

**Otoimmün bulguları olan hastalarda LRBA, CTLA4 protein
eksikliği ve STAT1 fonksiyon kazanımının klinik ve
laboratuvar belirteçler kullanarak erken tanınması ve takip
edilmesi**

Program Kodu: 3001

Proje No: 217S847

Proje Yürütücüsü:
Prof. Dr. Safa Barış

Araştırmacı(lar):

Prof. Dr. Ahmet Oğuzhan Özen

Doç. Dr. Ayça Kıyıkım

Dr. İsmail Öğülür

Bursiyer(ler):

Dilek Başer

Feyza Bayram

Eylül 2020
İSTANBUL

ÖNSÖZ

Primer immün yetmezlikler (PİY) tekrarlayan enfeksiyon bulgusu ile karakterize kronik bir hastalık grubudur. Bu grupta yer alan hastalıkların büyük bir bölümü monogenik kalıtım özelliği gösterir ve akraba evliliğinin sık olduğu bölgelerde görülme oranı fazladır. Son yıllarda gelişen genetik sekanslama yöntemleri ile PİY içerisinde birçok yeni gen mutasyonu tanımlanmıştır. Yeni tanımlanan bu genetik bozukluklar arasında *lipopolysaccharide-responsive beige like anchor protein (LRBA)* ve *cytotoxic T lymphocyte antigen 4 (CTLA4)* genlerindeki fonksiyon kaybına yol açan mutasyonlar ve *signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1)* genindeki fonksiyon kazanımı mutasyonları ile ilişkilendirilmiş immün disregulasyon sendromları bulunmaktadır. Belirtilen bu hastalıklardaki ortak özellik klinikte tekrarlayan enfeksiyonların yanı sıra otoimmünitenin fazla olmasıdır. Bu nedenle genellikle daha kötü seyir gösterirler. Bununla birlikte bu hastalıklar semptom olarak benzerlik gösterebilir de altta yatan moleküler bozuklukla ilişkili olarak farklı bir şekilde tedavi edilmektedir. Hastaların erken tanı alması ve erken dönemde komplikasyonlar gelişmeden önce uygun şekilde tedavi edilmesi de son derece önemlidir. Ancak klinik başvuru yakınmalarındaki benzerlikler nedeniyle çoğu zaman kesin tanı için genetik yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu nedenle tanıda gecikmeler yaşanmaktadır. Tanısal zorlukların yanı sıra, yeni tanımlanmış bu hastalıkların uzun dönem takip verileri olmadığı için çoğu zaman kanıtlanmış tedavileri bulunmamakta, bu da bu alanda çalışan hekimler için zorluk yaratmaktadır.

Ünitemizde bu hastalık grubunda yer alan olgular takip edilmekte olup, bu hastalıkların daha iyi anlaşılabilmesi için tanısal ve fonksiyonel çalışmalar proje boyunca yürütüldü. Hastaların klinik özelliklerinin değerlendirilmesinin yanında, ayrıntılı immün tiplendirme, LRBA, CTLA4, FOXP3, p-STAT1 proteinleri ve hücre içi interlökin (IL)-17, interferon (IFN)- γ gibi sitokinler akım sitometri yöntemiyle değerlendirildi ve 217S847'nolu TÜBİTAK destekli projemizde belirlediğimiz amaçlara uygun olarak çalışmamız tamamlandı. Çalışma sonucunda klinik bulguları ve bir takım immün belirteçleri içeren tanı algoritması geliştirildi. Ayrıca tanı için kullanılabilecek akım sitometri panelleri geliştirilerek hastalıkların daha erken tanımlanabilmesi sağlandı. Son olarak hastalar ileriye yönelik izlenerek başlanan hedefe yönelik tedavilerin (LRBA ve CTLA4 eksikliği için abatacept, STAT1 fonksiyon kazanımı için ise ruxolitinib) klinik bulgular ve immün parametreler üzerine olan etkileri değerlendirildi. Çalışmamızdan elde edilen veriler Ulusal ve Uluslararası kongrelerde sözlü sunum olarak sunuldu. Bunların birinde en iyi sözlü sunum ödülünü aldı. Bir yüksek lisans tezi üretildi. Ayrıca bulgularımız etki faktörü 7.6 olan Journal of Allergy and Clinical Immunology-In practice dergisinde Araştırma Makalesi olarak yayınlandı. Çalışmadaki olgularımız projedeki tanı kapasitesi sayesinde Uluslararası Çalışma projelerine ekle-

bilmiş ve buna bağılı olarak önemli araştırma yazısı ortaya çıkmıştır. Bu ikinci Araştırma Makalesi etki faktörü 10.2 olan Journal of Allergy and Clinical Immunology dergisinde yayına kabul edilmiştir.

Ülkemizde PİY'ler batı toplumlarına göre çok daha sık görülmesine rağmen bu hastalıklarla ilgilenen merkezlerin azlığı ve tanısız kısıtlılık nedeniyle hastalara çoğı zaman tanı koyulamamaktadır. Bu durumdan dolayı hasta örnekleri çoğı zaman yurt dışına gönderilmekte ve bu da tanıda gecikmelere neden olabilmektedir. Bu nedenle ülkemiz koşullarında daha basit tarama yöntemleriyle (akan hücre ölçer cihazı) hastalıkların tanısını koymak ve komplikasyon gelişmeden hedefe yönelik tedavilerin başlanması öncelikli hedeflerimizden biri olmalıdır. Bu bağlamda çalışmamızın sonuçları proje başvurusu sırasında belirtilen tüm hedefleri sağlamış durumdadır. Yapmış olduğumuz çalışma literatürde önemli bir boşluğu kapatmış durumdadır. Yayınlanmış olan araştırmamız sadece bir yıl içerisinde 20 adet atıf almıştır. Nadir hastalıklar konusunda çok zengin bir ülke olan Türkiye'de bu tür araştırmaların yapılması hem hastaların daha çabuk taranmasına ve tanı almasına olanak sağlayacak hem de bilimsel arenada konumunzu sağlamlaştıracığına inanmaktayız. Bu bağlamda ülkemizdeki bilimsel faaliyetlerin en büyük destekçisi olan TÜBİTAK'a projemize vermiş olduğu destek için teşekkür ederiz.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	i
KISALTMALAR.....	xi
ÖZET	xiii
ABSTRACT	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	4
2.1 İmmün Sistem	4
2.1.1 Doğal İmmün Sistem	5
2.1.1.1 Epitel tabaka.....	5
2.1.1.2 Fagositler.....	6
2.1.1.2.1 Nötrofiller	6
2.1.1.2.2 Monositler ve makrofajlar	7
2.1.1.3 Dendritik hücreler (DH).....	7
2.1.1.4 Mast hücreleri.....	8
2.1.1.5 Doğal lenfoid hücreler (ILC)	9
2.1.1.6 Doğal öldürücü hücreler (NK).....	9
2.1.1.7 Kompleman sistem	10
2.1.1.8 Sitokinler.....	11
2.1.2 Edinsel İmmün Sistem.....	13
2.1.2.1 T lenfositler ve hücrel immünite.....	14
2.1.2.1.1 CD4+ yardımcı T lenfositler (Th)	16
2.1.2.1.1.1 Th1, Th2 ve Th17 hücreler	16
2.1.2.1.1.2 T foliküler hücreler (TFH)	18
2.1.2.1.1.3 T regülatör hücreler (Treg)	18
2.1.2.1.2 CD8+ sitotoksik T lenfositler (CTL).....	19
2.1.2.2 B lenfositler ve humoral immünite	20
2.1.3 Primer İmmün Yetmezlikler (PİY)	22
2.1.3.1 CTLA-4 ve LRBA eksikliği patogenezi.....	23
2.1.3.2 STAT1 GOF patogenezi.....	24
3. GEREÇ ve YÖNTEM	26
3.1 Çalışma Planının Özeti.....	26
3.2 Çalışmada Kullanılan Solüsyonlar.....	27
3.3 Çalışmada Kullanılan Malzemeler.....	28
3.4 Çalışmada Kullanılan Cihazlar	29

3.5 Çalışmada Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması	29
3.5.1 PBS solüsyonunun hazırlanması	29
3.5.2 Stain buffer solüsyonunun hazırlanması	30
3.5.3 Lenfosit kültürleri için besiyerinin hazırlanması	30
3.5.4 Antikor mix hazırlanması	30
3.5.5 T hücre uyarımı için anti-CD2+CD3+CD28+ (CDmix) uyarınının hazırlanması	30
3.5.6 pSTAT1 fosforilasyonu için IFN- β 1a uyarınının hazırlanması	31
3.5.7 ELISA yönteminde kullanılacak solüsyonların ve standartların hazırlanması	31
3.6 Çalışma Planı	32
3.6.1 LRBA eksikliği, CTLA-4 eksikliği ve STAT1 GOF hastalarının ve sağlıklı bireylerin seçimi	35
3.6.2 Hastaların çalışmaya dahil edilme ve dışlanma kriterleri	35
3.6.3 Sağlıklı bireylerin çalışmaya dahil edilme ve dışlanma kriterleri	35
3.6.4 LRBA ve CTLA-4 eksikliği hastalarından ve sağlıklı bireylerden venöz kan alımı	36
3.6.4.1 Venöz kandan immünolojik parametrelerin boyanması.....	36
3.6.4.2 Venöz kandan T foliküler hücre (TFH) boyaması.....	36
3.6.4.3 Venöz kandan hücre içi LRBA proteini boyaması	37
3.6.4.4 Venöz kandan mononükleer hücre izolasyonu ve plazmanın stoklanması	37
3.6.4.5 İzole edilen lenfositlerden mononükleer hücre kültürü yapılması	38
3.6.4.6 Uyarım sonrası hücre yüzeyi ve hücre içi boyamalarının yapılması	38
3.6.4.7 Stoklanan plazma örneklerinden ELISA yöntemi ile sCD25 konsantrasyonu ölçümü	39
3.6.5 STAT1 GOF hastalarından ve sağlıklı bireylerden venöz kan alımı.....	40
3.6.5.1 Venöz kandan T foliküler hücre (TFH) boyaması.....	40
3.6.5.2 Venöz kanın 4 saatlik uyarımı ve hücre içi sitokin boyaması	40
3.6.5.3 Venöz kandan mononükleer hücre izolasyonu.....	41
3.6.5.4 İzole edilen lenfositlerden mononükleer hücre kültürü yapılması	41
3.6.5.5 Uyarım sonrası hücre yüzeyi ve hücre içi boyamalarının yapılması	42
3.6.6 Analizler.....	42
3.6.6.1 LRBA ve CTLA-4 eksikliği hastalarının analizleri	42
3.6.6.1.1 Lenfosit alt gruplarının analizleri.....	42
3.6.6.1.2 Lenfositlerin T foliküler hücre (TFH) analizi	46
3.6.6.1.3 Lenfositlerin hücre içi LRBA protein ifadesi analizi.....	48
3.6.6.1.4 Lenfositlerin düzenleyici T hücre yüzdesi ve CD25, FOXP3 ve CTLA-4 proteini ifadesi analizi	48
3.6.6.1.5 sCD25 konsantrasyonunun ölçümü ve analizi	52
3.6.6.2 STAT1 GOF hastalarının analizleri	53
3.6.6.2.1 Lenfositlerin T foliküler hücre (TFH) analizi.....	53

3.6.6.2.2 Hücre içi sitokin analizi	53
3.6.6.2.3 Lenfositlerin p-STAT1 proteini ifadesi analizi	55
3.6.7 İstatistiksel Analiz	56
4. BULGULAR	57
4.1 LRBA ve CTLA-4 Eksikliği Hastalarına Ait Bulgular	57
4.1.1 LRBA ve CTLA-4 eksikliği hastalarının teşhisi, demografik özellikleri ve klinik görünüşleri	57
4.1.2 LRBA ve CTLA-4 eksikliği hastalarının klinik verileri.....	60
4.1.3 LRBA ve CTLA-4 eksikliği hastalarının immünolojik fenotipleri	63
4.1.4 LRBA eksikliği hastalarında tedavi öncesi TFH yüzdesi ve PD1 MFI değeri anlamlı olarak yüksek saptandı	65
4.1.5 LRBA eksikliği hastalarında tedavi öncesi sCD25 konsantrasyonu (ng/ml) anlamlı olarak yüksek saptandı	67
4.1.6 CTLA-4 eksikliği hastalarında tedavi öncesi TFH yüzdesi ve PD1 MFI değerine bakıldığında anlamlı olarak yüksek bulundu	68
4.1.7 LRBA ve CTLA-4 eksikliği hastalarında tedavi öncesi TFH yüzdesi ve PD1 MFI değeri sağlıklı kontrollere göre anlamlı olarak yüksek saptandı	69
4.1.8 LRBA protein ifadesi sadece LRBA eksikliği hastalarında anlamlı olarak düşük saptandı	70
4.1.9 CD25+FOXP3+ Treg hücre yüzdesi hem LRBA eksikliği hem de CTLA-4 eksikliği hastalarında anlamlı olarak düşük saptandı.....	71
4.1.10 CD4+FOXP3+ hafıza Treg hücre yüzdesi hem LRBA eksikliği hem de CTLA-4 eksikliği hastalarında anlamlı olarak düşük saptandı	72
4.1.11 CD4+FOXP3+ hafıza Treg hücrelerdeki CD25 protein ifadesi LRBA eksikliği ve CTLA-4 eksikliği hastalarında anlamlı olarak düşük saptandı	73
4.1.12 CD4+FOXP3+ hafıza Treg hücrelerdeki FOXP3 protein ifadesi LRBA eksikliği ve CTLA-4 eksikliği hastalarında anlamlı olarak düşük saptandı	74
4.1.13 CD4+FOXP3+ hafıza Treg hücrelerdeki CTLA-4 protein ifadesi bazal seviyede en düşük LRBA eksikliği hastalarında görüldü	75
4.1.14 T hücre aktivasyonu ile CTLA-4 protein ifadesindeki artış LRBA eksikliği hastalarında CTLA-4 eksikliğine göre daha yüksek bulundu.	76
4.1.15 Hedefe yönelik ilaç olan abatacept'in hastalık aktivitesini kontrol etmede başarılıdır...78	
4.2 STAT1 GOF Hastalarına Ait Bulgular.....	81
4.2.1 STAT1 GOF hastalarının teşhisi, demografik özellikleri ve klinik görünüşleri	81
4.2.2 STAT1 GOF hastalarında tedavi öncesi TFH yüzdesi anlamlı olarak yüksek saptandı.83	
4.2.3 STAT1 GOF hastalarında hücre içi IL-17 yüzdesi anlamlı olarak yüksek bulundu.	84
4.2.4 STAT1 GOF hastalarında p-STAT1 protein ifadesi.....	84

4.2.5 Hedefe yönelik ilaç olan ruxolitinib hastalık aktivitesini kontrol etmede başarılıdır.....	85
4.3 Çalışma sonuçlarımıza göre geliştirilen tanı algoritması.....	86
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	88
6. KAYNAKLAR.....	96

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. A) CTLA-4'ün fonksiyonunu ve LRBA tarafından düzenlenmesini gösteren model. B) Primer immün yetersizlik ile ilişkili başlıca klinik otoimmün ve romatolojik özellikler	2
Şekil 2. Sulandırılmış IL-2R standardının hazırlanışı	32
Şekil 3. Çalışma planının şematik gösterimi	34
Şekil 4. Lenfosit alt gruplarının akım sitometri cihazında analizi	43
Şekil 5. B Lenfosit alt gruplarının akım sitometri cihazında analizi	44
Şekil 6. Naif ve bellek T hücrelerin akım sitometri cihazında analizi	45
Şekil 7. RTE ve DNT hücre oranlarının akım sitometri cihazında analizi	46
Şekil 8. CD4+PD1+CXCR5+ T foliküler hücrenin (TFH) akım sitometri cihazında analizi.....	47
Şekil 9. T foliküler hücre oranının ve PD1 proteini ifadesinin tedavi öncesi ve sonrası akım sitometri cihazında analizi	47
Şekil 10. Hücre içi LRBA protein ifadesinin akım sitometri cihazında analizi	48
Şekil 11. CD4+FOXP3+ düzenleyici T hücrelerin akım sitometri cihazında analizi.....	49
Şekil 12. CD25+FOXP3+ düzenleyici T hücrelerin akım sitometri analizi	50
Şekil 13. CD4+FOXP3+ hafıza düzenleyici T hücrelerin ve FOXP3+CTLA4+ hücrelerin akım sitometri cihazında analizi	51
Şekil 14. CD4+FOXP3+ hafıza düzenleyici T hücrelerdeki CD25 ve hücre içi FOXP3 ve CTLA-4 protein ifadelerinin akım sitometri cihazında analizi.	52
Şekil 15. Tedavi öncesi T foliküler hücre yüzde (%) oranının sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırılması.	53
Şekil 16. Hücre içi sitokinlerin akım sitometri cihazında analizi.	54
Şekil 17. IL-17 ve IFN- γ hücre içi sitokin yüzde (%) oranlarının karşılaştırılması.	55
Şekil 18. Lenfositlerin p-STAT1 protein ifadesinin akım sitometri cihazında analizi.	56
Şekil 19. A) LRBA eksikliği ve B) CTLA-4 eksikliği hastalarına ait mutasyonların protein domainleri üzerinde şematik gösterimi.	57
Şekil 20. LRBA eksikliği hastalarına ait klinik bulgular.	61
Şekil 21. CTLA-4 eksikliği hastalarının klinik bulguları.	62
Şekil 22. A) LRBA eksikliği ve B) CTLA-4 eksikliği hastalarının IgA, IgM ve IgG serum immüno-globulin seviyeleri.	63
Şekil 23 A) LRBA eksikliği ve B) CTLA-4 eksikliği hastalarına ait T, B, NK hücreler ve T hücre ve B hücre alt tipleri için flow sitometri analizi sonucu hücre yüzdelerinin gösterimi.....	64-65
Şekil 24. (A) LRBA eksikliği hastalarında tedavi öncesi foliküler hücre oranı ve (B) PD1 MFI değeri	66

Şekil 25. (A) LRBA eksikliği hastalarında tedavi öncesi ve tedavi sonrası foliküler hücre oranı ve (B) PD1 MFI değerlerinin karşılaştırılması.	66
Şekil 26. (A) LRBA eksikliği hastalarında sağlıklı kontrollere göre tedavi öncesi ve tedavi sonrası foliküler hücre oranı ve (B) PD1 MFI değerlerinin kıyaslanması.	67
Şekil 27. (A) LRBA eksikliği hastalarında tedavi öncesi sCD25 konsantrasyonu (ng/ml), (B) tedavi öncesi ve tedavi sonrası sCD25 konsantrasyonu (ng/ml) karşılaştırılması, (C) sağlıklı kontrollere göre tedavi öncesi ve tedavi sonrası sCD25 konsantrasyonunun karşılaştırılması..	68
Şekil 28. (A) CTLA-4 eksikliği hastalarında tedavi öncesi foliküler hücre oranı ve (B) PD1 MFI değeri.	68
Şekil 29. (A) CTLA-4 eksikliği hastalarında sağlıklı kontrollere göre tedavi öncesi ve tedavi sonrası foliküler hücre oranı ve (B) PD1 MFI değerlerinin karşılaştırılması	69
Şekil 30. (A) LRBA ve CTLA-4 eksikliği hastalarında sağlıklı kontrollere göre tedavi öncesi foliküler hücre oranı ve (B) PD1 MFI değerlerinin karşılaştırılması	70
Şekil 31. LRBA ve CTLA-4 eksikliği hastalarında sağlıklı kontrollere göre LRBA protein ifadelerinin karşılaştırılması	71
Şekil 32. LRBA ve CTLA-4 eksikliği hastalarında CD25+FOXP3+ Treg hücrelerin yüzdelerinin karşılaştırılması	72
Şekil 33. LRBA ve CTLA-4 eksikliği hastalarında CD4+FOXP3+ hafıza Treg hücrelerin yüzdelerinin karşılaştırılması	73
Şekil 34. LRBA ve CTLA-4 eksikliği hastalarında CD25 protein ifadesinin değerlendirilmesi	74
Şekil 35. LRBA ve CTLA-4 eksikliği hastalarında FOXP3 protein ifadesinin değerlendirilmesi.	75
Şekil 36. LRBA ve CTLA-4 eksikliği hastalarında CTLA-4 protein ifadesinin değerlendirilmesi.	76
Şekil 37. Uyarımdan sonra LRBA ve CTLA-4 eksikliği hastalarında CTLA-4 protein ifadesindeki artışın değerlendirilmesi	76
Şekil 38. Receiver operating characteristic (ROC) curve analizi.....	77
Şekil 39. Receiver operating characteristic (ROC) curve analizi.....	78
Şekil 40. Çalışma dizaynı.....	79
Şekil 41. LRBA eksikliğinde abatacept tedavisine verilen yanıt oranları.....	80
Şekil 42. LRBA eksikliğinde abatacept tedavisinin kullanım aralığına göre semptomların kontrol altına alınma süresi ve oranları.....	80
Şekil 43. LRBA eksikliğinde abatacept tedavisinin kullanımı ile foliküler T hücrelerinde ve PD1 protein ifadesinde oluşan değişiklikler.....	81
Şekil 44. STAT1 GOF hastalarına ait mutasyonların protein domainleri üzerinde şematik gösterimi	82

Şekil 45. STAT1 GOF hastalarında tedavi öncesi foliküler hücre oranının sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırılması	83
Şekil 46. A) STAT1 GOF hastalarında tedavi öncesi IL-17 ve B) IFN- γ yüzdelerinin sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırılması.....	84
Şekil 47. Farklı IFN- β 1a uyarım sürelerindeki pSTAT1 hücre içi protein ifadelerinin karşılaştırılması	85
Şekil 48. Farklı zaman aralıklarında p-STAT1 in defosforilasyon eğrisi.....	86
Şekil 49. Ruxolitinib öncesi ve sonrası cTFH oranları.....	86
Şekil 50. LRBA ve CTLA4 eksikliği, STAT1 fonksiyon kazanımı hastalarında klinik şüphe durumunda genetik tanı için yol gösterici akan hücre ölçer tabanlı tanı algoritması.....	87

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1. LRBA eksikliği hastalarına ait demografik veriler ve klinik görünüm.....	59
Tablo 2. CTLA-4 eksikliği hastalarına ait demografik veriler ve klinik görünüm.....	60
Tablo 3. STAT1 GOF hastalarına ait demografik veriler ve klinik görünüm	82

KISALTMALAR

ALPS	Otoimmün lenfoproliferatif sendrom
APC	Antijen sunucu hücre
APECED	Otoimmün poliendokrinopati, kandidiazis, ektodermal distrofi
BCR	B hücre reseptörü
CSF	Koloni uyarıcı faktörler
CTL	Sitotoksik T lenfosit
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4
DAMPs	Hasar-ilişkili moleküler paternlerin
DH	Dendritik hücre
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FBS	Fötal sıgır serumu
FDCs	Foliküler dendritik hücreler
FoxP3	Forkhead box p3
G-CSF	Granülosit koloni uyarıcı faktör
GITR	Glukokortikoid kaynaklı TNF- α reseptörü
GM-CSF	Granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktörler
HLA	İnsan lökosit antijeni
IFN	İnterferon
IL	İnterlökin
ILC	Doğal lenfosit hücreler
IPEX	İmmüendisregülasyon, poliendokrinopati, enteropati, X'e bağlı
JAK	Janus kinases
LRBA	Lipopolysaccharide-responsive beige-like anchor
M-CSF	Makrofaj koloni uyarıcı faktör
MAC	Membran atak kompleksi
MHC	Majör histokompatibilite kompleks
NETs	Hücre dışı tuzakları
NK	Doğal öldürücü hücre
PAMPs	Patojen-ilişkili moleküler paternler
PBS	Phosphate buffered saline
PİY	Primer immün yetmezlik
PKMH	Periferik kan mononükleer hücre
PRRs	Patern tanıma reseptörleri
sCD25	Soluble CD25
SCF	Kök hücre faktörü

STAT	Signal transducer and activator of transcription
TCR	T hücre reseptörü
TFH	T foliküler yardımcı hücre
Th	Yardımcı T hücre
TNF	Tümör nekroz faktör
Treg	T regülatör hücre

ÖZET

Amaç:

Primer immün yetmezlikler içerisinde immün disregülasyonla seyreden lipopolysaccharide-responsive beige-like anchor protein (LRBA), cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) eksiklikleri ve signal transducer and activator of transcription-1 (STAT1) fonksiyon kazanımı (GOF) hastalığı tekrarlayan enfeksiyonlar ve otoimmüniteyle ortaya çıkabilmektedir. CTLA-4 ve LRBA eksikliğinde Treg hücrelerde sayısal ve fonksiyonel azalma oluşabilmektedir. STAT1-GOF hastalarda Th17 hücrelerinde azalma görülmektedir. Çalışmadaki amacımız LRBA, CTLA-4 eksikliği ve STAT1-GOF hastalıklarında moleküler tanıyı öngörebilecek immünolojik testlerin tanısal değerinin araştırılması ve hedeflenmiş tedavilerin etkinliğinin ortaya konulmasıdır.

Yöntem:

Çok merkezli yürütülen çalışmada hastaların klinik ve laboratuvar özellikleri değerlendirildi. Lenfosit alt grupları, T foliküler hücre (TFH), LRBA protein ifadesinin yanında uyaransız ve 16 saatlik uyaranlı ortamda Treg hücre oranları, CD25, FOXP3 ve CTLA-4 protein ifadeleri akan hücre ölçerinde analiz edildi. ELISA ile sCD25 düzeyi ölçüldü. Hücre içi Th1/Th17 sitokin analizi ve farklı sürelerde IFN- β ile uyarımlı p-STAT1 protein fosforilasyonu değerlendirildi.

Bulgular:

Çalışmaya LRBA (n=29), CTLA-4 (n=12) eksikliği ve STAT1-GOF (n=5) olgusu alındı. Tedavi öncesi üç hastalık grubunda TFH oranları sağlıklı kontrollere göre anlamlı olarak yüksekti. SolubleCD25 düzeyi LRBA eksikliğinde anlamlı olarak yüksekti. Abatacept tedavisiyle TFH ve sCD25 düzeylerinin düştüğü görüldü. LRBA protein ekspresyonu sadece LRBA eksikliğinde anlamlı olarak düşüktü. Uyaransız ortamda LRBA eksikliği olgularında CTLA-4 ekspresyonu sağlıklı kontrol ve CTLA-4 eksikliği olgularına göre anlamlı olarak düşükken, T hücre uyarımıyla beraber sağlıklı kontrollere benzer ifade artışı gözlemlendi. Bu artış CTLA-4 eksikliği olgularından anlamlı olarak daha yüksek bulundu. Her iki eksiklikte sağlıklı kontrollere göre uyarımla Treg hücre oranı, CD25 ve FOXP3 protein ekspresyonunda anlamlı düşüklük gözlemlendi. STAT1-GOF hastalarında TFH sayısında artma, p-STAT1 döngüsünde bozulma ve Th17 yüzdesinde anlamlı düşüklük bulundu. Abatacept ve ruxolitinib tedavisi ile otoimmün bulguların ve lenfoproliferasyonun kontrol altına alındığı görüldü.

Sonuç:

İmmün disregülasyonla seyreden olgularda akan hücre ölçer bulguları erken tanı ve hedefe yönelik tedavi ve gen dizileme için yol göstericidir.

Anahtar Sözcükler: Primer immün yetmezlikler, LRBA eksikliği, CTLA-4 eksikliği, STAT1 GOF, Treg, abatacept, ruxolitinib

ABSTRACT

Aim:

LPS responsive beige-like anchor protein (LRBA), cytotoxic T-lymphocyte protein-4 (CTLA-4) deficiencies and signal transducer and activator of transcription-1 (STAT1) GOF present with susceptibility to infections and autoimmunity. LRBA and CTLA-4 deficiencies demonstrate similar immune phenotypes that characterize by Treg deficiency. STAT1-GOF patients show defective Th17 development. We sought to investigate the role of flow cytometry in predicting the genetic defect in patients with LRBA, CTLA-4 deficiencies and STAT1-GOF. Furthermore, we investigated the efficacy of the targeted therapy in these diseases.

Method:

The patients were recruited from different immunology centers and evaluated clinically and laboratory for lymphocyte subsets, T follicular helper cells (TFH), LRBA expression, baseline and 16 hours stimulated Tregs, CD25, FOXP3 and CTLA-4 expression. We also measured sCD25 level by ELISA. Intracellular Th1/Th17 cytokines and IFN- β -induced p-STAT1 phosphorylation was determined in STAT1-GOF patients.

Findings:

LRBA (n=29), CTLA-4 (n=12) deficiency and STAT1-GOF (n=5) patients were included. Baseline TFH cells was significantly high in all study groups, compared to healthy controls. sCD25 level was found to be significantly higher in LRBA deficiency and LRBA protein expression was only low in the same patients' group. Baseline CTLA-4 expression was significantly diminished in LRBA deficiency, but after short-term T-cell stimulation, significant CTLA-4 induction was observed in LRBA deficiency and controls, while this expansion was lower in CTLA4-deficient patients. After T-cell stimulation, the frequency of Tregs significantly increased in both disease group, but noted as lower than controls. High frequency of TFH, impaired p-STAT1 phosphorylation/dephosphorylation pattern and decreased Th17 cells were observed in STAT1-GOF patients. Abatacept and ruxolitinib therapies were able to control autoimmunity and lymphoproliferation in the patients.

Conclusion:

The utility of this flow cytometric approach is useful in predicting the defective gene and can thus allow early personalized therapy and targeted genetic sequencing that provide rapid diagnosis of immune dysregulatory disorders.

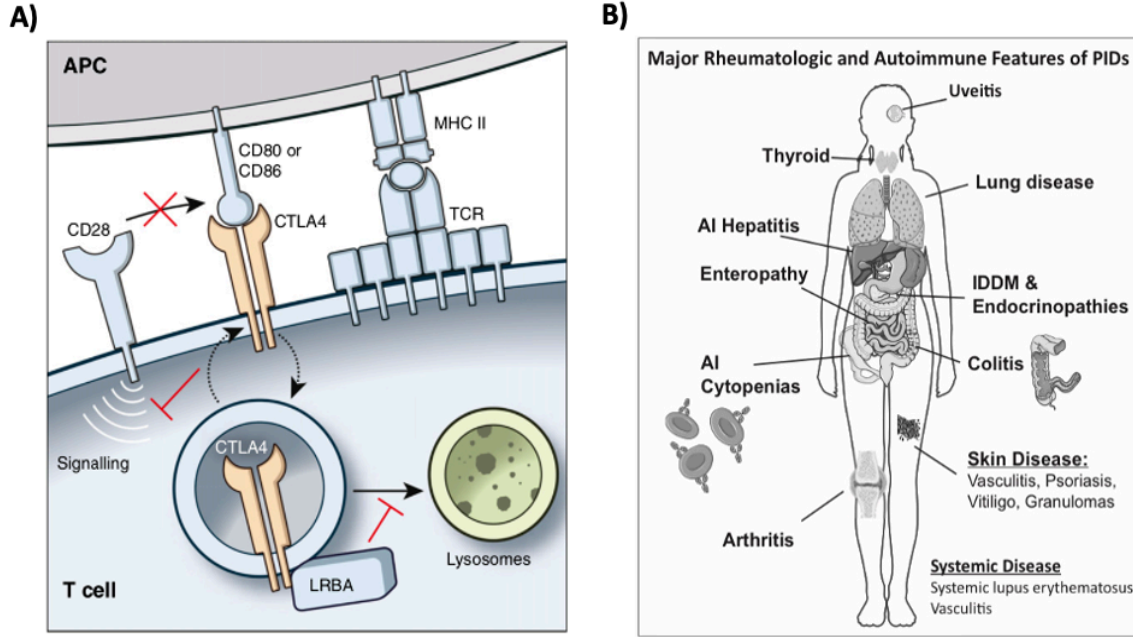
Keywords: Primary immune deficiencies, LRBA deficiency, CTLA-4 deficiency, STAT1 GOF, Treg, abatacept, ruxolitinib

1. GİRİŞ

Primer immün yetmezlikler (PİY), akraba evliliğinin fazla olduğu bölgelerde daha sık görülmekte olup, çoğunlukla monogenik kalıtım özelliği gösteren 450'den fazla hastalığı içerirler. Tolerans mekanizmasında meydana gelen kusurlar immün disregülasyon ile seyretmekte olup, bunun sonucunda genellikle sık, tekrarlayan enfeksiyonlar ve otoimmünite ile karakterize kronik bir hastalık grubu gelişmektedir.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda immün yetmezlik ile ilgili olan genlerin ve moleküler yolların araştırılması, immün yetmezliğin ve otoimmünitenin gerçekte iç içe olduğunu gösterilmiştir. Primer immün yetmezliklerde otoimmüniteden sorumlu görülen başlıca mekanizmalar arasında; programlı hücre ölümünü etkileyen yollarda bozukluk, organizmanın hücrelerine reaksiyon gösteren T hücrelerinin santral ve çevresel baskılayıcı basamaklardan kaçması, düzenleyici T hücrelerin anormal işlev göstermesi, anormal B hücrelerin kemik iliği ya da çevre dokularda yok edilememesi yer alır.

T hücre reseptörleri patojenlerin tanınması ve immün yanıtta önemli rol oynarlar. İmmün yanıtı baskılayıcı özellikteki cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4 (CTLA-4) reseptörü, çoğunlukla düzenleyici T (Treg) hücrelerde eksprese edilen bir immün regülatördür. CTLA-4, T hücre aktivasyonunda uyarıcı reseptör olan CD28 ile rekabet halindedir ve antijen sunucu hücreler (APC) üzerinde eksprese edilen CD80 (B7-1) ve CD86 (B7-2) ligandlarına bağlanmada CD28'e kıyasla daha yüksek bir affinite gösterir (Şekil 1A). Yapılan çalışmalarda otozomal dominant CTLA-4 eksikliğinde Treg sayısında ve baskılayıcı fonksiyonunda azalma saptanmıştır. Bunun sonucu olarak da bellek T ve otoreaktif B hücrelerinde kontrolsüz bir artış görülmektedir. İmmün disregülasyona ve otoimmüniteye yol açan CTLA-4 eksikliğinde tekrarlayan solunum yolu enfeksiyonları, otoimmün sitopeni ve enteropati, infiltratif akciğer hastalığı, lenfoproliferasyon, gastrointestinal tutulum gibi ağır bir klinik tablo oluşmaktadır (Şekil 1B).



Şekil 1. A) CTLA-4'ün fonksiyonunu ve LRBA tarafından düzenlenmesini gösteren model. (Lo vd., 2016). B) Primer immün yetersizlik ile ilişkili başlıca klinik otoimmün ve romatolojik özellikler (Kitcharoensakkul ve Cooper, 2019).

Lipopolysaccharide-responsive beige-like anchor protein (LRBA) CTLA-4 ile yakın ilişkilidir ve CTLA-4'ün lizozomlarda parçalanmasını önleyerek Treg gibi hücrelerin yüzeylerinde yeniden eksprese edilmesine yardım eder. Otozomal çekinik bir kalıtım gösteren LRBA eksikliğinde CTLA-4 eksikliğine benzer şekilde; düzenleyici T hücrelerinin sayısında ve fonksiyonunda azalma, B hücrelerinin aktivasyonunda ve immünglobulinlerin üretiminde bozulmalar tespit edilmiş ve buna bağlı olarak hastalarda naif T hücresi azalırken, bellek T hücrelerinde artış görülmüştür. Ayrıca anormal regülasyonundan dolayı bu olgularda, T foliküler hücrelerde (TFH) ve soluble CD25 (sCD25) düzeylerinde artış saptanmaktadır. Hastalığın erken döneminde ağır bir klinik tablo izlenmekle birlikte üst solunum yollarında tekrarlayan enfeksiyonlar, hipogamaglobülinemi, enflamatuvar barsak hastalığı, otoimmün endokrinopatiler ve sitopeniler dahil olmak üzere otoimmünite bulguları görülmüştür.

Signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) virüslere ve hücre içi bakterilere karşı doğal ve adaptif immün yanıtları sağlamada birçok sitokin hareketine aracılık eden önemli bir transkripsiyon faktörüdür. STAT1 GOF (gain-of-function), otozomal dominant geçiş gösteren bir PİY'dir. Otoimmünitenin eşlik ettiği bu olgularda mukokutanöz kandidiyazisin yanı sıra otoimmüntiroidit, sitopeni, hepatit, tip I diyabet ve sistemik lupuseritematozus görülmüştür. Bu hastalarda artmış STAT1 fosforilasyonuna veya defosforilasyonda gecikmelere bağlı olarak

abartılı interferon-gamma (IFN- γ) yanıtı olduğu ve bunun sonucunda yardımcı T hücre gelişimlerinde dengesizlikler oluşmaktadır. Buna göre Th1 hücrelerinde normal veya artmış gelişim olurken, Th17 hücrelerinde genellikle azalma saptanmıştır.

Otoimmünitinin eşlik ettiği kötü seyir gösteren bu PİY'ler, klinik bulgularındaki benzerliklere rağmen, hastalığa sebep olan sorumlu genler bakımından farklılık gösterir. Bu nedenle kesin tanı için genetik yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Tanısal kısıtlılık ve bu hastalıklarla ilgilenen merkezlerin azlığı nedeniyle hasta örneklerinin çoğunluğu yurt dışına gönderilmekte bu durum tanıda gecikmelere neden olmakla birlikte maliyetlidir. Bu nedenle genetik tanıya ihtiyaç duymadan hastalıkların erken tanısını koymak ve komplikasyon gelişmeden hedefe yönelik tedavilerin başlanması sağlamak için ülkemiz koşullarında daha basit tarama yöntemlerini (akan hücre cihazı ve enzim-ilişkili immünosorbent testi) kullanmak yarar sağlayacaktır. Tüm bu bilgilerden yola çıkarak bu çalışmadaki amacımız; immün disregülasyonla seyreden LRBA, CTLA-4 eksikliği ve STAT1 GOF hastalıkları için moleküler tanıyı öngörebilecek laboratuvar (TFH yüzey boyaması, LRBA, CTLA4, FOXP3, fosfo-STAT1, Th1 ve Th17 hücre içi boyaması) belirteçlerini içeren bir tanı algoritması oluşturulmasıdır. Hastalara sağlanacak erken tanı sayesinde kötü prognozu en aza indirmeyi hedeflemekteyiz. Çalışma boyunca ileriye yönelik takip edilecek hastalarda verilecek hedefe yönelik tedavilerin etkinlikleri hem klinik hem de laboratuvar olarak değerlendirilecektir. Çalışmamızda ayrıca ölçülecek olan sCD25 ve TFH hücreleri gibi biyobelirteçlerin tanıdaki ve tedavi etkinliğini değerlendirmedeki rolü araştırılacaktır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 İmmün Sistem

Tüm yaşamımız boyunca vücudumuz sayısız mikroorganizmaya ev sahipliği yapmaktadır. Geniş bir çeşitliliğe sahip olan bu mikroorganizmalardan bazıları vücudumuz için yararlı iken, bazıları vücuttaki sistemlerin işleyişini bozarak zararlı olmaktadır. Vücuda girerek hastalıklara yol açabilen virüs, bakteri ve parazit gibi mikroorganizmalar patojen olarak adlandırılır. Vücudun bu istilacı ajanları tanımak, ortadan kaldırmak ve vücudu korumak üzere gelişmiş immün sistem (bağışıklık sistemi) olarak adlandırılan bir savunma sistemi bulunmaktadır. Tüm vücudun birçok bölümüne yayılan bu sistem değişik hücre tiplerini, organları, proteinleri ve dokuları içermektedir. Hastalıklara yol açan mikroorganizmalara karşı bu hücrelerin ve moleküllerin iş birliği yaparak verdiği reaksiyon immün yanıtı oluşturur. İmmün sistemin ana görevi vücudu patojenlere karşı savunmaktır. Aynı zamanda ölü, hasar görmüş ve anormal hücreleri de yok etmektedir. Farklı ve çok çeşitli ayırt edici yapılara sahip olan yabancı maddelere karşı immün sistem farklı yanıtlar oluşturur. Bu yanıtlarda patojenleri tanıyan ve onları etkisizleştiren özel mekanizmalar gelişmiştir. Vücudun çeşitli bölümlerine dağılarak etki gösteren immün sistemde yer alan hücrelerin öncülleri kemik iliğinde oluşur. Birçok aşamadan geçerek olgunlaşmaya kadar kemik iliğinde kalabilir veya vücudun farklı bölgelerine göç ederek orada olgunlaşmalarını tamamlarlar. İmmün sistem hücreleri, salgılanan protein ya da peptit yapısında sitokin olarak adlandırılan ve kendilerinin veya başka hücrelerin salgıladığı hormon benzeri çözünmüş moleküllerin etkisi ile gelişir, immün yanıt oluşturur veya baskılanır (Abbas vd., 2016).

