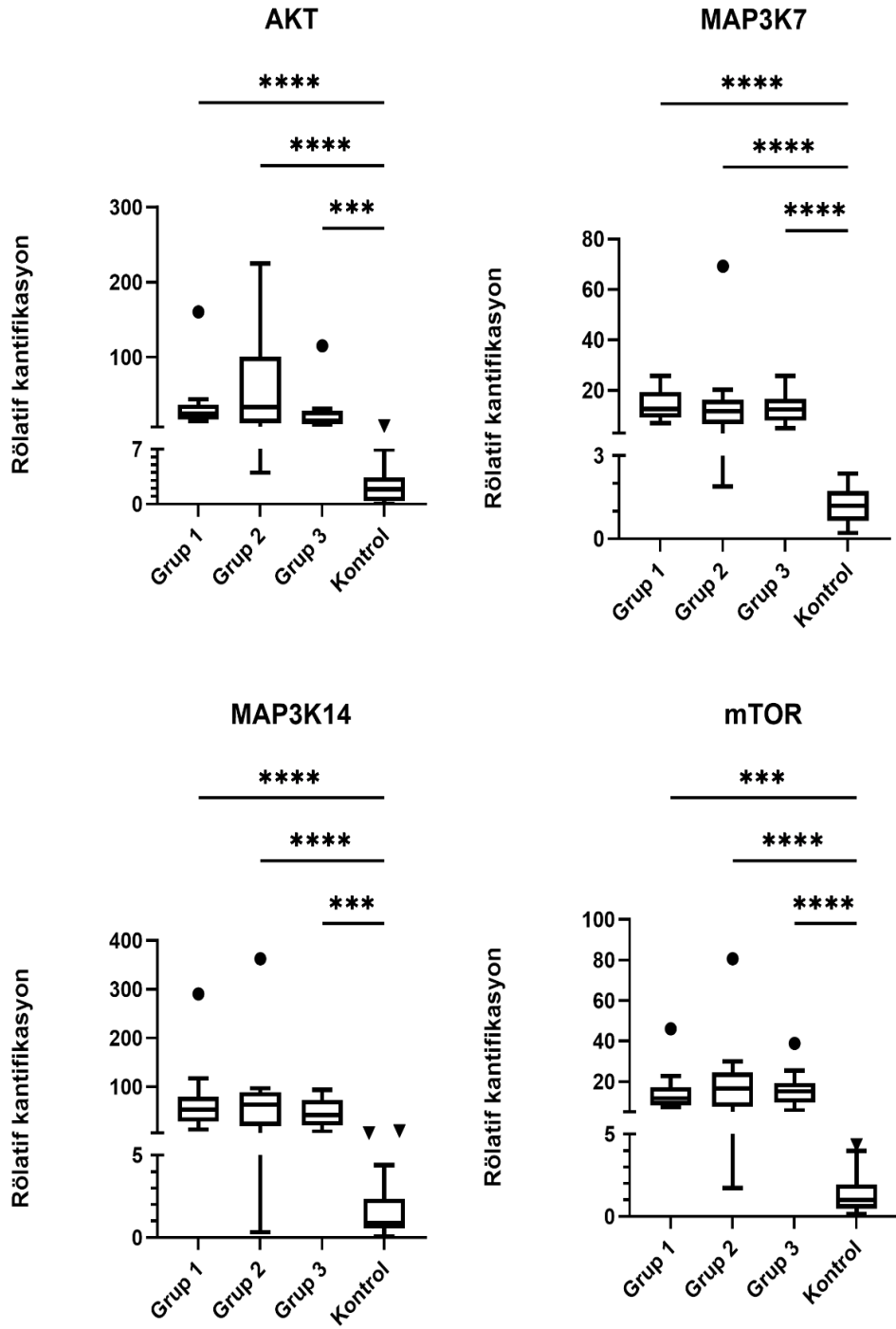
**Tablo 4.6.** Hasta gruplarının kendi arasında ve kontrol grubuna göre karşılaştırma sonuçları ve p değerleri

	<b>Grup 1-K</b>	<b>Grup 2-K</b>	<b>Grup 3-K</b>	<b>Grup 2-3</b>	<b>Grup 1-3</b>	<b>Grup 1-2</b>
<b>CASP8</b>	p<0,001	p<0,001	P=0,002	p>0,05	p>0,05	p>0,05
<b>CASP10</b>	p<0,001	p<0,001	P=0,058	p>0,05	p>0,05	p>0,05
<b>FAS</b>	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p>0,05	p>0,05	p>0,05
<b>FASL</b>	P=0,001	P=0,002	P=0,001	p>0,05	p>0,05	p>0,05
<b>AKT</b>	p<0,001	p<0,001	P=0,001	p>0,05	p>0,05	p>0,05
<b>MAP3K7</b>	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p>0,05	p>0,05	p>0,05
<b>MAP3K14</b>	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p>0,05	p>0,05	p>0,05
<b>mTOR</b>	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p>0,05	p>0,05	p>0,05
<b>NFKB1</b>	p<0,001	p<0,001	P=0,001	p>0,05	p>0,05	p>0,05
<b>NFKB2</b>	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p>0,05	p>0,05	p>0,05
<b>NFKBIA</b>	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p>0,05	p>0,05	p>0,05
<b>TRAF3</b>	p<0,001	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05

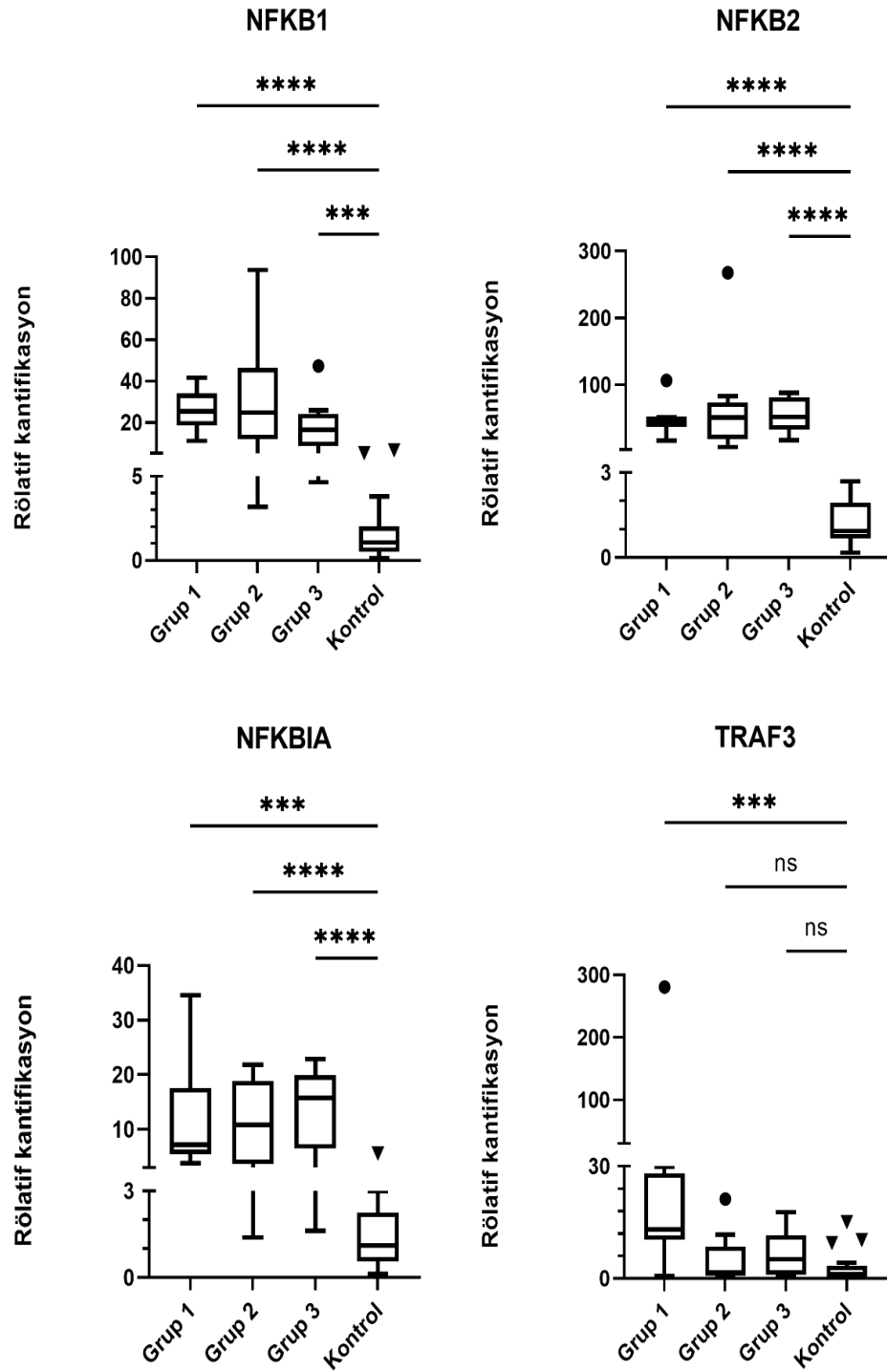


**Şekil 4.7.** Hasta grupları ve kontrol hedef gen rölatif kantifikasyon karşılaştırma grafikleri (Grup 1 (ALPS) n:10, Grup 2 (immün sitopeni) n:12, Grup 3 (EBV ilişkili lenfoproliferasyon) n:10) (\*\*\*\*p<0,0001)



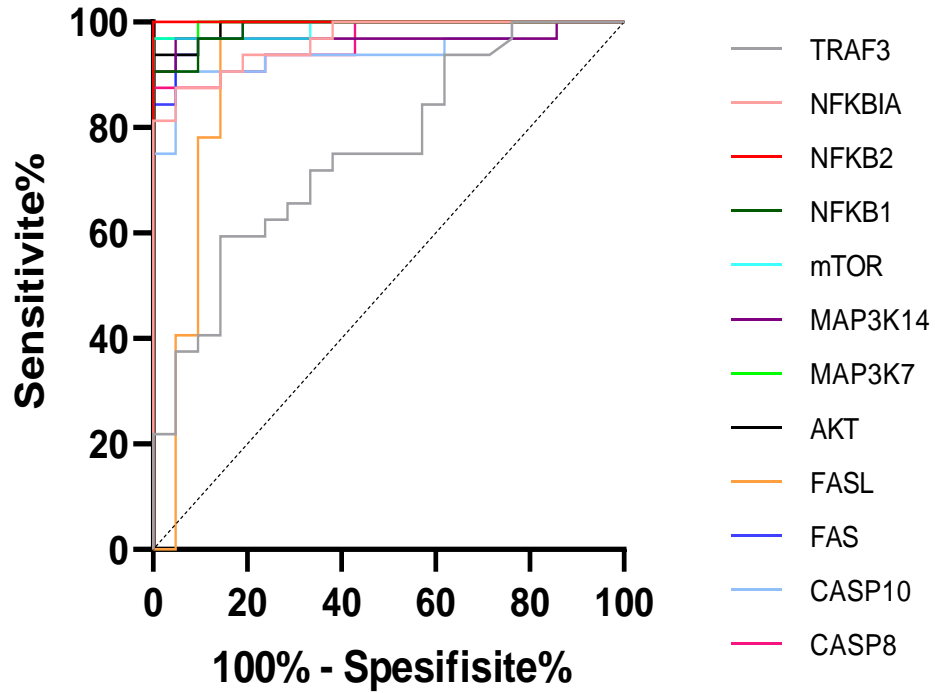


**Şekil 4.8.** Hasta grupları ve kontrol hedef gen rölatif kantifikasyon karşılaştırma grafikleri (Grup 1 (ALPS) n:10, Grup 2 (immün sitopeni) n:12, Grup 3 (EBV ilişkili lenfoproliferasyon) n:10) (\*\*\*\* p<0,0001)



**Şekil 4.9.** Hasta grupları ve kontrol hedef gen rölatif kantifikasyon karşılaştırma grafikleri (Grup 1 (ALPS) n:10, Grup 2 (immün sitopeni) n:12, Grup 3 (EBV ilişkili lenfoproliferasyon) n:10) (\*\*\*\* p<0,0001)

Hedef genlerin tanısal performansını değerlendirebilmek, testin hastalar ile hasta olmayan bireyleri ayırmadaki doğruluk oranını belirleyebilmek ve gen bazında test performanslarını karşılaştırabilmek amacı ile ROC eğrisi (ROC curve: receiver operating characteristic curve) oluşturulmuştur ve hedef genler için cut-off değerlerinin belirlenebilmesi amacıyla Youden Index kullanılarak cut-off değerler belirlenmiştir. Hedef genler için AUC (area under curve) değerleri ve cut-off değerler Tablo 6'da verilmiştir. ROC eğrisi Şekil 4.10'de verilmiştir. Bu değerlere göre hasta ve kontrolleri ayırt edebilmesi açısından tanısal oranı en yüksek hedef genler NFKB2, MAP3K7, AKT, mTOR, NFKB1 ve FAS genleridir. Bütün genler için hasta ve sağlıklı bireyleri ayırt etmede kullanılacak cut-off değerleri Tablo 4.7'de verilmiştir.



Şekil 4.10. ROC eğrisi analizi

**Tablo 4.7.** Hedef genler için AUC (area under curve) değerleri ve cut-off değerler

	AUC	%95 Güven Aralığı-Alt sınır	%95 Güven Aralığı-Üst sınır	Cut-off
<b>CASP8</b>	0,961	0,916	1,000	9,64
<b>CASP10</b>	0,942	0,878	1,000	1,69
<b>FAS</b>	0,987	0,965	1,000	4,94
<b>FASL</b>	0,914	0,808	1,000	2,06
<b>AKT</b>	0,993	0,978	1,000	9,18
<b>MAP3K7</b>	0,997	0,989	1,000	3,43
<b>MAP3K14</b>	0,970	0,918	1,000	6,2
<b>mTOR</b>	0,990	0,968	1,000	4,72
<b>NFKB1</b>	0,988	0,968	1,000	6,71
<b>NFKB2</b>	1,000	1,000	1,000	4,51
<b>NFKBIA</b>	0,964	0,923	1,000	3,39
<b>TRAF3</b>	0,754	0,624	0,885	4,51

AUC: area under the curve, eğri altında kalan alan

Hastaların bazı klinik ve laboratuvar özellikleri hasta grubu içinde değişken olarak alınarak, hasta ve kontrol grupları arasında hedef genlerin ekspresyonları incelenmiştir. Veriler normal dağılım varsayımını sağlamamış ve bu nedenle Kruskal Wallis H testi kullanılarak karşılaştırma yapılmıştır.

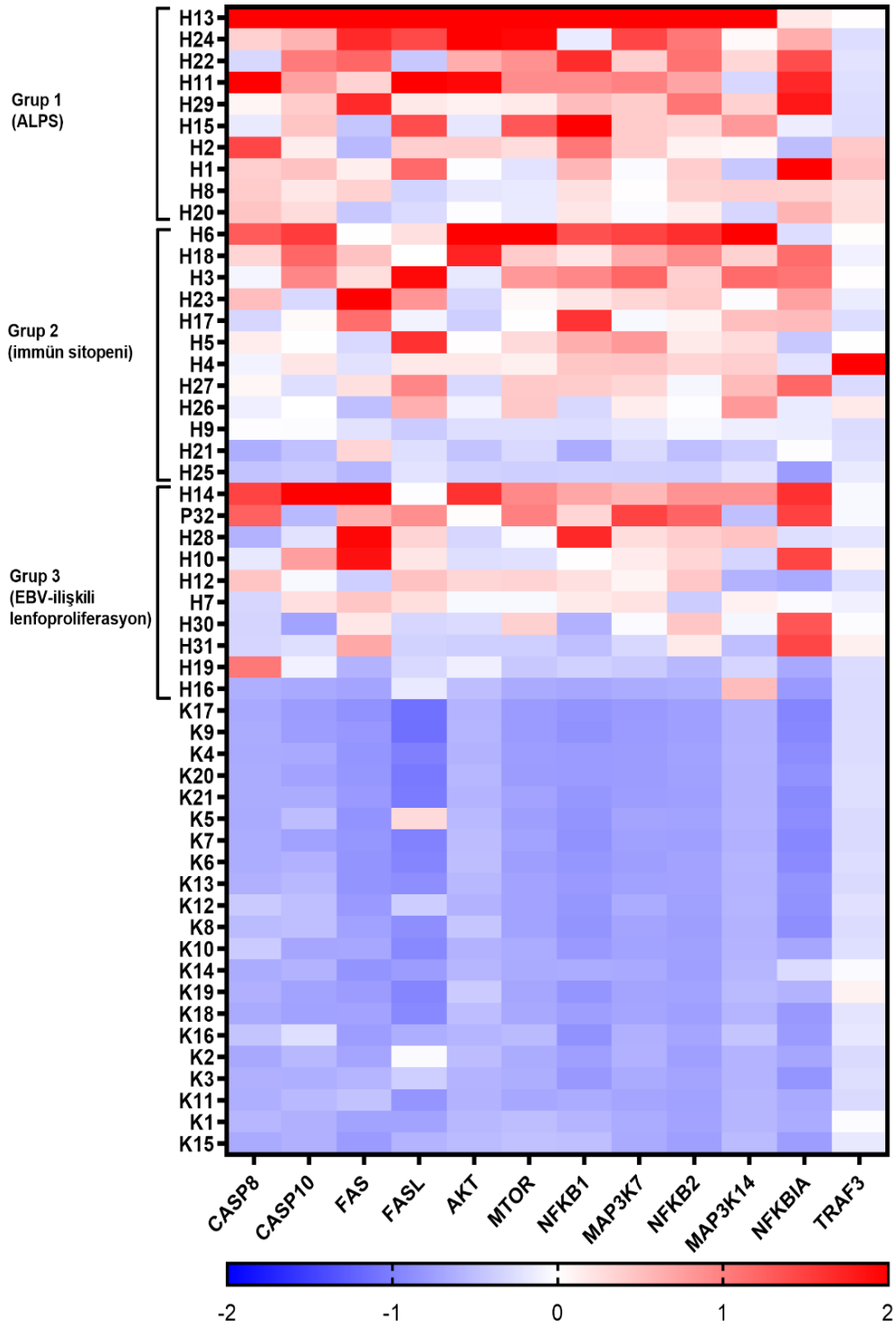
Hastalardan semptom başlama yaşı 10 yaşın altında olan ve olmayan grup karşılaştırılmış ve hiçbir gen ekspresyonu açısından anlamlı farklılık bulunmamıştır ( $p>0,05$ ). Tekrarlayan enfeksiyonu olan ve olmayan grup karşılaştırılmış ve hiçbir gen ekspresyonu açısından anlamlı farklılık bulunmamıştır ( $p>0,05$ ). Herhangi bir alerjik durumu olan ve olmayan grup karşılaştırılmış ve hiçbir gen ekspresyonu açısından anlamlı farklılık bulunmamıştır ( $p>0,05$ ). Herhangi bir otoimmün bulgusu olan ve olmayan grup karşılaştırılmış ve hiçbir gen ekspresyonu açısından anlamlı farklılık bulunmamıştır ( $p>0,05$ ). Herhangi bir otoinflamasyon bulgusu olan ve olmayan grup karşılaştırılmış ve hiçbir gen ekspresyonu açısından anlamlı farklılık bulunmamıştır ( $p>0,05$ ). Ebeveynleri arasında akrabalık olan ve olmayan grup karşılaştırılmış ve hiçbir gen ekspresyonu açısından anlamlı farklılık bulunmamıştır ( $p>0,05$ ). Çoklu sitopenisi (birden fazla seride) olan ve olmayanlar karşılaştırılmış ve çoklu sitopenisi olan ve olmayan grup arasında hiçbir gen ekspresyonu açısından anlamlı farklılık bulunmamıştır ( $p>0,05$ ). Malignitesi olan ve olmayan gruplar karşılaştırılmış ve hiçbir gen ekspresyonu açısından anlamlı farklılık bulunmamıştır ( $p>0,05$ ).

Lenfoproliferasyon bulgusu olan ve olmayan gruplar karşılaştırılmış ve hiçbir gen ekspresyonu açısından anlamlı farklılık bulunmamıştır ( $p>0,05$ ). EBV DNA ya da EBER pozitif olan ve olmayan grup karşılaştırılmış; EBV DNA ya da EBER pozitif olan ve olmayan grup arasında hiçbir gen ekspresyonu açısından anlamlı farklılık bulunmamıştır ( $p>0,05$ ). ANA pozitifliği olan ve olmayan grup karşılaştırılmış ve hiçbir gen ekspresyonu açısından anlamlı farklılık bulunmamıştır ( $p>0,05$ ). Çoklu otoantikor pozitifliği olan ve olmayan grup karşılaştırılmış ve hiçbir gen ekspresyonu açısından anlamlı farklılık bulunmamıştır ( $p>0,05$ ). DNT hücre yüzdesi 6'da büyük olan ve olmayan grup karşılaştırılmış ve hiçbir gen ekspresyonu açısından anlamlı farklılık bulunmamıştır ( $p>0,05$ ). Naif CD4<sup>+</sup> yardımcı T hücre düşüklüğü olan ve olmayan grup karşılaştırılmış ve hiçbir gen ekspresyonu açısından anlamlı farklılık bulunmamıştır ( $p>0,05$ ). Efektör hafıza CD4<sup>+</sup> yardımcı T hücre yüksekliği olan ve olmayan grup karşılaştırılmış ve hiçbir gen ekspresyonu açısından anlamlı farklılık bulunmamıştır ( $p>0,05$ ). Efektör hafıza CD8<sup>+</sup> sitotoksik T hücre yüksekliği olan ve olmayan grup karşılaştırılmış ve hiçbir gen ekspresyonu açısından anlamlı farklılık bulunmamıştır ( $p>0,05$ ). Naif CD4<sup>+</sup> yardımcı T hücre düşüklüğü ve efektör hafıza CD4<sup>+</sup> yardımcı T hücre yüksekliği aynı anda olan ve olmayan grup karşılaştırılmış ve hiçbir gen ekspresyonu açısından anlamlı farklılık bulunmamıştır ( $p>0,05$ ). Naif CD4<sup>+</sup> yardımcı T hücre düşüklüğü, efektör hafıza CD4<sup>+</sup> yardımcı T hücre ve efektör hafıza CD8<sup>+</sup> sitotoksik T hücre yüksekliği aynı anda olan ve olmayan grup karşılaştırılmış ve hiçbir gen ekspresyonu açısından anlamlı farklılık bulunmamıştır ( $p>0,05$ ). İmmünsupresif alan ve olmayan grup karşılaştırılmış ve hiçbir gen ekspresyonu açısından anlamlı farklılık bulunmamıştır ( $p>0,05$ ). Steroid alan ve olmayan grup karşılaştırılmış ve hiçbir gen ekspresyonu açısından anlamlı farklılık bulunmamıştır ( $p>0,05$ ). mTOR inhibitörü (rapamisin) alan ve olmayan grup karşılaştırılmış ve hiçbir gen ekspresyonu açısından anlamlı farklılık bulunmamıştır ( $p>0,05$ ). Rituksimab inhibitörü (rapamisin) alan ve olmayan grup karşılaştırılmış ve hiçbir gen ekspresyonu açısından anlamlı farklılık bulunmamıştır ( $p>0,05$ ). Klinik durumu açıklayabilecek genetik bir defekt saptanan ve saptanmayan gruplar karşılaştırılmış ve hiçbir gen ekspresyonu açısından anlamlı farklılık bulunmamıştır ( $p>0,05$ ).

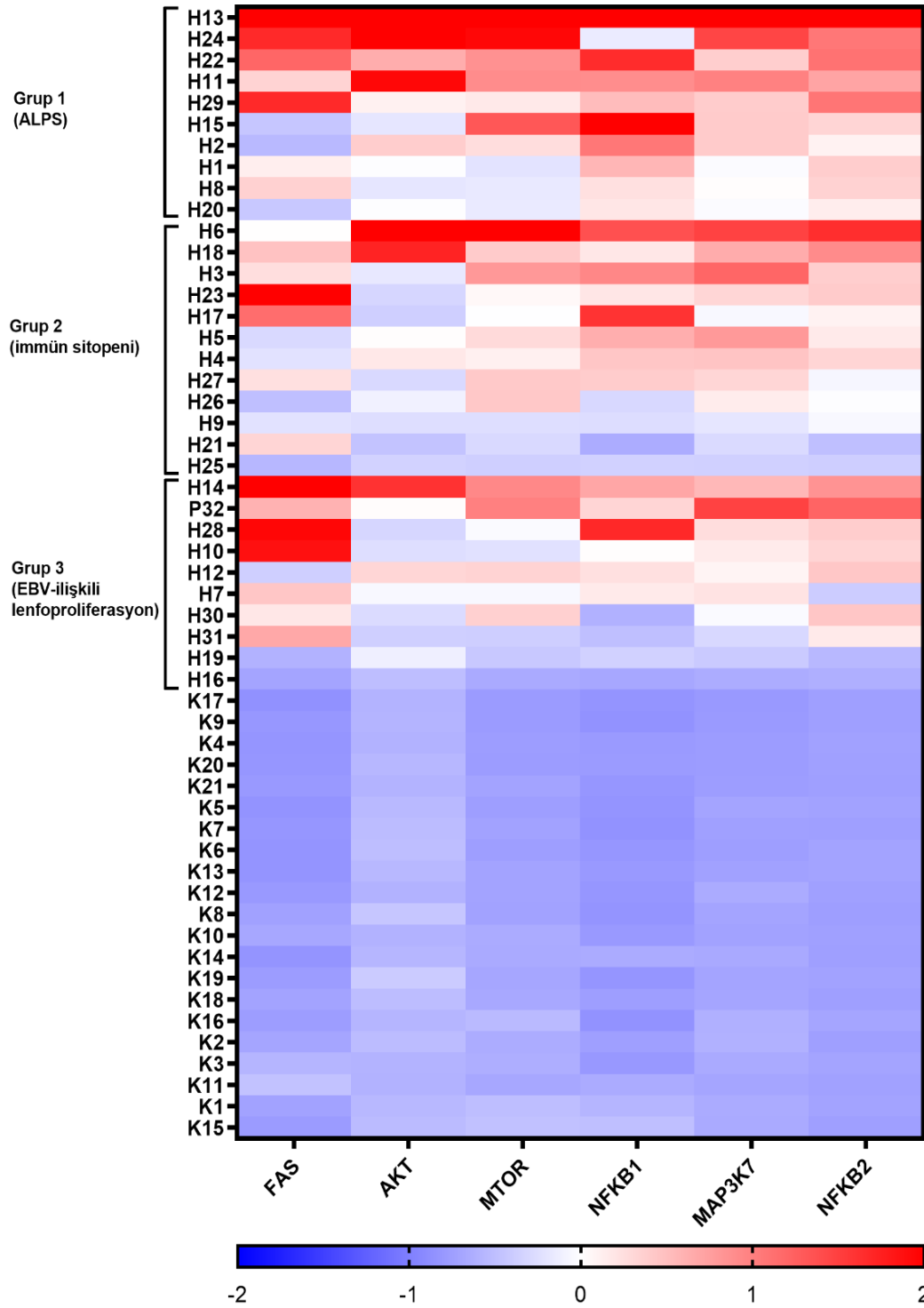
#### 4.5. Tedaviler ve Prognoz

Hastaların aldığı tedaviler değerlendirilmiştir ve toplamda 25 hastanın (%78,1) intravenöz immünglobulin tedavisi (IVIG) ve 23 hastanın (%71,9) immunsupresif aldığı; 19 hastanın (%59,4) steroid, 12 hastanın (%37,5) mikofenolat mofetil, iki hastanın (%6,3) mTOR inhibitörü (rapamisin), iki hastanın (%6,3) siklosporin, iki hastanın (%6,3) azatioprin tedavisi aldığı görülmüştür. Toplamda dört hastanın (%12,5) rituksimab, bir hastanın (%3,1) ruxolitinib tedavisi aldığı görülmüştür. Otolog hematopoetik kök hücre nakli (HKHN) iki hastaya (%6,3), aplastik anemi nedeni ile hematopoetik kök hücre nakli bir hastaya (%3,1) uygulanmıştır.

Çalışmanın sonlandığı tarih itibari ile bütün hastalar hayattadır ve Hacettepe Üniversitesi Çocuk İmmünoloji bölümünde takiplerine devam edilmektedir.