Multipotent hematopoietik kök hücreler önce multipotent hematopoietik öncüllere ardından ortak lenfoid öncüllere ve ortak myeloid öncüllere farklılaşırlar. Daha sonra bu öncüller farklılaşarak lenfoid öncüller doğal öldürücü (NK), T ve B hücreleri oluştururlar. T ve B hücreleri kemik iliğinde oluştuktan sonra, B hücreleri kemik iliğinde kalıp olgunlaşmalarını tamamlarken, T hücreleri olgunlaşmalarını tamamlamak üzere timüs adı verilen organa girer. Olgunlaşan hücreler kan yoluyla göç ederek yabancı antijenler ile karşılaşacakları ve aktiveleşecekleri dalak, lenf nodu ve epitel ilişkili periferik (sekonder) lenfoid organlara yerleşirler. Ortak myeloid öncüller de farklılaşarak monositler, bazofil, eozinofil ve nötrofil gibi granülositleri oluştururlar. Kemik iliğinde oluşan monositler dolaşıma katılır ve oradan da çeşitli dokulara geçerler. Dokularda makrofajlara dönüşerek geçtiği dokuya özgü makrofajlar olarak orada kalırlar (Alberts vd., 2015).

Genel olarak immün sistem doğal ve edinsel immünite olarak birbiri ile bağlantılı iki sistemden oluşur. Doğal immün yanıt; vücudun ilk koruma bariyerini oluşturan, patojenlerin ortak yapısal ve fonksiyonel özelliklerini spesifik olmadan tanıyarak vücuda girmeleriyle birlikte onları hızlıca yıkıma uğratmak için hazır bulunan sistemdir. Edinsel immün yanıt ise; kendinden olanı tanıyabilen, birçok farklı patojeni tanıyarak karşılaşma sonrası patojenlere ait antijenlere spesifik yanıtlar oluşturup daha etkili savunma gösteren ve aynı zamanda karşılaştığı antijenlere özgü bir hafıza oluşturan sistemdir (Iwasaki ve Medzhitov, 2015).

2.1.1 Doğal İmmün Sistem

Doğal immün sistem, vücuda giren patojenlere karşı erken ve hızlı yanıt oluşturan savunma sistemidir. Enfeksiyonlara karşı konak savunmasında ilk adım olan bu sistem enfekte olmuş dokuya birkaç saat içinde gelebilen hücrelerden oluşmaktadır. Bu savunma sistemi konak hücrelerde bulunmayan fakat birçok mikrop veya yabancı maddede ortak bulunan yapıları tanıyarak mikroplara karşı organizmayı savunur. Aynı zamanda zarar görmüş veya nekrotik konak hücrelerinden salgılanan molekülleri de tanıyıp yok ederek onların vücuttan uzaklaştırılmasını sağlar. Bu savunma sisteminde antijenlere yanıt aynı olduğundan özgünlük yoktur ve immünolojik belleğe sahip olmayan tüm defans mekanizmaları mevcuttur.

Doğal immünite fiziksel ve kimyasal bariyerler ile birlikte doğal immüniteye ait hücrelerden oluşan bir bütündür. Epitel doku, doku ve organların yüzeylerinde bulunarak patojenlerin girişini fiziksel bariyer oluşturarak engeller. Bu epitel dokuların yüzeyinde üretilen antimikrobiyal maddeler savunmanın kimyasal bariyerini oluşturmaktadır. Aynı zamanda savunmada rol oynayan kompleman, çeşitli lektin ve aglütininer gibi kan proteinleri doğal immün yanıtın bir parçasıdır. Doğal immünitenin hücreleri ise; NK hücreler, dendritik hücreler, fagosit hücreler olan nötrofil ve makrofajlar ve bazofiller, eozinofiller ve mast hücreleri gibi inflamatuvar mediatörleri salan hücrelerdir (Abbas vd., 2017).

2.1.1.1 Epitel Tabaka

Patojen ile ilk karşılaşmalar; deri, solunum, sindirim, idrar ve üreme yolları yüzeylerini kaplayan epitel tabakada olur. Patojenler bu ara yüzlerden fiziksel temas, yutma ve solunum yolu ile girebilir. Epitel tabaka patojenlerin girişini engellemek üzere hem fiziksel hem de kimyasal bariyer olarak savunma sağlar. Mikroplara karşı sıkı bağlantılar epitel hücreleri arasına girer ve sıkıca yapışık hücrelerden mekanik bir bariyer oluşturur. Bununla beraber deri yüzeyinde bulunan bazı hücreler tarafından çeşitli maddeler salgılanarak patojenlerin girişi engellenir.

Kalın bir fiziksel bariyer oluşturan keratinize epitel hücreleri ve mukozal epitel hücrelerinin salgıladıkları mukus, mikropların epitel ile temasını önler. Deride bulunan ve salgıladıkları yağ asitleri ve laktik asitler sayesinde bakteri büyümesini engelleyen yağ bezleri de patojenlerin girişini engellemede önemli görev yapar. Virüs, bakteri, mantar ve parazitler gibi birçok patojenin zarlarına bağlanarak onları bozan amfipatik bir peptit antibiyotik olan defensinler kimyasal bir bariyer oluşturur. Bunun yanında epitelyum, T hücre dizisine ait intraepitelyal T lenfositleri olarak adlandırılan lenfositleri içerir. Sınırlı çeşitlilikteki antijen reseptörlerini eksprese eden bu T hücrelerinin bazıları gama ve delta olmak üzere iki zincirden oluşur. Çoğu T lenfositlerinde eksprese edilen alfa-beta T hücrelerine benzeyen ancak özdeş olmayan reseptörleri eksprese ederler. Genellikle mikrobik lipitleri ve aynı tip mikroplar tarafından paylaşılan diğer yapıları tanırlar. İntraepitelyal T lenfositler muhtemelen epiteli aşılabilen patojenlere karşı yanıt verirler ancak bu hücrelerin özgüllükleri ve fonksiyonları tam anlamıyla bilinmemektedir (Alberts ve vd., 2015; Abbas vd., 2016).

2.1.1.2 Fagositler

Vücudumuzda gelişen bir enfeksiyona karşı ilk savunmayı oluşturan hücreler profesyonel fagositler olarak adlandırılan dolaşımdaki nötrofiller ve makrofajlardır. Bu hücreler mikropları hızlıca tanıyıp onları fagosite ederler. Yutulan mikrobu parçalayıcı enzim içeren lizozom olarak adlandırılan bir keseye birleştirip yok ederler böylelikle erken ve hızlı bir yanıt sağlarlar.

2.1.1.2.1 Nötrofiller

Patojenler epitel tabakayı başarıyla aşıp dokulara ulaşabilirlerse; patojenler ve dokulardaki makrofajlar tarafından oluşturulan sinyaller dolaşımda hazır halde bulunan nötrofilleri enfeksiyon bölgesine yönlendirecek olan endotel hücreleri aktive ederler. Bu sinyalleri alan kemik iliğinde üretilen ve dolaşımda birkaç saatliğine dolaşan bu hücreler enfeksiyon bölgesine hızlıca göç ederek fagositoz yoluyla mikropları yok eden ve ilk savunmayı sağlayan hücre grubudur. Hem antimikrobiyal moleküllerini salarlar hem de enfeksiyon ve inflamasyonun kontrolünü sağlamak amacıyla hücre dışı tuzakları (NETs) salarlar. Aktifleşmiş nötrofiller, makrofajlara ek olarak dendritik hücrelerin de aktivasyonu ve olgunlaşması için sinyaller gönderirler. Ayrıca çeşitli patojenlere ve tümör antijenlerine karşı T hücresi immün yanıtının düzenlenmesinde rol oynarlar. Nötrofiller dokular da hasar gören bölgelere de ulaşarak hücre enkazının temizlenmesine yardımcı olurlar. Mikrolitrede 4000 ile 10.000 sayıyla kanda en çok bulunan lökositlerdir. Bir enfeksiyon olduğunda üretimleri de artar (Borregaard, 2010; Kumar ve Sharma, 2010).

2.1.1.2.2 Monositler ve Makrofajlar

Kanda nötrofillerin aksine daha az sayıda bulunan monositler, enfeksiyon bölgesine nötrofillerden sonra göç eden kemik iliği kökenli fagositik hücrelerdir. Fagositoz yeteneklerinin yanında T lenfositlerine antijen sunumu ve bazı sitokinleri üretebilmelerinden dolayı önem taşırlar. Ayrıca monositler sitoplazmalarında fagositik vakuoller, lizozomlar ve hücre iskeleti filamentleri içerirler. Monositlerin en önemli özelliklerinden biri çeşitli dokuya göç edebilmeleridir. Bu sayede daha uzun süre yaşayabilecekleri ve patojenlere karşı savaşabilecekleri makrofajlara olgunlaşırlar. Makrofajlar bulundukları dokuya göre; kemik iliğindeki osteoklast, karaciğerdekiler kupffer hücreleri, merkezi sinir sistemindekiler mikroglialar, akciğerdekiler alveolar makrofajlar ve istersitisyel bağ dokusundakiler histiyositler olarak isimlendirilirler. Aynı zamanda dalakta da makrofajlara farklılaşabilen birçok mononükleer fagosit hücre alt grubu vardır. Anatomik konumları değişse bile hepsi makrofaj gibi davranarak patojene karşı savunma gösterir. Makrofajlar genel fonksiyonel özelliklerine göre iki grupta incelenmektedir. M1 makrofajlar; mikrobisidal aktive gösteren makrofajlar ve M2 makrofajlar immüno modulator rolü olan makrofajlardır (Galli vd., 2011)

Makrofajlar hem proteolitik hem dekatabolik aktivitelere sahiplerdir. Konak hücre savunmasında mikropların fagosit ediliş öldürülmesinde reaktif oksijen ve nitrojen ürünleri ile proteolitik enzimler rol oynar. Bunun yanı sıra makrofajlar; ölü ve hücre kalıntıları uzaklaştırır ve genellikle süpürücü (scavenger) olarak adlandırılırlar. Yaralanma sonrası anjiyogenez ve fibrozisi uyarak doku onarımına katkı sağlarlar. Makrofajlar enflamasyonu uyaran ve düzenleyen proinflatuar sitokinler olarak adlandırılan interlökin-1 (IL-1), interlökin-6 (IL-6) ve tümör nekroz faktör-alfa (TNF- α) sitokinlerinin üretimini yapar. Salgılanan bu sitokinler fagositik hücrelerin aktive edilmesini, endotelde adezyonun artışı ve bunların enfekte dokulara geçişini hızlandırır. Makrofajların önemli özelliklerinden biri antijen sunucu hücre (APC) olarak görev yapmalarıdır. Bu hücreler antijen varlığı ile aktifleşir, patojenleri yakalar, yutar ve onları majör histokompatibilite kompleksi (MHC) ile birleşebilen peptit fragmanlarına parçalar. Bu yol ile mikrobiyal antijenleri T lenfositlere sunarlar. Böylece fagositer hücre olan makrofajlar lenfositler ile iş birliği yaparak hem doğal hem de edinsel immünitenin aktivitesini düzenler (Taylor vd., 2005; Zoroğlu vd., 2013; Songu ve Katılmış, 2012).

2.1.1.3 Dendritik Hücreler (DH)

Antijenlerin T hücrelerine sunulmasında görev yaparak naif T hücre aktivasyonunu sağlayan, miyeloid soylu ve fagositik aktiviteye sahip APC'lerdir. Göz, beyin ve testis hariç lenfoid doku, mukozal epitel ve organ parenkimleri gibi tüm dokularda bulunur. Bulundukları

bölgelere göre farklı görünüm ve özel fonksiyonlar kazanırlar. Deride Langerhans hücreleri, lenf nodlarında ise folliküler dentritik hücreler olarak bulunurlar. Uzun uzantılı ve Sınıf I ve II MHC yönünden zengin olan sitoplazmik membranlarına sahiptirler. Böylece antijeni yakalayıp, onu işleyip yüzeylerinde sunarak edinsel immün yanıtın başlamasında rol oynarlar. Doku içerisinde immature (olgunlaşmamış) olarak bulunurlar. Patojenleri fagosite edip işledikten sonra CD80 ve CD86 gibi kostimulatör (eş uyaran) molekülleri ve kemokin reseptörü olan CCR7 molekülünü ifade ederler böylece matur (olgunlaşmış) olarak lenfoid organlara göç ederler. Bu organlarda işlediği antijeni naif T hücrelerine sunarak, edinsel immün yanıtı başlatırlar (Guermonprez vd., 2002).

2.1.1.4 Mast Hücreleri

Kemik iliği kaynaklı dolaşımda progenitör hücreler olarak bulunan bu hücreler, dokulara geçerek farklılaşır ve kök hücre faktörü (SCF) gibi çeşitli sitokinler aracılığıyla olgunlaşırlar. Mast hücreleri özellikle patojenlere daha fazla maruz kalan deri, solunum yolları, gastrointestinal sistemi çevreleyen dokulara yaygın olarak dağılarak hem doğal hem de edinsel immünitede savunma sağlarlar. Bol sitoplazmik granülüne sahip olan mast hücreleri, yeni üretilen veya depolarında hazır bulunan biyolojik olarak aktif birçok medyatör salgırlar. Bu medyatörler; proinflamatuvar, antiinflamatuvar ve/veya immünsüpresif fonksiyonlar gösterirler.

Mast hücreleri allerjen, bakteri, parazit gibi farklı yollar ile uyarılır. Mast hücre aktivasyonu iki temel mekanizma ile gerçekleşir: Fc reseptörleri ve Fc reseptörleri dışı. Aktive olan mast hücrelerinde degranulasyon gerçekleşir. Mast hücreleri granülleri, vazoaktif aminleri ve proteolitik enzimler içerir. Bunlardan en önemlisi vazodilatasyon ve kılcal geçirgenliği arttıran histamindir. Histamin ile birlikte bu grupta yer alan proteazlar, proteoglikanlar ve TNF- α vasküler geçirgenlik üzerine güçlü etkiye sahiptirler.

Proteolitik enzimler ise bakterileri öldürür veya mikrobik toksinleri inaktive ederler. Yeni üretilen medyatörlerden bir kısmı lipid medyatörleri içerirken, diğer bir kısmı ise saatler içerisinde üretilip salınacak olan TNF- α , SCF, gibi sitokin ve kemokinleri içerir. Aynı zamanda mast hücre ürünleri helmintler ve diğer patojenlere karşı savunma sağlarlar. Alerjik hastalık belirtilerinden sorumlu rol oynarlar (Marshall ve Jawdat, 2004; Bayramgürler ve Odyakmaz-Demirsoy, 2013).

2.1.1.5 Doğal Lenfoid Hücreler (ILC)

Doğal lenfoid hücreler (ILC'ler) son zamanlarda keşfedilmiş, T hücre antijen reseptörlerini (TCR) eksprese etmeyen ancak T lenfositlere oldukça benzer hücre çeşitleridir ve sitokin üretere immün sistemde rol alırlar. Doğal lenfoid hücreler salgıladıkları sitokinlere göre CD4+ T hücrelerinin üç ana grubuna ayrılır. Bunlar; Th1, Th2 ve Th17'dir. Aynı zamanda hem epitelyal hem de diğer enfeksiyon bölgesindeki hücrelerin üretilip salgıladıkları sitokinler, ILC'lerin yanıtlarını uyarır ve artırır. Böylece enfeksiyonlara karşı erken savunma sağlayan ILC'ler, T hücre yanıtını da yönlendirme özelliğine sahiptir. Doğal lenfoid hücre ailesi, sitotoksik hücrelerden (NK) ve sitotoksik olmayan ILC1, ILC2 ve ILC3 alt gruplarından oluşur. Sırasıyla, ILC1 grubu, miyeloid hücre türeği IL-12 ile aktive edilebilir, ILC2 grubu ise epitel kaynaklı sitokinler ile aktive edilir ve mast hücreleri, bazofiller, eozinofiller ve makrofajların etkileşimleri ile tip 2 bağışıklığı düzenleme görevine sahiptirler. Son olarak ILC3 grubu ise hem doğal hem de edinsel immünitenin hücreleriyle etkileşime girerek etki göstermektedirler. Ayrıca, ILC3'ler epitelyal bariyer takviyesinin yanı sıra, antimikrobiyal program başlatan IL-22'yi salgırlar (Abbas vd., 2016; Thaiss vd., 2016).

2.1.1.6 Doğal Öldürücü Hücreler (NK)

NK hücreler, periferik kan lenfositlerinin %10-15'i hücrelerden oluşur. Normal şartlarda periferik kan, kemik iliği ve dalakta bulunurlar. Farklı kemoatraktanlar yanıt olarak enflamasyonlu dokuya göç edebilirler. Bu hücreler sitotoksik T lenfositlerin aksine aktive edilmek için spesifik bir antijeni tanıma ihtiyacı duymazlar. Virüsleri, diğer patojenleri, tümörlü hücreleri direk olarak sitotoksik mekanizmayla öldürmeye programlandıkları için bu hücreler doğal öldürücü hücreler olarak adlandırılmışlardır. Bu yönleriyle spesifik olmayan efektör hücrelerdir (Abbas vd., 2016).

NK hücreleri timustan bağımsız oldukları için kendi etkinliklerini gösterirler. NK hücreleri fonksiyonlarını birtakım reseptörler ile düzenleyebilirler. Patojenler veya enfekte olmuş hücrelerin yok edilmesinde aktivatör reseptörler görev alır. Bu reseptörlerin hedef hücrelerdeki ligandlarına bağlanması ile NK hücreleri aktive edilir ve hücre lizisini başlatırlar. NK hücreleri hedef hücre ile temas noktasından hücre dışı boşluğa sitoplazmik granül içeriğini bırakır (ekzositoz). Granüller hedef hücreye girerek apoptozu indükleyen enzimleri aktive ederler, lizis başlatılır ve hücre yok edilir. Bu yönüyle sitotoksik T hücrelerinin hedef hücreleri öldürme mekanizmasına benzerlik gösterir. Aktivasyondan sonra NK hücreleri, immün yanıtları düzenleyici sitokinleri ve kemokinleri salgırlar. Bunlar enflamatuvar yanıtları uyarır, monosit ve granülosit hücre büyümesini ve fonksiyonunu kontrol etmektedir. Diğer hücrelerle etkileşime

girerek edinsel immün yanıtı tetiklemektedirler. NK hücreleri sitokin IFN- γ sentezleyip salgılar ve makrofajları aktive eder. Makrofajlar ve dendritik hücreler de sitokinler salgılayarak NK hücrelerinin enfeksiyona karşı savunma yeteneğini artırır. Normal hücrelerin lizisinin önlenmesinde veya NK hücre aktivasyonunun sonlanması gereken durumda NK hücre inhibitör reseptörleri görev alır (Moretta vd., 2002; Farag ve Caligiuri, 2005).

2.1.1.7 Kompleman Sistem

Kompleman sistemi, çoğunlukla karaciğerde üretilen plazma proteinlerinden veya hücre yüzeyinde eksprese edilen membran proteinlerinden oluşan, konağın patojenlere karşı savunmasında ve homeostazında anahtar rol oynayan, doğal immün yanıtın karmaşık ve temel bir ögesidir (Merle vd., 2015). Kompleman sistemi, mikroorganizmalar, anormal konakçı hücreler ve hücre dışı ortamda modifiye edilmiş moleküller ile ilişkili moleküler modellerin tanınması üzerine 3 farklı yoldan (klasik, alternatif ve lektin) tetiklenebilir (Bajic vd., 2015; Gialeli vd., 2018). Kompleman aktivasyonu boyunca, dolaşımdaki proteinler parçalanır ve yeni ortaya çıkan ayrılmış parçalar geniş bir dizi downstream (aşağı akış) doğal ve adaptif immün fonksiyonlarına katılır (Thurman ve Nester, 2016).

Tüm aktivasyon yolları, C3 ve C5 konvertaz enzim komplekslerinin oluşturulmasına yol açarak, patojenlerin fagositik alımını destekleyen ve nötrofilleri ve monositleri aktive eden opsoninler ve anafilatoksinlerin oluşumunu sağlar (Kolev vd., 2014). C3'ü, C3a ve C3b'ye ayıran iki konvertaz mevcuttur: C3b ve faktör Bb'den oluşan C3bBb konvertaz alternatif yolda, C4b ve C2b'den oluşan C4bC2b konvertaz ise klasik ve lektin yollarında görev yapar. Anti-mikrobiyal ve antifungal aktiviteye sahip olan C3a, doğal immün efektör hücrelerin toplanmasına ve aktivasyonuna yardım eder. C3b ise mikrobik veya apoptotik yüzeyleri kaplar ve fagositoz için partikülü işaretler. Aktivasyon kaskadı C3'ün C3a ve C3b'ye ayrılmasının ötesine geçebilirse, ek bir C3b molekülü C3 konvertazlarına bağlanarak, C5 konvertazları üretilir: alternatif yolak için C3bBbC3b veya klasik ve lektin yolları için C4bC2bC3b. Bu iki enzim de C5'i, güçlü bir anafilaktik peptit olan C5a ve terminal yolağı başlatabilen C5b'ye ayırır. C5b'nin bir hedef üzerinde birikimi, terminal membran atak kompleksini (MAC) oluşturmak üzere C6, C7, C8 ve C9 moleküllerini toplar. Böylece hücre lizisini uyarmak üzere hücre membranında porlar oluşur (Zipfel ve Skerka, 2009; Mathern ve Heeger, 2015). Patojenlere karşı savunmada kompleman sistem aktive edildiğinde, sistemin zararlı etkilerine karşı konak hücreleri koruyan farklı kompleman düzenleyici proteinler eksprese edilir (Sina vd., 2018).

2.1.1.8 Sitokinler

Sitokinler, patojenlere yanıtta sinyal iletim yollarının aktivasyonu, hücreler arası sinyal ve iletişim ağının kurulabilmesi için gerekli olan düzenleyici protein grubudur. Sitokin üretiminden sorumlu başlıca hücre tipleri makrofajlar ve DC'lerdir. Mast hücreleri, endotel hücreler ve bazı epitel hücrelerle birlikte diğer hücre tipleri de sitokin üretebilir. Çeşitli hücre tiplerinden salgılanan sitokinler birçok önemli hücresel olaya katılır. Oldukça değişken olan sitokin sinyalizasyonu koruyucu ve hasar verici yanıtlara sahip olabilir. Doğal immünite ve enflamatuar yanıtların, lökosit büyüme ve farklılaşmasının düzenlenmesinde, antiviral özelliklerin ve sitotoksik T lenfositlerin aktive edilmesinde rol oynarlar. Sitokinler, diğer sitokinlerin sentezini ve davranışlarını da etkileyebilirler. Geniş bir çeşitliliğe sahip olan sitokin ailesinin ana tipleri; interferonlar, intörlökinler, kemokinler, koloni uyarıcı faktörler (CSF) ve tümör nekroz faktördür (TNF). Sitokinler hedef hücre üzerindeki spesifik reseptörlerine yüksek afiniteyle bağlanırlar. Sitokine ve hedef hücreye bağlı olarak farklı etkiler gösterirler. Salgılanan birçok sitokin; otokrin etki göstererek onları üreten hücrelere veya parakrin etki göstererek komşu hücrelere etki gösterirler. Sitokinlerin bir kısmı da ciddi enfeksiyonlarda fazla miktarlarda üretilir ve endokrin etki göstererek, dolaşım yoluyla uzaktaki hedef hücreye etki gösterir (Zhang ve An, 2007; Simbirtsev ve Kozlov, 2012).

Doğal immünitede görevli salgılanan sitokinlerden en iyi bilineni TNF'ler, bakteri ve diğer enfeksiyöz mikroplara karşı akut inflammatuar yanıtta mediatör olarak görev yaparlar. TNF TNF'ler TNF- α olarak da adlandırılır. Lenfotoksin olarak adlandırılan TNF- β ile yakın ilişkilidir. Makrofajlar ve DC hücreler TNF'lerin üretildikleri ana kaynaklardır. TNF'ler nötrofillerin aktivasyonunu, kas ve yağlarda katabolizmayı ve çoğu hücre tipinde apoptozu uyarır. TNF'ler ve IL-1'ler, endotel hücreleri aktive ederek, inflamasyon ve pıhtılaşmayı sağlarlar. Bu iki sitokin hipotalamusa etki ederek ateş oluşumundan da sorumludur (Aggarwal, 2003).

IL-1'lerin üretildikleri ana hücre kaynağı makrofajlardır ve aynı zamanda nötrofiller, keratinositler gibi epitel hücreleri ve endotel hücrelerde de üretilebilirler. IL-1 ve IL-6 sitokinleri, akut-faz proteinlerinin sentez edilmesi için karaciğere etki ederler ve Th17 farklılaşmasında rol oynarlar. Makrofajlar, endotel hücreler ve T hücreler tarafından üretilen IL-6 lokal ve sistemik etkiye sahip önemli bir sitokindir. Ek olarak IL-6; kemik iliğinde nötrofillerin üretimini ve B hücrelerini uyararak antikor üreten hücrelerin proliferasyonunu sağlar. IL-10'lar, makrofajlar ve çoğunlukla regülatör T hücreler tarafından salgılanan ağırlıklı olarak inhibitör sitokinlerdir ve makrofajlara ve DC'lere etki ederek IL-12, sınıf II MHC moleküllerinin ve eş uyaranlarının ekspresyonlarını engeller. IL-12'ler, aktive edilmiş makrofajlar ve DC'lerce üretilir. T hücrelere etki ederek Th1 farklılaşmasını uyarır, NK ve T hücrelerinin sitotoksik fonksiyonlarını artırır ve

IFN- γ sentezlenmesini sağlarlar. IL-15 makrofaj ve diğer hücre tiplerinden salgılanır. IL-2 ile yapısal olarak benzerdir. NK ve hafıza CD8+T hücrelerinin proliferasyonunu uyarır. IL-18'de makrofajlar tarafından sentezlenir ve yapısal olarak IL-1 ile benzerlik gösterir. Fonksiyonel olarak ise IL-12 ile benzerlik göstererek NK ve T hücrelerinden IFN- γ sentezlenmesini sağlamaktadır. IL-23 ve IL-27'yi üreten hücre tipleri makrofajlar ve DC'lerdir. IL-23, IL-17 üreten T hücrelerinin farklılaşmasına yardım etmektedir. IL-27 ise T hücrelerine etki ederek, Th1 farklılaşması ve Th17 hücrelerin gelişimini engellemektedir. Ayrıca NK hücrelerini uyarak IFN- γ sentezlenmesini sağlamaktadır (Borish ve Steinke, 2003; Abbas vd., 2017).

Kemokinler; makrofajlar, endotel ve T hücreler, fibroblastlar ve trombositler tarafından üretilen kemotaktik geniş bir molekül ailesidir. Konak savunmasında enfeksiyonun olduğu bölgeye (yangı) lökositleri, makrofajları ve CD8+ T lenfositleri yönlendiren moleküllerdir. Doku reddi ve alerjik reaksiyonlarda rol oynarlar. Lenfositlerin periferik lenfoid dokular arasındaki trafiğinin düzenlenmesinde görev alırlar. Tümör metastazların engellenmesini sağlarlar. CSF'ler; granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktörler (GM-CSF), makrofaj koloni uyarıcı faktör (M-CSF) ve granülosit koloni uyarıcı faktör (G-CSF) olarak ayrılmıştır. Enflamasyon ile ilişkili olan bu CSF'ler, hematopoietik hücrelerin proliferasyonunu ve farklılaşmasını uyarırlar (Tosincik vd., 2012).

Tip I interferonlar, viral enfeksiyonlara karşı erken immün yanıtta rol oynayan sitokinlerle yapısal olarak ilişkili büyük bir ailedir. Viral savunmada en önemlileri INF- α ve INF- β 'dir. INF- α makrofajlar ve plazmasitoid DC'ler, INF- β ise fibroblastlar tarafından üretilir. Bu interferonlar, NK hücreleri ve CD8+ CTL'lerin sitotoksitesini artırır. Bununla birlikte naif T hücrelerinin, yardımcı T hücrelerin (Th) Th1 alt grubuna farklılaşmasını uyarır. Tip I interferonlar bu etkileriyle virüslerin ve bakterilerin gibi patojenlerin yol açtığı hücre içi enfeksiyonlara karşı hem doğal hem de edinsel immüniteyi destekler. Tip I interferonlar, sınıf I MHC moleküllerin ekspresyonunu uyarır. Böylece virüs ile enfekte olmuş hücrelerin sınıf I MHC molekülleriyle sunulan viral protein kaynaklı peptitleri, CD8+ sitotoksik T'ler tarafından tanınabilir ve bu enfekte hücrelerin öldürülme olasılıkları artar (Takaoka ve Yanai, 2006). Interferon- γ ise Th1 hücreler tarafından ve çok az miktarda olsa da T ve NK hücreler tarafından üretilen önemli bir interferon çeşitidir. İmmün yanıtları düzenleyici etkiye sahiptir. Fagositer, endotel, T ve NK hücrelerin aktivasyonunu uyarır. B hücre farklılaşmasını sağlar. Çoğu hücre tipinde virüslere karşı aktivasyonu az da olsa uyarır ve sınıf I veya II MHC ekspresyonunu artırır. Aynı zamanda hücre bölünmesini durdurur (Malmgaard, 2004).

2.1.2 Edinsel İmmün Sistem

İmmün sistem vücuda giren patojenlere karşı iş birliği ile çalışan iki ana savunma sistemi ile yanıt verir: İlk savunma sistemi kısa süreli ve spesifik olmayan doğal immünitedir. Diğeri ise daha uzun süreli, spesifik ve bellek hücreleri sayesinde kalıcı olan edinsel immünitedir. Doğal immün sistemin mekanizmaları patojenlere ait belirli yapıları tanırlar. Edinsel immünitenin mekanizmaları ise çok sayıda patojenin farklı epitoplarını seçici olarak tanıyarak spesifik yanıtlar verir. Edinsel immünite aynı uyaran ile tekrar karşılaştığında bellek özelliği olduğundan dolayı uyaranı anında tanıyabilir ve ilk yanıtından daha güçlü bir şekilde yanıt verebilir. Doğal immün yanıtlar; patern tanıma reseptörleri (PRRs) tarafından patojen-ilişkili moleküler paternlerin (PAMPs) ve hasar-ilişkili moleküler paternlerin (DAMPs) tanınmasına ve aynı zamanda kompleman proteinleri veya antikor ile kaplanmış opsonize antijenlerin Fc reseptörlerine ve kompleman reseptörlerine bağlanmasına dayanan geniş bir tanıma yelpazesine sahiptirler. Ancak doğal immün sistemin tanıyamadığı veya yok edemediği dirençli patojenlere karşı edinsel immün yanıtın gelişmesi oldukça önemlidir (Iwasaki ve Medzhitov, 2015).

Edinsel immün yanıtlar; lenfositlerin aracılık ettiği hücre-aracılı yanıt ve lenfosit ürünü olan antikorların aracılık ettiği humoral yanıt olarak iki şekilde oluşturulur. Bu yanıtlarda edinsel immünite kendisine ait iki özel hücre tipi olan T ve B lenfositleri kullanır. Bu iki hücre tipinin antijen tanıma yöntemleri birbirinden farklıdır. Antijenler vücuda girdiklerinde lenfositler tarafından tanınan immün yanıtın başlamasına neden olan ve yanıtlar sırasında salgılanan antikor ile kompleksler oluşturabilen moleküllerdir. Küçük peptit yapılı antijenler T lenfositler tarafından tanınırken, daha büyük yapılı protein, karbonhidrat, lipit ve nükleik asit yapısındaki antijenler ise B lenfositler tarafından tanınırlar. Antijen sunucu hücreler tarafından antijenler proteolitik işlemlerden geçirilir ve peptitlere ayrılır, açığa çıkan peptitler MHC sınıf I ve sınıf II yüzey molekülleri ile T lenfositlerine sunulur. MHC'ler, insan lökosit antijen (HLA) proteinleri içerirler böylece kendi hücrelerimiz ve yabancı hücreler ayırt edilebilir. MHC sınıf I molekülleri HLA-A, B ve C'yi, MHC sınıf II molekülleri ise HLA-DP, DQ ve DR'yi içerir. APC'ler farklı antijenlerin yok edilmesinde en etkili T lenfosit tipini uyarmak için peptitleri MHC'lerin iki sınıfı ile sunarlar. MHC sınıf I molekülü ile sitozoldeki endojen (hücre içi) proteinlerin peptitlerini CD8+ sitotoksik T lenfositlerine sunulur. MHC sınıf II molekülleriyle ise hücre içi veziküllerde yer alan ekzojen (ekstraselüler) proteinlerden oluşmuş peptitler CD4+ yardımcı T lenfositlerine sunulur. T lenfositler sunulan peptitleri T hücre reseptörleriyle (TCR) tanırlar. Aktive olabilmeleri için bu sunumla beraber eş uyaranların varlığı da gereklidir. Aktive olan T lenfositler lenfoid organlara veya enfeksiyon bölgesine göç ederek savunma sağlarlar. Aynı zamanda APC özpeptitlerini de T lenfositlere sunarlar. Normal koşullarda T lenfositler öz peptitlerin sunumuyla aktive edile-

mezler çünkü öz peptitler için spesifik olan T lenfositler timusta olgunlaşmaları sırasında silinirler ve periferik dokularda bulunamazlar. B lenfositler ise antijenleri B hücre reseptörü (BCR) ile tanır ve T hücrelerden daha farklı bir yol ile aktive olurlar. Aktive olan B hücreler antikorlar üretilirler ve bu sayede bulundukları bölgeden daha uzak bir mesafede savunma sağlarlar (Delves, 2014; Lundegaard vd., 2007).

Edinsel immünite hücre içi ve hücre dışı patojenlere karşı konak savunmada iki mekanizmasını birlikte kullanır. Bunlar T lenfositlerin sorumlu olduğu hücresel immünite ve B lenfositler ile ürettikleri antikorların sorumlu olduğu humoral immünitedir (Pancer ve Cooper, 2006).

2.1.2.1 T Lenfositler ve Hücresel İmmünite

Hücresel immünite, edinsel immünitenin en önemli mekanizmasıdır. T lenfositlerin ve en etkili fagositler olan makrofajların etkisinin hâkim olduğu hücresel immünite virüslere, hücre içi bakterilere, kanser hücrelerine ve parazitlerin yol oynadığı enfeksiyonlara karşı savunma sağlar. Bu savunma mekanizması naif T hücreleri tarafından sağlanan birincil yanıtları, aktive edilmiş T hücrelerinin efektör fonksiyonlarını ve antijen spesifik bellek T hücrelerinin kalıcılığını içerir. Hücresel immünite; makrofajlar, NK'lar, mast hücreleri, bazofiller, eozinofiller ve nötrofiller gibi diğer efektör hücrelerin rol oynadığı karmaşık ve koordineli bir immün yanıtın parçasıdır (Broere vd., 2011).

Hücresel immünitenin en önemli aşamalarından biri antijen sunumudur. Periferde bulunan T hücrelerinin öz MHC ile sunulan yabancı antijenleri tanıyıp, etkileşime girmeleri gerekmektedir. Timus bu öz-MHC sınırlı T hücrelerin seçiminden sorumludur. Periferde yabancı MHC ile sunulan öz veya yabancı antijeni tanıyan veya öz MHC ile sunulan öz antijenini tanıyan T lenfositlerin varlığına izin verilemez. TCR'lerin bir kısmı yabancı peptiti tanıırken bir kısımda öz MHC molekülünü tanıır. Olgunlaşmamış T hücrelerden CD4 ve CD8 çift pozitif T hücrelerin çoğu apoptoza uğrar çünkü bu hücrelerin TCR'leri öz MHC molekülünü tanıyamazlar. Öz MHC moleküllerine bağlanabilmek için TCR'leri çeşitli afinitelere sahip olan lenfositler, kortikal epitelyal hücreler üzerinde pozitif seçim ile ayrılır. Böylece öz MHC'sini tanıyabilen TCR'ye sahip T hücreleri hayatta kalır. Bununla birlikte hücrelerin çoğunun TCR'leri, öz peptid ve öz MHC kompleksine yüksek afinite gösterir. Bu otoimmün T hücreler, timik medullada bulunan DC'ler ve makrofajlar ile etkileşime girdiklerinde apoptoza uğrarlar. Böylece negatif seçim yoluyla konağa zararlı bu hücreler yok edilir. Bu iki aşama ardından, öz MHC moleküllerine zayıf bir afinite gösteren ve yabancı peptiti tanıyabilen T lenfositler seçilir. Bu hücreler karşılaştıkları MHC sınıfına bağlı olarak, CD4 veya CD8 (tek pozitif hücreler) lenfositler olarak timustan ayrılarak T hücre havuzunu oluştururlar. Periferde öz MHC ile sunulan yabancı peptit

kompleksini tanıyabilen ve tanıma etkileşimleri belirli bir eşiğin aşabilen lenfositler aktifleşebilirler (Delves ve Roitt, 2000).

Kemik iliğinde oluşan ve olgunlaşmalarını timusta tamamlayan T lenfositler oldukça hareketlidir. Olgun T lenfositler bir bölgede sabit kalmazlar kan ve lenfatik sistemde dolaşırlar ve lenf düğümleri ve dalak da dahil olmak üzere ikincil lenfoid organlarda bulunurlar. Böylece dolaşımdaki antijenleri lenf ve kandan yakalamaya çalışırlar. Edinsel immün yanıtlar bu alanlarda oluşturulur. Genellikle doğrudan dolaşımdaki patojenler tarafından sağlanan doğal immün sistemi sinyallerinin etkisiyle veya dolaylı olarak, sekonder lenfoid organlara göç eden patojenle aktifleşen kutanöz veya mukozal APC'ler ile başlatılır. Belirli bir antijenle ilk karşılaşmalarından sonra naif T lenfositler aktive olurlar ve efektör fonksiyonları uygulamak için vücuttaki birçok farklı bölgeye göç edebilirler (Bonilla ve Oettgen, 2010).