**Şekil 4.11.** Bütün hedef genler için hasta ve kontroller için oluşturulmuş ısı haritası (heat map) H: hasta, K: kontrol, A: ALPS-grup 1, S: immün sitopeni-grup 2, E: EBV ilişkili lenfoproliferasyon-grup 3



**Şekil 4.12.** Seçilmiş altı hedef gen için hasta ve kontroller için oluşturulmuş ısı haritası (heat map) H: hasta, K: kontrol, A: ALPS-grup 1, S: immün sitopeni-grup 2, E: EBV ilişkili lenfoproliferasyon-grup 3



## 5. TARTIŞMA

Primer immün yetmezlikler immün sistemin herhangi bir bileşeninde eksiklik ve/veya fonksiyon bozukluğuna bağlı olarak ortaya çıkabilir. Fonksiyon bozukluğu olarak tanımladığımız durum, fonksiyon kaybı ya da kazanımı olabilir. Enfeksiyonlara yatkınlık, otoimmünite, otoinflamatuar hastalıklar, alerji ve/veya malignansi gelişimi görülebilir. İmmün sistemin regülasyonunda bozukluk, yani immün sistemin dengede tutulamaması ve durdurulamayan aktivasyonu; organizmanın kendi hücre ve dokularına zarar vermesi ya da hücrelerin kontrolsüz çoğalması ile sonuçlanır (34). Otoimmünite, otoinflamasyon, lenfoproliferasyon ve malignite gibi immün regülasyonun bozulduğu durumlar tüm PİY'lerde görülebilmekle birlikte; immün sistemin regülasyon mekanizmalarında aksaklık sonucu ortaya çıkan immün disregülasyon hastalıkları, Uluslararası İmmün Yetersizlik Birliği (International Union of Immunodeficiency Societies (IUIS)) tarafından ayrı olarak sınıflandırılmıştır (3).

Bazı tanımlanmış ya da yeni tanımlanan yolaklarda yer alan moleküllerin eksikliği ya da fazlalığının ve/veya yolakların birbiri ile etkileşiminin bozulmasının hastalarda immün toleransın bozulmasına ve immün disregülasyona neden olduğu bilinmektedir. Bizim çalışmamızda iyi bilinen yolaklardan bazı önemli moleküller dahil edilerek, hasta ve kontrollerde bu hedef genlerin ekspresyonlarının kat farkını karşılaştırılmıştır. Hedef gen ekspresyonları kat farkları ( $2^{(-\Delta\Delta CT)}$ ) yani rölatif kantifikasyon değerleri karşılaştırılmıştır.

İlk olarak hasta gruplarımızdan birini otoimmün lenfoproliferatif sendrom (ALPS) kliniği olan hastaların oluşturması nedeni ile apoptoz yolağında yer alan ve otoimmün lenfoproliferatif sendrom nedenlerinden olarak kabul edilen *FAS*, *FASL*, *CASP8* ve *CASP10* genlerini çalışmaya dahil ettik. ALPS; kronik, malign olmayan ya da enfeksiyöz olmayan lenfoproliferasyon, otoimmün bulgular (özellikle sitopeni) ve lenfomaya yatkınlık ile seyreden bir klinik durumdur. Klinik ALPS hastalarının %20 kadarında genetik bir etioloji tespit edilememiştir. Ancak tanımlanabilen genetik nedenlerin görülme sıklığı da göz önüne alınarak bu klinikle başvuran hastalarda öncelikle *FAS*, eğer patojenik bir varyant bulunamazsa *FASL* ve *CASP10* genlerinin germline ve somatik mutasyonlar açısından tetkik edilmesi önerilmektedir. Ekstrinsik apoptoz yolağında yer alan ve ölüm reseptörleri ve ligandlarının etkileşimi sonucu

aktivasyonu gerçekleşen ve apoptozdan sorumlu diğer bir gen *CASP8* de çalışılmıştır (69). Bizim çalışmamızda 2. hastamızda (H2) *FAS* geninde heterozigot ACMG'ye göre patojenik bir varyant tespit edilmiştir. 8. hastamızda (H8) da *FASL* geninde heterozigot ACMG'ye göre klinik önemi bilinmeyen bir varyant tespit edilmiştir. Diğer hastalarımızda *FAS*, *FASL*, *CASP8* ve *CASP10* genlerinde herhangi bir varyant tespit edilmemiştir. H2 özelinde bakıldığında hastamızda *FAS* ekspresyonunun diğer hastalardan az ancak kontrollerden fazla olduğu görülmüştür. H8 özelinde bakıldığında hastamızda *FASL* ekspresyonunun diğer hastalarla benzer ve kontrollerden yüksek olduğu görülmüştür. *FAS* genindeki germline heterozigot mutasyonlar, otozomal dominant paternde kalıtılır ve korunmuş protein ekspresyonu ile ilişkilidir ancak homozigot mutasyonlar otozomal resesif paternde kalıtılır ve azalmış/saptanamayan protein ekspresyonu ile ilişkilidir (70). Ekstraselüler yanlış anlamlı (missense) mutasyonlar ve çerçeve içi delesyonlar olduğunda kusurlu *FAS* proteini ifade edilir, ancak *FAS* ligandına bağlanamaz ve *FAS* aracılı apoptoz ile dominant-negatif yarış sergilemesinden dolayı *FAS* ligandının indüklediği apoptozun azalmasına neden olur (71). Bizim hastamızda olduğu gibi ölüm domaininde (death domain=DD) heterozigot mutasyon olan bireyler protein eksprese edilebilir. H2'de *FAS* ekspresyonunun kontrollere göre yüksek saptanması bu durumla ilişkili olabilir. Çalışmamızda hastalar ve kontroller arasında bakılan toplu karşılaştırmada *FAS* hedef geni rölatif kantifikasyon ortancası hasta grubunda 19,8 ve kontrol grubunda 1,13 hesaplanmıştır, hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı fark saptanmıştır ( $p < 0,001$ ). *FAS* gen ekspresyonu açısından farklı hasta grupları (otoimmün lenfoproliferatif sendrom kliniği olan 10 hasta, nedeni belli olmayan immün sitopeni nedeni ile başvuran 12 hasta, EBV ilişkili lenfoproliferasyon kliniği olan 10 hasta) arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır ( $p > 0,05$ ). Otoimmün lenfoproliferatif sendrom kliniği ile başvuran hastalarda daha önce yapılan çalışmalarda apoptoz yolağı gen ekspresyon ifadelerinde artma saptanmamıştır; eğer homozigot mutasyonsa ya da heterozigot ve penetransı yüksek mutasyonsa ifadelerde azalma gözlenmiştir (49). Bizim hastalarımızda regülatör mekanizmaların etkilendiği ve defektif olduğu, muhtemelen artan hücre sayısına-lenfoproliferasyona karşı apoptoz mekanizmalarının indüklediği ve apoptoz yolağı gen ifadelerinin bu nedenle yüksek bulunduğu yorumu yapılabilir. Daha önce yapılan bir çalışmada gastrik kanser hastalarında  $CD8^+$  T hücrelerinde *FAS*

ekspresyonunun artması, hastalarda dolaşımdaki CD8<sup>+</sup> T hücrelerinin artmış apoptozuyla ilişkilendirilmiştir (72). Bu durumda da sitotoksik CD8<sup>+</sup> T hücrelerinin azalması ve fonksiyon kaybı, lenfoproliferasyon ve malignansilere yakınlıkla ilişkilendirilebilir. Bizim hasta grubumuzda da hücre spesifik olarak gen ekspresyonu artmış ve apoptoz indüklenmiş olabilir. Sitotoksik T hücre, regülatör T hücre ya da doğal öldürücü hücre artmış apoptozu, lenfoproliferasyona, malignansilere yakınlık oluşmasına ve otoimmün bulgulara neden olabilir. Literatürde daha önce yapılmış bir çalışmada Evans sendromu (otoimmün hemolitik anemi ve trombositopeni) saptanan yedi vakada ve akut idiyopatik trombositopenik purpuralı yedi vakada lenfosit Fas ekspresyonu ve Fas aracılı T lenfosit apoptozu değerlendirilmiştir (4). Bizim hastalarımıza benzer şekilde, Evans sendromu tanısı olan hastalarda periferik kan T ve B lenfositlerinde daha yüksek Fas ekspresyonu ve kontrol gruplarına kıyasla aktive T lenfositlerinin FAS aracılı eliminasyonunda artış görülmüştür. Bizim çalışmamızda da hastalardan elde edilen T ve B lenfositlerde FAS ekspresyonu bakılmış ve kontrollere göre yüksek bulunmuştur.

FASL, periferik T hücre kompartmanını hem pozitif hem de negatif olarak düzenleme kapasitesine sahiptir (73). Bazı çalışmalarda FASL eksprese eden lenfositlerin şistozomal enfeksiyon sırasında CD4<sup>+</sup>T hücre apoptozuna aracılık ettiği ve FASL eksprese eden makrofajların da insan immün yetmezlik virüsü enfeksiyonu sırasında CD4<sup>+</sup>T hücre apoptozuna aracılık ettiği gösterilmiştir (74, 75). Hastalarımızda da benzer mekanizmalarla sitopeni gelişmiş olabileceğini düşünmekteyiz. FAS'a benzer şekilde FASL hedef geni açısından rölatif kantifikasyon ortancası hasta grubunda 4,37 ve kontrol grubunda 1,09 olup, hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı fark saptanmıştır ( $p < 0,001$ ); ancak farklı hasta grupları arasında anlamlı fark bulunamamıştır ( $p > 0,05$ ).

T hücrelerinin, aktivasyonla indüklenen hücre ölümü (AICD: activation-induced cell death), periferik immün sistemi düzenleyen bir süreçtir (76). Antijen, sitokin ve kemokinler gibi çeşitli uyarlardan türetilen çok sayıda sinyal tarafından, T hücreleri kontrol edilir. T hücrelerinde çeşitli sinyal molekülleri aracılığıyla yaşamdan ölüme geçişle, FAS/FASL aracılı apoptoz yoluyla AICD tetiklenir (76). FAS veya FASL ekspresyonu ve kontrolü T hücrelerinin AICD' sini etkiler.

FAS/FASL aracılı apoptoz ile AICD kontrolünde anormallik, otoimmünitinin başlamasına veya gelişmesine yol açabilir. Buradan yola çıkılarak hastalarımızda, doğal T hücre ölüm süreci ile tetiklenen FAS ve FASL ekspresyonunun artmış olabileceği yorumu yapılabilir. Ancak FAS ve FASL ekspresyonundaki bu artışa rağmen hastalarda lenfoproliferasyon ve otoimmünitinin kontrol edilemeyişi ve devam ediyor olması, bu yolağa karşı yönde hareket eden diğer yolların (PI3K, NFkB gibi) daha fazla aktive olduğunu düşündürmektedir. Yani, hastalarımızda T hücre aktivasyonunun neden olduğu lenfoproliferasyon ve otoimmünite devam ettiği için, FAS veya FASL aracılı T hücre ölümü de devam etmekte ve bu genlerin ekspresyonu kontrollere göre yüksek bulunmaktadır.

Kaspaz 8 (CASP8)' in apoptotik hücre ölümündeki rolü bilinmektedir, ancak son dönemlerde, lenfosit aktivasyonu ve proliferasyonunda da rol oynayabileceği gösterilmiştir ve özellikle primer T hücresi aktivasyonu sırasında FADD-kaspaz yolağı aracılığı ile aktive olan kaspazların T hücresi proliferasyonu indüklediği gösterilmiştir (77). Ayrıca FASL'ın da CD3 stimülasyonu ile kombine bir şekilde T hücre proliferasyonunu ve interlökin 2 sentezini arttırdığı bildirilmiştir (5). CASP8 hedef geni açısından rölatif kantifikasyon ortancası hasta grubunda 23,6 ve kontrol grubunda 1,09 olup, hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı fark saptanmıştır ( $p < 0,001$ ), farklı hasta grupları arasında anlamlı fark bulunamamıştır ( $p > 0,05$ ).

CASP10 hedef geni açısından rölatif kantifikasyon ortancası hasta grubunda 4,79 ve kontrol grubunda 1,11 olup, hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı fark saptanmıştır ( $p < 0,001$ ), farklı hasta grupları arasında anlamlı fark saptanmamıştır ( $p > 0,05$ ). CASP10 ekstrinsik apoptoz yolağında yer alan ve diğer kaspaz efektörlerle benzer fonksiyonları olan bir molekül olarak bilinmektedir. Ancak literatürde yapılan son çalışmalarda kaspaz 10'un, FASL aracılı kaspaz 8 aktivasyonunun indüklediği hücre ölümüne karşılık olarak, kaspaz 10 aracılı NFkB aktivasyonunu uyardığı saptanmış ve hücre yaşamını destekleyici rolü üzerinde durulmaya başlanmıştır (78). NFkB yolağını aktifleştirerek hücre yaşamını desteklemesi, CASP10 gen ifadesi artmış olan hastalarımızda, lenfoproliferasyon mekanizmasını kısmen açıklamaktadır. Ayrıca CASP10'un apoptoz yolağındaki görevini yerine getiremeyerek, lenfoproliferasyonu engelleyemediğini düşünmekteyiz.

NFκB yolağı ile apoptoz yolağında yer alan moleküller ve özellikle kaspaz 8 yakın ve dengeli bir ilişki içindedir. cFLIP gibi pro-survival genlerin NF-κB aracılı ekspresyonu, inhibitör cFLIP/kaspaz-8 heterodimerlerinin oluşumunu indükleyerek ve böylece kaspaz-8 aktivasyonunu inhibe ederek ekstrinsik apoptozu önler (79). NF-κB yokluğunda, ekstrinsik apoptozu tetikleyen aktif kaspaz-8 dimerleri oluşur. Aktif kaspaz-8 sadece apoptotik programı başlatmakla kalmaz, aynı zamanda RIPK1 (receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1) ve RIPK3 (receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 3) gibi temel nekroptoz araçlarını parçalayıp etkisiz hale getirerek nekroptozu da negatif olarak düzenler. Ancak diğer taraftan da NFκB yolağı aktivasyonu sonrası aktifleşen RIPK1 kaspaz-8'in aktivasyonunu da teşvik edebilir (80). NF-κB'nin proinflamatuvar süreçlerdeki rolleri dikkate alındığında, regülasyonun bozulduğu durumlarda ekspresyonunun artabileceği ve RIPK1 üzerinden de CASP8 ekspresyonunu arttırabileceği yorumu yapılabilir. Nitekim bizim çalışmamızda da NF-κB yolak genleri ile CASP8 gen ekspresyonunda kontrollere göre anlamlı artışlar görülmüştür.

Çift negatif (DN: double negative) T hücre artışı ALPS tanısı için lenfoproliferasyon ile birlikte gerekli iki kriterden biridir. DNT hücrelerinin gelişimi ile ilgili bazı hipotezler ortaya atılmış ancak bir görüş birliğine varılamamıştır. Gelişim sürecinde, progenitör lenfositler kemik iliğinden köken alır ve T hücre farklılaşmasının gerçekleştiği timusa göç ederler. Burada, timositler olgunlaşmanın erken aşamalarında CD4 ve CD8 ko-reseptörlerinden yoksundur ve çift negatif timositler olarak adlandırılır (81). DNT hücresi gelişim aşamaları, CD25<sup>+</sup> ve CD44<sup>+</sup> gibi hücre yüzeyi belirteçlerinin ekspresyonu ile karakterize edilir. DN timositlerden gelişen, CD44<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> (DN1) hücreleri CD44<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (DN2) hücrelerinin oluşumuna yol açar. Daha sonra, DN2 hücreleri CD44 ifadesini kaybeder ve CD44<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup> DN3 hücreleri haline gelir. Sonunda, DN3 T hücreleri CD25'i kaybeder ve CD44<sup>-</sup>CD25<sup>-</sup> DN4 hücrelerine farklılaşır. DN4'ü takip eden aşamada DNT hücreleri CD4 ve CD8 edinip, çift pozitif (DP: double positive) T hücreleri haline gelir. Bu hücreler timustan çıkıp perifere gitmeden önce CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> ve CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> tek pozitif olarak farklılaşır (82). DNT hücre gelişiminin fizyolojisi henüz aydınlığa kavuşmamıştır. Periferik DNT hücrelerinin kökenine ilişkin beş teori bulunmaktadır (83). İlk teori DNT hücrelerinin periferde geliştiğini, timusta CD4<sup>+</sup> veya CD8<sup>+</sup> T hücreleri olarak farklılaştığını, ancak daha

sonra ko-reseptörlerini kaybettiklerini öngörmektedir. Lupus yatkınlığı olan, DNT hücrelerinin arttığı bir fare çalışmasında, DNT hücrelerinin öncüsünün CD8<sup>+</sup> hücreler olduğu gösterilmiştir. CD8 ko-reseptörünün normal ifade edildiği hücrelerde, CD8 geninde demetilasyon yolu ile aktivasyon görülmektedir ve CD8 ekspresyonu sağlanmaktadır. DNT hücreleri bu gende aynı demetilasyonu gösterir, ancak CD8<sup>+</sup> reseptörleri mevcut değildir, bu durum da DNT hücrelerinin, periferik CD8<sup>+</sup> T hücrelerinden CD8 reseptörünün negatif regülasyonu ile geliştiğini kanıtlamaktadır (84). Teori 2, hematopoetik kök hücrelerin doğrudan kemik iliğinden çıkıp periferde DNT hücrelerine dönüştüğünü varsaymaktadır (85). Teori 3, timusta DN4 aşamasından DP' ye geçişin hiçbir zaman tamamlanmadığını ve DNT hücrelerinin perifere gittiğini öne sürmektedir (86). Teori 4, timus üzerinden alternatif bir yol olduğunu varsayarken; teori 5'e göre, periferik DNT hücreleri farklı kökenlere sahip heterojen hücrelerden oluşan bir havuzdur ve diğer solid organlarda da lokalize olabilir (87). DNT hücreleri HLA-DR ve CD69 gibi aktivasyon belirteçlerini ifade ederken, aynı zamanda naif T hücrelerinin bir belirteci olan CD45RA' yı ve sitotoksik T hücrelerinin bir belirteci olan granzim A' yı da ifade eder (88). DNT hücrelerinin repertuarı poliklonaldır ancak CD4 ve CD8 T hücrelerinden daha kısıtlıdır. Ayrıntılı bir repertuar analizi, DNT hücrelerinin esasen periferik CD8<sup>+</sup> T hücresi popülasyonundan ortaya çıktığını göstermiştir (89). DNT hücrelerinin proliferasyon olmadığı görülmüş ve bu nedenlerden dolayı DNT hücreler hastalığa neden olan bir hücre popülasyonundan ziyade hastalığın bir belirteci olarak kabul edilmiştir. DNT hücrelerinin sistemik lupus eritematozus (SLE), romatoid artrit (RA), tip 1 diyabet ve Sjögren sendromu gibi çeşitli otoimmün hastalıklara etkin katılımı tanımlanmıştır (90-93). Periferik kanda DNT hücrelerinin artması, artmış doku inflamasyonu ve doku hasarı ile ilişkilidir. Ancak bizim çalışmamızda DNT hücre artışı (>%6) ile apoptoz ilişkili gen ekspresyonları arasında anlamlı korelasyon bulunmamıştır (p>0,05).

Birçok çalışma DNT' lerin hiperaktif mTOR yolağı ile ilişkili olduğunu göstermektedir (23). Bir mTOR inhibitörü olan sirolimusun, farelerde DNT' leri, lenfadenopatiyi, splenomegaliyi ve otoantikörleri azaltmada etkili olduğunu gösteren prelinik ALPS modellerindeki çalışmalara dayanarak, hiperaktif mTOR sinyalinin DNT' lerin anormal çoğalmasını sağlayabileceği hipotezi ortaya atılmıştır (94).

Hastalarımızda mTOR yolağı ile ilgili genlerin ekspresyonunun arttığı ispatlanmış, ancak DNT hücre artışı ile ilişkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $p>0,05$ ).

Bizim çalışmamızda proinflamatuvar süreçlerdeki rolleri iyi bilindiğinden, NFκB kanonik ve non-kanonik yolda yer alan moleküllerden bazılarını değerlendirebilmek amacı ile MAP3K7 (TAK1), MAP3K14 (NIK), NFKB1, NFKB2, NFKBIA ve TRAF3 ekspresyonu değerlendirilmiştir. NFKB1, TAK1, NFKBIA kanonik tarafta fonksiyon gösterirken, NIK, NFKB2 ve TRAF3 non-kanonik tarafta fonksiyon göstermektedir. NFKBIA kanonik yolağın aktive olmasını engellerken, TAK1 aktive olmasına katkıda bulunur. İstirahat halindeki hücrelerde NIK, cIAP'lerin aracılık ettiği K43-bağlı poliubikitinasyon ile yapısal olarak yıkılır. Stimülasyon gerçekleştiğinde, cIAP'ler K43-bağlı poliubikitin zincirlerini TRAF3'e konjuge ederek onun degradasyonunu indükler ve böylece NIK stabilize ve aktive olarak IKK1'i fosforile eder. Böylece alternatif yolağın aktivasyonu gerçekleşir. Bu bilgiler ışığında non-kanonik yolağın aktivasyonu sırasında TRAF3 azalırken, NIK ve NFKB2 ekspresyonunun artması beklenir.

NFKB1, kanonik yolağın sitokin-büyüme faktörü reseptörleri, patern tanıma reseptörleri, B ve T hücre reseptörleri aracılığı ile uyarılarak aktifleşmesi sonucu RelA ile heterodimer oluşturarak nükleusa geçer ve uyarana göre bazı genlerin transkripsiyonunu indükler. Ancak homodimer olarak nükleusa geçerse, supresör etkileri ortaya çıkmaktadır. NFκB proliferasyon, apoptoz, immün yanıt, hücre adezyonu ve farklılaşması gibi hücre fonksiyonları düzenlerken, bir taraftan da NFKB1 lenfomagenezde rol oynar (95). p50/p65 ve p50/c-Rel dimerlerini aktive eden kanonik yolağın ya da p52/RelB dimerlerini aktive eden kanonik olmayan yolağın aracılığıyla, NFκB proteinlerinin anormal aktivasyonu, diffüz büyük B hücreli lenfomada tümör hücresi sağkalımı ve proliferasyonu ile ilişkilendirilmiştir (96). NFκB'de daha önce tanımlanan bir polimorfizmin de mide kanserinde hücre proliferasyonu ve motilitesi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (97). NFκB1 daha önceki çalışmalarda inflamatuvar barsak hastalığı ve serviks, mide, karaciğer ve over kanseri gibi birçok durumla ilişkilendirilmiştir (98, 99). Özellikle TNFR-IL1 ve BCR-TCR-PRR üzerinden NFκB kanonik yolağın aktivasyonunun otoimmün hastalıkların ya da bulguların ortaya çıkmasında önemli rolleri olduğu bilinmektedir (9). NFκB romatoid

artrit, sistemik lupus eritematozus, tip I diyabet, multipl skleroz, inflamatuvar bağırsak hastalığı gibi birçok otoimmün hastalığın patogeneğinde yer almaktadır (100). NFκB aktivasyonu normal bir bağışıklık yanıtı sırasında geçici olarak gerçekleşirken, otoimmün hastalıkların etkilenen dokularında kronik olarak aktive olur. NFκB'nin iyi bilinen bir etkisi, bağışıklık hücrelerinin toplanmasına ve inflamasyonun oluşmasına aracılık eden proinflamatuvar sitokinlerin ve kemokinlerin indüklenmesidir. Buna ek olarak, NFκB, dendritik hücrelerin (DC'ler) işlevini modüle ederek doğrudan veya dolaylı olarak otoimmün T hücrelerinin aktivasyonunu teşvik eder. Düzensiz ve denetimi bozulmuş TCR sinyalizasyonu homeostatik sinyalizasyon eşliğini bozarak belirli otoimmün T hücre klonlarının genişlemesine ve sistemik otoimmünitenin gelişmesine neden olabilir ve NFκB'nin TCR sinyalizasyonuna aracılık etmedeki kritik rolü ile tutarlı olarak, düzensiz NFκB aktivasyonu hayvan modellerinde bozulmuş T hücre homeostazı ve sistemik otoimmünite ile ilişkilidir (101). NFκB ayrıca CD4<sup>+</sup> T hücrelerinin, özellikle de otoimmünite ve inflamasyon patogeneğinde merkezi bir role sahip olan T helper 17 (Th17) hücrelerinin farklılaşmasını düzenler (102). Non-kanonik NFκB yolağı da organizmanın kendi antijenlerine karşı T hücre cevaplarının düzenlenmesinde ve otoimmün T hücrelerinin üretiminde rol oynar. Bu yolun merkezi sinyal bileşeni olan NIK'in T hücrelerinde aşırı ekspresyonu farelerde ölümcül otoimmüniteye neden olmuştur (103). NF-κB sinyal yolunun B hücre reseptörü üzerinden konstitütif aktivasyonu neredeyse tüm DLBCL'lerde bulunan ayırt edici bir özelliktir; bu durum ilk olarak bu lenfoma vakalarının gen ekspresyon profillerinde NFκB hedef genlerinin önemli ölçüde ifadesinin artması ve tümör hücrelerinde NFκB transkripsiyon faktörlerinin nükleer lokalizasyonu ile ortaya çıkmıştır (104). EBV-pozitif Hodgkin Lenfoma (HL) vakalarında (tüm tanıların ~%30-40'ı) NFκB, normal hücre CD40 ve BCR sinyalini taklit eden viral genom tarafından kodlanan LMP1 (Epstein–Barr virus latent membrane protein 1) ve LMP2a (Epstein–Barr virus latent membrane protein 2a) gen ürünleri aracılığıyla aktive edilir (105). Buna karşılık, özellikle EBV negatif HL'de NFκB sinyal kaskadının düzenleyicilerini bozan çoklu genetik değişiklikler bulunmuştur. Ayrıca, NFκB yolunun yapısal aktivasyonu, primer mediastinel büyük B hücreli Lenfoma (PMBL: Primary Mediastinal Large B-Cell Lymphoma)'nin tanımlayıcı bir özelliği olarak kaydedilmiştir; bu durum, NF-κB transkripsiyonel imzası ve tümör hücrelerinde NFκB transkripsiyon faktörü



komplekslerinin nükleer translokasyonu ile kanıtlanmıştır (106). Bütün bunlar göz önüne alındığında otoimmün-lenfoproliferatif bulgularla başvuran hastalarda, çalışmamızda olduğu gibi kanonik ve non-kanonik yolak aktivatör moleküllerinin ifadesinin artması beklenmektedir. Kanonik yolakta yer alan NFkB1 hedef geni açısından rölatif kantifikasyon ortancası hasta grubunda 21,35 ve kontrol grubunda 1,06 olup, hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı fark saptanmıştır ( $p < 0,001$ ). Farklı hasta grupları arasında anlamlı fark saptanmamıştır ( $p > 0,05$ ). NFkB1, ROC eğrisi değerlendirmesi sonucunda da immün disregülasyon imzası için kullanılabilir tanısal performansı yüksek genlerden biri olarak dikkatimizi çekmiştir.

NFkB2, kanonik olmayan yolağın CD40-CD40L, BAFF ve LT $\beta$  tarafından uyarılarak aktive olması sonucu RelB ile kompleks oluşturarak nükleusa geçer ve lenfoid organogenezde yer alan genlerin transkripsiyonunu sağlar. Ancak NFkB1 ile aynı şekilde homodimer olarak nükleusa geçerse, supresör etkileri ortaya çıkmaktadır. NFkB2 fonksiyon kazanım mutasyonları sonucu hastalarda hipogamaglobulinemi, tekrarlayan üst ve alt solunum yolu enfeksiyonları yanında, şiddetli EBV ve CMV enfeksiyonları, siğiller, lenfositik interstisyel pnömoni, bronşiolitis obliterans, primer sklerozan kolanjit, lenfoproliferasyon, T hücreli büyük granüler lenfosit lösemi ve bazal hücreli karsinomlar gibi yaygın değişken immün yetmezliğe özgü olmayan sorunlar da gelişmiştir (107). Bu bilgilere ek olarak non-kanonik NFkB yolağının otoimmün T hücrelerinin üretimindeki fonksiyonu da düşünüldüğünde otoimmün bulgularla ve dolayısı ile immün disregülasyonla başvuran hastalarda NFkB2 gen ifadesinin artması beklenir. Çalışmamızda NFkB2 hedef geni açısından rölatif kantifikasyon ortancası hasta grubunda 49,08 ve kontrol grubunda 0,93 olup, hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı fark saptanmıştır ( $p < 0,001$ ) ve ROC eğrisi ve eğri altında kalan alan dikkate alındığında NFkB2'nin immün disregülasyon durumunu tahmin etmede çalışılan hedef genler içerisinde en önemli biyobelirteç olduğu kanısına varılmıştır. Oluşturduğumuz immün disregülasyon imzasının önemli bir bileşeni olarak ilk sırada yerini almıştır.