Aktive olmuş T lenfositler hızlı bir şekilde çoğalırlar (klonal genişleme). Dokulardan antijenlerin bulunduğu bölgelere göç ederler. Bu bölgelerde hücre aracılı sitotoksikite ve çeşitli sitokinlerin üretimi gibi efektör fonksiyonlarını gösterirler. Yüzeylerinde CD2 ve CD3 belirteçlerini ifade eden tüm CD2+CD3+ T lenfositler, farklı efektör fonksiyonlarını gerçekleştirmek üzere hücre yüzey proteinlerine göre alt gruplara ayrılırlar. Antijen taşıyan enfekte veya habis hücrelerin apoptoz programı ile yok edilmesinde yüzeylerinde CD8 molekülünü ifade eden CD8+ CTL'ler rol oynar. Yüzeylerinde CD4 molekülü ifade eden CD4+ yardımcı T hücreler ise; hedef hücreler için doğrudan toksik etkisi olabilen veya diğer T hücreleri efektör fonksiyonlarını gösterebilmeleri ve B hücrelerini de antikor üretmeleri amacıyla uyarabilen spesifik sitokinleri üretirler. Bu sitokinler aynı zamanda makrofajların aktive edilmesine de yardımcı olurlar. Bu mekanizma sayesinde hem doğal immünite hem de edinsel immünite arasında bir köprü kurulur (Inman vd., 2014). Efektör fonksiyonlarını gösteren çoğu T hücresi, antijenin ortadan kaldırılmasının ardından yok edilir. Geriye kalan T lenfositler ise lenfoid organlarda ve periferik dokularda yıllarca hayatta kalabilecekleri bir forma dönüşür. Bellek T hücreleri olarak adlandırılan bu lenfositler, aynı antijenle yeniden karşılaşmada naif T lenfositlerin birincil yanıtına oranla daha hızlı ve güçlü ikincil immün yanıt oluşturur. Aktive olan bellek T hücreler periferik dokularda ani efektör fonksiyonlarını gösterirler. Aynı zamanda lenfoid organlarda aktivasyon ve klonal genişleme yapabilirler. Bu sayede patojenler hastalığın erken döneminde ortadan kaldırılır (Broere vd., 2011).

2.1.2.1.1 CD4+ Yardımcı T Lenfositler (Th)

Yüzeylerinde CD3 ve CD4 molekülü taşıyan, yardımcı T hücreler (Th), lenfositlerin büyük bir çoğunluğunu oluşturmaktadır. Peptit yapısındaki antijenler, APC'lerin yüzeylerinde bulunan sınıf II MHC molekülüyle CD4+ yardımcı T lenfositlere sunulur ve lenfositlerin TCR'leri bu sunulan antijenleri tanır. Adezyon ve eş uyaran moleküllerden de gelen sinyallerin etkisiyle lenfosit aktivasyonu tetiklenir. Bu olay bir dizi farklı biyokimyasal yolağın sinyalizasyonuna yol açar. Sonuç olarak lenfositlerin çoğalmasında ve farklılaşmasında rol oynayan genlerin transkripsiyonel aktivasyonu gerçekleşir. Sinyaller yalnızca TCR ve MHC-antijen kompleksinden gelirse uyarım gerçekleşmez ve bu durumda anergi veya apoptoz meydana gelir. Aktivasyon için eş uyaran molekülünün ve sitokinler gibi çözünür medyatörlerin varlığı gereklidir. Eş uyarılardan en güçlüsü T hücrelerin yüzeyinde bulunan CD28 molekülü, APC'lerin yüzeyinde bulunan CD80 (B7-1) veya CD86 (B7-2) ligandına bağlanır. CD28 molekülü; T lenfosit proliferasyonunu, sitokin üretimini uyarıp, aynı zamanda hücresel sağkalım ve metabolizmayı etkilemektedir. T lenfositlerin yüzeylerinde bulunan diğer eş uyaran molekülü de aynı şekilde APC'lerin yüzeylerindeki ligandlarıyla etkileşime girerek aktivasyona katılırlar; CD154 ligandı CD40'a ve CD2 ligandı CD58'e bağlanır (Delves ve Roitt, 2000; Smith-Garvin vd., 2009).

Salgılanan sitokinlere bağlı olarak Th lenfositler, morfolojik olarak benzer ancak fonksiyonel olarak çeşitli alt gruplara ayrılarak farklı efektör yanıtlarını gösterirler. APC tipine ve ortamda bulunan sitokinlerin etkisiyle APC ile uyarılma sırasında öncül lenfosit olan Th0; Th1, Th2, Th17 ve T regülatör (Treg) hücre ana alt gruplarına farklılaşır (Bonilla ve Oettgen, 2010).

2.1.2.1.1.1 Th1, Th2 ve Th17 Hücreler

Konak savunmada kritik rol oynayan Th lenfositler; Th1, Th2 ve Th17'dir. Th1 hücreler, virüs ve toxoplazma dahil olmak üzere hücre içi patojenlere karşı koruma sağlarlar. Antijen sunucu hücreler sınıf II MHC molekülü üzerinde peptit yapısındaki antijenleri naif CD4+ T lenfositlerine sunarlar. Eş uyarınlarda aktivasyona katılmasıyla birlikte, enfeksiyonlara karşı birincil yanıt sağlayan makrofajlar ve DH'ler; IL-12, IL-23, IL-27 ve tip I IFN gibi sitokinler üreterek Th1 farklılaşmasını uyarırlar. IL-12 ve IFN- γ varlığında Th0'lar Th1 lenfositlere farklılaşır ve IFN- γ salgırlar. Th1 hücrelerin gen ekspresyonu ve hayatta kalımında önemli bir uyarıcı ve büyüme faktörü olan IL-12; Th2 lenfositlerin ana düzenleyici transkripsiyon faktörü olan GATA-3'ün ekspresyonunu baskılar. IFN- γ ise STAT1'i aktive eder ve transkripsiyon faktörü T-bet'in ekspresyonunu düzenler. Böylece daha fazla IFN- γ üretimi ve Th1 farklılaşmasını uyarır. STAT4'ü aktive eden IL-12'ye sürekli yanıt oluşturulur. IFN- γ geninin uyarılmasında başka bir sitokin olan IL-18, IL-12 ile iş birliği içinde çalışır. Aynı zamanda IFN- γ hücreye antijen sunan

APC'nin üzerindeki reseptörüne bağlanır. Bu yol ile birçok transkripsiyon faktörü eksprese edilerek, biyokimyasal sinyal yolları tetiklenir ve patojenlerin etkili bir biçimde yok edilmesini sağlar (Agnello vd., 2003; Reiner, 2007).

Helmintlere ve alerjenlere karşı savunmada rol oynayan Th2 hücreler, Th1'lerin aksine hücre dışı immüniteden sorumludurlar. Astım ve alerji patogeneğinde rol oynarlar. Naif CD4+ T lenfositlerin Th2'ye farklılaşmasında sorumlu olan ana sitokin IL-4'dür. IL-4, GATA-3 transkripsiyon faktörünün eksprese edilmesini uyaran STAT6'yı aktive eder. GATA-3 ise Th2 yanıtlarında önemli rollere sahiptir; sitokin üretimini uyarır, Th2 hücrelerinin seçici büyümelerini sağlar ve Th1 hücrelerine özgü faktörleri engeller. Bununla birlikte, Th2 farklılaşmasında eksprese edilen transkripsiyon faktörleri c-Maf ve NFAT; IL-4, IL-5 ve IL-13 sitokinlerini düzenler ve antikorların üretimini destekler. Farklılaşan Th2 hücreler; IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 ve IL-13 sitokinlerini salgırlar. IL-4 B hücrelerinden sınıf dönüşümü ile IgE üretimini, IL-5 eozinofillerin üretimini ve aktivasyonunu uyarır ve IL-13 ise mukus salgılanmasını sağlar (Murphy ve Reiner, 2002; Mesquita Júnior vd., 2010).

Th17 hücreler hücre dışı bakterilere ve mantarlara karşı konak savunmasında rol oynarlar ve otoimmün hastalıklarda önemli etkilere sahiptirler. Th1 ve Th2'ye göre daha geç keşfedilen Th17 hücre alt grubu, otoimmün hastalıkların tedavisi için yeni bir yaklaşım sunmaktadır. Th17 farklılaşmasında ilk adım TCR sinyalizasyonudur. Th17 hücre farklılaşması birçok sitokin ve sinyal molekülü tarafından düzenlense de özellikle IL-6 ve TGF- β 'nın iş birliği ile naif CD4+ T hücreleri, Th17 hücrelere farklılaşır. Farklılaşmalarında eksprese edilen ROR γ t, ROR α , STAT3 ve IRF4 transkripsiyon faktörleri de rol oynar. Th17 hücreler, Th1 ve Th2'nin ana transkripsiyon faktörleri olan T-bet ve GATA-3'ü eksprese etmezler. Bu hücreler nötrofillerin toplanması, aktivasyonu ve göç etmesi, dokuların yeniden modellenmesi ve onarımı, antimikrobiyal proteinlerin üretimi ile ilişkili IL-17A (IL-17), IL-17F ve IL-22 sitokinlerini üretirler (Littman ve Rudensky, 2010; Thakur vd., 2019). Bununla birlikte TGF- β , inflamasyon ve otoimmüniteyi baskılayan Treg hücrelerinin farklılaşmasında rol oynar. TGF- β , IL-6 ile birlikte naif CD4+ T hücrelerinden IL-17 eksprese edilmesini ve Th17 hücre farklılaşmasını sağlarken, sadece TGF- β etkisi altında naif CD4+ T hücreleri Treg hücrelerinin ana transkripsiyon faktörü olan Foxp3+ ü eksprese ederler. Bu nedenle IL-6, Foxp3+ Treg hücrelerinin TGF- β ile uyarımında inhibitör etki gösterir. Diğer sitokinlerinde etkisi altında Th17 veya Foxp3+ Treg hücrelerine farklılaşma gerçekleşir (Miossec vd., 2009).

2.1.2.1.1.2 T Foliküler Hücreler (TFH)

T foliküler yardımcı hücreler (TFH hücreler) olarak adlandırılan bu hücreler CD4+ T hücrelerinin alt gruplarından biridir. Foliküler hücrelerin ana görevi, antikor yanıtı oluşturmaları ve bellek B hücrelerine dönüşümleri için B lenfositlerine yardımcı olmaktır. Lenfoid organların T hücre bölgesinde MHC sınıf II ile sunulan peptit antijenlerin TCR tarafından tanınması ve eş-uyaranların birbirine kenetlenmesi sonucu CD4+ T yardımcı hücreler, IL-6 ve IL-21 sitokinlerinin etkisi altında TFH hücrelere farklılaşırlar. Farklılaşmada rol oynayan ana transkripsiyon faktörleri STAT-3 ve Bcl-6'dır (Hirahara vd., 2011).

Aktive olan TFH hücreler önemli bir sitokin olan IL-21 salgırlar ve CD28 ile ICOS ekspresyonunu uyarırlar. Bu yardımcı sitokin hem TFH üzerindeki reseptörüne hem de antikor oluşturan hücrelere farklılaşmalarını uyarmak amacıyla B hücreler üzerinde eksprese edilen IL-21R'ye bağlanır. Aynı zamanda T-B hücre ara yüzünde TFH hücreler; diğer Th hücrelerden daha fazla miktarda CD40L, ICOS ve OX40 gibi eş-uyaran moleküllerin ve foliküllere göçte önemli rol oynayan CCR7 ve CXCR5 moleküllerinin de ekspresyonunu sağlarlar. TFH hücreler foliküler dendritik hücreler (FDCs) de dahil olmak üzere foliküler stromal hücreler tarafından üretilen CXCL13'ün kemokin reseptörü olan CXCR5'i fazla miktarda eksprese ederler. CXCR5 lenfoid dokuların foliküler bölgelerinde B ve T hücrelerin konumlanmasından sorumludur. Foliküler hücreler, reseptör–ligand etkileşimi sayesinde B hücrelerine yardım edebildikleri foliküllere yerleşebilirler. CXCR5, sekonder lenfoid dokularda B hücre foliküllerinin gelişimi için gerekli olduğundan dolayı tüm olgun B lenfositler tarafından da eksprese edilebilir. Böylece TFH ve B hücreler CXCL13'ün üretim bölgelerine birlikte yerleşerek B – T hücre etkileşimlerini gerçekleştirirler. B hücreleri antikor üretmek üzere plazma hücrelerine farklılaşırlar. TFH hücrelerin farklılaşması ve T-hücre bağlı antikor yanıtın uyarılmasında rol oynayan ilgili moleküllerin fazla veya az miktarda eksprese edilmesi bazı otoimmün hastalıkların veya immün yetmezliklerin patogenezinin aydınlatılmasında yol gösterici olabilir (Abbas vd., 2017; King vd., 2008; Fazilleau vd., 2009).

2.1.2.1.1.3 T Regülatör Hücreler (Treg)

Treg hücreler periferik kandaki toplam CD4+ T hücrelerin %5-10'unu oluştururlar. Tregler, otoreaktif T lenfositlerin aktivasyonunu ve çoğalmasını aktif bir şekilde baskılayarak vücudu otoimmün yanıtlardan korur. Böylece öz antijenlere karşı öz-toleransın korunmasını sağlarlar. Treg aracılı baskılama mekanizması; otoimmün bozukluklar, akut ve kronik enfeksiyonlar, alerji, kanser ve metabolik inflamasyonda önemini gösterir. Aynı zamanda Tregler yabancı

antijenlere karşı oluşturulan immün yanıtın azaltılmasına da aracılık ederler (Josefowicz vd., 2012).

Başta bütün T hücre soyları timusta oluşur ve naif CD45RA+ T hücreler olarak periferde göç ederler. Periferde naif T hücreleri aktive olur, uyarana ve ortamdaki belirleyici moleküllere bağlı olarak ya T hücre alt tiplerine ya da düzenleyici T alt gruplarına farklılaşırlar. Daha sonra bazı T hücreler antijenle yeniden karşılaştıklarında tekrar aktifleşebilen bellek T hücrelerine dönüşürler. Treg hücreler de terminal efektör Treglere farklılaşabilirler (Sakaguchi vd., 2010). Treg hücre tipleri oluşum şekillerine göre doğal Treg (nTreg) ve indüklenmiş Treg (iTreg) olmak üzere ikiye ayrılır. nTreg'ler timusta oluşurken, inflamatuvar yanıt anında iTregler CD4+ T ve ya CD8+ T hücreler tarafından uyarım sonrası oluşur. Treg hücre farklılaşmasında rol oynayan ana sitokin IL-2'dir, TGF- β da farklılaşmaya katılır. Eksprese edilen yüzey belirteçleri bu hücre çeşitlerinin fenotiplerinin belirlenmesini sağlar. Tregler başta CD3, CD4 ve IL-2 reseptörü (IL-2R) α zinciri (CD25) olmak üzere, fonksiyonlarına bağlı olarak değişiklik gösteren CD62L, CD69, CD71, CD122, CTLA-4, HLA-DR ve glukokortikoid kaynaklı TNFa reseptörü (GITR) gibi belirteçleri eksprese ederler. Ayrıca immün yanıt baskılamada Treglerin gelişimleri ve fonksiyonları için kritik bir role sahip olan düzenleyici transkripsiyon faktör Foxp3'ü eksprese ederler. Foxp3 geninde mutasyon taşıyan hastalarda bir otoimmün bozukluk olan IPEX (İmmün disregülasyon, poliendokrinopati, enteropati, X'e bağlı) sendromu gelişir. Bu hastalıkta Treglerin gelişiminde ve immün yanıt baskılayıcı fonksiyonlarındaki bozukluk nedeniyle T hücreleri aşırı aktive olur ve sonuç olarak otoantijenlere, bağırsak komensal bakterilerine veya zararsız çevresel antijenlere karşı otoimmün poliendokrinopati, bağırsak inflamatuvar hastalık veya alerji gelişir (Chatila, 2005; Mesquita Júnior vd., 2010). Tregler baskılayıcı özelliklerini CTLA-4 gibi inhibitör moleküller ile doğrudan hücre teması yoluyla veya salgıladıkları IL-10 ve TGF- β gibi sitokinler aracılığıyla gerçekleştirirler (Garra ve Vieira, 2004).

2.1.2.1.2 CD8+ Sitotoksik T Lenfositler (CTL)

Sitotoksik T lenfositler (CTL), virüs ile enfekte olmuş veya kanser nedeniyle değişime uğramış konak hücrelerin yok edilmesinde rol oynarlar. Enfekte olmuş hücrede üretilen viral peptitler sınıf I MHC molekülleri ile CTL'lere sunulur ve uyarım sağlanır. Eş uyarım sinyallere ihtiyaç duymadan, IL-2 varlığında hızla çoğalan CTL'ler, birincil immün yanıtta sayılarını hızla arttırmırlar. Antijen – MHC sınıf I kompleksi ile kolay aktive olabildikleri ve dolaşımdaki daha iyi sağ kalım yapabildikleri için Th lenfositlere kıyasla daha fazla klonal genişleme gösterirler. Aktivasyonun ardından CTL'ler hedef hücreyi farklı mekanizmalar ile öldürür. Ca^{+2} -bağımlı öldürme mekanizmasında; CTL hedef hücre ile arasında kurduğu immünolojik sinapsa; perforin, granzim B ve granulozin gibi efektör proteinler içeren özelleşmiş sitolitik granüllerin

salınımını başlatır. Perforin hedef hücre membranında porlar açarak Granzim B'nin hücre içine geçişini kolaylaştırır. Granzimler ise kaspazları aktive ederek apoptozu uyarır. Diğer bir CTL aracılı öldürme olan Ca^{+2} -bağımsız mekanizma; CD95 (Fas) CD95L (FasL) arasındaki etkileşimle sağlanır. TCR ile aktive edilen CTL'lerin yüzeyinde FasL eksprese edilir. FasL hedef hücrede eksprese edilen Fas'a bağlandığında, sıralı kaspaz aktivasyonunu uyararak apoptozu uyarır. CTL lenfositler $TNF-\alpha$, $IFN-\gamma$ gibi anti-viral sitokinleri salgılar. $IFN-\gamma$, sınıf I MHC ekspresyonunu artırır ve viral replikasyonların baskılanmasını sağlar (Broere vd., 2011; Zhang ve Bevan, 2011).

2.1.2.2 B Lenfositler ve Hümmoral İmmünite

Edinsel immüitenin vücuda giren patojenlere karşı diğer savunma yöntemi B lenfositlerin rol oynadığı hümmoral immünitedir. Dendritik hücreler gibi T hücreler ve diğer hücrelerden alınan sinyaller ile uyarılan B lenfositler, plazma hücrelerine olgunlaşarak antikorlar üretirler. Salgılanan antikorlar dolaşıma katılırlar ve patojenlerle savaşmak üzere enfeksiyon bölgesine giderler. Antikorlar birçok virüs, bakteri ve tümör hücrelerinin opsonizasyonunu sağlarlar. Bu sayede kompleman sisteminin aktivasyonuna ve toksinlerin nötralizasyonuna yardımcı olarak doğal immün yanıtı desteklerler. Aynı zamanda antijen sunabilen bu lenfositler konak savunmasında ve otoimmün hastalıkların patogeneğinde büyük rol oynarlar (Manz vd., 2002; Thakur vd., 2019).

Periferik kandaki lenfositlerin %15-20'sini oluşturan B hücreler antijenden bağımsız olarak kemik iliğinde bulunan hemopoietik kök hücrelerden çeşitli hücre öncüllerine farklılaşarak gelişirler. Kemik iliğindeki olgunlaşma sürecinde B lenfositler antijen özgüllüğü kazanırlar ve yüzey reseptörlerini eksprese ederler. Olgunlaşmamış (immature) B hücre yüzeyinde yalnızca IgM'yi ve daha sonra olgun (mature) B hücre olarak hem IgM hem de IgD'yi eksprese eder ve böylece BCR tamamlanır (Bonilla ve Oettgen, 2010). BCR'yi eksprese etmeyen hücreler ortadan kaldırılır, öz-proteinleri yüksek afiniteyle tanıyan B hücreler ise apoptozla yok edilir (Mesquita Júnior vd., 2010). Kemik iliğinde gelişimlerini ve olgunlaşmalarını tamamlayan olgunlaşmış B hücreler dolaşıma katılırlar ve periferik lenfoid organlara göç ederler. Dinlenme halindeki bu hücreler lenf düğümleri, dalak gibi bu organlarda spesifik bir antijenle karşılaştıklarında yanıt vermek üzere aktive olurlar (LeBien ve Tedder, 2008).

B hücreler T hücre-bağımlı ve T hücre-bağımsız olmak üzere iki yol ile aktive edilebilir. Polisakkarid, lipid gibi protein yapısında olmayan birçok antijen T hücre-bağımsız antijenler olarak adlandırılır. Th hücre yardımına ihtiyaç duymadan direkt olarak B lenfositleri aktive ede-

bilir ve antikor salgırlarlar. T hücre-bağımlı antijenler ise protein ve glikoprotein yapısındaki antijenlerdir. Bu antijenlerin öncelikle Th hücre tarafından tanınması gerekir, ardından Th hücreler B lenfositlerin aktive edilmesine yardımcı olurlar (Bonilla ve Oettgen, 2010). T hücre-bağımlı hümmoral yanıt fazlardan oluşur. Bu yanıtın başlatılabilmesi için T hücreler T hücre zonlarından foliküle doğru, B hücreler ise foliküllerden T hücre zonuna doğru göç ederler ve aynı antijene özgü bu iki hücre etkileşime girer. BCR'ler tarafından protein antijenler hücre içine alınarak peptit olarak işlenir ve sınıf II MHC'ler ile B hücre yüzeyinde sunulur böylece B hücreler APC hücre olarak da görev yapabilirler. Th hücreler sunulan peptitleri tanır. B7-1, B7-2 ve CD28 eş uyarırlarının birbirine bağlanmasının ardından uyarılan Th hücreler yüzeylerinde CD40L eksprese ederler ve sitokin salgırlarlar. CD40L'nin B hücreler üzerindeki CD40'a bağlanması ve Th hücrelerden salınan sitokinler B hücrelerinde aktivasyonu sağlar (Elgueta vd., 2009). Böylece bu hücrelerde klonal genişleme, sınıf değişimi, afinite olgunlaşması ve bellek B lenfositlere farklılaşma aşamaları uyarılır (Baumgarth, 2000; McHeyzer-Williams ve McHeyzer-Williams, 2005).

Aktive edilen birçok B hücresi lenfatik sistem ve lenf düğümleri boyunca dolaşarak antijenlere karşı ekstra foliküler yanıtta rol oynarlar. Bu hücreler çoğalarak kısa ömürlü plazmablast hücreler haline gelirler ve antikor salgırlarlar. T hücre bağımlı antikor yanıtlarının geç evresi germinal merkeze göç eden aktif B hücreleri tarafından oluşturulur. Bu hücreler santral bölgelerinde hızla çoğalırlar. Antijenle karşılaşan bazı aktive B hücreler, Ig ağır zincir sınıf değişimi yaparak IgM antikoru salgırlarken, daha sonra IgG, IgA veya IgE antikorlarını üreten ve salgılayan hücrelere dönüşürler (Delves ve Roitt, 2000). Farklılaşma ve seçim aşamalarından sonra B hücrelerin bazıları plazma hücrelerine farklılaşarak antikor salgılamaya devam ederler. Bazıları ise antijenle yeniden karşılaşma durumunda hızlı yanıt verebilen uzun ömürlü bellek B hücrelerine farklılaşır. Yüzeylerinde IgM, IgD ve CD27'yi eksprese eden bellek hücreleri unswitched olarak adlandırılırken; IgM, IgD eksprese etmeyen ancak CD27'yi eksprese eden hücreler switched olarak adlandırılır (Bonilla ve Oettgen, 2010; Shlomchik ve Weisel, 2012; Schrezenmeier vd., 2018).

İmmünoglobulinler (Ig) olarak adlandırılan antikorlar hümmoral immün yanıtın efektör molekülleridir. Bir Ig molekölü iki hafif (Light-L) ve iki ağır (Heavy-H) zincirin bir araya gelmesiyle oluşur (Pieper vd., 2013). Hafif zincir bir değişken (Variable-V) ve bir sabit (Constant-C) bölgeye sahiptir ve kappa (κ) ve lambda (λ) olmak üzere iki türü vardır. Her bir ağır zincir ise bir V, üç ya da dört C bölgeye ve α , γ , δ , ϵ ve μ olmak üzere beş tip ağır zincire sahiptir. Sahip oldukları ağır zincir tipine göre adlandırılan beş farklı antikor vardır: IgG, IgA, IgD, IgE ve IgM. Bu antikorların her biri hümmoral yanıtta farklı görevleri üstlenirler. Bir Ig molekölünün ağır ve hafif zincirlerden oluşan iki çatal ucu antijeni bağlama özgülüğüne sahiptir

ve Fab olarak adlandırılır. Sadece ağır zincirden oluşan kuyruk kısmı ise Fc olarak adlandırılır (Mesquita Júnior vd., 2010; Abbas vd., 2016).

Antijenlere karşı ilk maruz kalmada olgun naif B hücreleri aktive edilir ve primer hümmoral immün yanıt başlatılır ancak yavaştır. Afinitesi düşük ve az miktarda üretilen IgM antikorları ile savunma yapılır. Aynı antijen ile daha sonraki karşılaşmada yanıt; primer immün yanıtla oranla daha hızlı ve daha kuvvetli olan sekonder hümmoral immün yanıt tarafından oluşturulur. Hafıza B hücrelerinin rol oynadığı bu yanıtta daha fazla ve daha çeşitli Ig izotipleri (IgG, IgA, IgE) salgılanır. Ayrıca salgılanan Ig'lerin antijen afiniteleri de oldukça yüksektir (Tarlinton, 2006; Mesquita Júnior vd., 2010).

2.1.3 Primer İmmün Yetmezlikler (PİY)

Çoğunlukla monogenik kalıtım özelliğı gösteren ve 450'den fazla gen mutasyonu ile ilişkilendirilmiş primer immün yetmezlikler (PİY), genellikle sık, tekrarlayan ve kalıcı enfeksiyonlarla karakterize kronik bir hastalık grubudur (Tangye vd., 2020; Ziegler ve Ballow, 2019). Primer immün yetmezliklerde tolerans mekanizmasındaki ve immün regölasyonlardaki kusurlar immün disregölasyon ile seyreden bir grup hastalığına yol açmaktadır (Arason vd., 2010; Agarwal ve Cunningham-Rundles, 2019).

İmmün yetmezliğe sebep olan genlerin ve moleküler yolların araştırılması, genel olarak otoimmün hastalıkların daha iyi anlaşılmasını ve klinik değeriendirilmede zıt gibi görölen immün yetmezliğı ve otoimmünitenin gerçekte iç içe olduğunu göstermiştir (Cunningham-Rundles, 2011). PİY hastalıklardan otoimmün poliendokrinopati, kandidiazis, ektodermal distrofi (APECED), otoimmün lenfoproliferatif sendrom (ALPS), immün disregölasyon, poliendokrinopati, enteropati, X'e bağılı (IPEX), IPEX benzeri sendromlar (CD25 ve STAT5b eksikliği), LRBA eksikliği, CTLA-4 eksikliği, *STAT1* geninde fonksiyon kazanımı belirgin otoimmünite ile karakterizedir. Primer immün yetmezliklerde otoimmüniteden sorumlu görölen başlıca mekanizmalar arasında; programlı hücre ölümünü etkileyen yollarlarda bozukluk, organizmanın hücrelerine reaksiyon gösteren T hücrelerinin santral ve çevresel baskılayıcı basamaklardan kaçması, düzenleyici T hücrelerin anormal işlev göstermesi, anormal B hücrelerin kemik iliğı ya da çevre dokularda yok edilememesi yer alır (Amaya vd., 2019; Saifi ve Wyszocki, 2015; Bussone ve Mouthon, 2009).

2.1.3.1 CTLA-4 ve LRBA Eksikliği Patogenezi

İmmün sistemin temel mekanizması basitçe kendinden olanı yabancından ayırt etme prensibine dayanmaktadır. Bu sistemde patojenlerin yok edilmesinde timustan köken alan T hücreler kritik görevler üstlenirler. Olgunlaşmamış hücreler çoğalırlar ve geniş bir TCR repertuarı oluştururlar. Bu oluşum sürecinde öz-reaktif T hücrelerinin timusta seçilerek apoptoz ile yok edilmeleri, otoimmüniteyi önlemek amacıyla önemli bir basamak olsa da tam olarak yeterli değildir. Bu nedenle immün sistemdeki farklı birçok kontrol noktaları ile immün yanıtlar denetlenir. Olgunlaşmış hücrelerin neden olabileceği konak hasarına karşı periferal toleransın rolü büyüktür (Walker ve Sansom, 2015; Buchbinder ve Desai, 2016).

Geniş bir repertuara sahip olan T hücre reseptörleri, patojenlerin tanınmasının ardından T hücrelerin aktivasyonunu sağladıkları gibi, immün yanıtların dengesini ve yanıtlar sırasında oluşabilecek konak hasarına karşı kontrol mekanizmalarını da yönlendirirler. CD152 olarak da bilinen CTLA-4 (Cytotoxic T-lymphocyte–associated antigen 4); periferal tolerans ve otoimmünite de kritik rol oynayan inhibitör bir reseptördür (Şekil 1). T lenfosit aktivasyonunu engelleyerek, immün yanıtı baskılayan CTLA-4'ü eksprese eden ana hücre tipi Treg hücrelerdir. Aynı zamanda hem CD4+ hem de CD8+ T hücreler tarafından eksprese edilebilen CTLA-4, naif T lenfositler ve dinlenme halindeki efektör T lenfositlerde eksprese edilmez (Mitsuiki vd., 2019). CTLA-4 antijen sunan hücreler üzerinde eksprese edilen CD80 (B7-1) ve CD86 (B7-2) ligandlarına bağlanmada, T hücre aktivasyonunda uyarıcı reseptör olan CD28 ile rekabet halindedir ve ligandlara bağlanmada daha yüksek bir affinite gösterirler. Aynı zamanda rakibi olan CD28 yüzey reseptörü iken, CTLA-4'ün küçük bir kısmı herhangi bir zamanda yüzeyde eksprese edilse de çoğunluğu hücre içi veziküllerdedir (Verma vd., 2017).

Otozomal dominant kalıtım özelliği sergileyen cytotoxic T-lymphocyte–associated antigen 4 eksikliğinde lenfoproliferasyon, hematogammaglobulinemi, otoimmün sitopeni ve enteropati, tekrarlayan üst ve alt solunum yolu enfeksiyonları, gastrointestinal tutulum gibi ağır bir klinik tablo görülmüştür. Hastalığın daha ayrıntılı immünolojik analizlerinde Treg sayısında ve baskılayıcı fonksiyonunda azalma saptanmıştır. Bunun sonucu olarak da bellek T ve otoreaktif B hücrelerinde kontrolsüz bir artış görülmektedir. *In-vitro* CTLA-4 analogu olan abatacept ile tedavi bu bulguların düzeldiği görülmüştür (Schubert vd., 2014; Mitsuiki vd., 2019; Verma vd., 2017).

Sitozolik bir protein olan LRBA genellikle her hücre tipinde eksprese edilir ve birçok hücrel işleyişe katılır. Bunlar arasında veziküler trafik kontrolü, sinyal iletimi, transkripsiyonel

düzenleme, apoptoz, hücre iskeletinin ve kromatin dinamiğinin oluşturulması gibi görevler vardır (Azizi vd., 2018). CTLA-4 ile yakın ilişkili olan LRBA proteini, CTLA-4'ün lizozomlarda parçalanmasını önler ve Treg gibi hücrelerin yüzeylerinde yeniden eksprese edilmesine yardım eder. Otozomal çekinik kalıtım gösteren bir hastalık olan LRBA eksikliği, ağırlıklı olarak Treg hücre sayısında ve fonksiyonunda azalmaya, B lenfositlerin aktivasyonunda ve immünglobulinlerin üretiminde bozulmalara yol açar (Cunningham-Rundles, 2011; Amaya vd., 2019; Schmidt vd., 2017). Buna bağlı olarak, hastalarda naif T hücresi azalırken, bellek T hücrelerinde artış görülür. Anormal regülasyona bağlı olarak bu olgularda, TFH hücrelerde ve sCD25 düzeylerinde artış saptanmaktadır (Charbonnier vd., 2015). Ayrıca Treg ve aktive olmuş T hücrelerde CTLA-4 proteininde düşüklük gösterilmiştir (Lo vd., 2015).

Yapılan araştırmalarda hem CTLA-4 hem de LRBA eksikliği patogenezinde rol oynayan immünolojik değişimlerin immün disregülasyona ve otoimmüniteye yol açtığı kanıtlanmıştır. CTLA-4 eksikliğine benzer şekilde LRBA eksikliğinde de hastalığın erken döneminde ağır bir klinik tablo izlenmekle birlikte üst solunum yollarında tekrarlayan enfeksiyonlar, hipogamaglobülinemi, enflamatuvar barsak hastalığı, otoimmün endokrinopatiler ve sitopeniler dahil olmak üzere otoimmünite bulguları görülmüştür (Kiykim vd., 2019; Alroqi vd., 2018; Hou vd., 2017).

2.1.3.2 STAT1 GOF Patogenezi

Spesifik sitokinlerin hücre yüzey reseptörlerine bağlanması, 4 çeşit alt tipi bulunan JAK'ları (Janus kinases) aktive eder. Bunlar; JAK1, JAK2, JAK3 ve TYK2'dir. JAK'lar aktive olup, sitokin reseptörlerini fosforile ederler. Çoğu hücrede bulunan tanımlanmış 7 farklı STAT (signal transducer and activator of transcription) proteini (STAT1-4, STAT5a, STAT5b ve STAT6) vardır. Fosforilasyonun ardından STAT proteinleri sitokin reseptörlerine toplanır. Burada fosforilasyon ve homodimerize veya heterodimerize aşamalarından geçip hücre çekirdeğine lokalize olurlar. Böylece çeşitli immün yolakların aktivasyonu için gen transkripsiyonunu sağlarlar (Vargas-Hernández vd., 2018; Leiding ve Forbes, 2019).

JAK-STAT yolağındaki moleküllerde saptanan mutasyonların, insanlarda ağır klinik tablo gözlemlenen birçok hastalık ile ilişkili olduğunu bulunmuştur. STAT'larda saptanan mutasyonlardan; STAT sinyalizasyonunu arttıranlar STAT GOF (gain-of-function) mutasyonları ve azaltanlar ise STAT LOF (loss-of-function) mutasyonları olarak adlandırılır (Schmidt vd., 2017).

JAK-STAT sinyal yolağında yer alan STAT1 (signal transducer and activator of transcription 1), Th1 hücrelerin gelişiminde kritik bir transkripsiyon faktörüdür. İnterferonların, interleokinlerin, büyüme faktörlerinin ve hormonların reseptörlerine bağlanması ile tetiklenen birçok

yolağın merkezinde STAT1 yer alır (Lehman ve Gordon, 2019). STAT1, virüslere ve hücre içi bakterilere karşı doğal ve adaptif immün yanıtları sağlamada birçok sitokin eylemine aracılık eder. STAT1 GOF mutasyonları defosforilasyonu önler ve buna bağlı olarak STAT1'in aşırı fosforilasyonuna ve aynı zamanda PDL-1, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , IL-27, IL-6 ve IL-21 sitokinlerinin daha fazla ekspresyonuna yol açar (Leiding ve Forbes, 2019). Normal bir hücre sürecinde IL-6, IL-21 ve IL-23 sitokinlerine yanıt olarak STAT3, Th17 hücrelerinin gelişimi üzerinde etki gösterir. Ancak *STAT1* GOF mutasyonunda STAT1'in aşırı fosforilasyonu STAT3 sinyalizasyonundan baskın olması nedeniyle Th17 hücrelerin gelişimi baskılanır (Weinacht vd., 2017).

STAT1 GOF otozomal dominant geçiş gösteren bir PİY'dir. Otoimmünitenin eşlik ettiği bu olgularda mukokutanöz kandidiyazisin yanı sıra otoimmün tiroidit, sitopeni, hepatit, tip I diyabet ve sistemik lupus eritematozus görülmüştür. Bu hastalarda artmış STAT1 fosforilasyonuna veya defosforilasyonda gecikmelere bağlı olarak abartılı interferon-gamma (IFN- γ) yanıtı oluştuğu ve bunun sonucunda Th1 hücrelerinde artış ve Th17 hücrelerinde azalma saptanmıştır (Leiding ve Forbes, 2019; Baris vd., 2016).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, Marmara Üniversitesi Klinik Araştırma Etik Kurulu'nun 02.12.2016 tarih ve 09.2016.582 sayılı protokol kodu ile onaylandı. İmmünolojik çalışmalar ve analizler Marmara Üniversitesi Işıl Berat Barlan Çocuk Alerji ve İmmünoloji Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi.

3.1 Çalışma Planının Özeti

Bu tez çalışmasına Türkiye'nin farklı immünoloji merkezinde takip edilen ve genetik tanısı bilinen LRBA ve CTLA-4 protein eksiklikleri ve STAT1 GOF olguları dahil edildi. Çalışma ileriye yönelik olarak tasarlanmış olup, nadir görülen bu hastalıklar için klinik bulgular ile laboratuvar (T foliküler hücre yüzey boyaması, LRBA, CTLA-4, FOXP3, fosfo-STAT1, Th1 ve Th17 hücre içi boyaması) belirteçleri içeren bir tanı algoritması oluşturulması amaçlandı.

Bu amaçla;

LRBA ve CTLA-4 protein eksikliği hastalarından ve sağlıklı kontrollerden alınan venöz kandan:

1. Yüzey boyama yöntemi ile lenfosit alt grupları analiz edildi.
2. Yüzey boyama yöntemi ile foliküler T hücre (TFH) oranı değerlendirildi.
3. Hücre içi boyama yöntemi ile LRBA protein ifadesi değerlendirildi.
4. Periferik kan mononükleer hücrelerin izolasyonu yapıldı, lenfositlerin uyarımının ardından, hücre yüzeyi ve hücre içi proteinlere özgü monoklonal antikorlar ile boyama yapılarak akan hücre ölçerde CTLA-4 protein ekspresyonu ve düzenleyici T hücre (Treg) oranları değerlendirildi.
5. LRBA eksikliği hastalarından ve sağlıklı kontrollerden toplanan plazma örneklerinden sCD25 ölçümü için ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) plakları kullanıldı ve ELISA okuyucusunda plazmalardaki sCD25 konsantrasyonu hesaplandı.

STAT1 GOF hastalarından ve sağlıklı bireylerden alınan venöz kandan:

1. Yüzey boyama yöntemi ile lenfosit alt grupları analiz edildi.
2. STAT1 GOF hastalarından ve sağlıklı bireylerden alınan venöz kandan sitokin salınımı sağlanması amacıyla 4 saat etüvde uyarım yapılması ve *in-vitro* uyarılan hücrelerden hücre içi boyama ile sitokin profilleri belirlenmesi amaçlandı.
3. Periferik kan mononükleer hücrelerin izolasyonu yapılması, lenfositlerin uyarınsız ve uyarınlı ortamda interferon beta ile inkübe edilmelerinin ardından hücre yüzeyi ve hücre içi proteinlere özgü monoklonal antikorlar ile boyama yapılarak STAT1 fosforilasyonu akan hücre ölçerde değerlendirilmesi amaçlandı.