MAP3K7 (TAK1), serin/treonin protein kinaz ailesinin bir üyesidir ve kanonik yolakta yer alan bir moleküldür. Hem TNFR-IL1R üzerinden gelen sinyaller hem de B ve T hücrelerde CBM kompleksi aracılığı ile gelen sinyaller aracılığı ile aktifleşerek,

NFκB sinyalini indüklemek için kinaz kompleksi oluşturmak üzere TAB2 ve TAB3 ile veya TAB2, TAB3, LUBAC ve TRAF6 ile birleşir. Bu kompleks IKK'yı fosforilleyerek aktifleşmesini sağlar ve böylece NFκB dimerlerinin aktifleşerek nükleusa yer değiştirmesi ile sonuçlanan enzimatik olaylar kaskadını başlatır. IKK aktivasyonu, bağışıklık hücrelerinin toplanmasına ve aktivasyonuna aracılık eden sitokinlerin, kemokinlerin ve adezyon moleküllerinin ekspresyonunu indükler. Buna ek olarak TAK1, hücreleri sitokin kaynaklı ölümden korumak için antiapoptotik proteinlerin ekspresyonunu indükler. Bu nedenle, sinyal yollarının kilit bir düzenleyicisi olarak TAK1, merkezi sinir sistemi otoimmün enflamasyonu, artrit ve kolit dahil olmak üzere birçok patofizyolojik süreçte rol oynamaktadır (108, 109). Yapılan çalışmalarda TAK1 ifadesinin DLBCL hücrelerinde arttığı ve bu hastaların kötü prognozlu olduğu ve TAK1 inhibisyonunun kronik NFκB sinyalizasyonunun inhibisyonu yoluyla DLBCL hücrelerinin ölümünü teşvik ettiği kanıtlanmıştır (110). Literatürde TAK1 kinazın kutanöz T-hücreli lenfoma hücrelerinde konstitüif olarak aktive olduğu ve TAK1'in kutanöz T-hücreli lenfoma için potansiyel bir biyobelirteç ve terapötik hedef olabileceği gösterilmiştir (111). MAP3K7 hedef geni açısından rölatif kantifikasyon ortancası hasta grubunda 12,44 ve kontrol grubunda 1,19 olup, hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı fark saptanmıştır ( $p < 0,001$ ). Bu hastalarda MAP3K7 kontrolsüz aktivasyonunun özellikle lenfoproliferasyon gelişmesine katkıda bulunabileceği düşünülebilir ve hastalarda sağlıklı kontrollere göre yüksek bulunmuştur.

NFKBIA, diğer adıyla IKBα, NFκB dimerlerinin sitoplazmada inaktif halde tutulmasından sorumludur ve IKK tarafından fosforillere nek degrade olması sonucu NFκB üzerindeki kontrolü sona erer ve NFκB aktifleşir. Bu açıdan düşünüldüğünde, NFKBIA, ekspresyonunun azaldığı durumlarda, NFκB üzerindeki supresör görevini gerçekleştiremez ve kontrolsüz NFκB aktivasyonu gerçekleşir. Ancak NFKBIA ekspresyonunun normal ya da fazla olduğu durumlarda NFκB kontrol altında tutulabilir. Daha önce açıkladığımız NFKB1, NFKB2, MAP3K7, NIK gibi moleküllerin ifadesinin artması NFκB yolak aktivasyonu ile doğru orantılı iken, NFKBIA ve TRAF3 gen ifadelerinin artması NFκB yolak aktivasyonu ile ters orantılıdır. Çalışmamızda NFKBIA hedef geni açısından rölatif kantifikasyon ortancası hasta grubunda 11,64 ve kontrol grubunda 1,1 olup, hasta ve kontrol grubu

arasında anlamlı fark saptanmıştır ( $p < 0,001$ ). Daha önce inflamatuvar barsak hastalığı tanısı bulunan vakalarda yapılmış bir çalışmada infliksimab tedavisi alanlarda intestinal mukozada  $IKB\alpha$  ve  $IKB\gamma$  gen ifadelerinde artış gözlemlendiği ve infliksimab tedavisinin NF $\kappa$ B inhibitörlerinin degradasyonuna yol açan sinyalleri azaltarak, IKB proteinlerinin ifadesinin artmasına neden olduğu ve dolayısı ile NF $\kappa$ B yolak aktivasyonunun baskılandığı belirtilmiştir (112). Bu durum çalışmamızda yer alan hastaların çoğunda immünsupresif tedavilerin ve/veya anti-inflamatuvar biyolojik ajanların kullanılıyor olması ile bağdaştırılabilir. Diğer taraftan kontrolsüz olarak artmış NF $\kappa$ B yolak aktivasyonunu durdurabilmek amacı ile bir feedback mekanizması olarak NFKBIA ifadesinin organizma tarafından arttırıldığını ancak yine de artan aktivatör molekül (NF $\kappa$ B1, NF $\kappa$ B2, MAP3K7, NIK) ifadelerinin önüne geçemediğini öngörebiliriz. ROC eğrimizden de görülebileceği üzere diğer aktivatör moleküllerin artışı, NFKBIA artışından çok daha etkilidir.

MAP3K14 (NIK), NF $\kappa$ B non-kanonik yolakta yer alan ve stabilizasyonunun sağlanması sonrası yolağı aktive eden ve genel olarak daha uzun sürede gerçekleşen, lenfogenezle sonuçlanan olayları başlatan moleküldür. NIK, farklılaşma, büyüme ve hücrenin hayatta kalması dahil olmak üzere temel hücresel süreçlerin kontrolünü sağlar. Önceki çalışmalardan birinde NIK'e özgü bir inhibitör kullanılarak NIK'in inhibe edilmesi, OX40, BAFF ve CD40 sinyalizasyonunda bir azalma yoluyla aşırı aktif bağışıklık hücrelerini kısıtlayarak deneysel bir fare lupus modelinde sağkalımı arttırmıştır (113). Yakın zamanda Romatoid artrit (RA) hastalarından alınan sinovyal sıvıda, NIK'in endotel hücrelerinin inflamatuvar aktivasyonunu ve inflamasyon kaynaklı anjiyogenezini indüklediği gösterilmiştir (114). Sistemik lupus eritematozusa benzer şekilde, yüksek BAFF sinyali inflamatuvar RA mikroçevresini destekler ve bu nedenle, BAFF sinyalinin bir düzenleyicisi olarak NIK, RA terapötikleri için uygun bir hedef olmaktadır (115). Bununla birlikte, kanonik NF $\kappa$ B sinyalizasyonuna benzer şekilde, NIK ve kanonik olmayan NF $\kappa$ B yolağının disregülasyonunun çeşitli kanser türlerinin (akut myeloid lösemi, Hodgkin lenfoma, multipl myelom, meme kanseri, pankreas kanseri, glioblastoma multiforme, melanom) oluşumuna ve ilerlemesine yol açabileceği bildirilmiştir (116). Otoimmünite, otoinflamasyon, lenfoproliferasyon, solid kanser oluşumu ve prognozunda etkin bir molekül olan NIK ifadesinin hastalarımızda da artmış olması beklenen ve deneylerimizde ispatlanmış bir bulgudur.

MAP3K14 hedef geni açısından rölatif kantifikasyon ortancası hasta grubunda 53,19 ve kontrol grubunda 0,89 olup, hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı fark saptanmıştır ( $p<0,001$ ). Farklı hasta grupları arasında ise anlamlı fark saptanmamıştır ( $p>0,05$ ).

TRAF3, NF $\kappa$ B non-kanonik yolda yer alan inhibitör bir moleküldür. T lenfositlerde, T hücresi antijen reseptörü tarafından başlatılan sinyalizasyon için gereklidir. NIK molekülünün negatif regülatörü olan sitoplazmik TRAF3, hem T hem de B hücrelerde NF $\kappa$ B2 aktivasyonunu kısıtlar (117). Aslında TRAF3 ifadesinin de NF $\kappa$ BIA gibi yola aktivasyonu ile ters orantılı bir düzeyde olması beklenir. Daha önce yapılmış olan bir çalışmada, lenfosit-spesifik TRAF3 transgenik fareler üzerinde araştırmalar yapılmış; bu farelerin B hücrelerinde TRAF3'ü aşırı ifade etmesi sağlanmış ve farelerde hipergamaglobulinemi, plazmasitoz, otoimmünite, sistemik inflamasyon ve kanser geliştiği görülmüştür (118). Bu bulgular B hücresi homeostazında TRAF3'ün önemli rolleri olduğunu düşündürmektedir ve TRAF3'ün B hücresi tarafından başlatılan proinflamatuvar eylemler yoluyla dolaylı olarak karsinogenezi teşvik edebileceği tahmin edilmektedir. Hem TRAF3 fazla ekspresyonunun hem de TRAF3 düşük ifadesinin in vivo hiperglobulinemiye ve otoimmüniteye neden olması, TRAF3 için farklı rollerin, benzer fenotipe yol açması ancak farklı nedenlerle ortaya çıkması anlamına gelebilir. Overekspresyon durumunda kronik inflamasyonun kanserlere yakınlık yarattığı düşünülmektedir (119). TRAF3 hedef geni açısından rölatif kantifikasyon ortancası hasta grubunda 6,75 (IQR: 1,16-13,11) ve kontrol grubunda 1,2 (IQR: 0,45-2,98) olup, hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı fark saptanmıştır ( $p=0,002$ ). TRAF3'ün, ekspresyonu azaldığında tümör supresor fonksiyonunun baskılanması nedeni ile ve ekspresyonu arttığında ise kronik aktivasyonu tetikleyerek malignensilere yakınlık yarattığı düşünülmektedir. Ancak TRAF3 molekülünün bu çift taraflı dengesi, molekül ekspresyonundaki artışın diğer genler kadar belirgin olmamasına neden olmaktadır. ROC eğrimizden yola çıkılarak diğer aktivatör moleküllerin artışı, TRAF3 artışından daha etkilidir ve immün disregülasyon imzası için anlamlı görünmemektedir.

AKT ve mTOR, fosfoinositid 3 kinaz yolağının efektör molekülleridir. PI3K yolağını ilgilendiren moleküllerde meydana gelen mutasyonlar eğer fonksiyon

kazanımı ile sonuçlanırsa, yolağın kontrolsüz aktivasyonu gerçekleşerek, AKT ve mTOR ifadesi artmakta ve immün disregülasyona ait otoimmünite, otoinflamasyon ve lenfoproliferasyon bulguları ortaya çıkmaktadır (120-123). Fare çalışmalarında artmış ve disregüle PI3K/AKT ekspresyonunun sistemik otoimmüniteye neden olduğu gösterilmiştir (124). Yapılmış olan çalışmalardan elde edilen kanıtlara göre, AKT molekülünün EBV kaynaklı malignitelerde önemli bir rol oynadığını gösterilmiştir (125). EBV onkoproteinleri olan latent membran proteinleri (LMP)1 ve LMP2A, PI3K/AKT yolunu aktive edebilir ve bu da hücrelerin hayatta kalmasını, apoptozu, çoğalmasını ve genomik instabilitiyi, alt akış hedef proteinleri aracılığıyla kansere yatkınlık yaratacak şekilde etkiler. Ayrıca, PI3K/AKT yolunun aktivasyonunun kemoterapiye karşı ilaç direncine yol açabileceği gösterilmiştir. Bu nedenle, bu yolun inhibisyonu EBV ile ilişkili kanserlere karşı terapötik etkinliğini artırabilir. Bunların yanında ALPS hastalarında mTOR kontrolsüz aktivasyonunun lenfoproliferasyonu tetiklediği gösterilmiştir (23). Literetür ile uyumlu olarak AKT hedef geni açısından rölatif kantifikasyon ortancası hasta grubunda 22,9 (IQR: 13,79-42,05) ve kontrol grubunda 1,88 (IQR: 0,46-3,34) olup, hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı fark saptanmıştır ( $p<0,001$ ). mTOR hedef geni açısından rölatif kantifikasyon ortancası hasta grubunda 14,31 (IQR: 8,48-23,03) ve kontrol grubunda 1,01 (IQR: 0,49-1,94) olup, hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı fark saptanmıştır ( $p<0,001$ ).

Hastalarımızda çalışma sürdüğü sırada saptanan genetik defektler Tablo 2' de verilmiştir. H20'de *IL21R* homozigot bir varyant saptanmıştır. İnterlökin 21 (IL-21) veya interlökin 21 reseptöründe (IL-21R) fonksiyon kaybı ile sonuçlanan biallelik mutasyonlar sonucu kombine immün yetmezlik gelişen hastalar tanımlanmıştır (126). Hastaların çoğunda, özellikle kronik kolanjit ile ilişkili kriptosporidial enfeksiyonlar olmak üzere tekrarlayan solunum yolu bakteriyel ve gastrointestinal enfeksiyonları bildirilmiştir. IL-21/IL-21R eksikliğinin diğer özellikleri kronik ishal, büyüme geriliği, herpes labialis, mikobakteriyel enfeksiyonlar ve hipogamaglobulinemidir. Bu bireylerde T hücre proliferasyonunun, sitokin üretiminin, B hücresi farklılaşmasının bozulduğu ve doğal öldürücü hücre sitotoksitesinin azaldığını tanımlanmıştır. Daha önceki yayınlarda yüksek IL-21 düzeyinin otoimmünite ile ilişkisi ortaya konulmuştur (127). Literatürde, yüksek IL-21 düzeyinin otoimmünite patogenezini etkilediği kesin mekanizmalar konusunda farklı düşünceler vardır. Otoimmün hastalık patogenezinde,

artan IL-21/IL-21R sinyalizasyonunun B hücreleri üzerindeki etkileri üzerinde durulmuştur (128). Diğer taraftan IL-21'in, proliferasyonu destekleyen metabolik yolların (PI3K/AKT ve MAP kinaz) aktivasyonunu tetiklediği bilinmektedir (129). Çalışmış olduğumuz hedef genlerden PI3K yolağı molekülleri ile ilişkisi bulunduğu görülmektedir.

Bir hastamızda (H25) *SRP72* geninde heterozigot bir varyant saptanmıştır. Daha önceki çalışmalarda *SRP72* myelodisplastik sendrom ile ilişkili bulunmuştur (130). Literatürde bizim çalıştığımız hedef genlerle ilişkilendirilmemiştir. Tanımlanan *SRP72* varyantı taşıyan hastalarda otoimmünite ya da lenfoproliferasyon bildirilmemiştir. Hastamızın kliniğini direk şekillendirmekten ziyade, sitopeni durumuna katkıda bulunduğunu düşünmekteyiz.

Diğer bir hastamızda (H16) ise *SKIV2L* geninde homozigot bir varyant tespit edilmiştir. *SKIV2L*'deki fonksiyon kaybı mutasyonları ishal, cilt lezyonları, kırılğan saçlar ve immün yetmezlik ile karakterize trikohepatoenterik sendroma neden olur. Hastalık seyirindeki otoinflamatuvar durumların patogenezi araştırılmaktadır. Bir çalışmada *SKIV2L* eksikliğinin keratinositlerde ve T hücrelerde mTORC1 sinyalizasyonunu aktive ettiği ve cilt bariyer bütünlüğünü ve T hücresi homeostazını bozduğu bildirilmiştir (131). İlginç bir şekilde, mTOR inhibitörü rapamisin ile tedavi, *SKIV2L* eksikliği olan farelerde cilt semptomlarını iyileştirmiştir. mTOR bizim çalışmamızdaki hedef genlerimizden birisidir, hastamızdaki artışı bu durumla açıklanabilir.

H19'da *UNC13D* geninde birleşik heterozigot bir varyant saptanmıştır. Familial hemofagositik lenfositosis nedenlerinden biri olup, resesif kalıtlı ve IUIS'e göre immün disregülasyon hastalıkları ve altgrupları başlığında sınıflandırılmıştır. T lenfositlerin ve makrofajların ateş ile ilişkili kontrolsüz aktivasyonu hastalığın yaygın klinik tablosuna (pansitopeni, hepatosplenomegali, kemik iliğinde hemofagositoz) neden olmaktadır (132). Daha önce yapılmış bir çalışmada 21 ALPS hastasında ve sağlıklı kontroller ile multiple skleroz hastalarında *UNC13D* dizilemesi yapılmış ve üç ALPS hastasında *UNC13D* geninde nadir varyantlar saptanmıştır (133). Bu veriler, *UNC13D*'nin fonksiyon kaybı ile sonuçlanan varyasyonlarının ALPS gelişimi için risk faktörü olduğunu göstermiştir. Bu çalışma

apoptoz yolağı ile UNC13D mutasyonları arasında bir ilişki olduğunu düşündürmektedir.

Diğer bir hastamızda (H31) ise *UBA1* hemizigot bir varyant tespit edilmiştir. Son zamanlarda, kemik iliğinde *UBA1*'deki somatik varyantlardan kaynaklanan VEXAS (vakuoller, E1-ubiquitin aktive edici enzim, X'e bağlı, otoinflamatuvar, somatik) sendromu tanımlanmıştır (134). Daha önce bilinen inflamasyonun genetik nedenlerinden farklı olarak, *UBA1* varyantları edinilmiş nedenlerdir ve klinik bulgular yaşamın ilerleyen dönemlerinde ortaya çıkar. Germ hattı *UBA1* varyantları ise X'e bağlı spinal kaslar atrofiye neden olur. VEXAS sendromlu hastalarda inflamasyonun neden olduğu romatolojik, hematolojik, dermatolojik ve pulmoner bulgular görülür. Ubikitin benzeri modifiye edici aktive edici enzim 1 (*UBA1*), ubikitinasyonu başlatan bir ubikitin aktive edici enzimdir. NFκB yolağının aktivasyonu için ubikitasyonun önemli bir mekanizma olması nedeni ile *UBA1* ve NFκB yolağı arasında ilişki olabileceğini öngörmekteyiz.

Hasta ve kontrol grupları arasında bütün hedef genler açısından ekspresyon farkı belirgin iken, farklı hasta grupları (ALPS, immün sitopeni ve EBV ilişkili lenfoproliferasyon grupları) kendi arasında gen ekspresyonları açısından anlamlı farklılık göstermemiştir. Gruplar ayrı ayrı kontrollerle karşılaştırıldığında gen ifade farkları anlamlı, ancak birbirleri ile karşılaştırıldığında anlamlı değildir. Bunu hasta gruplarının genelde örtüşen klinik bulguları gösteren hastalardan seçilmiş olmasından kaynaklandığını düşünmekteyiz. Bu bulguların hepsini (otoimmünite, lenfoproliferasyon, malignensi) bir çatı altında (immün disregülasyon çatısı) düşünebiliriz, genelde aynı hastada farklı zamanlarda da olsa birlikte görülebildiğini bilmekteyiz. Bu nedenle hastalığı gruplandırmamız da immün disregülasyon çatısı altında takip edilen hastalarda immün disregülasyon imzası bakarak; tanı, prognoz öngörüsü ve tedavi planlanması-takibinde önemli ipuçları elde edeceğimizi düşünmekteyiz.

Hedef genlerin tanısal performansını saptayabilmek ve rölatif kantifikasyon olarak ifade edilen ekspresyon karşılaştırmalarının hastalar ile kontrolleri ayırmadaki doğruluk oranını belirleyebilmek amacıyla yapılan ROC eğrisi değerlendirmelerinde, hasta ve hasta olmayan bireyleri ayırt edebilmesi açısından tanısal oranı en yüksek

hedef genler NFKB2, MAP3K7, AKT, mTOR, NFKB1 ve FAS genleri olarak belirlenmiştir. Çalışmamızda bütün hedef genler için cut-off değerleri verilmiştir, ancak daha fazla sayıda hasta ve kontrollerle yapılacak olan çalışmalar da, cut-off değerlerinin daha net ve doğru belirlenmesine katkıda bulunacaktır. Literatürden bildiğimiz üzere interferon imzası, interferon aracılı inflamatuvar hastalıklarda başarı ile kullanılabilen bir tanısal biyobelirteçtir (135). Biz de immün disregülasyon hastaları için, özellikle immün sitopeni ve lenfoproliferasyon grubu için immün disregülasyon skoru-imzası oluşturabiliriz. Bizim çalışmamızdan çıkan sonuçlar dikkate alınarak özellikle NFKB1, NFKB2, MAP3K7, AKT, mTOR ve FAS kullanılarak bir skor oluşturulabilir. Ancak daha geniş bir hasta kohortunda farklı genlerle yapılacak olan çalışmalar ile de skor için kullanılacak genler arttırılabilir. Şekil 14 ve 15'te hasta ve sağlıklı kontroller dahil edilerek, hem çalışmamızda değerlendirilen bütün genler hem de ROC eğrisi ve cut-off değerlendirmeleri sonucu tanısal oranı daha yüksek olarak belirlenen 6 gen için Z-skoruna dayalı göreceli gen ifadelerini gösteren heat map-ısı haritaları oluşturulmuştur. Hasta grubu ve kontroller arasındaki keskin fark ikisinde de göze çarparken, seçilmiş 6 hedef gen için yapılan heat map-ısı haritası çok daha dikkat çekicidir ve hasta ve kontroller arasındaki fark daha belirgin hale gelmiştir. İmmün disregülasyon imzası yapılacak geniş çaplı çalışmalarla geliştirilerek, immün disregülasyon hastaları için bir biyobelirteç olarak kullanılabilir.



## 6. SONUÇ ve ÖNERİLER

1. İmmün disregülasyon hastaları klinik bulgulara göre üç gruba ayrılmıştır. Gruplar otoimmün lenfoproliferatif sendrom kliniği olan hastalar, immün sitopeni (otoimmün hemolitik anemi ve/veya lökopeni ve/veya idiyopatik-immün trombositopeni) nedeni ile başvuran hastalar ve EBV ilişkili lenfoproliferasyon (lenfadenopati ve/veya splenomegali) kliniği olan hastalardan oluşturulmuştur.
2. Apoptoz, Nükleer faktör-  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) ve Fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K) yolları değerlendirilmiştir. Gen ekspresyonları açısından farklı gruplar kendi arasında ve kontrolle karşılaştırılarak anlamlılık değerlendirilmiştir.
3. CASP8, FAS, FASL, AKT, MAP3K7 (TAK1), MAP3K14 (NIK), mTOR, NFKB1, NFKB2 ve NFKBIA gen ekspresyonlarında tüm gruplarda kontrole göre belirgin anlamlı artış saptanmıştır. CASP10 gen ekspresyonu grup 1 ve grup 2'nin kontrole göre karşılaştırmasında anlamlı olarak artmışken, grup 3-kontrol karşılaştırmasında anlamlı fark saptanmamıştır. TRAF3 gen ekspresyonu ise grup 1-kontrol karşılaştırmasında anlamlı olarak artmışken, grup 2 ve grup 3'ün kontrole göre karşılaştırmasında anlamlı fark saptanmamıştır.
4. Apoptoz yolak moleküllerinin (CASP8, CASP10, FAS, FASL) gen ifadesinin artması kompensatris olarak değerlendirilmiştir.
5. mTOR yolak moleküllerinin ekspresyon artışı lenfoproliferasyon ve otoimmünitede hücre proliferasyon ve aktivasyonu ile ilişkili bulunmuştur.
6. Çalışmada kontrolle belirgin farklılık ve gruplar arasında benzerlik görülmesi çalışmanın sonuçlarının başarılı olduğu şeklinde yorumlanmıştır.
7. Klinik bulgulara göre üç grupta incelenen ve kontrolle karşılaştırmalı olarak değerlendirilen hasta gruplarının birbirleri arasında anlamlı farklılık olmaması, bu hastalarda farklı klinik bulgular olsa da immün disregülasyonun aynı mekanizmalar üzerinden ilerlediğinin göstergesidir.
8. Bu nedenle de interferon imzasına benzer şekilde immün disregülasyon imzasının yani ekspresyonu en çok artan genlerin değerlendirilmesinin immün disregülasyon açısından tanı ve tedavide yol gösterici olabileceği düşünülmektedir.

## 7. KAYNAKLAR

1. McCusker C, Upton J, Warrington R. Primary immunodeficiency. *Allergy Asthma Clin Immunol.* 2018;14(Suppl 2):61.
2. Yu JE. New primary immunodeficiencies 2023 update. *Curr Opin Pediatr.* 2023.
3. Bousfiha A, Moundir A, Tangye SG, Picard C, Jeddane L, Al-Herz W, et al. The 2022 Update of IUIS Phenotypical Classification for Human Inborn Errors of Immunity. *J Clin Immunol.* 2022;42(7):1508-20.
4. Savaşan S, Warriier I, Buck S, Kaplan J, Ravindranath Y. Increased lymphocyte Fas expression and high incidence of common variable immunodeficiency disorder in childhood Evans' syndrome. *Clin Immunol.* 2007;125(3):224-9.
5. Suzuki I, Fink PJ. Maximal proliferation of cytotoxic T lymphocytes requires reverse signaling through Fas ligand. *J Exp Med.* 1998;187(1):123-8.
6. Kühtreiber WM, Hayashi T, Dale EA, Faustman DL. Central role of defective apoptosis in autoimmunity. *J Mol Endocrinol.* 2003;31(3):373-99.
7. Worth A, Thrasher AJ, Gaspar HB. Autoimmune lymphoproliferative syndrome: molecular basis of disease and clinical phenotype. *Br J Haematol.* 2006;133(2):124-40.
8. Meynier S, Rieux-Laucat F. FAS and RAS related Apoptosis defects: From autoimmunity to leukemia. *Immunol Rev.* 2019;287(1):50-61.
9. Barnabei L, Laplantine E, Mbongo W, Rieux-Laucat F, Weil R. NF- $\kappa$ B: At the Borders of Autoimmunity and Inflammation. *Front Immunol.* 2021;12:716469.
10. Tas SW, Bryant VL, Cook MC. Editorial: Non-canonical NF- $\kappa$ B signaling in immune-mediated inflammatory diseases and malignancies. *Front Immunol.* 2023;14:1252939.
11. Sun SC, Chang JH, Jin J. Regulation of nuclear factor- $\kappa$ B in autoimmunity. *Trends Immunol.* 2013;34(6):282-9.
12. Grondona P, Bucher P, Schulze-Osthoff K, Hailfinger S, Schmitt A. NF- $\kappa$ B Activation in Lymphoid Malignancies: Genetics, Signaling, and Targeted Therapy. *Biomedicines.* 2018;6(2).
13. Wirasinha RC, Davies AR, Srivastava M, Sheridan JM, Sng XYX, Delmonte OM, et al. Nfkb2 variants reveal a p100-degradation threshold that defines autoimmune susceptibility. *J Exp Med.* 2021;218(2).
14. Cao H, Lu J, Du J, Xia F, Wei S, Liu X, et al. TAK1 inhibition prevents the development of autoimmune diabetes in NOD mice. *Sci Rep.* 2015;5:14593.
15. Zhang GL, Zou YF, Feng XL, Shi HJ, Du XF, Shao MH, et al. Association of the NFKBIA gene polymorphisms with susceptibility to autoimmune and inflammatory diseases: a meta-analysis. *Inflamm Res.* 2011;60(1):11-8.
16. Zhang M, Huang J, Tan X, Bai J, Wang H, Ge Y, et al. Common Polymorphisms in the NFKBIA Gene and Cancer Susceptibility: A Meta-Analysis. *Med Sci Monit.* 2015;21:3186-96.

17. Boztug H, Hirschmugl T, Holter W, Lakatos K, Kager L, Trapin D, et al. NF- $\kappa$ B1 Haploinsufficiency Causing Immunodeficiency and EBV-Driven Lymphoproliferation. *J Clin Immunol*. 2016;36(6):533-40.
18. Nunes-Santos CJ, Uzel G, Rosenzweig SD. PI3K pathway defects leading to immunodeficiency and immune dysregulation. *J Allergy Clin Immunol*. 2019;143(5):1676-87.
19. Ball J, Archer S, Ward S. PI3K inhibitors as potential therapeutics for autoimmune disease. *Drug Discov Today*. 2014;19(8):1195-9.
20. Pham MN, Cunningham-Rundles C. Evaluation of Lymphoproliferative Disease and Increased Risk of Lymphoma in Activated Phosphoinositide 3 Kinase Delta Syndrome: A Case Report With Discussion. *Front Pediatr*. 2018;6:402.
21. Wu T, Mohan C. The AKT axis as a therapeutic target in autoimmune diseases. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2009;9(2):145-50.
22. Suto T, Karonitsch T. The immunobiology of mTOR in autoimmunity. *J Autoimmun*. 2020;110:102373.
23. Völkl S, Rensing-Ehl A, Allgäuer A, Schreiner E, Lorenz MR, Rohr J, et al. Hyperactive mTOR pathway promotes lymphoproliferation and abnormal differentiation in autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Blood*. 2016;128(2):227-38.
24. Chinn IK, Chan AY, Chen K, Chou J, Dorsey MJ, Hajjar J, et al. Diagnostic interpretation of genetic studies in patients with primary immunodeficiency diseases: A working group report of the Primary Immunodeficiency Diseases Committee of the American Academy of Allergy, Asthma & Immunology. *J Allergy Clin Immunol*. 2020;145(1):46-69.
25. Chi CY, Lin CH, Ho MW, Ding JY, Huang WC, Shih HP, et al. Clinical manifestations, course, and outcome of patients with neutralizing anti-interferon- $\gamma$  autoantibodies and disseminated nontuberculous mycobacterial infections. *Medicine (Baltimore)*. 2016;95(25):e3927.
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 Clin Immunol*. 2022;18(1):19.
27. Notarangelo LD. Primary immunodeficiencies. *J Allergy Clin Immunol*. 2010;125(2 Suppl 2):S182-94.
28. Bonilla FA, Khan DA, Ballas ZK, Chinen J, Frank MM, Hsu JT, et al. Practice parameter for the diagnosis and management of primary immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol*. 2015;136(5):1186-205.e1-78.
29. Kilic SS, Ozel M, Hafizoglu D, Karaca NE, Aksu G, Kutukculer N. The prevalences [correction] and patient characteristics of primary immunodeficiency diseases in Turkey--two centers study. *J Clin Immunol*. 2013;33(1):74-83.
30. Chinen J, Paul ME, Shearer WT. Approach to the Evaluation of the immunodeficient patient. Rich RR, Fleisher TA, Shearer WT, Schroeder HWJ, Frew A, Weyand C, editors. London: Elsevier; 2012. pp. 1-31.