Tüm hücre kültürü çalışmalarında, test edilmiş steril ve tek kullanımlık hücre kültürü malzemeleri kullanıldı ve bu işlemler laminar akışlı steril kabinde steril koşullarda gerçekleştirildi.

LRBA ve CTLA-4 protein eksikliği ve STAT1 GOF hastaları Marmara Üniversitesi Pendik Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Çocuk Alerji ve İmmünoloji Bilim Dalı polikliniğine veya Başka İmmünoloji merkezlerine başvuran ve daha önce tanısı konulan takipli hastalar arasından doktor kontrolünde seçilmiştir. Hastalardan venöz kan alımı için onam formları etik kurul gereklerine uygun şekilde açıklama yapılarak onaylatıldı. Bu tez çalışmasına dahil edilen tüm bireylere, hazırlanmış olan “Gönüllü Bilgilendirme Formu” okutuldu ve “Gönüllü Onam Formu” onayları alındı.

3.2 Çalışmada Kullanılan Solüsyonlar

- CD3 FITC (Beckman Coulter, FR; A07746)
- CD4 A700 (Beckman Coulter, FR; B10824)
- CD8 PC7 (Beckman Coulter, FR; 737661)
- CD16 PE (Beckman Coulter, FR; A07766)
- CD56 PC5.5 (Beckman Coulter, FR; A79388)
- CD19 A750 (Beckman Coulter, FR; A94681)
- CD20 PB (Beckman Coulter, FR; A74777)
- IgD FITC (Beckman Coulter, FR; B30652)
- CD27 PE (Beckman Coulter, FR; IM2578)
- CD21 PB (Beckman Coulter, FR; B09982)
- CD38 PC5.5 (Beckman Coulter, FR; A70205)
- CD31 PB (Beckman Coulter, B13035)
- TCRab APC (Beckman Coulter, FR; B13981)
- CD25 PC5 (Beckman Coulter, FR; IM2646)
- CD45KO (Beckman Coulter, FR; B36294)
- CD45RA A750 (Beckman Coulter, FR; A86050)
- CD45RO ECD (Beckman Coulter, FR; IM2712U)
- CD45RO PE (Beckman Coulter, FR; A07787)
- CD152(CTLA-4) PE (Beckman Coulter, FR; IM2282)
- Anti-FoxP3 A647 (BeckmanCoulter, FR; B30650)
- CD4 FITC (Beckman Coulter, FR; A07750)
- CD279(PD-1) PE (Beckman Coulter, FR; B30634)

- CD185(CXCR5) APC (Biolegend, UK; 356908)
- Stem-Count Fluorospheres (Beckman Coulter)
- HISTOPAQUE®-1077, 100 mL (Sigma, UK; RNBG3390)
- D-PBS, 500 mL (HyClone, USA; SH30028.02)
- RPMI Medium 1640 (1X), 500 mL (Gibco, UK; 21875-034)
- Fetal Bovine Serum (FBS) (HyClone, AT; SV30160.03)
- Penicillin-Streptomycin Solution (HyClone, USA; SV30010)
- L-Glutamine 200 Mm Solution (HyClone, USA; SH30034.01)
- 10x Phosphate Buffered Saline (PBS), 1L (Bio-Rad, 1610780)
- Human T cell Activation/Expansion Beads (MACS Miltenyi Biotec, USA; 130-091-441)
- Versa Lyse Lysing Solution (Beckman Coulter, FR; A09777)
- PerFix-nc (no centrifuge assay kit, Beckman Coulter, FR; B31167)
- DurActive Tube 1 (Beckman Coulter, IN; C11101)
- DuraClone IF T Helper Tube (Beckman Coulter, IN; C04666)
- IntraPrep Permeabilization Reagent (Beckman Coulter, IM2389)
- IsoFlow Sheath Fluid (Beckman Coulter)
- Anti-LRBA antibody produced in rabbit (Sigma, HPA023597)
- Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody Alexa Fluor 488 (ThermoFisher, A-11034)
- Rabbit (DA1E) mAbIgG XP® Isotype Control (Cell Signaling, USA; 3900S)
- BD Phosflow™ Human T Cell Activation Kit (BD, USA; 560750)
- Human IFN-β1a, research grade (MACS Miltenyi Biotec, USA; 130-107-888)
- sIL-2R/CD25 Soluble Human ELISA Kit (ThermoFisher, AT; BMS212-2)
- Steril distile su, 1L (Polifarma, TR; C-1909001)
- %70 alkol

3.3 Çalışmada Kullanılan Malzemeler

- 5 ml Polypropylene test tüpleri (Beckman Coulter, 2523749)
- Heparinli kan alma tüpü (Yeşil kapaklı, BD Vacutainer, 368494)
- EDTA'lı kan alma tüpü (Mor kapaklı, BD Vacutainer, 368499)
- 15 ml'lik steril falcon tüpü (SPL, 50015)
- 50 ml'lik steril falcon tüpü (Firatmed, 8870000087)
- 2 ml'lik steril eppendorf tüpü (Nest, 620011)
- 2 ml'lik steril enjektör (Setecoject, 21EC-0203213801)

- 10 ml'lik steril enjektör (Setecoject, 21EC-1003213801)
- 0,22 µm'lik filtre (Aisimo, 171108SF25PS22S)
- 3 ml'lik steril pastör pipeti (Citotest Labware Manufacturing, 31027003US)
- 2 µl - 20 µl'lik otomatik pipet (Beckman Coulter, eppendorf 3120 000.038)
- 20 µl - 200 µl'lik otomatik pipet (Beckman Coulter, eppendorf 3120 000.054)
- 100 µl - 1000 µl'lik otomatik pipet (Beckman Coulter, eppendorf 3120 000.062)
- Çoklu pipet
- 12 kuyulu plak
- 96 kuyulu plak (Steril U-Type, SPL, 34096)
- Tüp sporu (standı)

3.4 Çalışmada Kullanılan Cihazlar

<u>Cihaz</u>	<u>Marka</u>	<u>Model</u>
Santrifüj	Beckman Coulter	Allegra X-22
Vorteks	Yellow Line	TTS2
Su banyosu	Techne	TE-10A DIKLM
Isıtmalı manyetik karıştırıcı	Janke&Kunkelik	IKAMAG RH
ELISA okuyucu		
Rotator	Miltenyi Biotec	MACS mix
Akan hücre ölçer	Beckman Coulter	NAVİOS EX
Işık mikroskobu	Olympus	BX53
Steril kabin	Biosafety Cabinet	Class I Tip
CO2 inkübatörü	Thermo Series II	Water Jacket
CO2 tüpü	Habaş	
Buzdolabı (+4 °C)	Uğur	USS1000
Derin dondurucu (-20 °C)	Regal	LF 2102 A+
Derin dondurucu (-80 °C)	Nüve	DF 290/490/590

3.5 Çalışmada Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması

3.5.1 PBS Solüsyonunun Hazırlanması

Konsantrasyonu 10 mM fosfat ve 150 mM sodyum klorür olacak şekilde 1 adet tablet 100 ml distile suda çözündürüldü. Elde edilen 1X PBS solüsyonunun pH değeri 7,2- 7,4 olarak ölçüldü.

Her kullanım öncesi mikrobiyal yükün azaltılması ve partikülden arındırılması amacıyla 0,22 µm' lik filtreden geçirilerek kullanıldı.

3.5.2 Stain Buffer Solüsyonunun Hazırlanması

%2 oranında FBS içeren stain buffer hazırlamak amacıyla; 50 ml'lik falkon tüpe pastör pipet ile 1 ml FBS alındı, üzerine 1X PBS solüsyonu eklenerek 50 mL'ye tamamlandı. Bu solüsyon her çalışma öncesi taze hazırlanarak hedeflenen hücrelerin yıkanması ve süspansiyonu için kullanıldı.

3.5.3 Lenfosit Kültürleri için Besiyerinin Hazırlanması

Lenfosit kültürleri için %10 oranında FBS, %1 oranında penicillin ve %1 oranında L-Glutamine ilave edilen RPMI besiyeri kullanıldı. Bu solüsyon komple RPMI (cRPMI) olarak isimlendirildi ve her kültür işlemi öncesi besiyeri taze olarak hazırlandı.

3.5.4 Antikor Karışımının Hazırlanması

Basit immünofenotipleme boyamasında kullanmak amacıyla; CD3 FITC, CD4 A700, CD8 PC7, CD16 PE, CD56 PC5.5, CD19 A750, CD20 PB, CD45 KO antikorlarının her birinden 5 µl alındı ve antikor-karışım tüpüne aktarıldı ve vortekslendi.

B lenfosit alt gruplarının boyamasında kullanmak amacıyla; CD19 A750, CD21 PB, CD38 PC5.5, CD27 PE, IgD FITC, CD45KO antikorlarının her birinden 5 µl alındı ve antikor-karışım tüpüne aktarıldı ve vortekslendi.

T lenfosit alt gruplarının boyamasında kullanmak amacıyla; CD3 FITC, CD4 A700, CD8 PC7, CD45RA A750, CD45RO ECD, TCRab APC, CD31 PB antikorlarından her birinden 5 µl alındı ve antikor-karışım tüpüne aktarıldı ve vortekslendi.

3.5.5 T hücre Uyarımı için Anti-CD2+CD3+CD28+ Aktivasyon Boncuklarının hazırlanması

Kültür içerisinde T hücrelerinin optimal uyarımı için uyaran stok solüsyonu toplam 100 µl ve boncuklar: mononükleer hücre oranı 1:2 olacak şekilde hazırlandı. 100 µl DPBS solüsyonu içerisinde %0,5 oranında FBS çözüldü. Ayrı bir ependorf tüpe bu karışımdan 20 µl eklendi ve üzerine anti-CD2, CD3 ve CD28 antikorlarının her birinden 10 µl eklendi. Anti-Biotin MACSi Bead partikülü vortekslendi ve içerisinde 50 µl alınarak ependorfa eklenerek tekrar

vortekslendi. Rotator üzerinde, düşük hızda ve +4°C'de 2 saat döndürülerek kullanıma hazır hale getirildi. Kültürdeki hücrelerin uyarımı için, +4°C'de muhafaza edilen stok solüsyonundan 5 µl alınarak 1 mL'lik kültür içerisine eklendi.

3.5.6 p-STAT1 Fosforilasyonu için IFN-β1a Uyarısının Hazırlanması

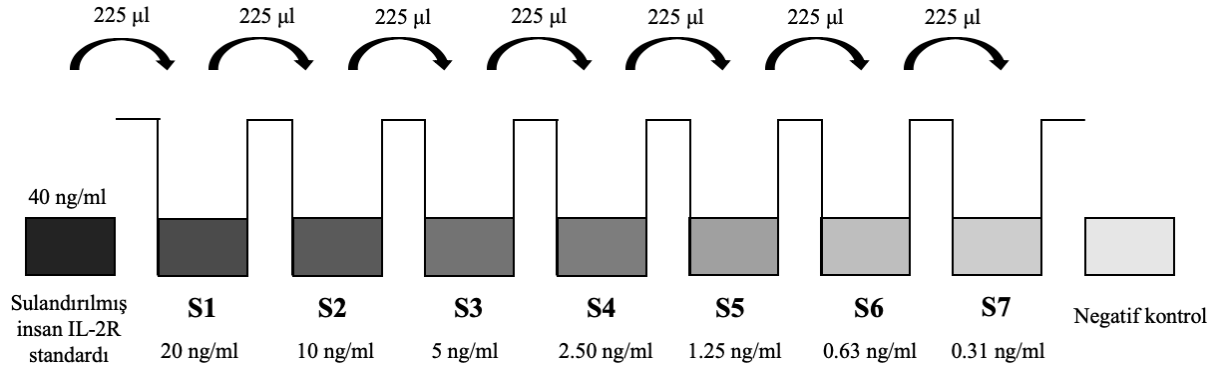
Ana stoğu 20 µg olan IFN-β1a, 200 µl distile su içerisinde çözöldü (0,1 µg/µl). Başka bir steril eppendorf içerisinde 50 µl FBS, 1 ml PBS içerisinde çözöldü. 0,1 µg/µl IFN-β1a çözeltisinden 5 µl, hazırlanan FBS + PBS karışımından 45 µl alınarak toplam 50 µl uyarın hazırlandı (5 µl / 50 µl = 0,1 µl). 100 ng/ml IFN-β1a uyarımı için içerisinde 10 µl alındı.

3.5.7 ELISA Yönteminde Kullanılacak Solüsyonların ve Standartların Hazırlanması

Deneye başlamadan önce tüm solüsyonlar oda ısısına getirildi ve kit talimatlarına uygun olarak dilüe edildi.

- Yıkama tamponu (1x) için; 500 ml'lik dereceli cam bir kap içerisine, yıkama tamponu konsantresinden (20x) 25 ml aktarıldı, üzerine distile su eklenerek son hacmi 500 ml'ye tamamlandı. Köpürtölmeden hafifçe karıştırdı. Oda sıcaklığında saklandı.
- Test tamponu (1x) için; 50 ml'lik falkon içerisine, test tamponu konsantresinden (20x) 2,5 ml aktarıldı, üzerine distile su eklenerek son hacmi 50 ml'ye tamamlandı. Köpürtölmeden hafifçe karıştırdı. +4°C'de saklandı.
- HRP Konjugat için; 15 ml'lik falkon içerisine, konsantre HRP konjugat solüsyonundan 30 µl aktarıldı, üzerine test tamponundan (1x) eklenerek son hacmi 3 ml'ye tamamlandı. Solüsyon dilüe edildikten sonra 30 dakika içerisinde kullanıldı.
- İnsan IL-2Rα (sCD25) standart dilüsyonlarının oluşturulması için; distile su eklenerek insan IL-2Rα standardı dilüe edildi. Seyreltilme hacmi standart şişesinin üzerinde belirtilen orana göre, dilüe edilmiş standardın konsantrasyonu 40 ng/ml olacak şekilde ayarlandı. Tam ve homojen bir çözölme sağlamak için hafifçe karıştırdı. Dilüsyonlara devam edilmeden standart 10-30 dakika bekletildi ve dilüe edilmeden önce iyice karıştırdı.

Her bir standart noktası için bir tane olmak üzere 7 tüp isimlendirildi: S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7. Standart eğri için 1:2 seri dilüsyonları Şekil 3'te belirtildiği gibi hazırlandı. Her bir tüpe 225 µl örnek dilüentten eklendi. Konsantrasyonu 40 ng/ml olan dilüe edilmiş standarttan pipet ile 225 µL alınarak S1 olarak etiketli ilk tüpe eklendi ve karıştırdı (S1=20 ng/ml konsantrasyon). Bu seyreltilmiş S1 standardından da 225 µl alınarak S2 etiketli ikinci tüpe eklendi ve bir sonraki aktarımdan önce iyice karıştırdı. Seri dilüsyonlar bu şekilde 5 kez tekrarlandı.



Şekil 2. Sulandırılmış IL-2Rα standardının hazırlanışı.

3.6 Çalışma Planı

3.6.1 LRBA eksikliği, CTLA-4 eksikliği ve STAT1 GOF hastalarının ve sağlıklı bireylerin seçimi

3.6.2 Hastaların çalışmaya dahil edilme ve dışlanma kriterleri

3.6.3 Sağlıklı bireylerin çalışmaya dahil edilme ve dışlanma kriterleri

3.6.4 LRBA ve CTLA-4 eksikliği hastalarından ve sağlıklı bireylerden venöz kan alımı

3.6.4.1 Venöz kandan immünolojik parametrelerin boyanması

3.6.4.2 Venöz kandan T foliküler hücre (TFH) boyaması

3.6.4.3 Venöz kandan hücre içi LRBA proteini boyaması

3.6.4.4 Venöz kandan mononükleer hücre izolasyonu ve plazmanın stoklanması

3.6.4.5 İzole edilen lenfositlerden mononükleer hücre kültürü yapılması

3.6.4.6 Uyarım sonrası hücre yüzeyi ve hücre içi boyamalarının yapılması

3.6.4.7 Stoklanan plazma örneklerinden ELISA yöntemi ile sCD25 konsantrasyonu ölçümü

3.6.5 STAT1 GOF hastalarından ve sağlıklı bireylerden venöz kan alımı

3.6.5.1 Venöz kandan T foliküler hücre (TFH) boyaması

3.6.5.2 Venöz kanın 4 saatlik uyarımı ve hücre içi sitokin boyaması

3.6.5.3 Venöz kandan mononükleer hücre izolasyonu

3.6.5.4 İzole edilen lenfositlerden mononükleer hücre kültürü yapılması

3.6.5.5 Uyarım sonrası hücre yüzeyi ve hücre içi boyamalarının yapılması

3.6.6 Analizler

3.6.6.1 LRBA ve CTLA-4 eksikliği hastalarının analizleri

3.6.6.1.1 Lenfosit alt gruplarının analizleri

3.6.6.1.2 Lenfositlerin T foliküler hücre (TFH) analizi

3.6.6.1.3 Lenfositlerin hücre içi LRBA protein ifadesi analizi

3.6.6.1.4 Lenfositlerin düzenleyici T hücre yüzdesi ve CD25, FOXP3 ve CTLA-4 proteini ifadesi analizi

3.6.6.1.5 sCD25 konsantrasyonunun ölçümü ve analizi

3.6.6.2 STAT1 GOF hastalarının analizleri

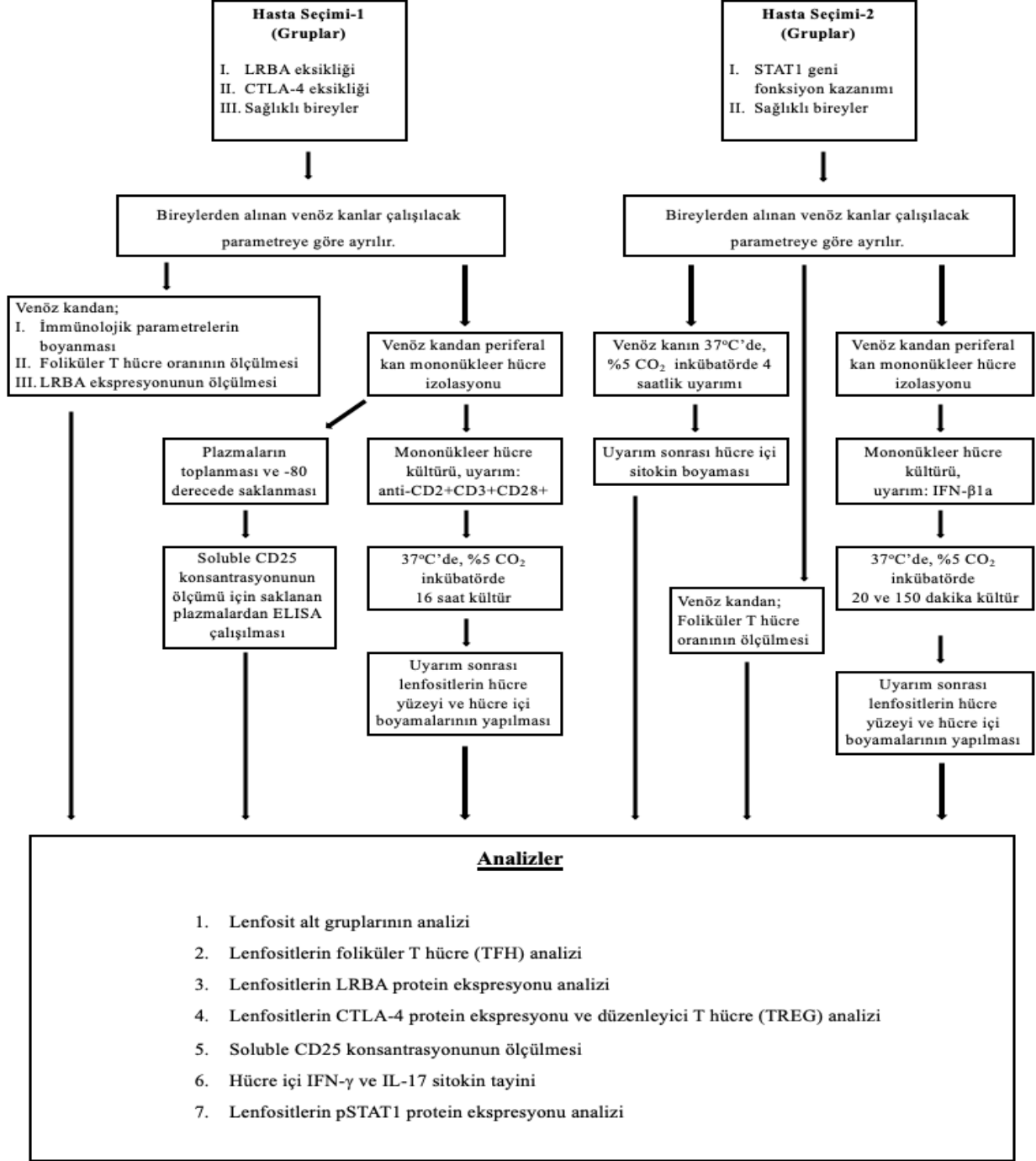
3.6.6.2.1 Lenfositlerin T foliküler hücre (TFH) analizi

3.6.6.2.2 Hücre içi sitokin analizi

3.6.6.2.3 Lenfositlerin p-STAT1 proteini ifadesi analizi

3.6.7 İstatiksel Analiz

ÇALIŞMA PLANI



Şekil 3. Çalışma planının şematik gösterimi.

3.6.1 LRBA Eksikliği, CTLA-4 eksikliği ve STAT1 Geni Fonksiyon Kazanımı Hastalarının ve Sağlıklı Bireylerin Seçimi

Bu çalışmaya dahil edilen tüm bireylere, “Gönüllü Bilgilendirme Formu” okutuldu ve bireylerin “Gönüllü Onam Formu” ile onayları alındı. Bireyler Marmara Üniversitesi Hastanesi Pediatrik Allerji ve İmmünoloji Kliniğine başvuran hastalar arasından aşağıdaki kriterlere göre seçildi.

3.6.2 Hastaların Çalışmaya Dahil Edilme ve Dışlanma Kriterleri

Çalışmaya dahil edilme kriterleri:

1. Genetik olarak tanısı LRBA eksikliği, CTLA-4 eksikliği veya STAT1 geni fonksiyon kazanımı olarak doğrulanmış çocuk veya erişkin hastalar,
2. Sık tekrarlayan kronik solunum yolu enfeksiyonları ve/veya hipogammaglobulinemi ve/veya otoimmün bulguları ve/veya lenfoproliferatif veya lenfoma benzeri hastalık (etiolojisi bilinmeyen veya CMV, EBV sonrası) geliştiren çocuk veya erişkin hastalar,
3. Dirençli hafif veya ağır mantar enfeksiyonuna, otoimmün bulguların eşlik ettiği çocuk veya erişkin hastalar,
4. Çalışmaya dahil edilme kriterini karşılayan ve biyolojik örnek almaya elverişli olan olgulardan “Gönüllü onam formunu” imzalamış hastalar çalışmaya dahil edilmiştir.

Çalışmadan dışlanma veya çıkarılma kriterleri

1. Klinik olarak durumu biyolojik örnek almaya uygun olmayan olgular,
2. Çalışma kapsamında yapılan takiplerine %70’den fazla gelmeyen olgular,
3. Çalışma için onamlarını geri çeken olgular çalışmaya dahil edilmemiştir.

3.6.3 Sağlıklı Bireylerin Çalışmaya Dahil Edilme ve Dışlanma Kriterleri

Çalışmaya dahil edilme kriterleri

1. Otoimmün veya alerjik hastalık hikayesi olmayan,
2. Son 6 ayda immün baskılayıcı veya steroid kullanmamış olması,

3. Deri prick testinde tüm antijenlere negatif yanıt veren bireyler çalışmaya dahil edilmiştir.

Çalışmadan dışlanma kriterleri

1. Kronik hastalığı bulunan,
2. Son 6 ayda steroid veya immün baskılayıcı kullanan bireyler çalışmaya dahil edilmemiştir.

3.6.4 LRBA ve CTLA-4 Eksikliği Hastalardan ve Sağlıklı Bireylerden Venöz Kan Alımı

Çalışmaya dahil edilen olguların ve sağlıklı bireylerin her birinden mor kapaklı EDTA içerentüplere 15-20 ml venöz kan ve yeşil kapaklı heparin içeren tüplere 2 ml venöz kan alındı.

3.6.4.1 Venöz Kandan İmmünolojik Parametrelerin Boyanması

Hastaların ve sağlıklı bireylerin her birinden mor kapaklı EDTA içeren tüplere alınan venöz kan kullanıldı. Hastalar için antikorların ekleneceği örnek tüpleri isimlendirildi. Basit immünotiplerle T, B, NK hücrelerin boyanması için ilk örnek tüpüne; CD3 FITC, CD4 A700, CD8 PC7, CD16 PE, CD56 PC5.5 antikorlarından 5'er µl eklendi. B lenfosit alt gruplarının boyanması için ikinci örnek tüpüne; IgD FITC, CD27 PE, CD38 PC5.5, CD3 APC, CD19 A750, CD21 PB, CD45 KO antikorlarından 5'er µl eklendi. T lenfosit alt gruplarının boyanması için üçüncü örnek tüpüne; CD3 FITC, CD45RO ECD, TCRab APC, CD8 PC7, CD45RA A750, CD31 PB, CD45KO antikorlarından 5'er µl eklendi. Antikorların eklenmesinin ardından tüplere 100'er µl tam kan örneği eklendi ve tüplerin içeriklerinin homojen bir şekilde karışabilmesi için 6-8 sn hızlı bir şekilde vorteks yapıldı. Ardından tüm tüpler 15 dakika boyunca karanlıkta ve oda ısısında inkübe edildi. İnkübasyon süresinin ardından tüm tüplere 0,5 ml VersaLyse lizat solüsyonu eklendi. Tüpler 15 dakika boyunca karanlıkta ve oda ısısında inkübe edildi. Tüplere 2ml PBS eklendi, 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Pelletlerin üzerine 0,5 ml PBS eklenerek tüpler akım sitometri cihazında okutuldu.

3.6.4.2 Venöz Kandan T Foliküler Hücre Boyanması

Hastaların ve sağlıklı bireylerin her birinden mor kapaklı EDTA içeren tüplere alınan venöz kan kullanıldı. Hastalar ve sağlıklı kontroller için antikorların ekleneceği örnek tüpleri isimlendirildi. Örnek tüplerine CD4 FITC, CD279 (PD-1) PE ve CD185 (CXCR5) APC monoklonal antikorlarından 5'er µl eklendi. Antikorların eklenmesinin ardından tüplere 100'er µl tam kan örneği eklendi ve tüplerin içeriklerinin homojen bir şekilde karışabilmesi için 6-8 sn hızlı bir şekilde vorteks yapıldı. Tüm tüpler 15 dakika karanlıkta ve oda ısısında inkübe edildi. İnkübasyonun

ardından, tüplere 0,5 ml VersaLyse Lysing solüsyonu eklendi. Tüpler 10 dakika boyunca karanlıkta ve oda ısısında inkübe edildi. Süre sonunda tüpler akım sitometri cihazında okutuldu.

3.6.4.3 Venöz Kandan Hücre İçi LRBA Proteini Boyaması

Hastaların ve sağlıklı bireylerin her birinden yeşil kapaklı heparin içeren tüplere alınan venöz kan kullanıldı. Hastalar ve sağlıklı kontroller için antikörlerin ekleneceği örnek tüpleri isimlendirildi. Her hasta ve kontrol için, birer tüpleri izotip tüpü olacak şekilde ikişer ayrı tüp yazıldı. Her tüpe venöz kandan 100 µl koyuldu. Üzerlerine 100 µl IntraPrep Reagent 1 (Fixative Reagent) eklendi. Tüplerin içeriklerinin homojen bir şekilde karışabilmesi için düşük hızda vorteks yapıldı ve karanlıkta, oda ısısında 10 dakika inkübe edildi. Süre sonunda tüplere 1 ml Isoflow solüsyonu eklendi ve 300 g'de 5 dakika santrifüj yapıldı. Süpernatant uzaklaştırıldı ve tüpler yüksek hızda, kuvvetlice vortekslendi (hücre yıkama işlemi iki kez tekrarlandı). Pelletlerin üzerine 100 µl IntraPrep Reagent 2 (Permeabilizing Reagent) eklendi ve karanlıkta, oda ısısında 5 dakika inkübe edildi. Süre sonunda tüplere 1 ml Isoflow solüsyonu eklendi ve 300 g'de 5 dakika santrifüj yapıldı. Süpernatant uzaklaştırıldı ve tüpler yüksek hızda, kuvvetlice vortekslendi (hücre yıkama işlemi iki kez tekrarlandı). Hem hastalar hem de sağlık kontrol için birer adet ayrılan izotip tüplerinin pelletleri üzerine sadece 100'er µl Isoflow solüsyonu eklendi. Diğer tüplerin üzerine ise sadece 100'er µl LRBA solüsyonu (1/200 oranında; 1 µl anti-LRBA, 199 µl Isoflow solüsyonu) eklendi. Karanlıkta ve +4°C'de 30 dakika boyunca inkübe edildi. Süre sonunda tüplere 1 mL Isoflow solüsyonu eklendi ve 300 g'de 5 dakika santrifüj yapıldı. Süpernatant uzaklaştırıldı ve tüpler orta şiddette vortekslendi (hücre yıkama işlemi iki kez tekrarlandı). Tüm tüplerdeki pelletlerin üzerine 100'er µl sekonder antikör solüsyonu (1/500 oranında; 1 µl seconder antikör, 499 µl Isoflow solüsyonu) eklendi. Karanlıkta ve +4°C'de 30 dakika boyunca inkübe edildi. Süre sonunda tüplere 1 ml Isoflow solüsyonu eklendi ve 300 g'de 5 dakika santrifüj yapıldı. Süpernatant uzaklaştırıldı ve tüpler orta şiddette vortekslendi (hücre yıkama işlemi iki kez tekrarlandı). Pelletlerin üzerine 0,5ml Isoflow solüsyonu eklendi ve tüpler akım sitometri cihazında okutuldu.

3.6.4.4 Venöz Kandan Mononükleer Hücre İzolasyonu ve Plazmanın Stoklanması

Hastaların ve sağlıklı bireylerin her birinden mor kapaklı EDTA içeren tüplere alınan venöz kan kullanıldı. Alınan kanlardan aşağıdaki protokole göre mononükleer hücre izolasyonu yapıldı. Periferik kan mononükleer hücre (PKMH) izolasyonu laminar hava akımlı aseptik kabin içerisinde gerçekleştirildi. Hastalardan ve sağlıklı bireylerin her birinden alınan 20 ml kan 50 ml'lik steril falkon tüpe aktarıldı ve üzerine 20 ml steril PBS solüsyonu eklendi ve homojen olarak

karışması için pastör pipet ile yavaşça karıştırıldı. Konik kapaklı 15 ml'lik steril falkontüplere 4 ml fikol solüsyonu eklendi. Eklenen fikol solüsyonunun üzerine birbiriyle karışmayacak şekilde, PBS ile homojenize edilmiş kan pastör pipet yardımıyla falkon tüp çeperinden dibe doğru yavaşça eklendi. Kan fikol üzerine yayıldıktan sonra 2000 rpm'de 25 dakika santrifüj edildi. 25 dakika sonunda yoğunluk farkına göre falkon tüp içerisinde en altta eritrositler, orta kısımda opak görünümlü mononükleer hücreler (buffy coat) ve üst kısımda ise plazma elde edildi. Buffy coat kısmı dağıtılmadan plazma kısım pastör pipet yardımıyla 2 ml'lik eppendorf tüplere aktarıldı. Eppendorf tüpler sCD25 konsantrasyonunun ölçümü için yapılacak olan ELISA çalışmasında kullanılmak üzere -80°C'de stoklandı. Ardından orta tabakada bulunan buffycoat kısım pastör pipeti ile dairesel hareketlerle toplandı ve steril 15 ml'lik boş bir falkon tüpe aktarıldı. Üzerine eşit hacimde PBS solüsyonu eklenerek pipetaj yapıldı. 1700 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant atıldı. Dipte kalan hücre pelleti üzerine önceden hazırlanmış olan cRPMI besiyerinden 1 ml eklendi ve pipet yardımıyla hücreler süspansiyon edildi. Hücre sayısının belirlenmesi amacıyla içinden 50 µl alınıp 5 ml'lik örnek tüplerine aktarıldı. Üzerine 450 µl PBS solüsyonu ve 50 µl sayım boncuğu (Stem-count fluorospheres) eklendi. Akım sitometri cihazında okutulurken, hastalar ve sağlıklı kontrollerden alınan venöz kandaki toplam lenfosit sayısı tayin edildi.

3.6.4.5 İzole Edilen Lenfositlerden Mononükleer Hücre Kültürü Yapılması

LRBA eksikliği, CTLA-4 eksikliği ve sağlıklı bireylerden elde edilen venöz kan mononükleer hücrelerinin uyaransız ve anti-CD2+CD3+CD28+ uyarımlı kültürleri yapılması planlandı ve steril plaklar buna göre isimlendirildi. Hücre sayımının ardından cRPMI içerisindeki hücre karışımından hem uyaransız kuyuda hem de boncuk ile uyarımlı kuyuda ayrı ayrı 1×10^6 hücre olacak şekilde alındı ve 12 kuyulu steril kültür plağına aktarıldı. Üzerlerine cRPMI eklenerek 1 ml'ye tamamlandı. Uyarımlı kuyuya uyarım için önceden hazırlanan boncuk solüsyonundan 5 µl eklendi ve kuvvetlice pipetaj yapıldı. Pipetaj işleminin ardından uyaransız ve uyarımlı her iki kuyuda homojenize edilen 1 ml'lik lenfosit süspansiyonları, 96 kuyulu steril kültür plağına her bir kuyuda 200 µl olacak şekilde 5'er kuyu olarak paylaştırıldı. Ardından 96 kuyulu kültür plağı 37°C'de, %5 CO₂ inkübatörde 16 saat boyunca inkübe edildi.

3.6.4.6 Uyarım Sonrası Hücre Yüzeyi ve Hücre İçi Boyamalarının Yapılması

16 saatlik inkübasyon süresi bittikten sonra kültür plağı inkübatörden çıkarıldı ve kuyulara pipetaj yapılarak dipte kalan ve hücre kültür solüsyon içindeki hücrelerin homojenize edilmesi sağlandı. Hücreler önceden isimlendirilen ilgili örnek tüplerine toplandı ve üzerlerine 2 ml stain-buffer solüsyonu eklendi. 500g'de 5 dakika santrifüj edildi. Hücre yıkama işleminin ardından

süpernatant döküldü, pellet 6-8 saniye kuvvetlice vorteklendi ve 50 µl stain buffer solüsyonu ile süspanse edildi. Ardından sırayla CD3 FITC, CD4 A700, CD25 PC5, CD45RA A750, CD45RO ECD hücre yüzeyi monoklonal antikörleri eklendi. Karanlıkta ve oda ısısında 15 dakika inkübe edildi. Süre sonunda üzerine 3 ml stain buffer solüsyonu eklenerek 500 g'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüjden sonra süpernatant döküldü, kalan pellet 6-8 saniye vortekslendi. Tüplere 50 µl %100 FBS ve 5 µl PerFix nc reagent Buffer 1 (Fixative Reagent) eklendi ve 6-8 saniye vorteks yapıldı. Karanlıkta ve oda ısısında 15 dakika inkübe edildi. Inkübasyon sonunda tüplere 400 µl Perfix nc Buffer 2 (Permeabilizing Reagent) eklenerek vortekslendi. Ardından tüm tüplere CD152(CTLA-4) PE ve Anti-FoxP3 A647 hücre içi antikörlerinden 5'er µl eklendi ve vortekslendi. Karanlıkta ve oda ısısında 60 dakika karanlıkta inkübe edildi. Süre sonunda 3 ml stain buffer solüsyonu eklenerek 5 dakika daha inkübe edildi. Ardından 500 g'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant döküldükten sonra tüpler vortekslendi, pellet üzerine 3 ml PerFix nc Buffer 3 (1:10 oranında, 1µl Buffer 3:9 µl distile su) eklendi ve 500 g'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant döküldü ve pellet üzerine 0,5 ml PerFix nc Buffer 3 eklenerek tüpler akım sitometri cihazında okutuldu.

3.6.4.7 Stoklanan Plazma Örneklerinden ELISA Yöntemi ile sCD25 Konsantrasyonu Ölçümü

ELISA plağındaki mikrokuyulara eklenerek çalışılmak istenilen dilüe edilmiş standartların, negatif kontrollerin, sağlıklı kontrollerden ve hastalardan toplanan plazma örneklerinin, toplam sayısı belirlendi. Olası hatayı önlemek amacıyla öncelikle örneklerin ekleneceği mikrokuyular belirlenerek yerleşim planı yapıldı ve kağıt üzerinde isimlendirildi.

Her bir mikrokuyuya 400 µl yıkama tamponu eklendi ve 10-15 saniye bekletilerek iki kez yıkandı. Son yıkamadan sonra, mikrokuyuların kurummasına izin vermeden plak emici kağıt üzerine ters bir şekilde hafifçe bastırılarak fazla yıkama tamponunun mikrokuyulardan uzaklaştırılması sağlandı. Ardından daha önceden hazırlanan standart dilüsyonları ilgili standart mikrokuyularına 100'er µl eklendi. Standart dilüsyonları negatif kontrol mikrokuyularına çift olarak 100'er µl eklendi. Standart dilüsyonları örnek mikrokuyularına ise 50'şer µl eklendi. Örnekler yerleşim planındaki ilgili mikrokuyularına çift olarak 50'şer µl eklendi. HRP-konjugat solüsyonundan tüm mikrokuyulara 50 µl eklendi. Ardından mikrokuyu plağı, yapışkan folyo ile sıkıca kaplandı ve oda sıcaklığında 3 saat inkübe edildi. Mikrokuyular 400 µl yıkama tamponu eklenerek 3 kez yıkandı ve plak emici kağıt üzerine ters bir şekilde hafifçe bastırılarak fazla yıkama tamponunun mikrokuyulardan uzaklaştırılması sağlandı. Tüm mikrokuyulara 100 µl TMB substrat solüsyonu eklendi. Mikrokuyu plağı odada sıcaklığında yaklaşık 10 dakika inkübe edildi. Süre sonunda hızlı ve düzgün bir şekilde tüm mikrokuyulara 100 µl durdurma

solüsyonu eklendi. Ardından plak ELISA okuyucusuna yerleştirilerek 450 nm'de mikrokuyulardaki renk yoğunluğunu (OD) ölçüldü.

3.6.5 STAT1 GOF Hastalarından ve Sağlıklı Bireylerden Venöz Kan Alımı

Çalışmaya dahil edilen olguların ve sağlıklı bireylerin her birinden mor kapaklı EDTA içeren tüplere 15-20 ml venöz kan ve yeşil kapaklı heparin içeren tüplere 2 ml venöz kan alındı.

3.6.5.1 Venöz Kandan T Foliküler Hücre Boyaması

Hastaların ve sağlıklı bireylerin her birinden mor kapaklı EDTA içeren tüplere alınan venöz kan kullanıldı. Hastalar ve sağlıklı kontroller için antikorların ekleneceği örnek tüpleri isimlendirildi. Örnek tüplerine CD4 FITC, CD279 (PD-1) PE ve CD185 (CXCR5) APC monoklonal antikorlarından 5'er µl eklendi. Antikorların eklenmesinin ardından tüplere 100'er µl tam kan örneği eklendi ve tüplerin içeriklerinin homojen bir şekilde karışabilmesi için 6-8 sn hızlı bir şekilde vorteks yapıldı. Tüm tüpler 15 dakika karanlıkta ve oda ısısında inkübe edildi. İnkübasyonun ardından, tüplere 0,5 ml VersaLyse Lysing solüsyonu eklendi. Tüpler 10 dakika boyunca karanlıkta ve oda ısısında inkübe edildi. Süre sonunda tüpler akım sitometri cihazında okutuldu.

3.6.5.2 Venöz Kanın 4 Saatlik Uyarımı ve Hücre İçi Sitokin Boyaması

Hastaların ve sağlıklı bireylerin her birinden yeşil kapaklı heparin içeren tüplere alınan venöz kan kullanıldı. Uyarım için 100'er µl kan alındı ve Brefeldin-A ve PMA-İyonomsin içeren Beckman Coulter DurActive tüplerine aktarıldı. Tüm tüpler 37°C %5 CO2 inkübatörde 4 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyon süresi bittikten sonra tüpler etüvden çıkarıldı ve tüm tüplere CD45KO ve CD45RO PE hücre yüzey antikorları eklendi. Karanlıkta ve oda ısısında 15 dakika inkübe edildi. Üzerlerine 25 µl PerFix nc reagent Buffer 1 (Fixative Reagent) eklendi. Kırmızı pellet ayrışmaya kadar vorteks yapıldı. Karanlıkta ve oda ısısında 15 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası tüplere 2 ml PBS eklendi ve 200 g'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant döküldü. Pelletlerin üzerine 25 µl %100 FBS eklendi ve kırmızı pellet ayrışmaya kadar vortekslendi. Ardından tüplere 300 µl Perfix nc Buffer 2 (Permeabilizing Reagent) eklendi ve tekrar vortekslendi. Tüplerdeki tüm içerik isimlendirilen Beckman Coulter IF T Helper DuraClone tüplerine pipet yardımıyla aktarıldı ve 6-8 saniye yüksek hızda vorteks yapıldı. Tüm tüpler karanlıkta ve oda ısısında 45 dakika boyunca inkübe edildi. İnkübasyondan sonra tüplere 3 ml PerFix nc Buffer 3 (1:10 oranında, 1µl Buffer 3, 9 µl distile su) yıkama solüsyonu eklendi ve 500 g'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant döküldü ve pellet üzerine 0,5 ml PerFix nc Buffer 3 eklenerek tüpler akım sitometri cihazında okutuldu.

3.6.5.3 Venöz Kandan Mononükleer Hücre İzolasyonu

Hastaların ve sağlıklı bireylerin her birinden mor kapaklı EDTA içeren tüplere alınan venöz kan kullanıldı. Alınan kanlardan aşağıdaki protokole göre mononükleer hücre izolasyonu yapıldı. PKMH izolasyonu laminar hava akımlı aseptik kabin içerisinde gerçekleştirildi. Hastalardan ve sağlıklı bireylerin her birinden alınan 20 ml kan 50 ml'lik steril falkon tüpe aktarıldı ve üzerine 20 ml steril PBS solüsyonu eklendi ve homojen olarak karışması için pastör pipet ile yavaşça karıştırıldı. Konik kapaklı 15 ml'lik steril falkon tüplere 4 ml fikol solüsyonu eklendi. Eklenecek fikol solüsyonunun üzerine birbiriyle karışmayacak şekilde, PBS ile homojenize edilmiş kan pastör pipet yardımıyla falkon tüp çeperinden dibe doğru yavaşça eklendi. Kan fikol üzerine yayıldıktan sonra 2000 rpm'de 25 dakika santrifüj edildi. 25 dakika sonunda yoğunluk farkına göre falkon tüp içerisinde en altta eritrositler, orta kısımda opak görünümlü mononükleer hücreler (buffy coat) ve üst kısımda ise plazma elde edildi. Orta tabakada bulunan buffy coat kısım pastör pipeti ile dairesel hareketlerle toplandı ve steril 15 ml'lik boş bir falkon tüpe aktarıldı. Üzerine eşit hacimde PBS solüsyonu eklenerek pipetaj yapıldı. 1700 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant atıldı. Dipte kalan hücre pelleti üzerine önceden hazırlanmış olan cRPMI besiyerinden 1 ml eklendi ve pipet yardımıyla hücreler süspanse edildi. Hücre sayısının belirlenmesi amacıyla içinden 50 µl alınıp 5 ml'lik örnek tüplerine aktarıldı. Üzerine 450 µl PBS solüsyonu ve 50 µl sayım boncuğu eklendi. Akım sitometri cihazında okutulurak, hastalar ve sağlıklı kontrollerden alınan venöz kandaki toplam lenfosit sayısı tayin edildi.

3.6.5.4 İzole Edilen Lenfositlerden Mononükleer Hücre Kültürü Yapılması

STAT1 geni fonksiyon kazanımı hastalarından ve sağlıklı bireylerden izole edilen venöz kan mononükleer hücrelerinin uyaransız kültürü ve aynı zamanda 20 ve 150 dakika boyunca IFN-β1a ile uyarımlı kültürleri yapılması planlandı. Konik kapaklı 15 ml'lik steril falkon tüpleri hasta adları ve uyarım planı sürelerine göre isimlendirildi. Hücre sayımının ardından cRPMI içerisindeki hücre karışımından her bir tüpte ayrı ayrı 1×10^6 hücre olacak şekilde alındı ve tüplere aktarıldı. Üzerlerine cRPMI eklenerek 1 ml'ye tamamlandı. İlk başta 150 dakika uyarım planlanan tüplere önceden hazırlanan IFN-β1a uyarısından 10 µl (100 ng/ml) eklendi. Tüm falkon tüpleri birlikte 37°C'de, %5 CO₂ inkübatöre koyuldu. 150 dakika geri sayım başlatıldı ve sürenin bitmesine 20 dakika kala 20 dakika uyarım planlanan tüplere IFN-β1a uyarısından 10 µl (100 ng/ml) eklendi. Yeniden geri sayım başlatıldı ve 20 dakika sonra tüm tüpler inkübatörden çıkarıldı ve boyama işlemlerine devam edildi.

3.6.5.5 Uyarım Sonrası h-Hücre Yüzeyi ve Hücre İçi Boyamalarının Yapılması

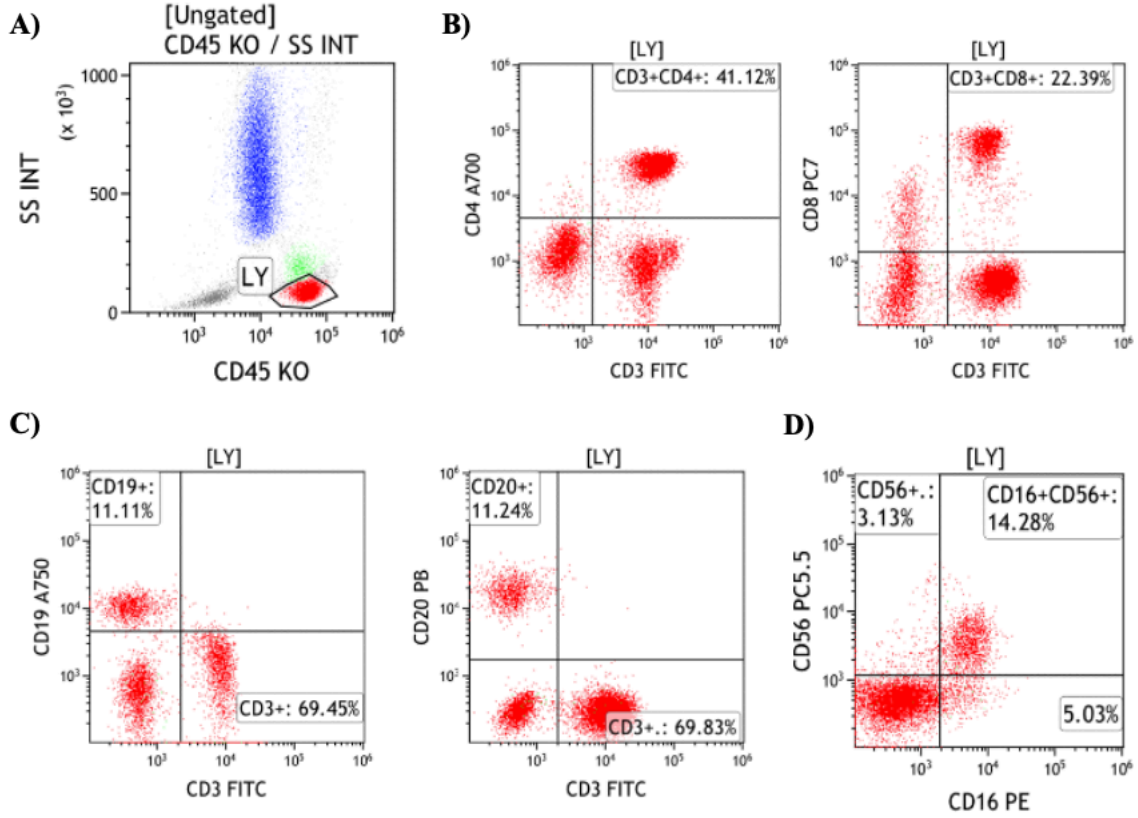
İnkübasyondan süresi bittikten sonra örnek tüpleri inkübatörden çıkarıldı ve pipetaj yapılarak dipte kalan ve hücre kültür solüsyonu içindeki hücrelerin homojenize edilmesi sağlandı. Üzerlerine 100 µl PerFix nc reagent Buffer 1 (Fixative Reagent) eklendi. Karanlıkta ve oda ısısında 15 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra tüplere 2 ml stain buffer solüsyonu eklendi ve 300 g'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant döküldü ve vorteks yapıldı (hücre yıkama işlemi iki kez tekrarlandı). Tüm tüpler buz üstüne koyuldu ve üzerlerine elde hafifçe karıştırılarak yavaş bir şekilde önceden soğutulmuş 500 µl Phosflow Perm Buffer III (BD Phosflow™ Human T Cell Activation Kit) solüsyonundan eklendi. Tüpler buz üzerinde 20 dakika bekletildi. Süre sonunda buzdan çıkarılarak üzerlerine 2 ml stain buffer solüsyonu eklendi ve 300 g'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant döküldü ve vorteks yapıldı (hücre yıkama işlemi iki kez tekrarlandı). Tüplere 100 µl stain buffer solüsyonu eklendi. Ardından Human T-Cell (CD4/CD8) antikor kokteylinden (BD Phosflow™ Human T Cell Activation Kit) 10 µl her bir tüpe eklendi. Karanlıkta ve oda ısısında 45 dakika inkübe edildi. İnkübasyon süresi bittikten sonra 2 ml stain buffer solüsyonu eklendi ve 300 g'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant döküldü ve vorteks yapıldı (hücre yıkama işlemi iki kez tekrarlandı). Pellet üzerine 0,5 ml stain buffer solüsyonu eklenerek tüpler akım sitometri cihazında okutuldu.

3.6.6 Analizler

3.6.6.1 LRBA ve CTLA-4 Eksikliği Hastalarının Analizleri

3.6.6.1.1 Lenfosi Alt Gruplarının Analizleri

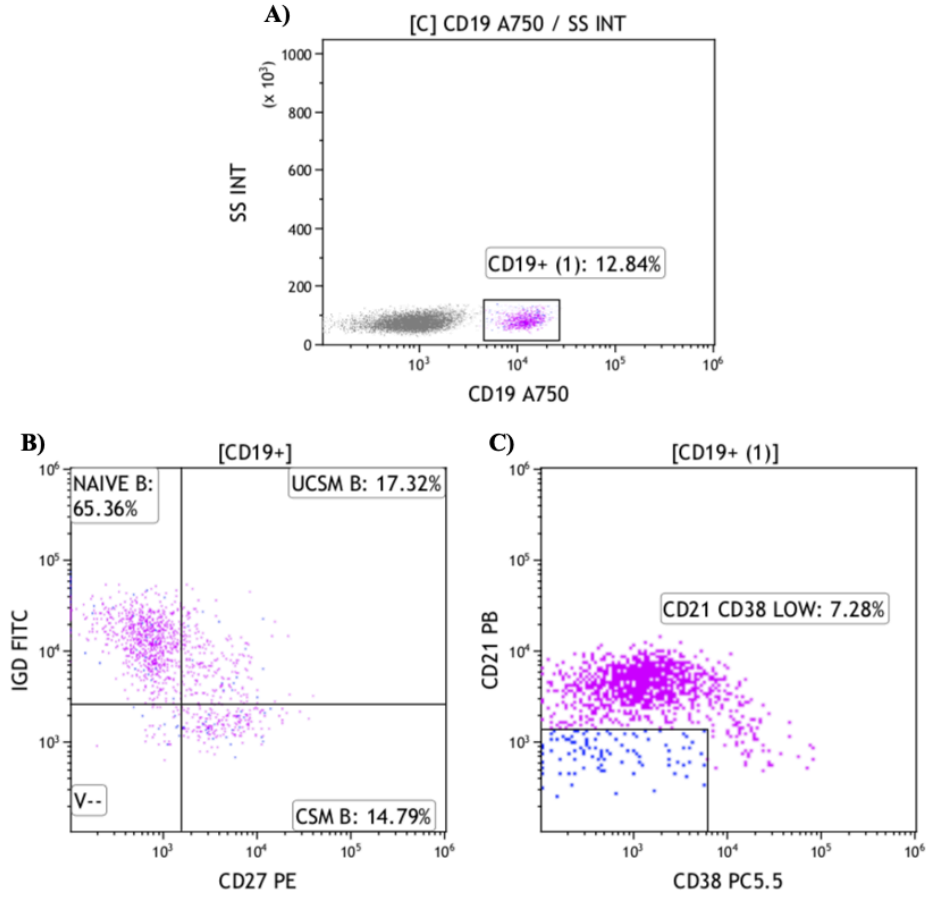
Yüzey boyama protokolünün uygulanmasının ardından lenfosit alt gruplarının yüzdeleri akım sitometri cihazında Kaluza Analysis Software (Version 2.1) programıyla analiz edildi ve hesaplandı. Total lenfosit kapılaması yöntemi ile CD3+, CD4+ ve CD8+ T, CD19+ ve CD20 B, CD16+ ve CD56+ NK hücrelerin yüzdeleri hesaplandı (Şekil 4).



Şekil 4. Lenfosit alt gruplarının akım sitometri cihazında analizi.

A) Akım sitometri analizinde lenfositler için kapıalandı. B) Lenfosit kapısının içinden total CD3+T, CD3+CD4+T ve CD3+CD8+T hücrelerin yüzde oranları analiz edildi. C) Lenfosit kapısından B hücre (CD19+, CD20+) yüzde oranları analiz edildi. D) Lenfosit kapısından NK hücre (CD16+CD56+) yüzde oranları analiz edildi.

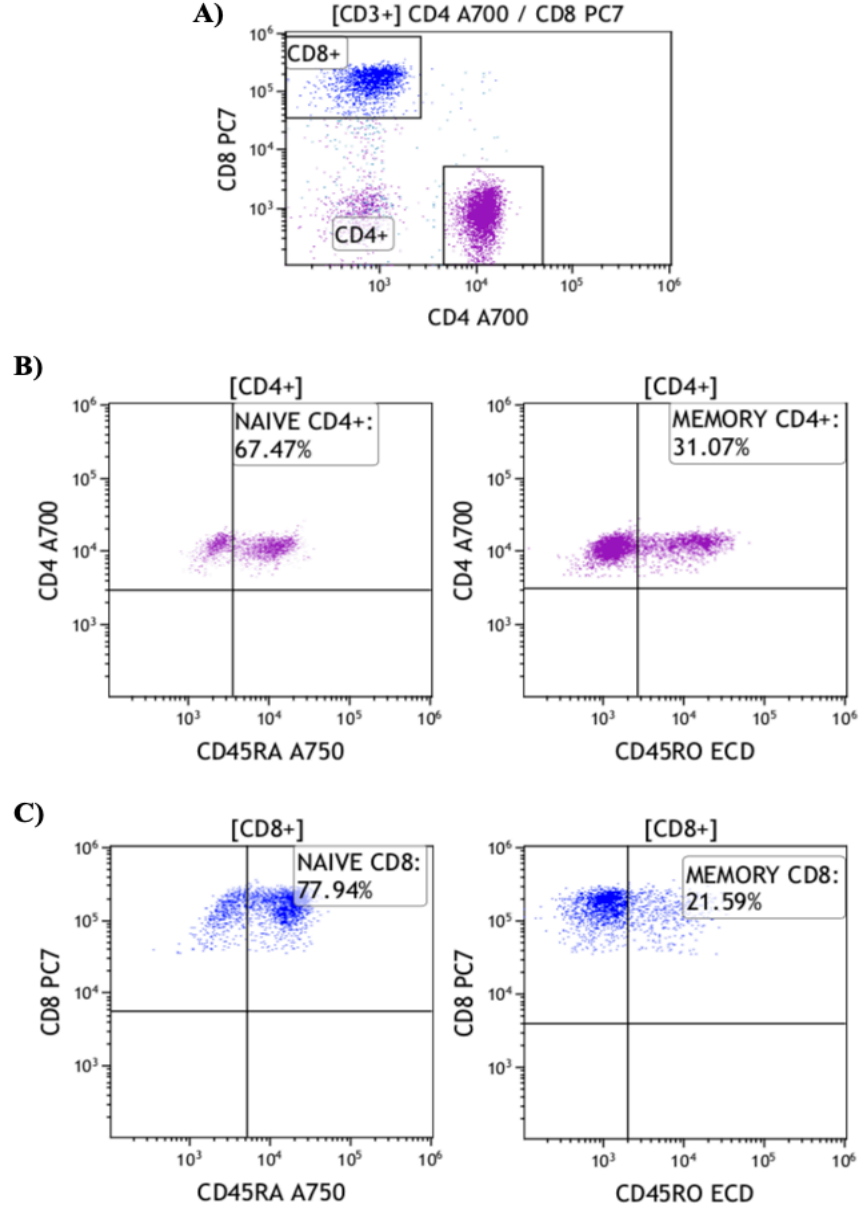
Sonraki aşamalarda T ve B lenfositlerinin belirli alt grupları akım sitometri cihazında analiz edildi. B hücrelerin naif (CD19+CD27-IgD+), sınıf dönüşümü yapmamış (CD19+CD27-IgD+) ve sınıf dönüşüm yapmış (CD19+CD27-IgD-) hafıza B ve düşük ekspresyon (CD19+CD21^{low}CD38^{low}) gösteren tükenmiş B hücre oranları belirlendi (Şekil 5).



Şekil 5. B lenfosit alt gruplarının akım sitometri cihazında analizi.

A) Lenfosit kapısı içinden B hücreler (CD19+) kapılandı. B) B lenfositlerin alt gruplarından naif B hücre (CD19+CD27-IgD+), sınıf dönüşümü yapmamış (CD19+CD27+IgD+) ve sınıf dönüşümü yapmış (CD19+CD27+IgD-) hafıza B hücre yüzde oranları analiz edildi. C) B hücre kapısı içinden CD21 ve CD38 düşük ekspresyon popülasyon yüzdesi analiz edildi.

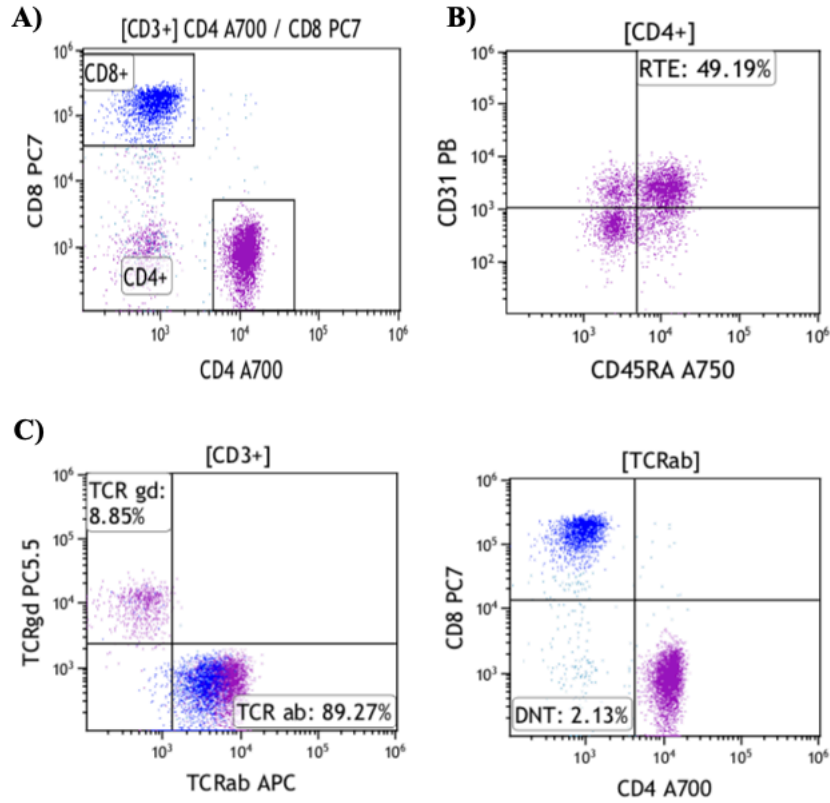
CD4+ ve CD8+ T lenfositlerin alt grup analizlerinde; naif (CD4+CD45RA+) ve memory (CD4+CD45RO+) CD4+ hücre ve naif (CD8+CD45RA+) ve memory (CD8+CD45RO+) CD8+ hücrelerin yüzde oranı analiz edildi (Şekil 6).



Şekil 6. Naif ve bellek T hücrelerinin akım sitometri cihazında analizi.

A) Total CD3+ kapısından CD4+ ve CD8+ T hücreler kapılandı. B) CD4+ T hücre kapısı içinden CD4+CD45RA+ naif ve CD4+CD45RO+ hafıza CD4+ T hücrelerin yüzde oranı analiz edildi. C) CD8+T hücre kapısı içinden CD8+CD45RA+ naif ve CD8+CD45RO+ hafıza CD8+ T hücrelerin yüzde oranı analiz edildi.

Lenfosit alt grup analizlerinde ayrıca timustan yeni çıkmış T (Recent thymic emigrant-RTE) hücre oranı ve çift negatif T (Double negative T – DNT) hücre oranı akım sitometri cihazı ile analiz edildi (Şekil 7).

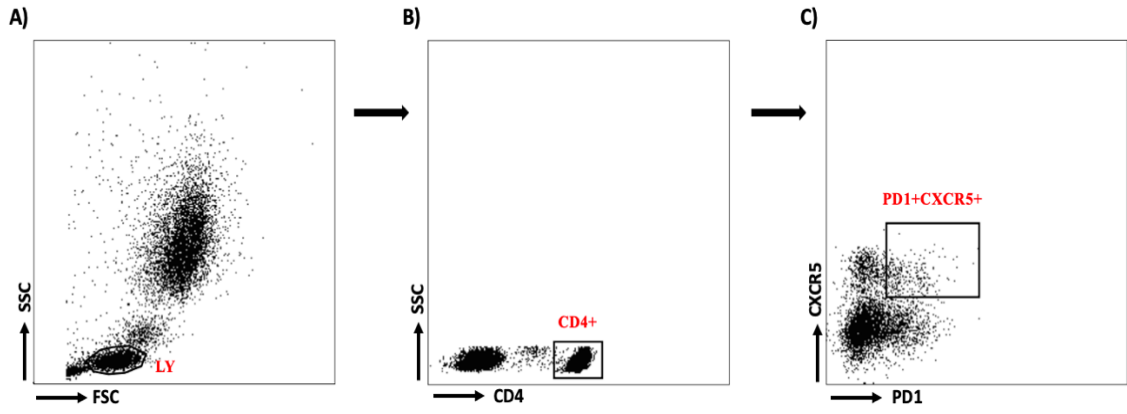


Şekil 7. RTE ve DNT hücre oranlarının akım sitometri cihazında analizi.

A) CD3+ lenfosit kapısı içinden CD4+ ve CD8+ hücre kapıları seçildi. B) RTE hücre oranı için, CD4+ T hücre kapısından CD45RA+CD31+ hücre yüzde oranı hesaplandı. C) CD3+ kapısından TCRab ve TCRgd hücre kapıları seçildi ve ardından DNT hücre oranı için, CD3+TCRab+ kapısından çift negatif (CD4-CD8-) hücre yüzde oranı hesaplandı.

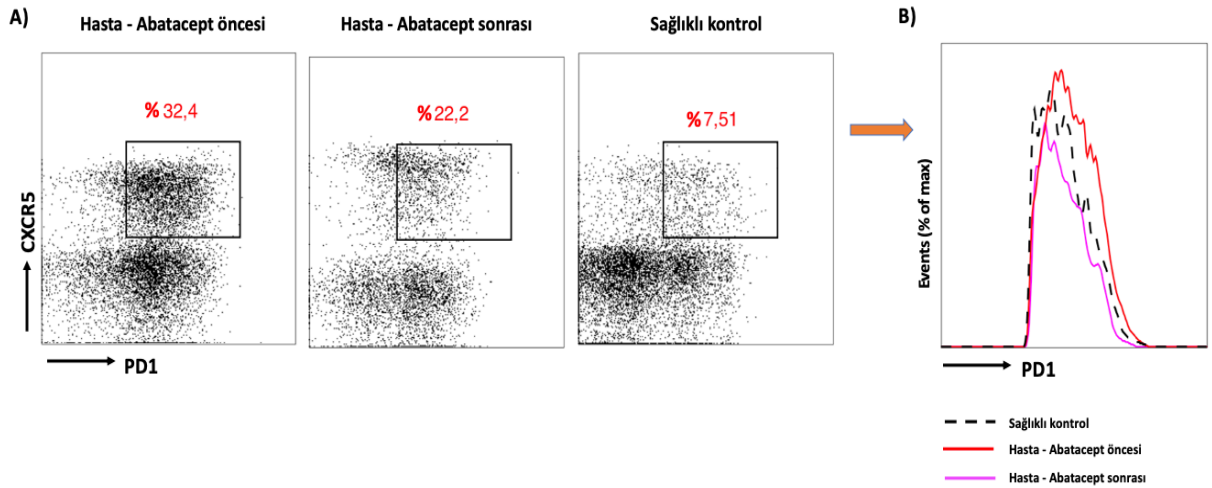
3.6.6.1.2 Lenfositlerin T Foliküler Hücre (TFH) Analizi

Yüzey boyama protokolünün uygulanmasının ardından hücreler akım sitometri cihazında değerlendirildikten sonra, lenfositlerin T foliküler hücre (CD4+PD1+CXCR5+) yüzdesi FlowJo™ (Single Cell Analysis Software v10 – 10.6.2) ve Kaluza Analysis Software (Version 2.1) programları kullanılarak analiz edildi ve hesaplandı. Total lenfosit kapısından CD4+ T lenfositler kapılandı ve daha sonra CD4+ T lenfosit kapısı içinden çift pozitif (PD1+CXCR5+) hücre popülasyonu kapılanarak T foliküler hücre yüzdesi hesaplandı (Şekil 8). Hastaların tedavi öncesi ve sonrası sağlıklı kontrollere kıyasla; T foliküler hücre oranları değerlendirildi ve T foliküler hücre kapısından PD1 protein ifadesi histogram olarak görüntülenerek, ortalama floresan yoğunluğu (MFI) değerine göre hesaplandı (Şekil 9).



Şekil 8. CD4+PD1+CXCR5+ T foliküler hücrenin (TFH) akım sitometri cihazında analizi.

A) Akım sitometri analizinde total lenfositler için kapı alındı. B) Lenfosit kapısı içinden CD4+T hücre yüzde oranı analiz edildi. C) CD4+ T lenfosit kapısından çift pozitif (PD1+CXCR5+) hücre popülasyonu seçilerek yüzde oranı hesaplandı.

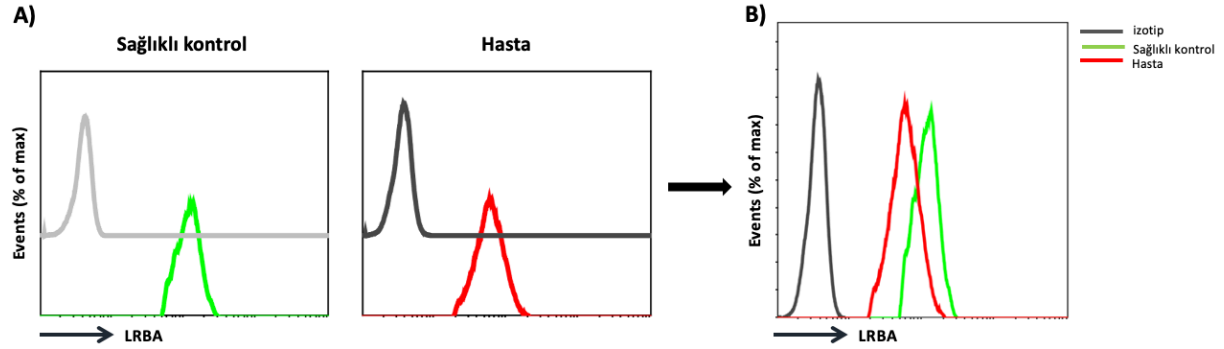


Şekil 9. T foliküler hücre yüzde (%) oranının ve PD1 proteini ifadesinin tedavi öncesi ve sonrası akım sitometri cihazında analizi.

A) CD4+ T lenfosit kapısından çift pozitif (PD1+CXCR5+) hücre popülasyonu seçildi ve hastaların T foliküler hücre oranı ilaç öncesi ve sonrası sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırıldı. B) T foliküler hücre kapısından PD1 protein ifadesi histogram olarak görüntülenerek akım sitometri analizinde ilaç öncesi ve sonrası değerlendirildi.

3.6.6.1.3 Lenfositlerin Hücre İçi LRBA Protein İfadesi Analizi

Hücre içi boyama protokolünün uygulanmasının ardından LRBA protein ifadesi akım sitometri cihazında Kaluza Analysis Software (Version 2.1) programı kullanılarak analiz edildi ve hesaplandı. Total lenfositler kapılandı ve bu kapıdan LRBA protein ifadesi histogram olarak görüntülendi. Histogramlardaki hücre içi LRBA protein ifadesi, MFI değerine göre hesaplandı (Şekil 10).



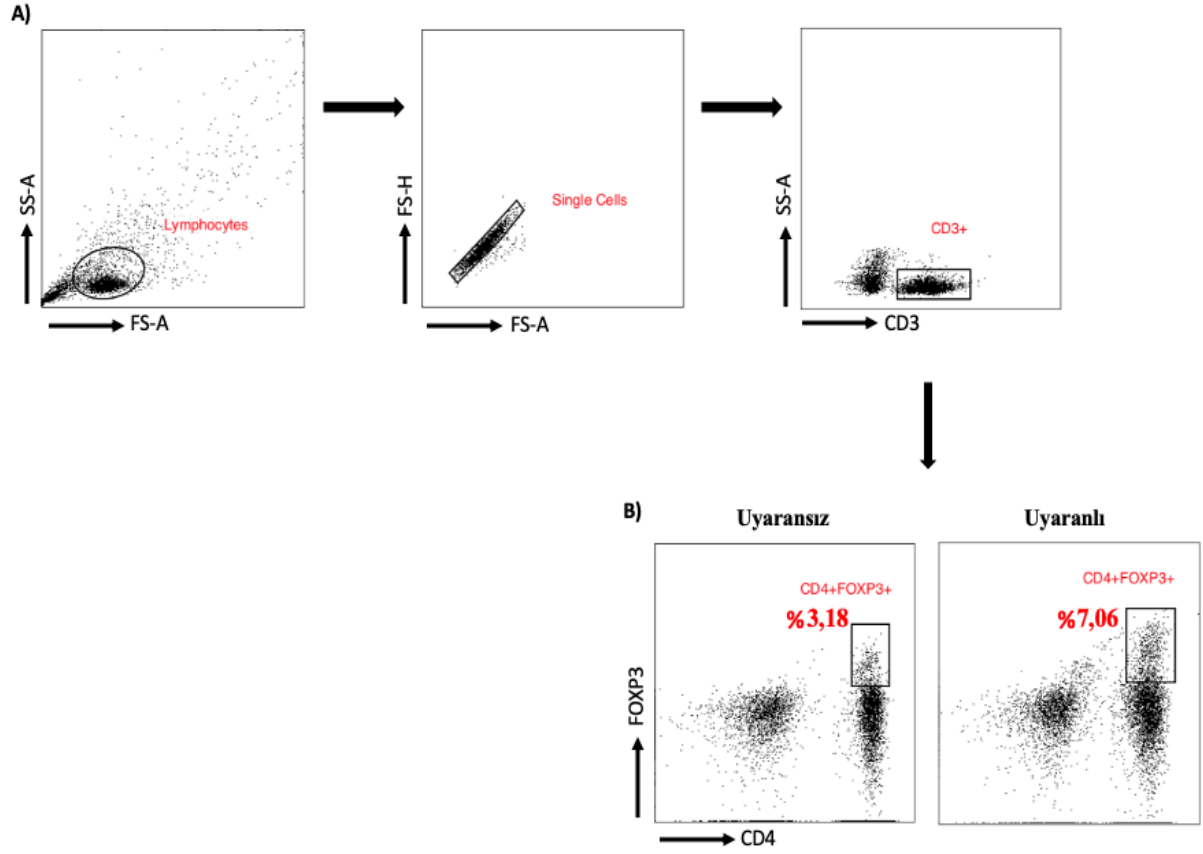
Şekil 10. Hücre içi LRBA protein ifadesinin akım sitometri cihazında analizi.

A) Sağlıklı kontrol ve hastanın lenfosit popülasyonlarının kapılanmasının ardından, izotip ve LRBA protein ifadeleri histogram olarak görüntülendi. B) İzotipin, sağlıklı kontrolün ve LRBA eksikliği hastasının birlikte histogram görüntüsü alınarak, hücre içi LRBA proteini ifadesi akım sitometri analizinde MFI değerlerine göre hesaplandı.

3.6.6.1.4 Lenfositlerin Düzenleyici T Hücre Yüzdesi ve CD25, FOXP3 ve CTLA-4 Protein İfadesi Analizi

Tam kan örneğinden izole edilen PKMH'lerin uyaransız ve uyaranlı kültürde 16 saat boyunca inkübasyonunun ardından hücre içi boyama protokolü uygulandı. Hücreler akım sitometri cihazında değerlendirildikten sonra, CD25, hücre içi FOXP3 ve CTLA-4 protein ifadeleri ve Treg hücrelerin yüzde (%) oranları FlowJo™ (Single Cell Analysis Software v10 – 10.6.2) programı kullanılarak analiz edildi ve hesaplandı.

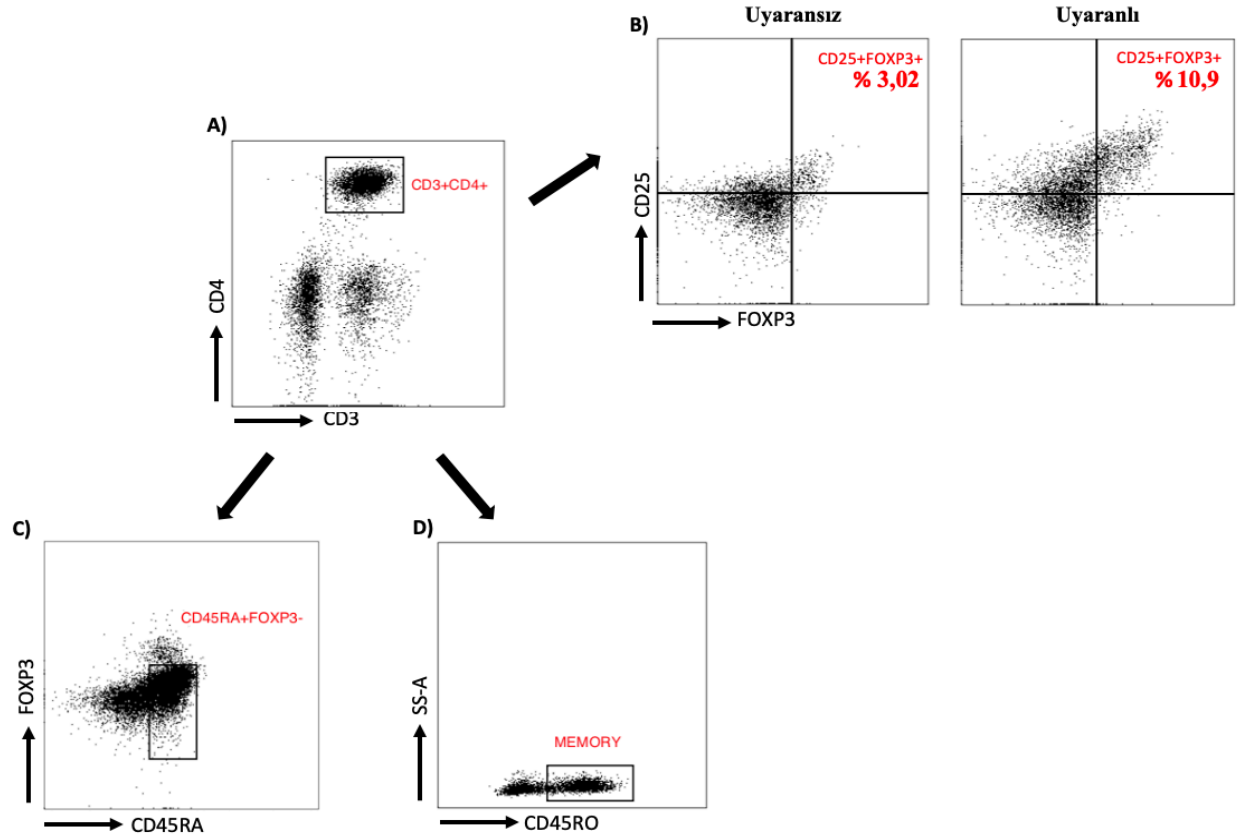
Analizde hem sağlıklı kontrol hem de hasta için; uyaransız ve uyaranlı ortamdaki hücre popülasyonları belirlendi. İlk olarak total lenfositler kapılandı. Bu kapıdan analizi debriden ve bir araya toparlanmış hücrelerden ayırt etmek amacıyla single hücreler seçildi. Ardından single hücreler içerisinde CD3+ ve CD3+CD4+ T hücre popülasyonları seçildi. CD3+ T hücre popülasyonu içerisinde CD4+FOXP3+ düzenleyici T hücre yüzdesi belirlendi ve karşılaştırıldı (Şekil 11).



Şekil 11. CD4+FOXP3+ düzenleyici T hücrelerin akım sitometri cihazında analizi.