31. Bonilla FA, Bernstein IL, Khan DA, Ballas ZK, Chinen J, Frank MM, et al. Practice parameter for the diagnosis and management of primary immunodeficiency. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2005;94(5 Suppl 1):S1-63.
32. Parvaneh N, Casanova JL, Notarangelo LD, Conley ME. Primary immunodeficiencies: a rapidly evolving story. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;131(2):314-23.
33. Chinn IK, Orange JS. Immunodeficiency Disorders. *Pediatr Rev*. 2019;40(5):229-42.
34. Azizi G, Pouyani MR, Abolhassani H, Sharifi L, Dizaji MZ, Mohammadi J, et al. Cellular and molecular mechanisms of immune dysregulation and autoimmunity. *Cell Immunol*. 2016;310:14-26.
35. Goodnow CC, Sprent J, Fazekas de St Groth B, Vinuesa CG. Cellular and genetic mechanisms of self tolerance and autoimmunity. *Nature*. 2005;435(7042):590-7.
36. Liston A, Lesage S, Gray DH, Boyd RL, Goodnow CC. Genetic lesions in T-cell tolerance and thresholds for autoimmunity. *Immunol Rev*. 2005;204:87-101.
37. Tsubata T, Honjo T. B cell tolerance and autoimmunity. *Rev Immunogenet*. 2000;2(1):18-25.
38. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 2007;35(4):495-516.
39. Lucas CL, Chandra A, Nejentsev S, Condliffe AM, Okkenhaug K. PI3K $\delta$  and primary immunodeficiencies. *Nat Rev Immunol*. 2016;16(11):702-14.
40. Chan FK, Chun HJ, Zheng L, Siegel RM, Bui KL, Lenardo MJ. A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. *Science*. 2000;288(5475):2351-4.
41. Sprick MR, Weigand MA, Rieser E, Rauch CT, Juo P, Blenis J, et al. FADD/MORT1 and caspase-8 are recruited to TRAIL receptors 1 and 2 and are essential for apoptosis mediated by TRAIL receptor 2. *Immunity*. 2000;12(6):599-609.
42. Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, et al. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *Embo j*. 1995;14(22):5579-88.
43. Irmeler M, Thome M, Hahne M, Schneider P, Hofmann K, Steiner V, et al. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature*. 1997;388(6638):190-5.
44. Park DR, Thomsen AR, Frevert CW, Pham U, Skerrett SJ, Kiener PA, et al. Fas (CD95) induces proinflammatory cytokine responses by human monocytes and monocyte-derived macrophages. *J Immunol*. 2003;170(12):6209-16.
45. Kischkel FC, Lawrence DA, Tinel A, LeBlanc H, Virmani A, Schow P, et al. Death receptor recruitment of endogenous caspase-10 and apoptosis initiation in the absence of caspase-8. *J Biol Chem*. 2001;276(49):46639-46.

46. Ichim G, Tait SW. A fate worse than death: apoptosis as an oncogenic process. *Nat Rev Cancer*. 2016;16(8):539-48.
47. Obeng E. Apoptosis (programmed cell death) and its signals - A review. *Braz J Biol*. 2021;81(4):1133-43.
48. Oliveira JB, Bleesing JJ, Dianzani U, Fleisher TA, Jaffe ES, Lenardo MJ, et al. Revised diagnostic criteria and classification for the autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS): report from the 2009 NIH International Workshop. *Blood*. 2010;116(14):e35-40.
49. Magerus A, Bercher-Brayer C, Rieux-Laucat F. The genetic landscape of the FAS pathway deficiencies. *Biomed J*. 2021;44(4):388-99.
50. Kohn LA, Long JD, Trope EC, Kuo CY. Novel Compound Heterozygote Variations in FADD Identified to Cause FAS-Associated Protein with Death Domain Deficiency. *J Clin Immunol*. 2020;40(4):658-61.
51. Zhang Q, Lenardo MJ, Baltimore D. 30 Years of NF- $\kappa$ B: A Blossoming of Relevance to Human Pathobiology. *Cell*. 2017;168(1-2):37-57.
52. Pahl HL. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene*. 1999;18(49):6853-66.
53. Lawrence T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2009;1(6):a001651.
54. Oeckinghaus A, Ghosh S. The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2009;1(4):a000034.
55. Hayden MS, Ghosh S. Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell*. 2008;132(3):344-62.
56. Dondelinger Y, Darding M, Bertrand MJ, Walczak H. Poly-ubiquitination in TNFR1-mediated necroptosis. *Cell Mol Life Sci*. 2016;73(11-12):2165-76.
57. Iwai K. Diverse roles of the ubiquitin system in NF- $\kappa$ B activation. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1843(1):129-36.
58. Tokunaga F. Linear ubiquitination-mediated NF- $\kappa$ B regulation and its related disorders. *J Biochem*. 2013;154(4):313-23.
59. Bonizzi G, Karin M. The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol*. 2004;25(6):280-8.
60. Sun SC. Non-canonical NF- $\kappa$ B signaling pathway. *Cell Res*. 2011;21(1):71-85.
61. Schnappauf O, Aksentijevich I. Mendelian diseases of dysregulated canonical NF- $\kappa$ B signaling: From immunodeficiency to inflammation. *J Leukoc Biol*. 2020;108(2):573-89.
62. Goncalves MD, Hopkins BD, Cantley LC. Phosphatidylinositol 3-Kinase, Growth Disorders, and Cancer. *N Engl J Med*. 2018;379(21):2052-62.
63. Okkenhaug K. Signaling by the phosphoinositide 3-kinase family in immune cells. *Annu Rev Immunol*. 2013;31:675-704.

64. Hawkins PT, Stephens LR. PI3K signalling in inflammation. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1851(6):882-97.
65. Lucas CL, Kuehn HS, Zhao F, Niemela JE, Deenick EK, Palendira U, et al. Dominant-activating germline mutations in the gene encoding the PI(3)K catalytic subunit p110 $\delta$  result in T cell senescence and human immunodeficiency. *Nat Immunol*. 2014;15(1):88-97.
66. Coulter TI, Cant AJ. The Treatment of Activated PI3K $\delta$  Syndrome. *Front Immunol*. 2018;9:2043.
67. Schatorjé EJ, Gemen EF, Driessen GJ, Leuvenink J, van Hout RW, van der Burg M, et al. Age-matched reference values for B-lymphocyte subpopulations and CVID classifications in children. *Scand J Immunol*. 2011;74(5):502-10.
68. Schatorjé EJ, Gemen EF, Driessen GJ, Leuvenink J, van Hout RW, de Vries E. Paediatric reference values for the peripheral T cell compartment. *Scand J Immunol*. 2012;75(4):436-44.
69. Kiraz Y, Adan A, Kartal Yandim M, Baran Y. Major apoptotic mechanisms and genes involved in apoptosis. *Tumour Biol*. 2016;37(7):8471-86.
70. Ben-Mustapha I, Agrebi N, Barbouche MR. Novel insights into FAS defects underlying autoimmune lymphoproliferative syndrome revealed by studies in consanguineous patients. *J Leukoc Biol*. 2018;103(3):501-8.
71. Hsu AP, Dowdell KC, Davis J, Niemela JE, Anderson SM, Shaw PA, et al. Autoimmune lymphoproliferative syndrome due to FAS mutations outside the signal-transducing death domain: molecular mechanisms and clinical penetrance. *Genet Med*. 2012;14(1):81-9.
72. Yoshikawa T, Saito H, Osaki T, Matsumoto S, Tsujitani S, Ikeguchi M. Elevated Fas expression is related to increased apoptosis of circulating CD8 $^{+}$  T cell in patients with gastric cancer. *J Surg Res*. 2008;148(2):143-51.
73. Suzuki I, Fink PJ. The dual functions of fas ligand in the regulation of peripheral CD8 $^{+}$  and CD4 $^{+}$  T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(4):1707-12.
74. Badley AD, McElhinny JA, Leibson PJ, Lynch DH, Alderson MR, Paya CV. Upregulation of Fas ligand expression by human immunodeficiency virus in human macrophages mediates apoptosis of uninfected T lymphocytes. *J Virol*. 1996;70(1):199-206.
75. Lundy SK, Boros DL. Fas ligand-expressing B-1a lymphocytes mediate CD4(+)-T-cell apoptosis during schistosomal infection: induction by interleukin 4 (IL-4) and IL-10. *Infect Immun*. 2002;70(2):812-9.
76. Arakaki R, Yamada A, Kudo Y, Hayashi Y, Ishimaru N. Mechanism of activation-induced cell death of T cells and regulation of FasL expression. *Crit Rev Immunol*. 2014;34(4):301-14.
77. Mack A, Häcker G. Inhibition of caspase or FADD function blocks proliferation but not MAP kinase-activation and interleukin-2-production during primary stimulation of T cells. *Eur J Immunol*. 2002;32(7):1986-92.

78. Horn S, Hughes MA, Schilling R, Sticht C, Tenev T, Ploesser M, et al. Caspase-10 Negatively Regulates Caspase-8-Mediated Cell Death, Switching the Response to CD95L in Favor of NF- $\kappa$ B Activation and Cell Survival. *Cell Rep*. 2017;19(4):785-97.
79. Verzella D, Pescatore A, Capece D, Vecchiotti D, Ursini MV, Franzoso G, et al. Life, death, and autophagy in cancer: NF- $\kappa$ B turns up everywhere. *Cell Death Dis*. 2020;11(3):210.
80. Ofengeim D, Yuan J. Regulation of RIP1 kinase signalling at the crossroads of inflammation and cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2013;14(11):727-36.
81. Spits H. Development of alphabeta T cells in the human thymus. *Nat Rev Immunol*. 2002;2(10):760-72.
82. Dik WA, Pike-Overzet K, Weerkamp F, de Ridder D, de Haas EF, Baert MR, et al. New insights on human T cell development by quantitative T cell receptor gene rearrangement studies and gene expression profiling. *J Exp Med*. 2005;201(11):1715-23.
83. Newman-Rivera AM, Kurzhagen JT, Rabb H. TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup> CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>-</sup> "double negative" T cells in health and disease-implications for the kidney. *Kidney Int*. 2022;102(1):25-37.
84. Mehal WZ, Crispe IN. TCR ligation on CD8<sup>+</sup> T cells creates double-negative cells in vivo. *J Immunol*. 1998;161(4):1686-93.
85. Ford MS, Zhang ZX, Chen W, Zhang L. Double-negative T regulatory cells can develop outside the thymus and do not mature from CD8<sup>+</sup> T cell precursors. *J Immunol*. 2006;177(5):2803-9.
86. Takahama Y, Kosugi A, Singer A. Phenotype, ontogeny, and repertoire of CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> T cell receptor alpha beta + thymocytes. Variable influence of self-antigens on T cell receptor V beta usage. *J Immunol*. 1991;146(4):1134-41.
87. Martina MN, Noel S, Saxena A, Bandapalle S, Majithia R, Jie C, et al. Double-Negative  $\alpha\beta$  T Cells Are Early Responders to AKI and Are Found in Human Kidney. *J Am Soc Nephrol*. 2016;27(4):1113-23.
88. Bleesing JJ, Brown MR, Novicio C, Guarraia D, Dale JK, Straus SE, et al. A composite picture of TcR alpha/beta(+) CD4(-)CD8(-) T Cells (alpha/beta-DNTCs) in humans with autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Clin Immunol*. 2002;104(1):21-30.
89. Bristeau-Leprince A, Mateo V, Lim A, Magerus-Chatinet A, Solary E, Fischer A, et al. Human TCR alpha/beta<sup>+</sup> CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> double-negative T cells in patients with autoimmune lymphoproliferative syndrome express restricted Vbeta TCR diversity and are clonally related to CD8<sup>+</sup> T cells. *J Immunol*. 2008;181(1):440-8.
90. El-Sayed ZA, El-Owaidy RH, Mohamed NL, Shehata BA. Alpha beta double negative T cells in children with systemic lupus erythematosus: The relation to disease activity and characteristics. *Mod Rheumatol*. 2018;28(4):654-60.