A) Total lenfositlerin kapılanmasının ardından single hücreler seçildi. Single hücrelerden CD3+ T lenfositler kapılandı. B) T lenfositler içerisinde uyaransız ve T hücre aktivasyon boncuğu uyaranlı ortamdaki CD4+FOXP3+ düzenleyici T hücre popülasyonu kapılandı.

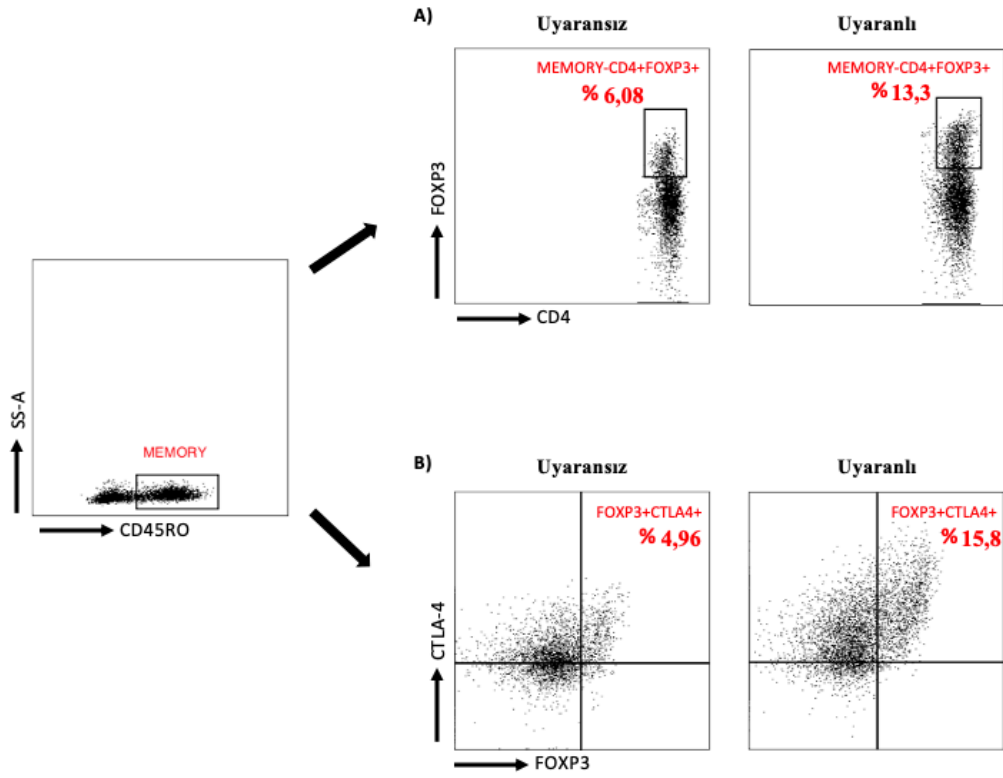
Single hücrelerden seçilen CD3+CD4+ T lenfosit kapısından ilk olarak uyaransız ve uyaranlı ortamdaki FOXP3+CD25+ düzenleyici T hücre yüzdesi belirlendi ve karşılaştırıldı. Aynı zamanda CD3+CD4+ T hücreler içerisinde uyarılmamış CD45RA+FOXP3- hücre popülasyonu kapılandı, bu naive T conventional (nTcon) hücreler, bireylerdeki uyaransız ve uyaranlı ortamdaki CD25, FOXP3 ve CTLA-4 protein ifadesini değerlendirmek için kontrol olarak kullanıldı. Diğer bir aşamada CD3+CD4+ T hücre popülasyonundan CD45RO+ kapısı seçilerek hafıza T hücreleri belirlendi (Şekil 12).



Şekil 12. CD25+FOXP3+ düzenleyici T hücrelerin akım sitometri cihazında analizi.

A) Singlet hücrelerden CD3+CD4+ T lenfositler belirlendi. B) T lenfositler içerisinde uyaransız ve uyaranlı ortamdaki CD25+FOXP3+ düzenleyici T hücre popülasyonu kapılandı. C) CD3+CD4+ T lenfositlerden CD45RA+FOXP3- (nTcon) hücreler ve D) CD45RO+ hafıza T hücreler kapılandı.

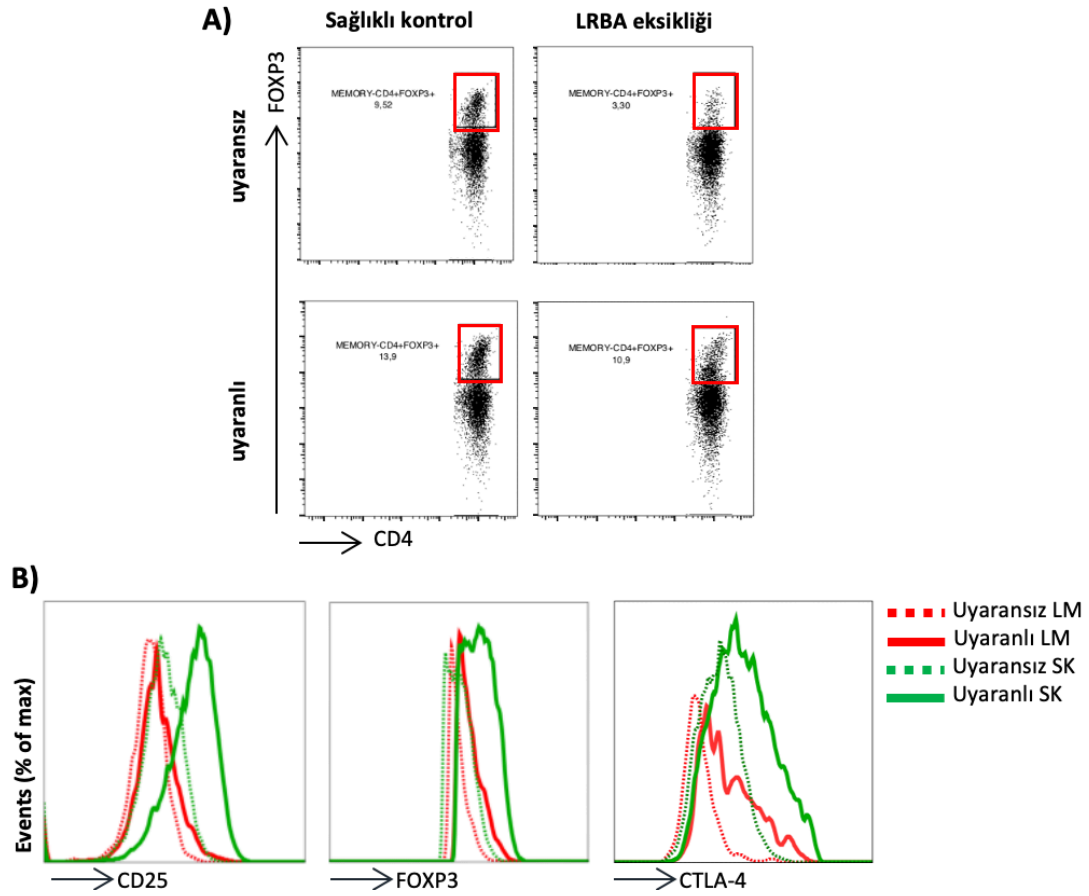
CD45RO+ hafıza T hücre popülasyonu içerisinde uyaransız ve T hücre aktivasyon boncuğu uyaranlı ortamdaki CD4+FOXP3+ hafıza düzenleyici T hücre (mTreg) yüzdesi belirlendi ve karşılaştırıldı. Aynı zamanda hafıza T lenfositlerdeki FOXP3+CTLA4+ hücre yüzdesi belirlendi ve karşılaştırıldı (Şekil 13).



Şekil 13. CD4+FOXP3+ hafıza düzenleyici T hücrelerin ve FOXP3+CTLA4+ hücrelerin akım sitometri cihazında analizi.

A) Hafıza T hücre popülasyonu içerisinde uyaransız ve T hücre aktivasyon boncuğu uyaranlı ortamdaki CD4+FOXP3+ hafıza düzenleyici T hücre ve B) FOXP3+CTLA4+ hücre popülasyonları kapılandı.

Ardından hem sağlıklı kontrol hem de hasta için; CD4+FOXP3+ hafıza düzenleyici T hücre popülasyon içerisindeki CD25, hücre içi FOXP3 ve CTLA-4 protein ifadeleri histogram olarak görüntülenerek, akım sitometri analizinde MFI değerlerine göre hesaplandı ve karşılaştırıldı (Şekil 14).



Şekil 14. CD4+FOXP3+ hafıza düzenleyici T hücrelerdeki CD25 ve hücre içi FOXP3 ve CTLA-4 protein ifadelerinin akım sitometri cihazında analizi.

A) Hem uyaransız hem de T hücre aktivasyon boncuğu uyaranlı ortamda CD4+FOXP3+ hafıza düzenleyici T hücreler kapılındı ve B) CD4+FOXP3+ hafıza düzenleyici T hücre kapısından CD25 ve hücre içi FOXP3 ve CTLA-4 protein ifadeleri histogram olarak görüntülendi ve MFI değerleri karşılaştırıldı.

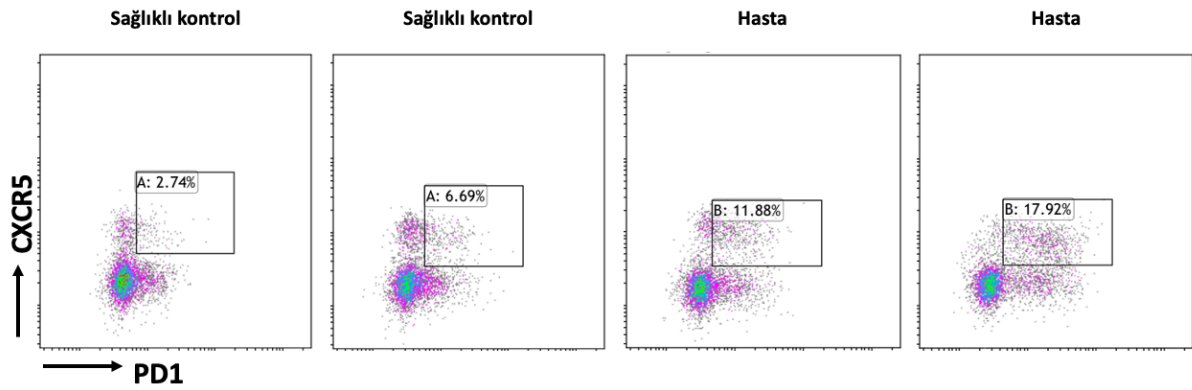
3.6.6.1.5 sCD25 Konsantrasyonunun Ölçümü ve Analizi

Toplanan plazma örneklerinde sCD25 ölçümü için bu moleküle özgü antikorlarla kaplanmış ELISA plakları kullanıldı ve üretici firmanın talimatına uygun olarak çalışılan örneklerin, ELISA okuyucusunda 450 nm'de OD değerleri ölçüldü. Deneyde belirlenen konsantrasyon ve dilüsyon değerleri analiz programına kayıt edildi. Örneklerin plaktaki sırasına göre ELISA okuyucusunda ölçülen OD değerlerinin Logit regression V21042005 free-software programı kullanılarak analiz edilmesiyle plazmalardaki sCD25 konsantrasyonu hesaplandı. Hastalar ileri dönük olarak izlenerek tedavi öncesi ve tedavi sonrası TFH ve sCD25 düzeyleri değerlendirildi.

3.6.6.2 STAT1 GOF Hastalarının Analizleri

3.6.6.2.1 Lenfositlerin T Foliküler Hücre (TFH) Analizi

Yüzey boyama protokolünün uygulanmasının ardından hücreler akım sitometri cihazında değerlendirildi ve lenfositlerin T foliküler hücre (CD4+PD1+CXCR5+) yüzdesi Kaluza Analysis Software (Version 2.1) programları kullanılarak analiz edildi ve hesaplandı. LRBA ve CTLA-4 eksikliği hastalarının analizinde olduğu gibi ilk olarak total lenfositler kapıldı. Bu kapıdan CD4+ T lenfositler kapıldı ve daha sonra CD4+ T lenfosit kapısı içinden çift pozitif (PD1+CXCR5+) hücre popülasyonu kapılanarak T foliküler hücre yüzdesi hesaplandı. Hastaları tedavi öncesi dönemdeki T foliküler hücre oranları sağlıklı kontrollerin hücre oranı ile karşılaştırılarak değerlendirildi (Şekil 15).



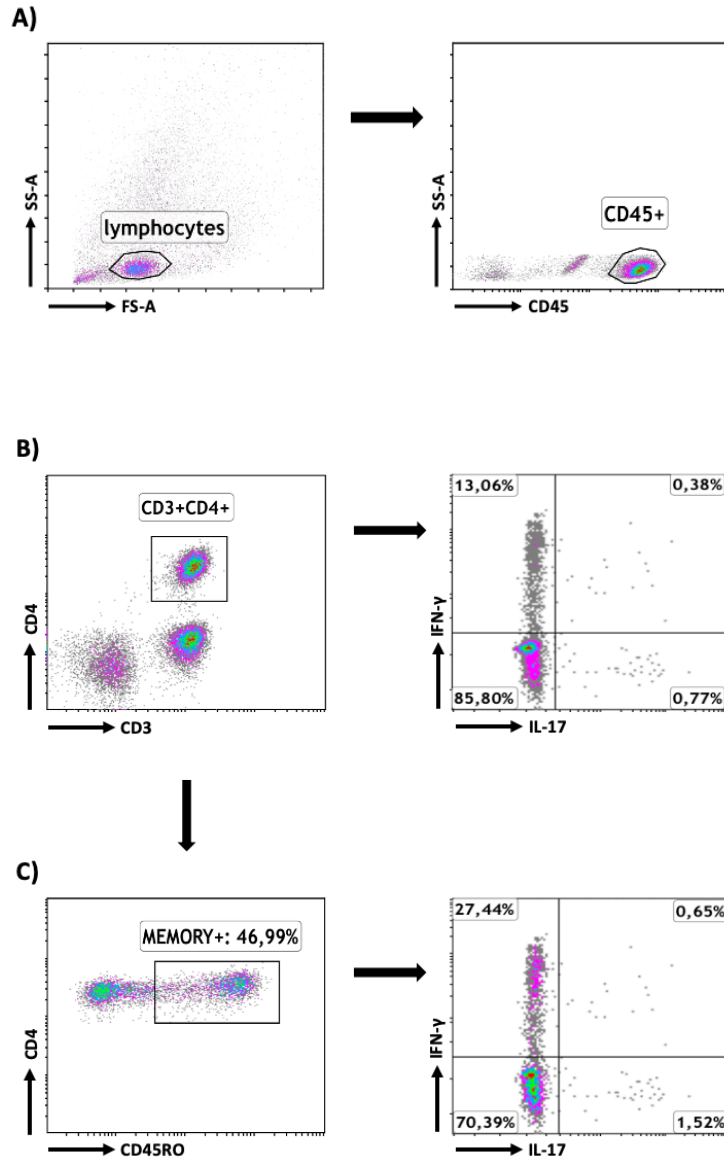
Şekil 15. Tedavi öncesi T foliküler hücre yüzde (%) oranının sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırılması.

CD4+ T lenfosit kapısından çift pozitif (PD1+CXCR5+) hücre popülasyonu seçildi ve hastaların T foliküler hücre oranı tedavi öncesi sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırıldı.

3.6.6.2.2 Hücre İçi Sitokin Analizi

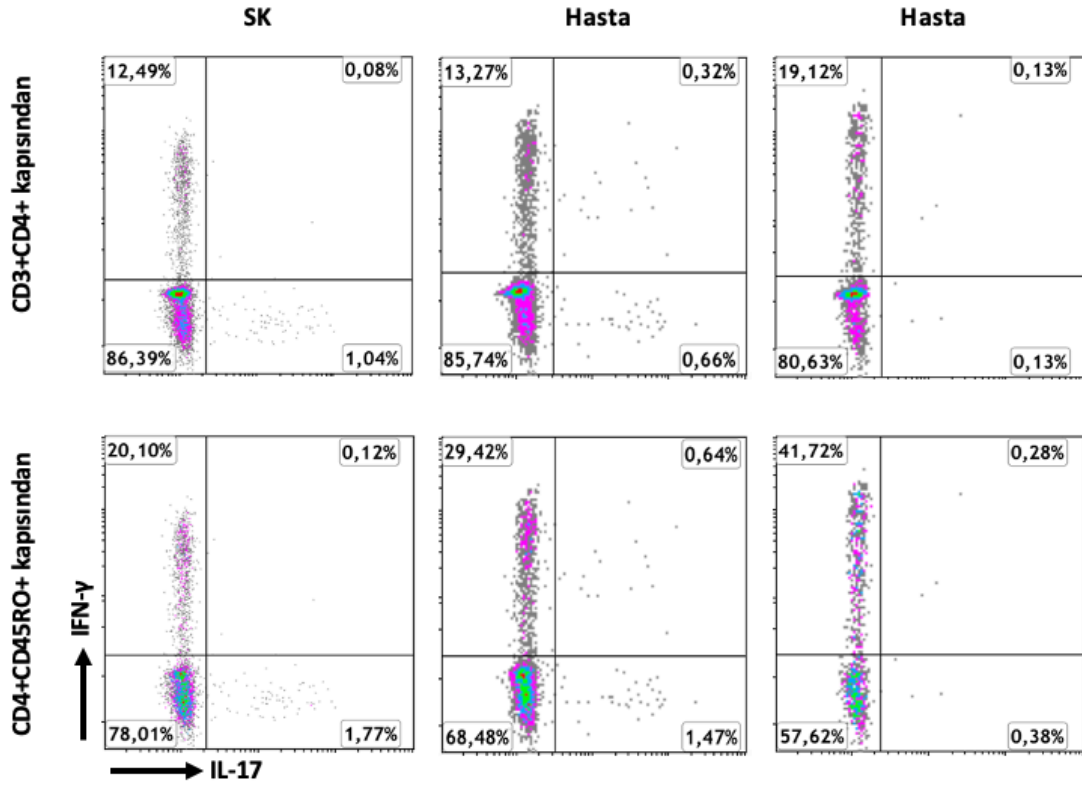
4 saatlik inkübasyon süresi bittikten sonra tüpler etüvden çıkarıldı, yüzey antikorlarının eklenmesinin ardından boyama protokolüne uygun çalışılan örnekler akım sitometri cihazında değerlendirildi ve hücre içi sitokinlerden IL-17 ve IFN- γ miktarının belirlenebilmesi amacıyla hücreler Kaluza Analysis Software (Version 2.1) programı kullanılarak analiz edildi ve hesaplandı. Total lenfositler kapıldı ve lenfositleri debris kısmından ayırt edebilmek amacıyla bu kapıdan CD45+ hücreler seçildi. CD45+ hücreler içerisinde CD3+CD4+ hücreler ve ardından CD4+CD45RO+ hafıza hücreler kapıldı. Hem CD3+CD4+ hem de CD4+CD45RO+

hafıza hücreler içerisinde IL-17 ve IFN- γ hücre oranları belirlendi (Şekil 16). Hastaların hücre içi sitokin yüzde (%) oranları sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırıldı (Şekil 17).



Şekil 16. Hücre içi sitokinlerin akım sitometri cihazında analizi.

A) Total lenfositlerin kapılanmasının ardından CD45+ hücreler seçildi. B) CD45+ lenfositlerden CD3+CD4+ T hücre popülasyonu kapılandı ve bu kapıdan IL-17 ve IFN- γ hücre oranları belirlendi. C) CD3+CD4+ kapısından CD4+CD45RO+ hafıza T hücreler seçildi ve bu kapıdan IL-17 ve IFN- γ hücre yüzde (%) oranları belirlendi.

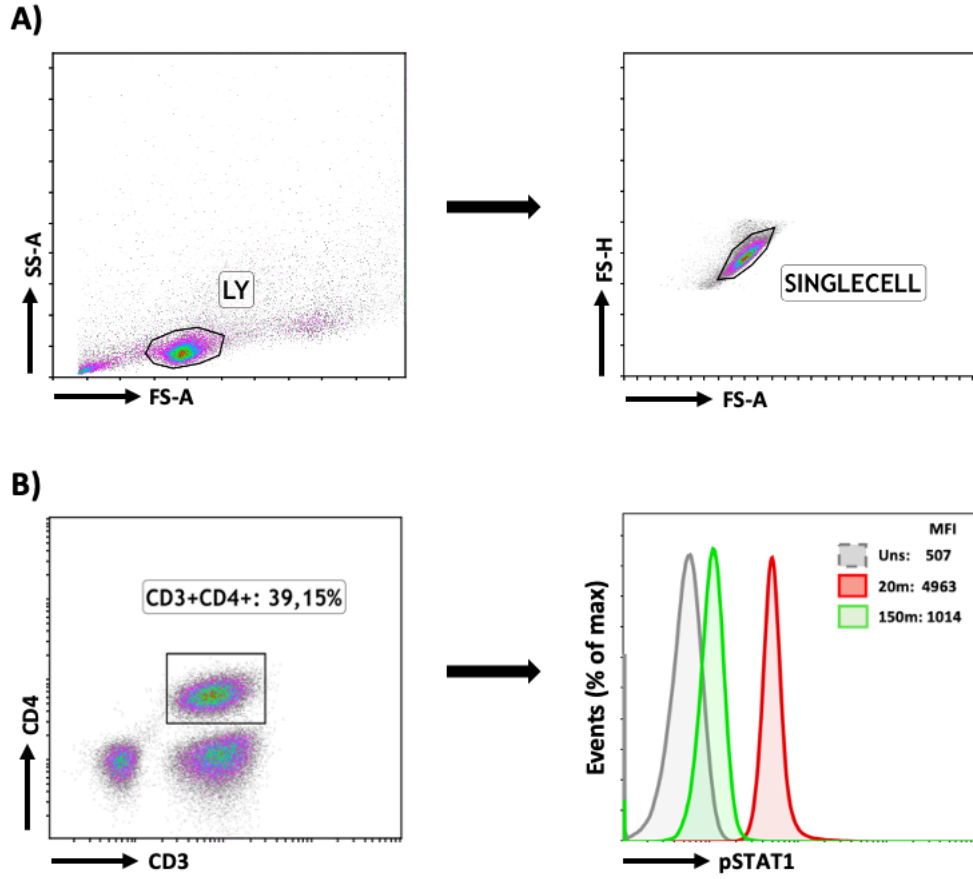


Şekil 17. IL-17 ve IFN-γ hücre içi sitokin yüzde (%) oranlarının karşılaştırılması.

CD3+CD4+ T hücre ve CD4+CD45RO+ hafıza T hücre popülasyonları içerisinde belirlenen IL-17 ve IFN-γ hücre yüzde (%) oranları hem grupların kendi içlerinde hem de sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırıldı. SK, Sağlıklı kontrol grubu; SGM, STAT1-Gof mutant.

3.6.6.2.3 Lenfositlerin p-STAT1 Proteinini İfadesi Analizi

PKMH izolasyonu sonucu uyaransız ve IFN-β1a uyarını ile 20, 60 ve 150 dakika olmak üzere üç farklı sürede uyarım yapılan hücreler etüvden çıkarıldı ve protokole uygun olarak boyama yapıldı. Ardından hücreler akım sitometri cihazında değerlendirildi ve p-STAT1 protein ifadesinin belirlenebilmesi amacıyla hücreler Kaluza Analysis Software (Version 2.1) programı kullanılarak analiz edildi ve hesaplandı. Total lenfositler kapılandı ve bu kapıdan analizi deb-riden ve bir araya toparlanmış hücrelerden ayırt etmek amacıyla single hücreler seçildi. Single hücreler içerisinde CD3+CD4+ hücreler kapılandı. CD3+CD4+ popülasyonu içerisinde p-STAT1 protein ifadesi farklı süredeki uyarımlarına göre değerlendirildi ve sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırıldı (Şekil 18).



Şekil 18. Lenfositlerin p-STAT1 protein ifadesinin akım sitometri cihazında analizi.

A) Akım sitometri analizinde total lenfositler kapılındı ve bu kapıdan single hücreler seçildi. B) Single hücrelerden CD3+CD4+ T hücre popülasyonu seçilerek bu hücre grubu içerisindeki p-STAT1 protein ifadesi histogram olarak görüntülendi ve farklı uyarım sürelerindeki MFI değerleri hesaplanarak karşılaştırma yapıldı.

3.6.7 İstatistiksel Analiz

Gruplar arasındaki farklılık GraphPad Prism 8 programı (GraphPad Software, Inc. CA, USA) kullanılarak analiz edildi. Veriler her grupta ortalama (Ort) $\pm$ standart deviasyon (SD) (minimum-maksimum) değerleri olarak verildi. İki'den fazla grup verilerinin bir arada karşılaştırılması ANOVA testi (tek yönlü varyans analizi) ile yapıldı. İki grup arasındaki karşılaştırmalar için parametrik dağılım için paired *t* testi, unpaired student *t* testi, non-parametrik dağılım için Wilcoxon signed ranks testi ve Mann-Whitney U testi kullanıldı. Duyarlılık ve özgüllük kestirim değerleri için ROC analizi yapıldı. *P*-değeri ≤ 0.05 değerler anlamlı olarak kabul edildi.

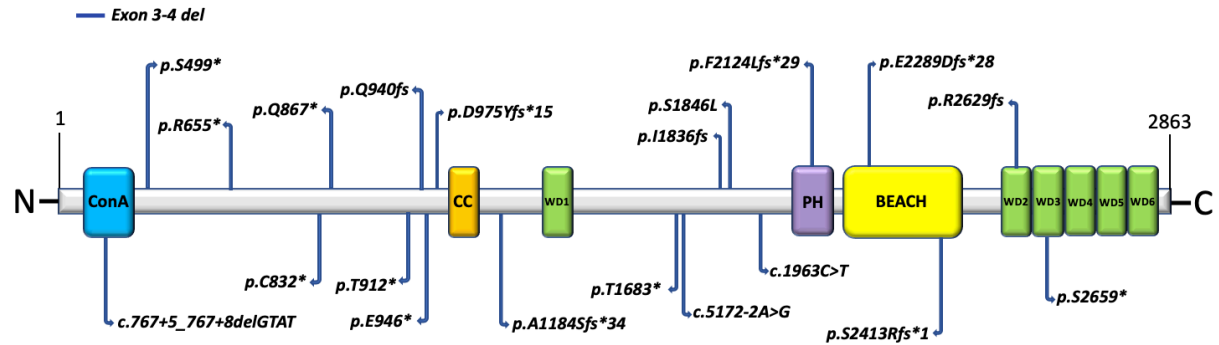
4. BULGULAR

4.1 LRBA ve CTLA-4 Eksikliği Hastalarına Ait Bulgular

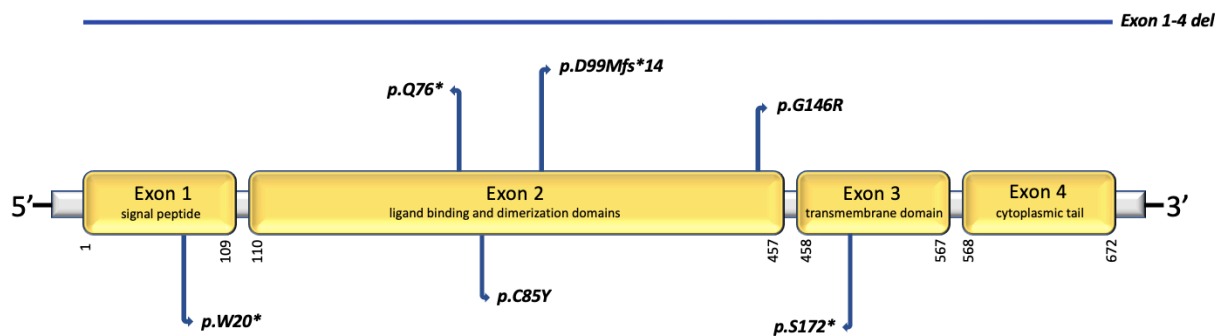
4.1.1 LRBA ve CTLA-4 Eksikliği Hastalarının Teşhisi, Demografik Özellikleri ve Klinik Görünümleri

Çalışmaya Marmara Üniversitesi Pendik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Pediatrik Allerji ve immünoloji polikliniğine ve Türkiye'nin farklı illerindeki ilgili İmmünoloji merkezlerine başvuran ve Sanger sekanslama yöntemi ile mutasyonu doğrulanarak tanısı yeni konulmuş veya daha önceden tanısı konularak takip edilen LRBA eksikliği ve CTLA-4 eksikliği hastaları dahil edilmiştir (Şekil 19). LRBA ve CTLA-4 geninde mutasyona sahip olan hastalar prospektif olarak ilgili merkezlerden çalışmaya alınmıştır. Çalışma sırasında hastaların demografik, klinik ve immünolojik verileri toplanmıştır.

A)



B)



Şekil 19. A) LRBA eksikliği ve B) CTLA-4 eksikliği hastalarına ait mutasyonların protein domainleri üzerinde şematik gösterimi.

Çeşitli İmmünoloji merkezlerinden çalışmaya katılan tüm hastalardan ve yaş uyumlu herhangi bir kronik hastalık öyküsü bulunmayan sağlıklı kontrollerden alınan periferik kan örnekleri; lenfosit alt kümesi analizi, cTFH hücre sayımı, sCD25 konsantrasyon ölçümü ve hücre içi LRBA, CTLA-4 ve FOXP3 boyamalarını içeren immünolojik değerlendirme için Marmara Üniversitesi Çocuk Alerji ve İmmünoloji laboratuvarına ulaştırılmıştır.

Çalışmaya alınan hastaların demografik özellikleri ve ana klinik bulguları Tablo 1’de gösterilmiştir. LRBA eksikliği tanısı almış 29 hastadan 12’si (41,4%) kız, 17’si (58,6%) erkek hastaydı. Bu hastaların yaş ortalaması $16,34 \pm 7,52$ yılı. Takip süreleri $4,01 \pm 4,47$ yılı. Semptom başlangıç yaşları $3,29 \pm 3,99$ yıl iken, tanıda gecikme süreleri $9,38 \pm 8,82$ yıl olarak gözlendi. LRBA eksikliği olan 4 hasta (13,8%) LM12, LM13, LM14 ve LM21 dışında geri kalan 25 hastada (86,2%) akrabalık vardı. LRBA eksikliği olan hastalar ilk klinik bulgularına göre değerlendirildiğinde; 11 (37,9%) hastada yaygın değişken immün yetmezlik (CVID), 12 (41,3%) hastada otoimmün lenfoproliferatif sendrom (ALPS), dört (13,7%) hastada ise poliendokrinopati, enteropati, X’e bağlı benzeri (IPEX-benzeri) klinik fenotiplerine benzerlik gözlendi. Yalnızca bir (3,4%) hastanın klinik olarak immün sitopenik hasta (LM11) ve bir hastanın (3,4%) ise asemptomatik hasta (LM19) olarak değerlendirildi. Çalışmanın sonunda, 27 (93,1%) hasta hayattayken, iki (6,9%) hasta kaybedildi (HSCT’den sonra LM28 ve hastalığının şiddetli seyir etmesinden dolayı LM29). Toplam sağkalım oranı 93,1% olarak belirlendi.

CTLA-4 eksikliği tanılı 12 hastadan 4’ü (33,3%) kız, 8’i (66,7%) erkek hastaydı. Bu hastaların yaş ortalaması $24,18 \pm 17,21$ yılı. Takip süreleri $5,87 \pm 7,81$ yılı. Semptom başlangıç yaşları $10,43 \pm 10,24$ yıl iken, tanıda gecikme süreleri $3,00 \pm 3,29$ yıl olarak gözlendi. Bu hastalardan dört hasta (33,3%) CM9, CM10, CM11 ve CM12 dışında geri kalan sekiz hastada (66,7%) akrabalık vardı. CTLA-4 eksikliği olan hastalar ilk klinik bulgularına göre değerlendirildiğinde; sekiz (66,7%) CVID ve iki (16,7%) hastada ALPS fenotipi gözlendi. Yalnızca iki hasta (16,7%) bulgular yönünden asemptomatik olarak değerlendirildi. Çalışmanın sonunda, bütün hastalar hayattaydı ve toplam sağkalım ise 100% idi.

Tablo 1. LRBA eksikliği hastalarına ait demografik veriler ve klinik görünüm.

Hasta	Aile	Yaş (y) / Cinsiyet	Akrabalık	SBY (ay)	Fenotip	Klinik teşhis	Mutasyon	Sağkalım
LM1	A1	15 / E	+	18	CD, ID, LP, RTI	CVID	c.5047C>T, p.R1683*	Yaşıyor
LM2	A2	11 / K	+	48	CD, ID, LP	ALPS	c.5047C>T, p.R1683*	Yaşıyor
LM3	A3	8 / E	+	8	CD, ID, LP, RTI	ALPS	c.7885delA, p.R2629fs	Yaşıyor
LM4	A3	15 / E	+	1	CD, ID, LP, RTI	ALPS	c.7885delA, p.R2629fs	Yaşıyor
LM5	A4	5 / K	+	8	ID, RTI	IPEX-like	c.5172-2A>G, intron 30	Yaşıyor
LM6	A5	37 / K	+	84	CD, ID, LP, RTI	CVID	c.7238dupG, p.S2413Rfs*1	Yaşıyor
LM7	A6	15 / E	+	42	CD, ID, LP, RTI	ALPS	c.2818dupC, p.Q940fs	Yaşıyor
LM8	A7	18 / K	+	4	CD, ID, RTI	CVID	c.2735_2738delGGGT, p.T912*	Yaşıyor
LM9	A8	15 / K	+	24	ID, LP, RTI	ALPS	c.3396-3397delAC, p.D975Yfs*15	Yaşıyor
LM10	A9	23 / K	+	6	CD, ID, LP, RTI	CVID	c.7976C>G, p.S2659*	Yaşıyor
LM11	A10	18 / E	+	160	ID, LP, RTI	İmmün sitopeni	c.5505delT, p.I1836fs	Yaşıyor
LM12	A11	20 / E	-	66	CD, ID, LP, RTI	ALPS	c.1963C>T, p.R655*	Yaşıyor
LM13	A11	14 / E	-	128	CD, LP, RTI	CVID	c.1963C>T, p.R655*	Yaşıyor
LM14	A11	17 / K	-	180	ID, LP	ALPS	c.1963C>T, p.R655*	Yaşıyor
LM15	A12	18 / K	+	60	CD, ID, RTI	CVID	c.6372del, p.F2124Lfs*29	Yaşıyor
LM16	A12	22 / K	+	2	CD, ID, LP, RTI	IPEX-like	c.6372del, p.F2124Lfs*29	Yaşıyor
LM17	A13	5 / K	+	9	CD	IPEX-like	c.1496C>A, p.S499*	Yaşıyor
LM18	A14	15 / K	+	9	CD, ID	IPEX-like	c.3549_3550insA, p.A1184Sfs*34	Yaşıyor
LM19	A14	5 / E	+	48	RTI	Asemp-tomatik	c.3549_3550insA, p.A1184Sfs*34	Yaşıyor
LM20	A15	29 / E	+	3	CD, ID, LP, RTI	CVID	c.767+5_767+8delGTAT, p ?	Yaşıyor
LM21	A16	20 / E	-	18	CD, ID, LP, RTI	ALPS	c.2836_2839delGAAA, p.E946*	Yaşıyor
LM22	A17	16 / E	+	6	CD, ID, LP, RTI	ALPS	c.1963C>T, p.R655*	Yaşıyor
LM23	A18	12 / E	+	13	CD, ID, LP, RTI	CVID	c.2496C>T, p.C832*	Yaşıyor
LM24	A18	13 / E	+	60	ID, LP, RTI	ALPS	c.2496C>T, p.C832*	Yaşıyor
LM25	A19	17 / K	+	18	RTI	CVID	c.5537C>T, p.S1846L	Yaşıyor
LM26	A20	35 / E	+	156	CD, ID, RTI	ALPS	c.6867delA, p.E2289Dfs*28	Yaşıyor
LM27	A21	11 / E	+	100	ID, RTI	CVID	Exon 3-4 delesyon	Yaşıyor
LM28	A22	11 / E	+	7	CD, ID, LP, RTI	CVID	c.2599C>T, p.Q867*	Öldü
LM29	A23	14 / E	+	8	CD, ID, LP, RTI	ALPS	c.7238dupG, p.S2413Rfs*1	Öldü

ALPS, otoimmünlenfoproliferatif sendrom; CD, kronik diyare; CVID, yaygın değişken immün yetmezlik; E, Erkek; ID, immüdisregülasyon; IPEX-like, poliendokrinopati, enteropati, X'e bağlı benzeri; K, Kız; LM, LRBA mutant; LP, lenfoproliferasyon; RTI, solunum yolu enfeksiyonu; SBY, semptom başlama yaşı.

Tablo 2. CTLA-4 eksikliği hastalarına ait demografik veriler ve klinik görünüm.

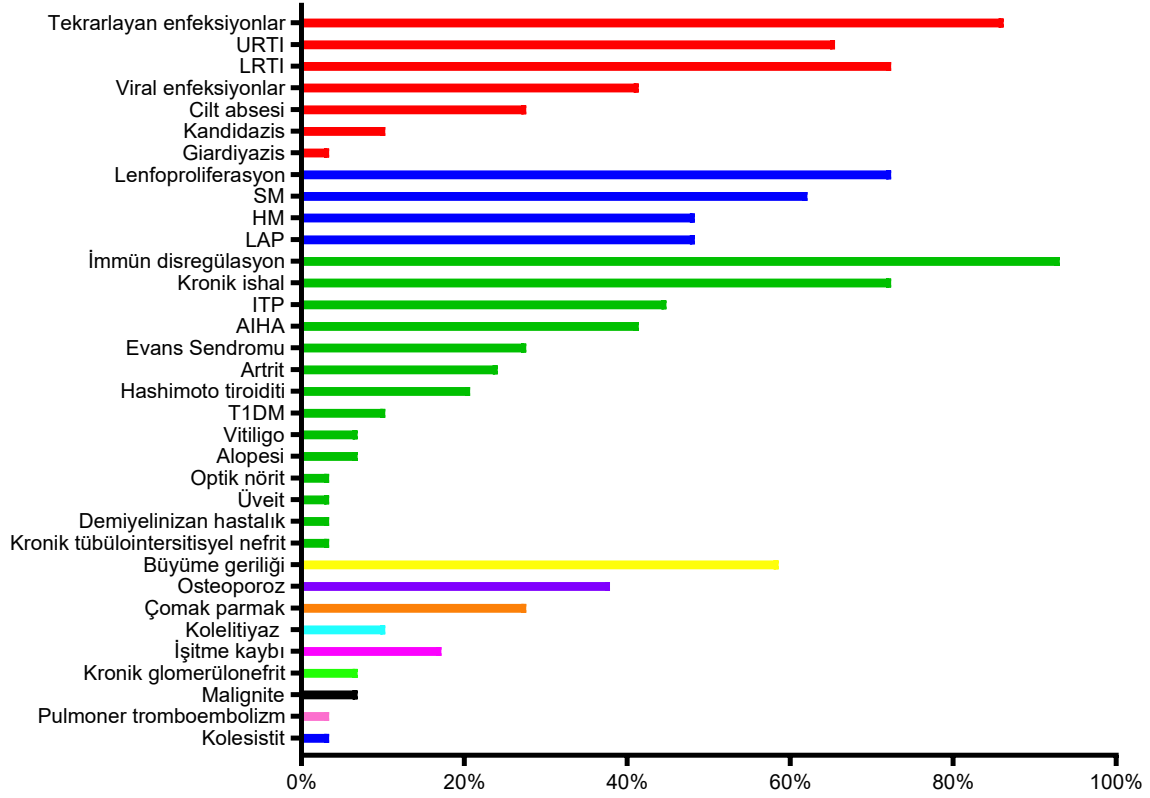
Hasta	Aile	Yaş (y) / Cinsiyet	Akrabalık	SBY (ay)	Fenotip	Klinik teşhis	Mutasyon	Sağkalım
CM1	A1	40 / E	+	144	CD, ID, LP, RTI	CVID	c.436G>A, p.G146R	Yaşıyor
CM2	A1	11 / E	+	48	CD, ID, LP, RTI	CVID	c.436G>A, p.G146R	Yaşıyor
CM3	A2	30 / K	+	288	CD, ID, LP, RTI	CVID	c.226C>T, p.Q76*	Yaşıyor
CM4	A2	65 / K	+	B	RTI	Asemp-tomatik	c.226C>T, p.Q76*	Yaşıyor
CM5	A3	9 / E	+	6	CD, ID, LP	CVID	c.515C>A, p.S172*	Yaşıyor
CM6	A4	8 / E	+	1	CD, ID	CVID	Exon 1-4 delesyon	Yaşıyor
CM7	A5	14 / K	+	152	CD, ID, LP, RTI	ALPS	c.294del, p.D99Mfs*14	Yaşıyor
CM8	A5	42 / K	+	396	ID	CVID	c.294del, p.D99Mfs*14	Yaşıyor
CM9	A6	15 / E	-	108	ID, LP, RTI	ALPS	c.60G>A, p.W20*	Yaşıyor
CM10	A7	15 / E	-	101	ID	CVID	c.254G>A, p.C85Y	Yaşıyor
CM11	A7	17 / E	-	8	ID, LP, RTI	CVID	c.254G>A, p.C85Y	Yaşıyor
CM12	A7	46 / E	-	-	-	Asemp-tomatik	c.254G>A, p.C85Y	Yaşıyor

ALPS, otoimmünlenfoproliferatif sendrom; B, bilinmiyor; CD, kronik diyare; CM, CTLA-4 mutant; CVID, yaygın değişken immün yetmezlik; E, Erkek; ID, immüdisregülasyon; IPEX-like, poliendokrinopati, enteropati, X'e bağlı benzeri; K, Kız; LP, lenfoproliferasyon; RTI, solunum yolu enfeksiyonu; SBY, semptom başlama yaşı.

4.1.2 LRBA ve CTLA-4 Eksikliği Hastalarının Klinik Verileri

LRBA eksikliği ve CTLA-4 eksikliği hastaları klinik özelliklerindeki benzerliklere rağmen hastalıkların karakteristik özelliklerinin daha iyi anlaşılabilmesi amacıyla ayrı olarak incelendi (Şekil 20 ve Şekil 21).

LRBA eksikliği hastalarının klinik fenotipi tekrarlayan enfeksiyonlar (n=25 [86.2%]), immün dis-regülasyon (ID) (n=27 [93,1%]) ve lenfoproliferasyon (LP) (n=21 [72.4%]) olmak üzere üç ana bulgu altında incelendi. Bu hastalardaki diğer yaygın bulgularda; büyüme geriliği (n=17 [58,6%]), osteoporoz (n=11 [37,9%]), çomak parmak (n=8 [27,6%]), iştih kaybı (n=5 [17,2%]), kolelitiaz (n=3 [10,3%]), kronik glomerülonefrit (n=2 [6,9%]), malignite (n=2 [6,9%]), pulmoner tromboemboli (n=1 [3,4%]), kolesistit (n=1 [3,4%]) LRBA eksikliği ile ilişkilendirildi.

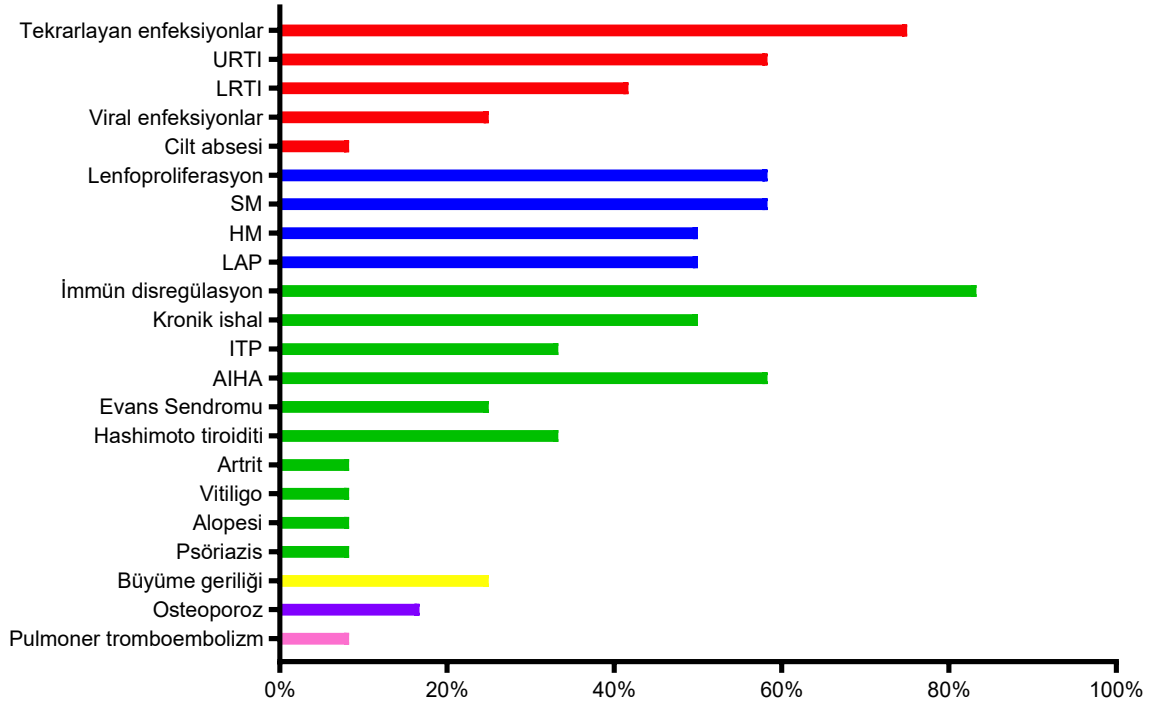


Şekil 20. LRBA eksikliği hastalarına ait klinik bulgular.

Bulgular farklı renk ile gösterilmiştir. AIHA, otoimmünhemolitik anemi; ITP, idiopatik trombositopenik purpura; HM, hepatomegali; LAP, lenfadenopati; LRTI, alt solunum yolu enfeksiyonları; SM, splenomegali; T1DM, Tip 1 diyabet; URTI, üst solunum yolu enfeksiyonları.

LRBA hastalarındaki ID bulguları değerlendirildiğinde hastaların çoğunluğunda kronik diyare (n=21 [72,4%]) hakimdi. Hastalarda sıklıkla görülen idiopatik trombositopenik purpura (ITP) (n=13 [44,8%]) ve otoimmün hemolitik anemi (AIHA) (n=12 [41,4%]) en baskın hematolojik belirtilerdi. Bununla birlikte 8 (41,4%) hastada Evans sendromu gelişirken 7 (24,1) hastada ise artrit olduğu gözlemlendi. Hashimoto tiroidine sahip 6 (20,7%) hasta vardı. LRBA eksikliği hastalarında daha nadir olarak görülen ID bulgularından; Tip 1 diyabet (T1DM) sadece üç (41,4%) hastada (LM1, LM5 ve LM18), vitiligo 2 (6,9%) hastada (LM21 ve LM28), alopesi iki (6,9%) hastada (LM4 ve LM26), uveit bir (3,4%) hastada (LM15), kronik tubulointerstiyel nefrit ise bir (3,4%) hastada (LM11) gözlemlendi. Optik nörit ve demiyelinizan plak bulguları ise yalnızca 1(3,4%) hastada (LM7) mevcuttu.

LRBA hastalarındaki yaygın LP bulguları incelendiğinde, hastaların çoğunluğunda splenomegali (n=18 [62,1%]) hakimdi. Diğer LP bulguları ise hepatomegali (n=14 [48,3%]) ve lenfadenopati (LAP) (n=14 [48,3%]) idi.



Şekil 21. CTLA-4 eksikliği hastalarının klinik bulguları.

Bulgular belirtilirken farklı renk kullanılmıştır. AIHA, otoimmünhemolitik anemi; ITP, idiopatik-trombositopenik purpura; HM, hepatomegali; LAP, lenfadenopati; LRTI, alt solunum yolu enfeksiyonları; SM, splenomegali; URTI, üst solunum yolu enfeksiyonları.

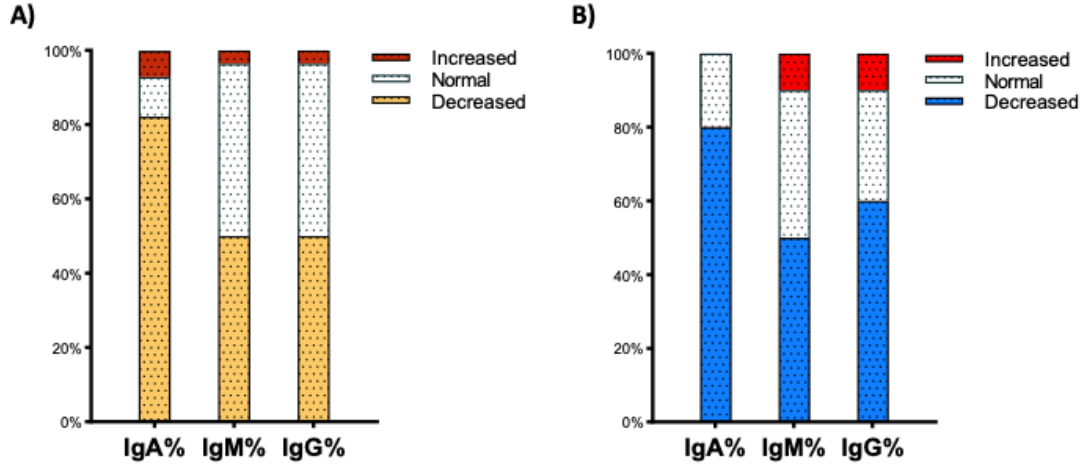
CTLA-4 eksikliği hastalarının klinik fenotipinde de LRBA eksikliğine benzer şekilde tekrarlayan enfeksiyonlar (n=9 [75,0%]), immün disregülasyon (ID) (n=10 [83,3%]) ve lenfoproliferasyon (LP) (n=7 [58,3%]) olmak üzere üç ana bulgu hakimdi. CTLA-4 eksikliği hastalarındaki diğer bulgular incelendiğinde hastalarda; büyüme geriliği (n=3 [25,0%]) (CM6, CM10 ve CM11), osteoporoz (n=2 [16,7%]) (CM3 ve CM7) ve pulmoner tromboemboli (n=1 [8,3%]) (CM1) olduğu gözlemlendi.

CTLA-4 eksikliği hastalarındaki ID bulguları incelendiğinde hastaların yarısında kronik diyare (n=6 [50,0%]) hakimdi. Hastalarda en baskın görülen hematolojik belirti AIHA (n=7 [58,3%]) idi. ITP ise sadece 4 (33,3%) hastada gözlemlendi. Evans sendromu yalnızca üç (25,0%) hastada (CM1, CM2 ve CM3) gelişti. Aynı şekilde Hashimoto tiroidi bulgusuna sahip dört (33,3%) hasta (CM3, CM6, CM7 ve CM8) vardı. CTLA-4 eksikliği hastalarında daha nadir ID bulgusu olarak artrit (CM7) ve alopesi (CM6) bulguları birer (8,3%) hastada gözlemlendi. Vitiligo ve psöriazis bulguları ise yalnızca bir hastada (n=1 [8,3%]) (CM9) saptandı.

LP ile ilişki bulgulara bakıldığında hastalarda en sık splenomegali (n=7 [58,3%]) hakimdi. Diğer LP bulgularından hepatomegali ve LAP hastaların yarısında (n=6 [50%]) gözlemlendi.

4.1.3 LRBA ve CTLA-4 Eksikliği Hastalarının İmmünolojik Fenotipleri

LRBA eksikliği hastalarının immünolojik verileri 28 hastaya göre değerlendirildi. Damar içi immünoglobulin tedavisinden önce değerlendirilen serum immünoglobulin seviyelerine bakıldığında 14 (50,0%) hastada IgG, 23 (82,1%) hastada IgA ve 14 (50,0%) hastada IgM düşük bulundu. Geriye kalan hastalar normal ve yüksek seviyelerdeydi. (Şekil 22A).



Şekil 22. A) LRBA eksikliği ve B) CTLA-4 eksikliği hastalarının IgA, IgM ve IgG serum immünoglobulin seviyeleri.

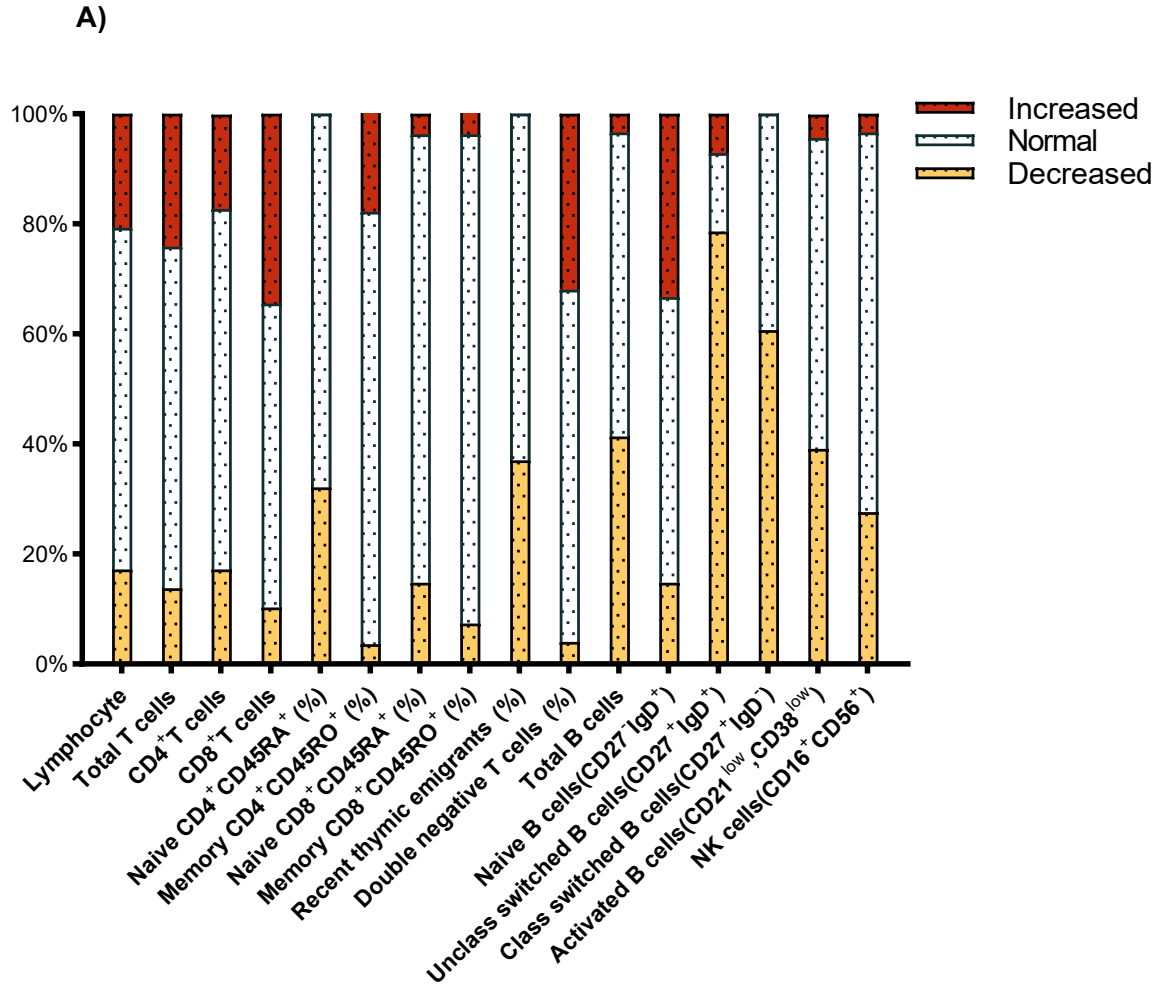
Hastaların T, B, NK hücreler ve T hücre ve B hücre alt tipleri için flow sitometri analizi değerlendirildi (Şekil 23A). CD3+ T lenfositlerin sayısı 4 (13,8%) hastada düşük, 7 (24,1%) hastada yüksek sayıda bulundu. CD4+ T lenfositlerin sayısına bakıldığında 5 (17,2%) hastada düşük iken, CD8+ T lenfositlerin sayısı 3 (10,3%) hastada düşük bulundu. DNT hücrelerin sayısı 8 (27,5%) hasta için artmış olarak gözlemlendi ve bunlar başlangıçta ALPS olarak değerlendirildi.

B hücrelerin sayısı incelendiğinde, toplam B hücre sayısı 41,4% hastada düşük bulundu. Alt tiplerine bakıldığında; 33,3% hastada artmış naif B (CD27-IgD+) hücreler, sınıf dönüşümü yapmış hafıza B (CD27-IgD-) hücreler 60,7% hastada azalmış sayıda ve aktive olmuş (CD21^{low}CD38^{low}) B hücreler 4,3% hastada artmış olarak bulundu. Bu verilerin hepsi B hücre anomalisi ile ilişkilendirildi. NK hücrelerine bakıldığında 27,6% hastada düşüklük gözlemlendi.

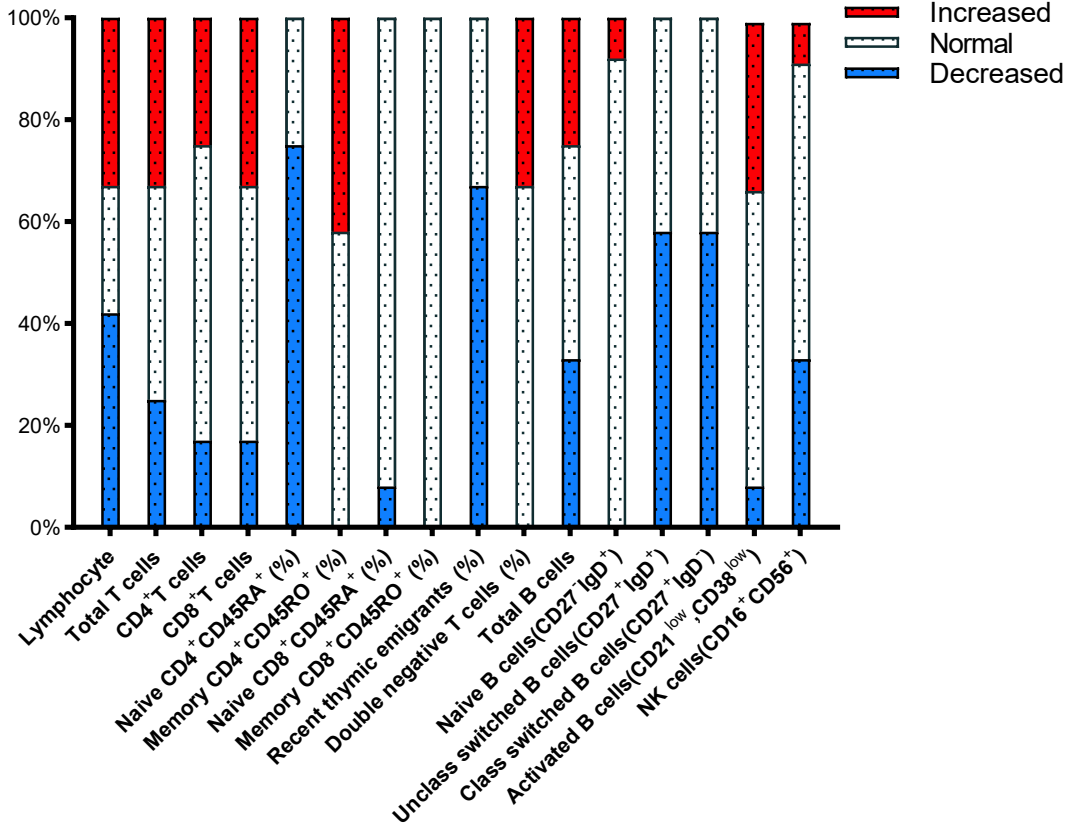
CTLA-4 eksikliği hastalarının immünolojik verileri ise 10 hastaya göre değerlendirildi. Damar içi immünoglobulin tedavisinden önce değerlendirilen serum immünoglobulin seviyelerine

bakıldığında 6 (60,0%) hastada IgG, 8 (80,0%) hastada IgA ve 5 (50,0%) hastada IgM düşük bulundu. Geriye kalan hastalar normal ve yüksek seviyelerdeydi (Şekil 22B).

LRBA eksikliğinde olduğu gibi CTLA-4 eksikliği hastalarının da flow sitometri analizi değerlendirildi (Şekil 23B). 25% hastanın CD3+ T lenfositlerinin sayısında düşük iken, 33,3% hastanın ise yüksek bulundu. Hem CD4+ T lenfositlerin sayısı hem de CD8+ T lenfositlerin sayısı 16,7% hastada düşük bulundu. DNT hücrelerin sayısında ise 33,3% hasta için artış gözlemlendi.



B)

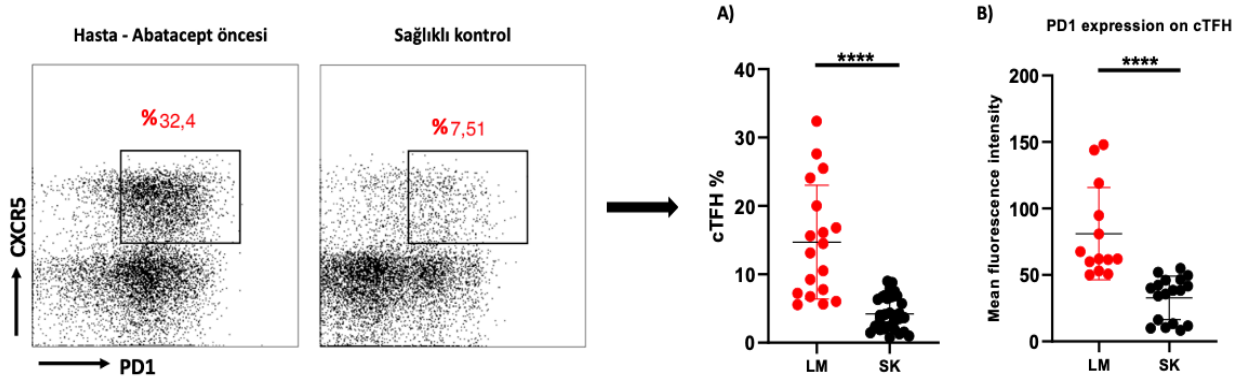


Şekil 23. A) LRBA eksikliği ve B) CTLA-4 eksikliği hastalarına ait T, B, NK hücreler ve T hücre ve B hücre alt tipleri için flow sitometri analizi sonucu hücre yüzdelerinin gösterimi.

Toplam B hücre sayısı 33,3% hastada düşük bulundu. B hücre alt tipleri için; artmış saf B (CD27-IgD⁺) hücreler 8,3% hastada, azalmış sınıf dönüşümü yapmış hafıza B (CD27-IgD⁻) hücreler 58,3% hastadave artmış aktive olmuş (CD21^{low} CD38^{low}) B hücreler ise 33,3% hastada bulundu. NK hücreler 33,3% hastada azalmış olarak gözlemlendi.

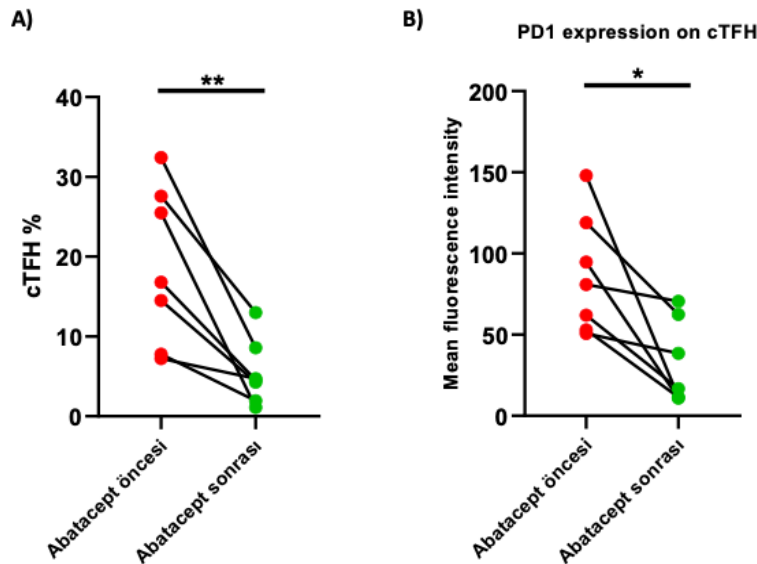
4.1.4 LRBA Eksikliği Hastalarında Tedavi Öncesi TFH Yüzdesi ve PD1 MFI Değeri Anlamlı Olarak Yüksek Saptandı.

Tedavi öncesi tam kandan yüzey boyama protokolü ile değerlendirilen TFH yüzdesi sağlıklı kontrollere göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p < 0,0001$). Bununla birlikte sağlıklı kontrollere kıyasla MFI değerleri de istatistiksel olarak yüksek bulundu ($p < 0,0001$) (Şekil 24).



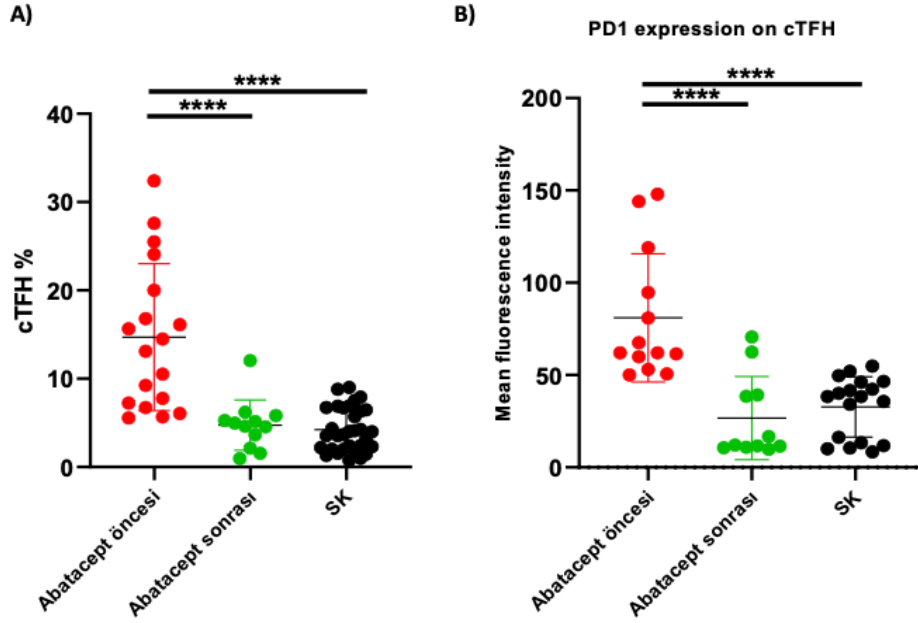
Şekil 24. (A) LRBA eksikliği hastalarında tedavi öncesi foliküler hücre oranı ve (B) foliküler hücrelerdeki PD1 MFI değeri. LM, LRBA mutant; SK, sağlıklı kontrol.

Takip edilen hastaların abatacept tedavi öncesi TFH yüzdesi tedavi sonrası değerlere göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p=0,005$). PD1 MFI değerinin de anlamlı olarak yüksek olduğu gözlemlendi ($p=0,015$) (Şekil 25).



Şekil 25. (A) LRBA eksikliği hastalarında tedavi öncesi ve tedavi sonrası foliküler hücre oranı ve (B) PD1 MFI değerlerinin karşılaştırılması.

Abatacept tedavisi uygulanan tüm hastaların tedavi öncesi TFH yüzdesi, sırasıyla tedavi sonrası ve sağlıklı kontrollere göre değerlere göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p<0,0001$) ve ($p<0,0001$). Aynı şekilde PD1 MFI değerlerinin de sırasıyla tedavi sonrası ve sağlıklı kontrollere göre anlamlı olarak yüksek olduğu gözlemlendi ($p<0,0001$) ve ($p<0,0001$). Hem TFH yüzdesi hem de PD1 MFI değerleri tedavi sonrası düşerek sağlıklı kontrollere yaklaştı ve arada anlamlı bir fark bulunamadı ($p=0,9477$) ve ($p=0,8013$) (Şekil 26). Bu sonuç ile TFH'in hastalık aktivitesini takip etmede ve ideal ilaç dozunu belirlemede yol gösterici iyi bir belirteç olduğu gösterildi.

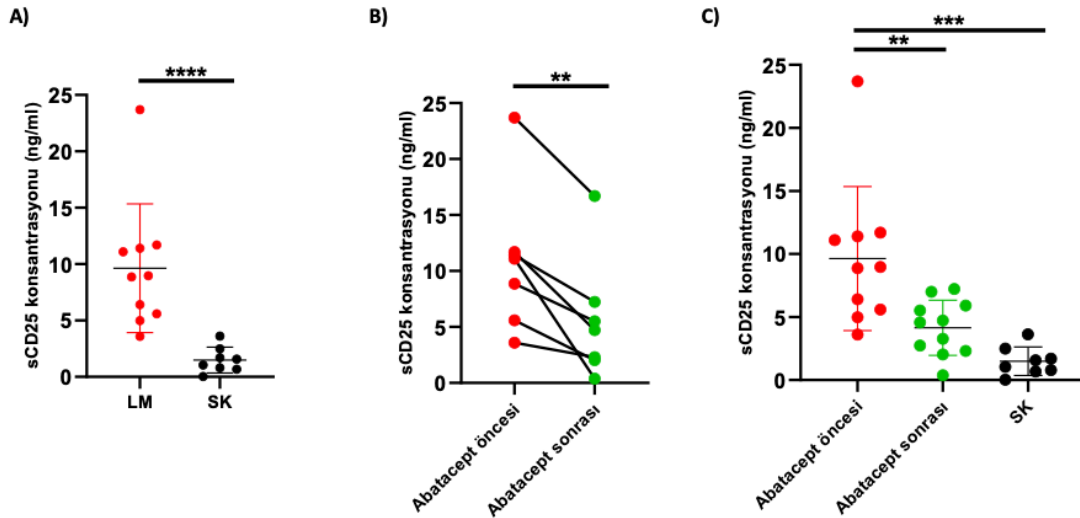


Şekil 26. (A) LRBA eksikliği hastalarında sağlıklı kontrollere göre tedavi öncesi ve tedavi sonrası foliküler hücre oranı ve (B) PD1 MFI değerlerinin kıyaslanması.

4.1.5 LRBA Eksikliği Hastalarında Tedavi Öncesi sCD25 Konsantrasyonu (ng/ml) Anlamlı Olarak Yüksek Saptandı.

Tedavi öncesi ELISA yöntemi ile ölçülen sCD25 konsantrasyonu (ng/ml) sağlıklı kontrollere göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p < 0,0001$) (Şekil 27A). Hastaların abatacept tedavisi öncesi ve tedavi sonrası sCD25 konsantrasyonu (ng/ml) kıyaslandığında, tedavi öncesi değer anlamlı olarak yüksek bulundu ($p = 0,0043$) (Şekil 27B).

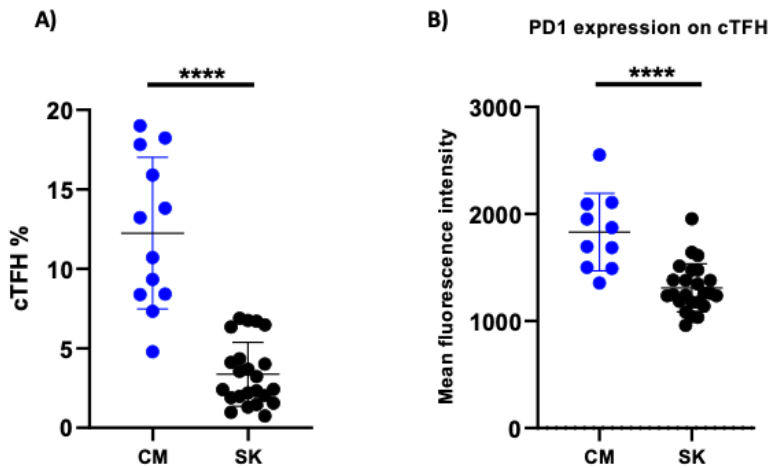
Hastaların sCD25 konsantrasyonu (ng/ml) tedavi öncesi ve sonrası sağlıklı kontrollere göre kıyaslandığında, tedavi öncesi hastaların değerleri anlamlı olarak yüksek iken ($p = 0,0002$), tedavi sonrası hastaların sCD25 değerlerinin düşerek sağlıklı kontrollere yaklaştığı ve arada anlamlı bir farkın bulunamadığı gözlemlendi ($p = 0,2801$). Tedavi öncesi ve tedavi sonrası değer arasında anlamlı bir fark vardı ($p = 0,0057$) (Şekil 27C). Bu sonuç ile TFH gibi sCD25'in hastalık aktivitesini takip etmede ve ideal ilaç dozunu belirlemede yol gösterici iyi bir belirteç olduğu bulundu.



Şekil 27. (A)LRBA eksikliği hastalarında tedavi öncesi sCD25 konsantrasyonu (ng/ml), (B) tedavi öncesi ve tedavi sonrası sCD25 konsantrasyonu (ng/ml) karşılaştırılması, (C) sağlıklı kontrollere göre tedavi öncesi ve tedavi sonrası sCD25 konsantrasyonunun karşılaştırılması. LM, LRBA mutant; SK, sağlıklı kontrol.

4.1.6 CTLA-4 Eksikliği Hastalarında Tedavi Öncesi TFH Yüzdesi ve PD1 MFI Değerine Bakıldığında Anlamlı Olarak Yüksek Bulundu.

CTLA-4 eksikliği hastalarda tedavi öncesi yapılan TFH değerlendirmesinde hem TFH yüzdesinin hem de PD1 MFI değerinin sağlıklı kontrollere kıyasla anlamlı olarak daha yüksek olduğu gözlemlendi ($p < 0,0001$ ve $p < 0,0001$) (Şekil 28).

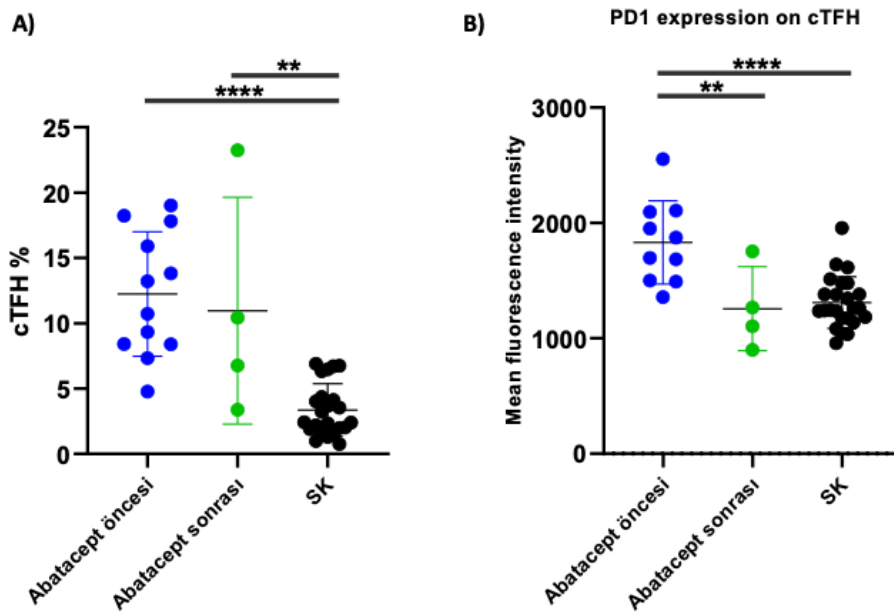


Şekil 28. (A) CTLA-4 eksikliği hastalarında tedavi öncesi foliküler hücre oranı ve (B) PD1 MFI değeri. CM, CTLA-4 mutant; SK, sağlıklı kontrol.

Tedavi altındaki tüm CTLA-4 hastalarının tedavi öncesi TFH yüzdesi sağlıklı kontrollere göre değerlere göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p < 0,0001$) (Şekil 29A). Tedavi sonrası TFH

yüzdesi tedavi öncesine göre sağlıklı kontrol ile arasındaki fark azaldı ama yine de anlamlı olarak yüksekti ($p=0,0032$). Bunun nedeni alınan tedavinin kısa süreli olmasına bağlandı (hastaların çoğu analiz sırasında tedavilerinin üçüncü ayında idi).

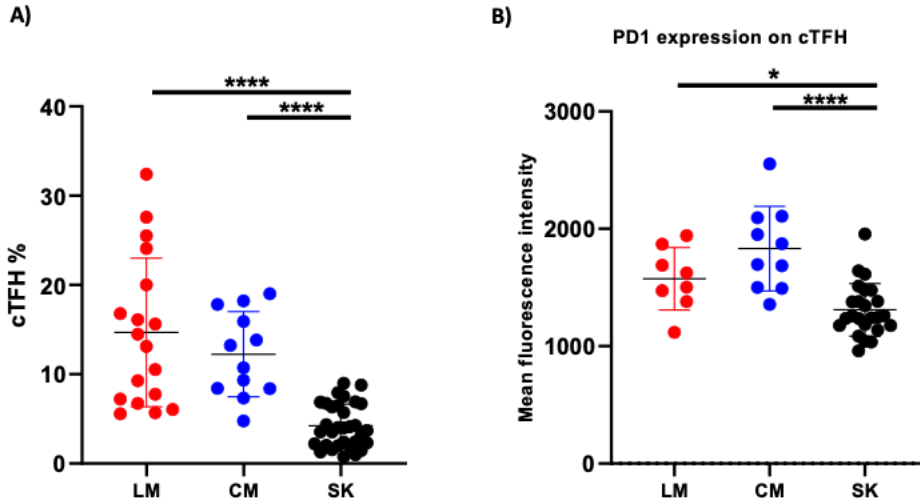
PD1 MFI değerlerine bakıldığında tedavi öncesi sağlıklı kontrollere göre anlamlı olarak yüksek olduğu gözlemlendi ($p<0,0001$). Tedavi öncesi değer ile tedavi sonrası değer arasında da anlamlı bir fark varken ($p=0,0027$), tedavi sonrası değerlerin düşmesi nedeniyle sağlıklı kontroller ile arasında anlamlı bir fark bulunamadı ($p=0,7265$) (Şekil 29B). Bu sonuç, PD1'in hastalık aktivitesini takip etmede iyi bir belirteç olduğunu göstermektedir.