91. Liu MF, Yang CY, Chao SC, Li JS, Weng TH, Lei HY. Distribution of double-negative (CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup>, DN) T subsets in blood and synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol*. 1999;18(3):227-31.
92. Liu T, Cong M, Sun G, Wang P, Tian Y, Shi W, et al. Combination of double negative T cells and anti-thymocyte serum reverses type 1 diabetes in NOD mice. *J Transl Med*. 2016;14:57.
93. Hayashi Y, Haneji N, Hamano H. Pathogenesis of Sjögren's syndrome-like autoimmune lesions in MRL/lpr mice. *Pathol Int*. 1994;44(8):559-68.
94. Teachey DT, Obzut DA, Axsom K, Choi JK, Goldsmith KC, Hall J, et al. Rapamycin improves lymphoproliferative disease in murine autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS). *Blood*. 2006;108(6):1965-71.
95. Cai Q, Tu M, Xu-Monette ZY, Sun R, Manyam GC, Xu X, et al. NF- $\kappa$ B p50 activation associated with immune dysregulation confers poorer survival for diffuse large B-cell lymphoma patients with wild-type p53. *Mod Pathol*. 2017;30(6):854-76.
96. Staudt LM. Oncogenic activation of NF-kappaB. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010;2(6):a000109.
97. Chen Y, Lu R, Zheng H, Xiao R, Feng J, Wang H, et al. The NFKB1 polymorphism (rs4648068) is associated with the cell proliferation and motility in gastric cancer. *BMC Gastroenterol*. 2015;15:21.
98. Glas J, Török HP, Tonenchi L, Müller-Myhsok B, Mussack T, Wetzke M, et al. Role of the NFKB1 -94ins/delATTG promoter polymorphism in IBD and potential interactions with polymorphisms in the CARD15/NOD2, IKBL, and IL-1RN genes. *Inflamm Bowel Dis*. 2006;12(7):606-11.
99. Gilmore TD. NF- $\kappa$ B and Human Cancer: What Have We Learned over the Past 35 Years? *Biomedicines*. 2021;9(8).
100. Pai S, Thomas R. Immune deficiency or hyperactivity-Nf-kappab illuminates autoimmunity. *J Autoimmun*. 2008;31(3):245-51.
101. Theofilopoulos AN, Dummer W, Kono DH. T cell homeostasis and systemic autoimmunity. *J Clin Invest*. 2001;108(3):335-40.
102. Dong C. TH17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(5):337-48.
103. Murray SE, Polesso F, Rowe AM, Basak S, Koguchi Y, Toren KG, et al. NF- $\kappa$ B-inducing kinase plays an essential T cell-intrinsic role in graft-versus-host disease and lethal autoimmunity in mice. *J Clin Invest*. 2011;121(12):4775-86.
104. Davis RE, Brown KD, Siebenlist U, Staudt LM. Constitutive nuclear factor kappaB activity is required for survival of activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma cells. *J Exp Med*. 2001;194(12):1861-74.
105. Weniger MA, Küppers R. NF- $\kappa$ B deregulation in Hodgkin lymphoma. *Semin Cancer Biol*. 2016;39:32-9.
106. Steidl C, Gascoyne RD. The molecular pathogenesis of primary mediastinal large B-cell lymphoma. *Blood*. 2011;118(10):2659-69.




107. Kuehn HS, Niemela JE, Sreedhara K, Stoddard JL, Grossman J, Wysocki CA, et al. Novel nonsense gain-of-function NFKB2 mutations associated with a combined immunodeficiency phenotype. *Blood*. 2017;130(13):1553-64.
108. Sato S, Sanjo H, Tsujimura T, Ninomiya-Tsuji J, Yamamoto M, Kawai T, et al. TAK1 is indispensable for development of T cells and prevention of colitis by the generation of regulatory T cells. *Int Immunol*. 2006;18(10):1405-11.
109. Courties G, Seiffart V, Presumey J, Escriou V, Scherman D, Zwerina J, et al. In vivo RNAi-mediated silencing of TAK1 decreases inflammatory Th1 and Th17 cells through targeting of myeloid cells. *Blood*. 2010;116(18):3505-16.
110. Wu Y, Yang R, Ming Y, Xu Y, Chen H, Yao M, et al. TAK1 is a druggable kinase for diffuse large B-cell lymphoma. *Cell Biochem Funct*. 2019;37(3):153-60.
111. Gallardo F, Bertran J, López-Arribillaga E, González J, Menéndez S, Sánchez I, et al. Novel phosphorylated TAK1 species with functional impact on NF- $\kappa$ B and  $\beta$ -catenin signaling in human Cutaneous T-cell lymphoma. *Leukemia*. 2018;32(10):2211-23.
112. Guidi L, Costanzo M, Ciarniello M, De Vitis I, Pioli C, Gatta L, et al. Increased levels of NF-kappaB inhibitors (IkappaBalpha and IkappaBgamma) in the intestinal mucosa of Crohn's disease patients during infliximab treatment. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2005;18(1):155-64.
113. Brightbill HD, Suto E, Blaquiére N, Ramamoorthi N, Sujatha-Bhaskar S, Gogol EB, et al. NF- $\kappa$ B inducing kinase is a therapeutic target for systemic lupus erythematosus. *Nat Commun*. 2018;9(1):179.
114. Kucharzewska P, Maracle CX, Jeucken KCM, van Hamburg JP, Israelsson E, Furber M, et al. NIK-IKK complex interaction controls NF- $\kappa$ B-dependent inflammatory activation of endothelium in response to LT $\beta$ R ligation. *J Cell Sci*. 2019;132(7).
115. Zhou B, Zhang H, Su X, Luo Y, Li X, Yu C, et al. Therapeutic effects of a novel BAFF blocker on arthritis. *Signal Transduct Target Ther*. 2019;4:19.
116. Maubach G, Feige MH, Lim MCC, Naumann M. NF-kappaB-inducing kinase in cancer. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*. 2019;1871(1):40-9.
117. Bishop GA. TRAF3 as a powerful and multitasking regulator of lymphocyte functions. *J Leukoc Biol*. 2016;100(5):919-26.
118. Zapata JM, Llobet D, Krajewska M, Lefebvre S, Kress CL, Reed JC. Lymphocyte-specific TRAF3 transgenic mice have enhanced humoral responses and develop plasmacytosis, autoimmunity, inflammation, and cancer. *Blood*. 2009;113(19):4595-603.
119. Chen K, Huang J, Gong W, Iribarren P, Dunlop NM, Wang JM. Toll-like receptors in inflammation, infection and cancer. *Int Immunopharmacol*. 2007;7(10):1271-85.
120. Elgizouli M, Lowe DM, Speckmann C, Schubert D, Hülsdünker J, Eskandarian Z, et al. Activating PI3K $\delta$  mutations in a cohort of 669 patients with primary immunodeficiency. *Clin Exp Immunol*. 2016;183(2):221-9.

121. Lucas CL, Zhang Y, Venida A, Wang Y, Hughes J, McElwee J, et al. Heterozygous splice mutation in PIK3R1 causes human immunodeficiency with lymphoproliferation due to dominant activation of PI3K. *J Exp Med*. 2014;211(13):2537-47.
122. Li Q, Wang W, Wu Q, Zhou Q, Ying W, Hui X, et al. Phenotypic and Immunological Characterization of Patients with Activated PI3K $\delta$  Syndrome 1 Presenting with Autoimmunity. *J Clin Immunol*. 2024;44(4):102.
123. Jamee M, Moniri S, Zaki-Dizaji M, Olbrich P, Yazdani R, Jadidi-Niaragh F, et al. Clinical, Immunological, and Genetic Features in Patients with Activated PI3K $\delta$  Syndrome (APDS): a Systematic Review. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2020;59(3):323-33.
124. Patel RK, Mohan C. PI3K/AKT signaling and systemic autoimmunity. *Immunol Res*. 2005;31(1):47-55.
125. Chen J. Roles of the PI3K/Akt pathway in Epstein-Barr virus-induced cancers and therapeutic implications. *World J Virol*. 2012;1(6):154-61.
126. Cagdas D, Mayr D, Baris S, Worley L, Langley DB, Metin A, et al. Genomic Spectrum and Phenotypic Heterogeneity of Human IL-21 Receptor Deficiency. *J Clin Immunol*. 2021;41(6):1272-90.
127. Ren HM, Lukacher AE, Rahman ZSM, Olsen NJ. New developments implicating IL-21 in autoimmune disease. *J Autoimmun*. 2021;122:102689.
128. Long D, Chen Y, Wu H, Zhao M, Lu Q. Clinical significance and immunobiology of IL-21 in autoimmunity. *J Autoimmun*. 2019;99:1-14.
129. Wang Y, Jiang X, Zhu J, Dan Y, Zhang X, Wang X, et al. IL-21/IL-21R signaling suppresses intestinal inflammation induced by DSS through regulation of Th responses in lamina propria in mice. *Sci Rep*. 2016;6:31881.
130. Park M. Myelodysplastic syndrome with genetic predisposition. *Blood Res*. 2021;56(S1):S34-s8.
131. Lee-Kirsch MA. Sensing of RNA stress by mTORC1 drives autoinflammation. *J Clin Invest*. 2022;132(2).
132. Canna SW, Marsh RA. Pediatric hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Blood*. 2020;135(16):1332-43.
133. Aricò M, Boggio E, Cetica V, Melensi M, Orilieri E, Clemente N, et al. Variations of the UNC13D gene in patients with autoimmune lymphoproliferative syndrome. *PLoS One*. 2013;8(7):e68045.
134. Beck DB, Bodian DL, Shah V, Mirshahi UL, Kim J, Ding Y, et al. Estimated Prevalence and Clinical Manifestations of UBA1 Variants Associated With VEXAS Syndrome in a Clinical Population. *Jama*. 2023;329(4):318-24.
135. Miyamoto T, Honda Y, Izawa K, Kanazawa N, Kadowaki S, Ohnishi H, et al. Assessment of type I interferon signatures in undifferentiated inflammatory diseases: A Japanese multicenter experience. *Front Immunol*. 2022;13:905960.


## 8. EKLER

### EK-1. Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzinleri

Tarih: 16/05/2024 11:42  
Sayı: E-16969337-030 04-00003333566



0003333566



**HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ARAŞTIRMA ETİK KURULU**

**KURUL KARARI**

OTURUM TARİHİ	OTURUM SAYISI	KARAR SAYISI
07.05.2024	2024/08	2024/08-67
Araştırma Numarası : GO 22/809		Onay Tarihi : 06.09.2022

Kurulumuzun 06.09.2022 tarihli toplantısında GO 22/809 kayıt numarası ile onaylanmış olan ve Üniversitemiz Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Deniz Çağdaş AYVAZ'ın sorumlu araştırmacı olduğu, Dr. Öğr. Üyesi Saliha ESENBOĞA, Arş. Gör. İsmail YAZ, Arş. Gör. Begüm ÖZBEK ile birlikte çalışacakları ve Dr. Hacer Neslihan BİLDİK'in doktora tezi olan, GO 22/809 kayıt numaralı "*İmmün Disregülasyon Bulguları Olan Hastalarda İlişkili Yolakların RT-PCR ile Değerlendirilmesi*" başlıklı projemiz için verilen dilekçe Kurulumuzun 03.10.2023 tarihli toplantısında değerlendirilmiş ve uygun bulunmuştur. Ancak çalışmanın Etik Kurul Kararında sehven Mersin Üniversitesi ifadesi yer almıştır. İlgili karar düzeltilerek kayıtlarımıza eklenmiştir.

Çalışma tamamlandığında sonuçlarını içeren bir rapor örneğinin Etik Kurulumuza gönderilmesi gerekmektedir.

Prof. Dr. Nüket PAKSOY ERBAYDAR Kurul Başkanı	Prof. Dr. Güzide Burça AYDIN Kurul Üyesi	Prof. Dr. Mehmet Özgür UYANIK Kurul Üyesi	Prof. Dr. Ayşe KİN İŞLER Kurul Üyesi
Prof. Dr. Burcu Balam DOĞU Kurul Üyesi	<b>İZİNLİ</b> Prof. Dr. Tolga YILDIRIM Kurul Üyesi	Prof. Dr. İpek GÜRBÜZ Kurul Üyesi	<b>İZİNLİ</b> Prof. Dr. Betül ÇELEBİ SALTIK Kurul Üyesi
Doç. Dr. Merve BATUK Kurul Üyesi	Doç. Dr. Gülten IŞIK KOÇ Kurul Üyesi	<b>İZİNLİ</b> Doç. Dr. İbrahim Halil ÖNCEL Kurul Üyesi	Dr. Öğr. Üyesi Melike Hacer ÖZKAN Kurul Üyesi
Dr. Öğr. Üyesi Müge DEMİR Kurul Üyesi	<b>İZİNLİ</b> Dr. Öğr. Üyesi Burcu Ersöz ALAN Kurul Üyesi	Dr. Öğr. Üyesi Güneş GÜNER Kurul Üyesi	

## EK-2. Turnitin Ekran Görüntüsü

### İMMÜN DİSREGÜLASYON BULGULARI OLAN HASTALARDA İLİŞKİLİ YOLAKLARIN RT-PCR ile DEĞERLENDİRİLMESİ.docx

#### ORJİNALLIK RAPORU

% <b>11</b>	% <b>10</b>	% <b>6</b>	% <b>3</b>
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

#### BİRİNCİL KAYNAKLAR

<b>1</b>	<a href="http://www.researchgate.net">www.researchgate.net</a> İnternet Kaynağı	% <b>2</b>
<b>2</b>	<a href="http://dergipark.ulakbim.gov.tr">dergipark.ulakbim.gov.tr</a> İnternet Kaynağı	% <b>1</b>
<b>3</b>	<a href="http://earsiv.odu.edu.tr:8080">earsiv.odu.edu.tr:8080</a> İnternet Kaynağı	% <b>1</b>
<b>4</b>	<a href="http://acikbilim.yok.gov.tr">acikbilim.yok.gov.tr</a> İnternet Kaynağı	% <b>1</b>
<b>5</b>	Polat, Derya. "Paraoksonaz 1 (PON1) Gen Polimorfizmlerinin Çocukluk çağı Obezitesinde Metabolik ve Antropometrik Parametreler İle Olan İlişkisi", Dokuz Eylul Üniversitesi (Turkey), 2024 Yayın	% <b>1</b>
<b>6</b>	<a href="http://openaccess.hacettepe.edu.tr">openaccess.hacettepe.edu.tr</a> İnternet Kaynağı	% <b>1</b>
<b>7</b>	<a href="http://dergipark.org.tr">dergipark.org.tr</a> İnternet Kaynağı	<% <b>1</b>

### EK-3. Dijital Makbuz

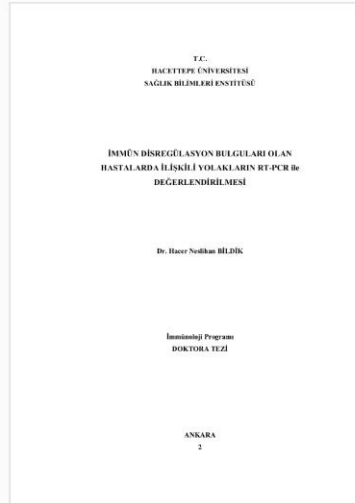


## Dijital Makbuz

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

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: Hacer Neslihan Bildik  
Ödev başlığı: İMMÜN DİSREGÜLYON BULGULARI OLAN HASTALARDA İLİ...  
Gönderi Başlığı: İMMÜN DİSREGÜLYON BULGULARI OLAN HASTALARDA İLİ...  
Dosya adı: İMMÜN\_DİSREGÜLYON\_BULGULARI\_OLAN\_HASTALARDA\_İ...  
Dosya boyutu: 2.72M  
Sayfa sayısı: 66  
Kelime sayısı: 15,131  
Karakter sayısı: 105,266  
Gönderim Tarihi: 18-Kas-2024 09:41ÖÖ (UTC+0300)  
Gönderim Numarası: 2523456164



## 9. ÖZGEÇMİŞ