Şekil 29. (A) CTLA-4 eksikliği hastalarında sağlıklı kontrollere göre tedavi öncesi ve tedavi sonrası foliküler hücre oranı ve (B) PD1 MFI değerlerinin karşılaştırılması. SK, sağlıklı kontrol.

4.1.7 LRBA ve CTLA-4 Eksikliği Hastalarında Tedavi Öncesi TFH Yüzdesi ve PD1 MFI Değeri Sağlıklı Kontrollere Göre Anlamlı Olarak Yüksek Saptandı.

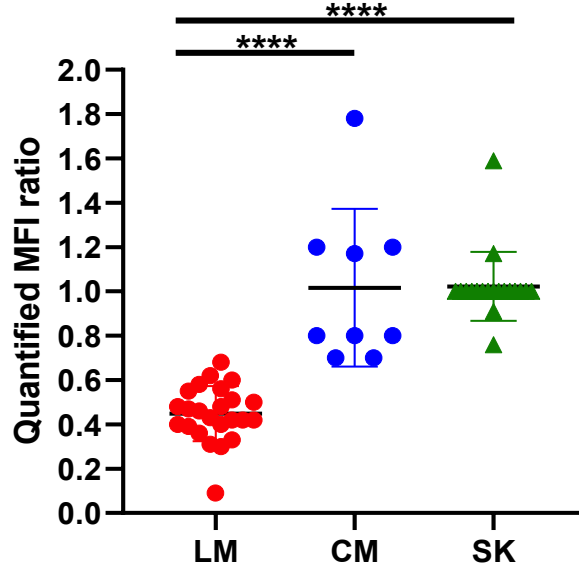
Tedavi öncesi dönemde hastaların TFH yüzdesi bir arada incelendiğinde hem LRBA eksikliği hem de CTLA-4 eksikliği hastalarında sağlıklı kontrollere kıyasla TFH yüzdesi anlamlı olarak yüksek bulundu, sırasıyla ($p<0,0001$) ve ($p<0,0001$). LRBA ve CTLA-4 eksikliği arasında ise anlamlı bir fark yoktu ($p=0,4240$) (Şekil 30A). Aynı şekilde MFI değerleri incelendiğinde LRBA eksikliği ve sağlıklı kontrollere arasında anlamlı bir fark ($p=0,0413$), aynı şekilde CTLA-4 eksikliği ve sağlıklı kontroller arasında da anlamlı bir fark bulundu ($p<0,0001$) (Şekil 30B).



Şekil 30. (A) LRBA ve CTLA-4 eksikliği hastalarında sağlıklı kontrollere göre tedavi öncesi foliküler hücre oranı ve (B) PD1 MFI değerlerinin karşılaştırılması. *LM, LRBA mutant; CM, CTLA-4 mutant; SK, sağlıklı kontrol.*

4.1.8 LRBA Protein İfadesi Sadece LRBA Eksikliği Hastalarında Anlamlı Olarak Düşük Saptandı.

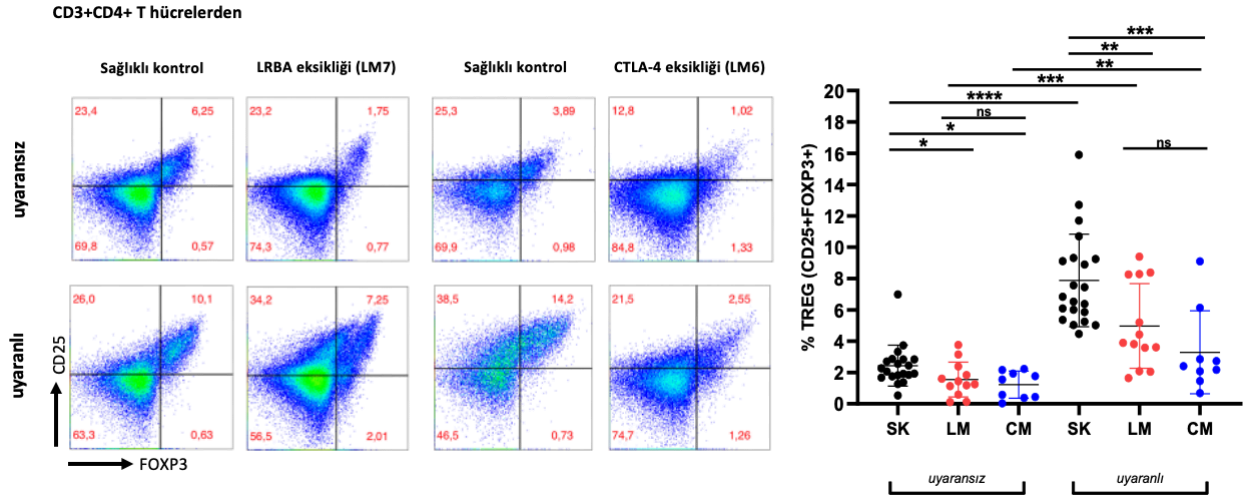
Lenfosit popülasyonunun belirlenmesinin ardından, single cells hücreler kapılandı ve bu hücrelerdeki LRBA protein ifadesi histogram olarak görüntülendi ve ham MFI değerleri hesaplandı (Şekil 10). Kontrol ve her bir hasta için; öncelikle LRBA antikor ekli hücrelerinin ham MFI değerleri kendi izotip hücrelerinin ham MFI değerlerine oranlandı. Ardından hastaların MFI değerindeki değişimi karşılaştırmak amacıyla kontrol grubunun oranlanmış MFI değerine göre hastalar normalleştirilerek nicelendirildi. Buna göre LRBA protein ifadesi LRBA eksikliği, CTLA-4 eksikliği ve sağlıklı kontrollere arasında değerlendirildi. LRBA eksikliği hastalarında LRBA protein ifadesi, CTLA-4 eksikliği ($p < 0,0001$) ve sağlıklı kontrol grubuna ($p < 0,0001$) kıyasla anlamlı olarak düşük bulundu. CTLA-4 eksikliği ve sağlıklı kontrol grubu arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu ($p = 0,9968$) (Şekil 31).



Şekil 31. LRBA ve CTLA-4 eksikliği hastalarında sağlıklı kontrollere göre LRBA protein ifadelerinin karşılaştırılması. *Quantified MFI ratio: Değerler sağlıklı kontrollere göre normalize edilmiştir.* LM, LRBA mutant; CM, CTLA-4 mutant; SK, sağlıklı kontrol.

4.1.9 CD25+FOXP3+ Treg Hücre Yüzdesi Hem LRBA Eksikliği Hem de CTLA-4 Eksikliği Hastalarında Anlamlı Olarak Düşük Saptandı.

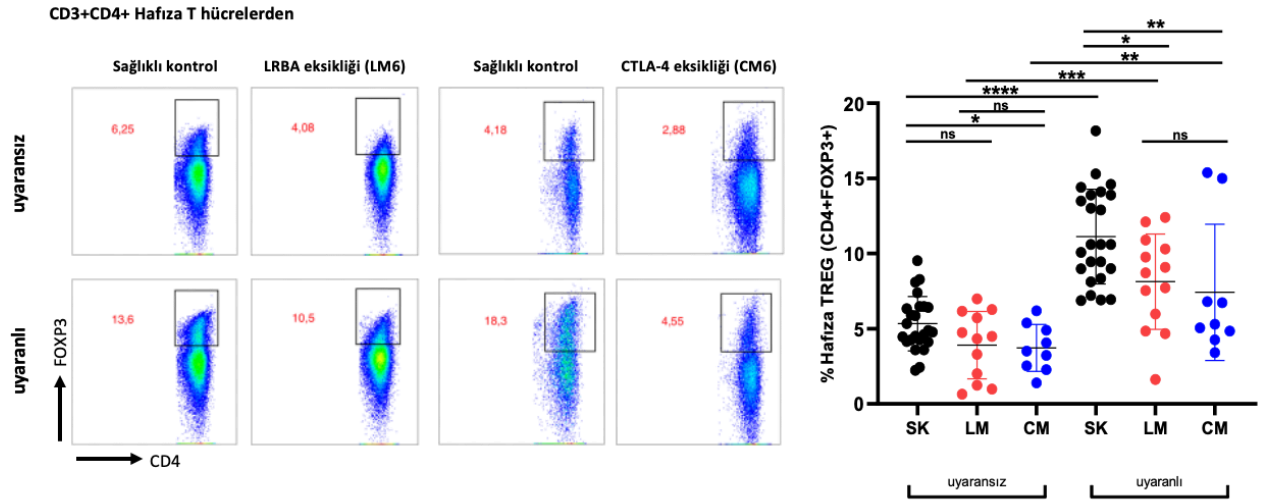
LRBA eksikliği, CTLA-4 eksikliği ve sağlıklı kontrol gruplarının hem uyaransız hem de T hücre aktivasyon boncuğu ile 16 saatlik uyarımlarının ardından CD3+CD4+ kapısından FOXP3+CD25+ Treg hücrelerin yüzdesi değerlendirildi. Uyarımsız koşulda gruplar kendi arasında incelendiğinde sağlıklı kontroller ile LRBA ve CTLA-4 eksikliği hastalarında anlamlı fark saptandı (sırasıyla, $p=0,0257$, $p=0,0117$). LRBA ve CTLA-4 eksikliği hastalarındaki hücre yüzdeleri karşılaştırıldığında uyaransız koşulda aralarında anlamlı bir fark bulunamadı ($p=0,7021$). Gruplar kendi içlerinde uyaransız ve uyarımlı olarak kıyaslandığında; uyarımın ardından sağlıklı kontrollerdeki CD25+FOXP3+ Treg hücrelerin yüzdesi anlamlı olarak yüksek bulundu ($p<0,0001$). LRBA ve CTLA-4 eksikliği hastalarında da hücreler sırasıyla anlamlı olarak artış gösterdi ($p=0,0005$ ve $p=0,0039$). Uyarımlı ortamdaki gruplar kendi aralarında incelendiğinde hem LRBA eksikliği hem de CTLA-4 eksikliği hastalarında CD25+FOXP3+ Treg yüzdesi sağlıklı kontrollere kıyasla düşük bulundu sırasıyla bu fark istatistiksel olarak $p=0,0052$ ve $p=0,0005$ şeklinde idi (Şekil 32).



Şekil 32. LRBA ve CTLA-4 eksikliği hastalarında CD25+FOXP3+ Treg hücrelerin yüzdelерinin karşılaştırılması. LM, LRBA mutant; CM, CTLA-4 mutant; SK, sağlıklı kontrol.

4.1.10 CD4+FOXP3+Hafıza Treg Hücre Yüzdesi Hem LRBA Eksikliği Hem de CTLA-4 Eksikliği Hastalarında Anlamlı Olarak Düşük Saptandı.

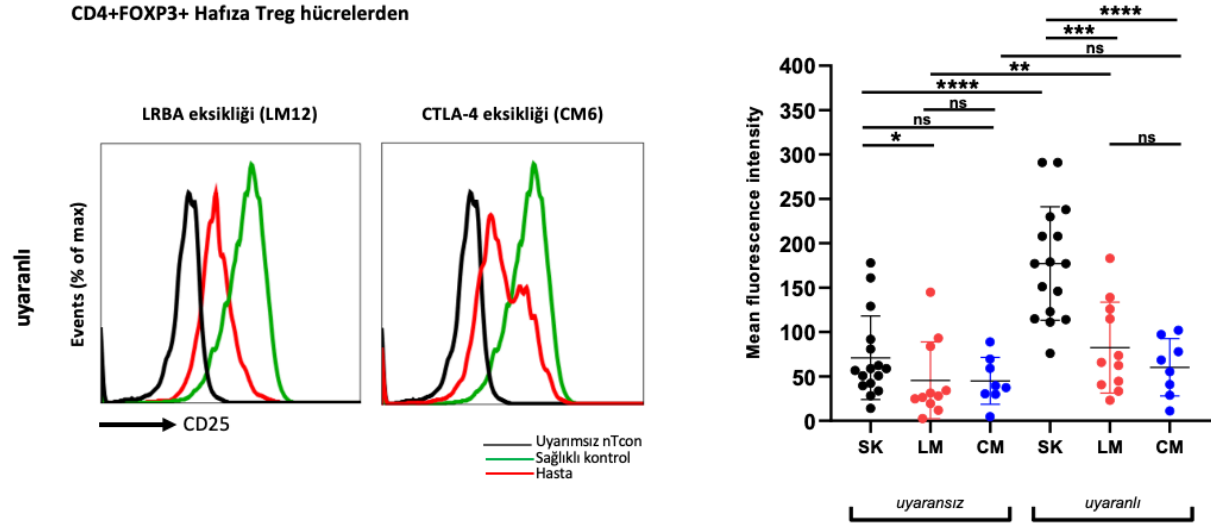
Uyaransız ve uyaranlı ile 16 saatlik uyarımın ardından CD3+CD4+ kapısından hafıza hücreler kapılandı (CD3+CD4+CD45RO+). Bu kapıdan ise hafıza Treg (CD45RO+CD4+FOXP3+) hücrelerin yüzdesi değerlendirildi. Uyaransız ortamda sağlıklı kontroller ve LRBA eksikliği hastalarındaki hücre yüzdeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir bulunmazken ($p=0.1098$), sağlıklı kontrollerdeki hafıza Treg hücrelerin yüzdesi CTLA-4 eksikliği hastalarına oranla daha yüksek bulundu ($p=0.0279$). LRBA ve CTLA-4 eksikliği hastalarındaki hücre yüzdeleri karşılaştırıldığında ise uyaransız koşulda aralarında anlamlı bir fark bulunamadı ($p=0.6470$). T hücre aktivasyon boncuğu ile uyarımın ardından gruplar kendi içlerinde uyaransız ve uyaranlı olarak karşılaştırıldığında; CD4+CD25+FOXP3+ Treg hücrelere benzer şekilde sağlıklı kontrollerde ($p<0,0001$) ve LRBA eksikliği ($p=0,0005$) ve CTLA-4 eksikliği ($p=0,0039$) hastalarında CD4+FOXP3+ hafıza Treg hücrelerin yüzdesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış bulundu. Uyarımla birlikte LRBA eksikliği ve CTLA-4 eksikliği hastalarında CD4+FOXP3+ Treg hücrelerin yüzdesi sağlıklı kontrollere oranla daha düşük bulundu ve sırasıyla bu fark istatistiksel olarak $p=0,0229$ ve $p=0,0093$ şeklinde idi (Şekil 33).



Şekil 33. LRBA ve CTLA-4 eksikliği hastalarında CD4+FOXP3+ hafıza Treg hücrelerin yüzdelерinin karşılaştırılması. LM, LRBA mutant; CM, CTLA-4 mutant; SK, sağlıklı kontrol.

4.1.11 CD4+FOXP3+ Hafıza Treg Hücrelerdeki CD25 Protein İfadesi LRBA Eksikliği ve CTLA-4 Eksikliği Hastalarında Anlamlı Olarak Düşük Saptandı.

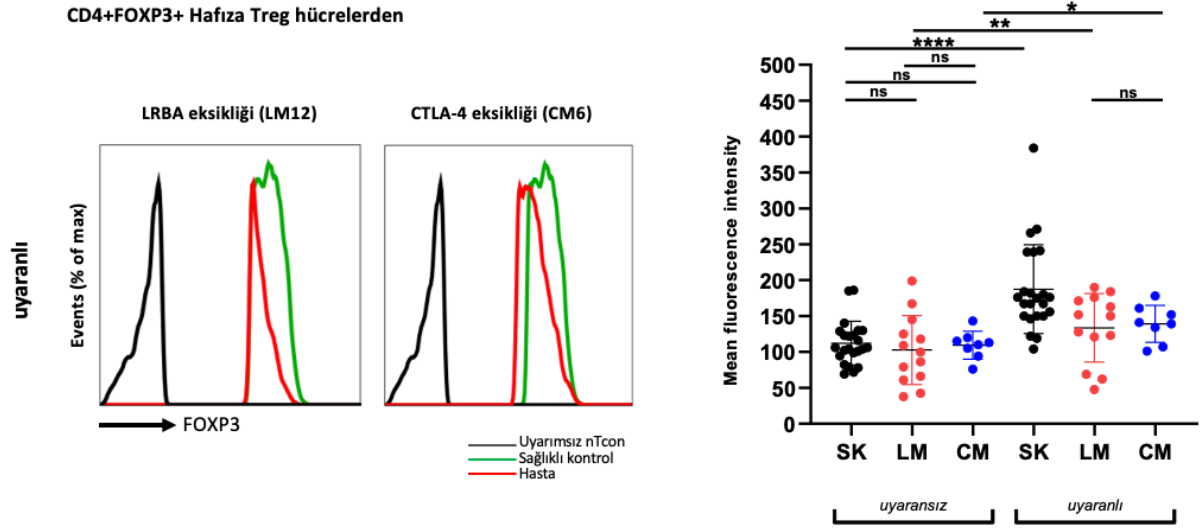
Uyaransız ve boncuk ile 16 saatlik uyarımın ardından CD4+FOXP3+ hafıza Treg hücrelerdeki CD25 protein ifadesi değerlendirildi. Uyaransız koşulda sadece sağlıklı kontrol grubu ve LRBA eksikliği hastaları arasında anlamlı bir fark var iken ($p=0,0485$), sağlıklı kontrol grubu ve CTLA-4 eksikliği hastalarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ($p=0,2318$). LRBA eksikliği ve CTLA-4 eksikliği hastalarındaki CD25 protein ifadesi karşılaştırıldığında uyaransız koşulda anlamlı bir fark yoktu ($p=0,4421$). Boncuk ile uyarımın ardından gruplar kendi içlerinde uyaransız ve uyaranlı olarak karşılaştırıldığında; sağlıklı kontrol grubu ve LRBA eksikliği hastalarında CD25 protein ifadesi artış gösterdi (SK: $p<0,0001$ ve LM: $p=0,0020$). CTLA-4 eksikliği hastalarında ise CD25 protein ifadesi uyarım ile değişmedi ($p=0,2500$). Uyarımın ardından gruplar karşılaştırıldığında hem LRBA hem de CTLA-4 eksikliği hastalarında CD25 protein ifadesi sağlıklı kontrol grubuna oranla daha düşük bulundu ve sırasıyla bu fark istatistiksel olarak $p=0,0008$ ve $p<0,0001$ şeklinde idi (Şekil 34).



Şekil 34. LRBA ve CTLA-4 eksikliği hastalarında CD25 protein ifadesinin değerlendirilmesi. LM, LRBA mutant; CM, CTLA-4 mutant; SK, sağlıklı kontrol.

4.1.12 CD4+FOXP3+ Hafıza Treg Hücrelerdeki FOXP3 Protein İfadesi LRBA Eksikliği ve CTLA-4 Eksikliği Hastalarında Anlamlı Olarak Düşük Saptandı.

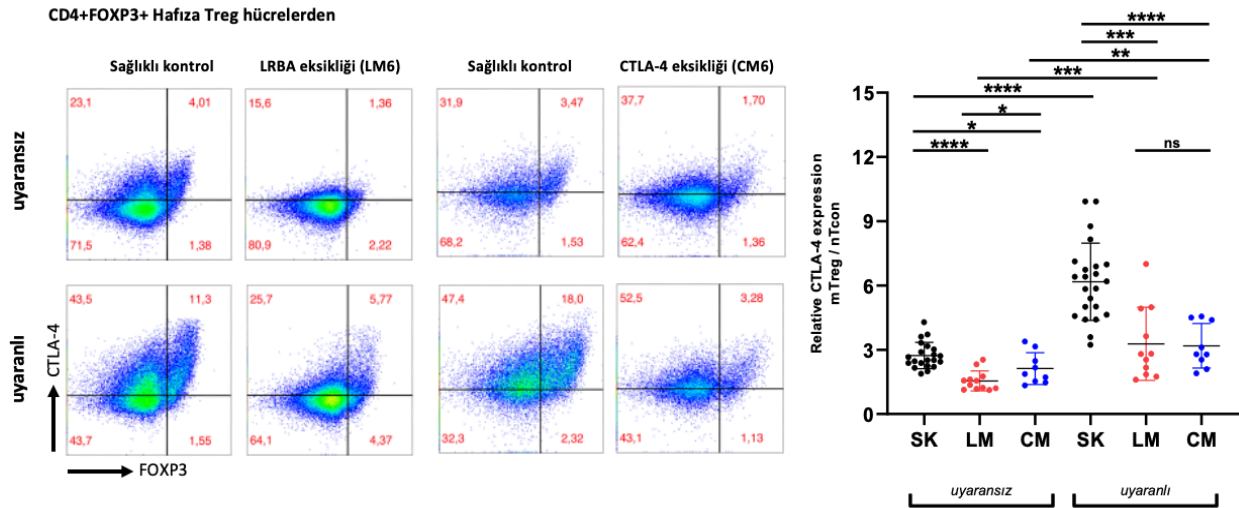
On altı saatlik T hücre aktivasyonundan sonra hafıza CD4+FOXP3+ Treg hücrelerdeki FOXP3 protein ifadesi değerlendirildi. Uyaransız ortamda hücre grupları arasında FOXP3 protein ifadesi karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamadı. İstatiksel olarak bu değerler; sağlıklı kontrol grubu ve LRBA eksikliği hastaları arasında $p=0,4296$, sağlıklı kontrol grubu ve CTLA-4 eksikliği hastaları arasında $p>0,9999$ ve LRBA eksikliği ve CTLA-4 eksikliği hastaları arasında ise $p=0,5951$ olarak bulundu. Uyarımın ardından gruplar kendi içlerinde uyaransız ve uyaranlı olarak karşılaştırıldığında; hem sağlıklı kontroller hem de LRBA ve CTLA-4 eksikliği hastalarında uyarım ile FOXP3 protein ifadesi anlamlı bir artış gösterdi (SK: $p<0,0001$, LM: $p=0,0081$ ve CM: $p=0,0391$). Uyarımla birlikte gruplar arasında karşılaştırma yapıldığında, LRBA ve CTLA-4 eksikliği hastalarında FOXP3 protein ifadesi sağlıklı kontrollere oranla anlamlı olarak düşük bulundu ve bu fark istatistiksel olarak sırasıyla $p=0,0357$ ve $p=0,0150$ şeklinde idi (Şekil 35).



Şekil 35. LRBA ve CTLA-4 eksikliği hastalarında FOXP3 protein ifadesinin değerlendirilmesi. LM, LRBA mutant; CM, CTLA-4 mutant; SK, sağlıklı kontrol.

4.1.13 CD4+FOXP3+ Hafıza Treg Hücrelerdeki CTLA-4 Protein İfadesi Bazal Seviyede En Düşük LRBA Eksikliği Hastalarında Görüldü.

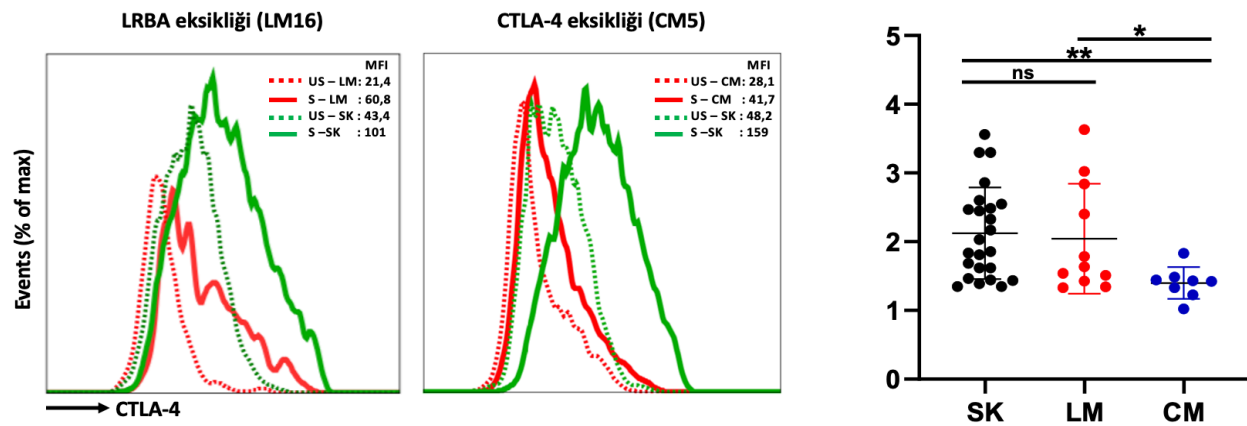
On altı saatlik T hücre aktivasyonu ile CD4+FOXP3+ hafıza Treg hücrelerdeki hücre içi CTLA-4 protein ifadesi incelendi. Hem uyaransız hem de uyaralı ortamdaki grupların CTLA-4 protein ifadesi, iç kontrol olarak kullanılan her bir grubun kendi uyaransız nTcon hücrelerindeki CTLA-4 protein ifadesine bölündü ve elde edilen değerler karşılaştırıldı. Buna göre uyaransız ortamdaki hücre grupları arasında CTLA-4 protein ifadesi değerlendirildiğinde; sağlıklı kontrol grubu ve LRBA eksikliği hastaları arasında $p < 0,0001$, sağlıklı kontrol grubu ve CTLA-4 eksikliği hastaları arasında $p = 0,0265$ ve LRBA eksikliği ve CTLA-4 eksikliği hastaları arasında ise $p = 0,0313$ olarak bulundu. Uyarımın ardından gruplar kendi içlerinde uyaransız ve uyaralı olarak karşılaştırıldığında; uyarımla birlikte sağlıklı kontroller ve LRBA ve CTLA-4 eksikliği hastalarının hepsinde CTLA-4 protein ifadesinde anlamlı bir artış görüldü (SK: $p < 0,0001$, LM: $p = 0,0010$ ve CM: $p = 0,0039$). Uyarımdan sonra gruplar arasında CTLA-4 ifadesi karşılaştırıldığında, LRBA eksikliği hastalarında CTLA-4 protein ifadesi sağlıklı kontrollere kıyasla düşük bulundu ($p = 0,0002$), CTLA-4 eksikliği ve sağlıklı kontroller arasında ise bu düşüklük daha fazlaydı ($p < 0,0001$). Ancak uyarımlı ortamda LRBA ve CTLA-4 eksikliği arasında anlamlı bir fark bulunmadı (Şekil 36).



Şekil 36. LRBA ve CTLA-4 eksikliği hastalarında CTLA-4 protein ifadesinin değerlendirilmesi. LM, LRBA mutant; CM, CTLA-4 mutant; SK, sağlıklı kontrol.

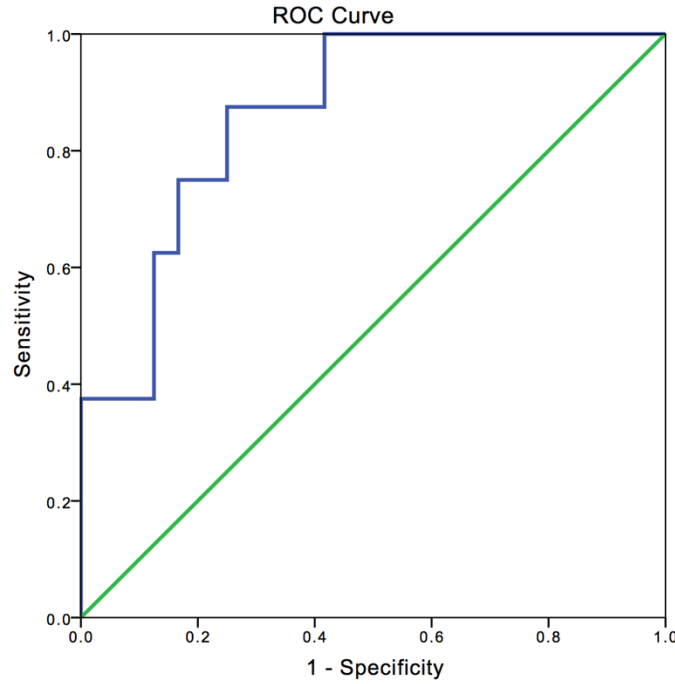
4.1.14 T Hücre Aktivasyonu ile CTLA-4 Protein İfadesindeki Artış LRBA Eksikliği Hastalarında CTLA-4 Eksikliğine Göre Daha Yüksek Bulundu.

On altı saatlik T hücre aktivasyonu ile CD4+FOXP3+ hafıza Treg/uyaransız nTcon CTLA-4 ifadesi kat artışı (fold change) incelendi. Buna göre uyarımın ardından CTLA-4 protein ifadesi değerlendirildiğinde; en fazla artış sağlıklı kontrol grubundaydı (ortalama 2.1 kat). LRBA eksikliğinde ortalama 2 kat, CTLA-4 eksikliğinde ortalama 1.4 kat artış saptandı. Sağlıklı kontrol grubu ile LRBA eksikliği arasında fark yokken, Sağlıklı kontroller ile CTLA-4 eksikliği arasında anlamlı fark saptandı ($p=0,0013$). LRBA eksikliği ve CTLA-4 eksikliği arasında da anlamlı fark bulundu ($p=0,0409$) (Şekil 37).



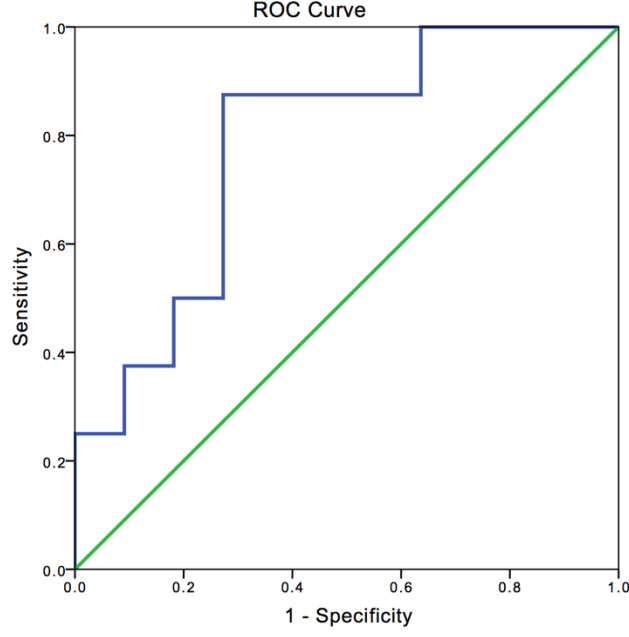
Şekil 37. Uyarımdan sonra LRBA ve CTLA-4 eksikliği hastalarında CTLA-4 protein ifadesindeki artışın değerlendirilmesi. LM, LRBA mutant; CM, CTLA-4 mutant; SK, sağlıklı kontrol.

Receiver operating characteristic (ROC) curve analizine göre, CTLA4 eksikliği olgularında uyarım ile CTLA4 ekspresyonu kat artışına göre hastalığı yakalama derecesi değerlendirildi. Buna göre kestirim değeri 1.8 kat altı alındığında, CTLA4 ekikliği olgularını LRBA eksikliği olgularından ayırt etme gücünün duyarlılığı: %100, özgüllüğü: 58,3 olduğu bulundu. Doğrunun altında kalan alan %86,5 (CI: 73,4-99,5) olarak belirlendi. Pozitif prediktif index: %53,3, negatif prediktif index: %100 olarak hesaplandı (Şekil 38).



Şekil 38. Receiver operating characteristic (ROC) curve analizi. Doğrunun altında kalan alan, duyarlılık ve özgüllük değerleri gösterilmektedir. Değerlendirme LRBA ve CTLA4 eksikliği olguları arasında yapıldı.

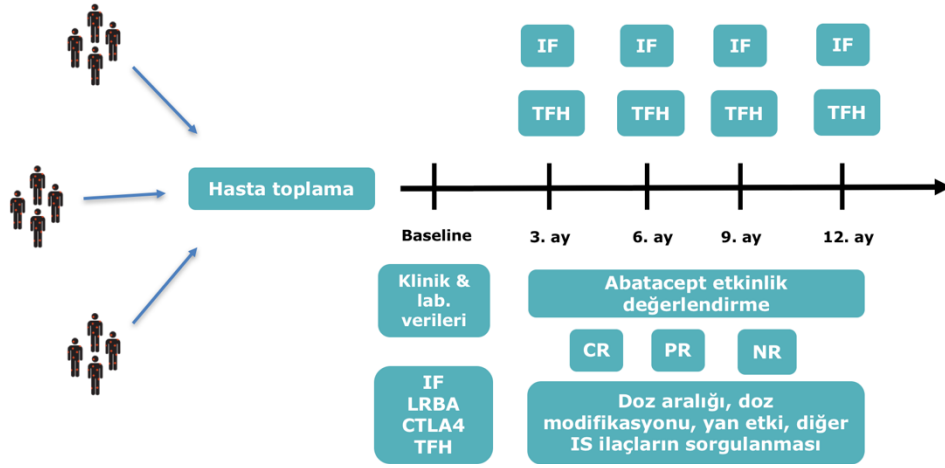
Öte yandan, CTLA4 eksikliğini sağlıklı kontrollerden ayırt etmek için 2.1 kestirim değeri ROC eğrisine göre belirlendi. Buna göre CTLA4 kat artışı 2.1 altı olan olgular incelendiğinde, CTLA4 eksikliğini sağlıklı kontrollerden ayırt etme gücünün duyarlılığı: %100, özgüllüğü: 36,7 olarak saptandı. Doğrunun altında kalan alan %78,4 (CI: 57,3-99,5) idi. Pozitif prediktif index: %40, negatif prediktif index: %100 olarak hesaplandı.



Şekil 39. Receiver operating characteristic (ROC) curve analizi. Doğrunun altında kalan alan, duyarlılık ve özgüllük değerleri gösterilmektedir. Değerlendirme CTLA4 eksikliği ve sağlıklı olgular arasında yapıldı.

4.1.15 Hedefe Yönelik İlaç Olan Abatacept'in Hastalık Aktivitesini Kontrol Etmede Başarılıdır.

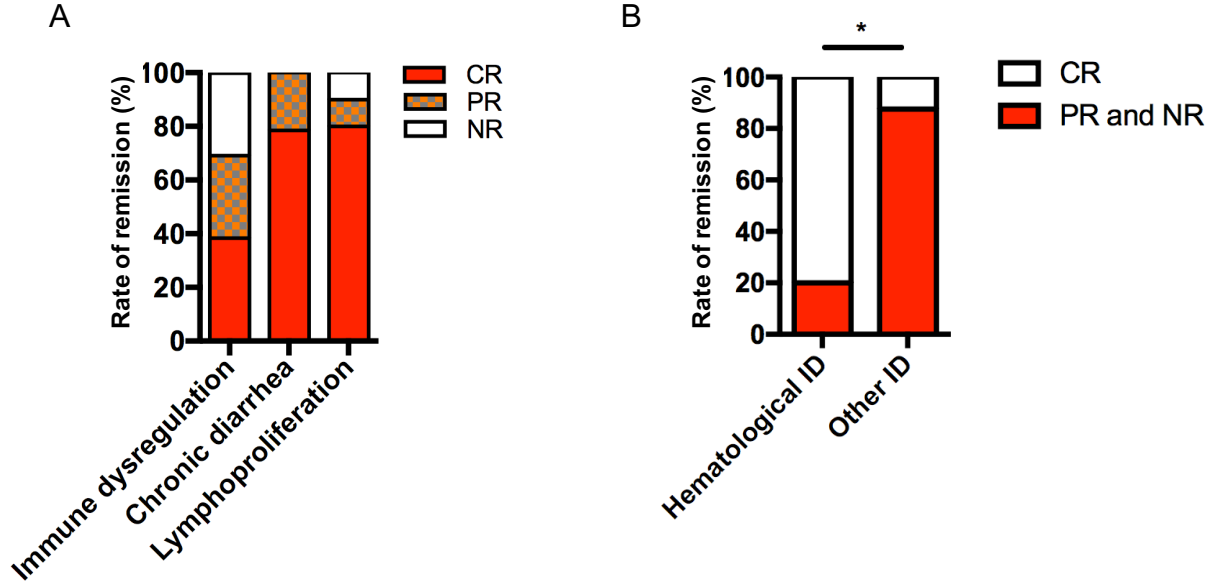
LRBA eksikliği olan olguların uzun dönem takiplerini de projemiz sırasında ileriye yönelik olarak değerlendirildi. Buna göre tanısı konulan hastalar proje sırasında hedeflenmiş tedavi olan abatacept “CTLA4-Ig füzyon protein” ile tedavi edildi ve tedavi etkinliği literatürde ilk defa ileri yönelik olarak 3 ayda bir değerlendirildi. Bu değerlendirme için Türkiye'nin farklı merkezindeki (12 farklı immünoloji merkezi) hastaların örnekleri laboratuvarımıza gönderildi. Çalışma tasarımı Şekil 40'de sunulmaktadır.



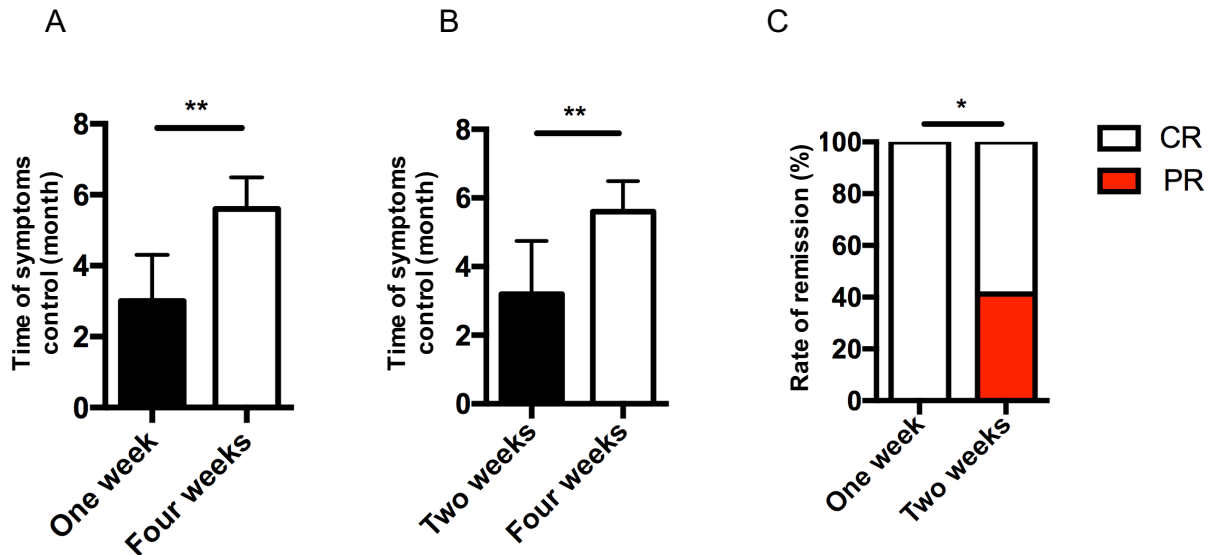
Şekil 40. Çalışma dizaynı. IF: İmmün fenotipleme, LRBA ve CTLA4 flow sitometri ile hücre içi boyama yapılarak değerlendirildi. TFH: Yardımcı foliküler T hücreler, CR: Complete remission, PR: partial remission, NR: nonresponsive.

Klinik ve laboratuvar parametrelerindeki değişimler (bazal ve tedavi sonrası) toplam 18 hastada düzenli olarak karşılaştırıldı. Ortanca ilaç kullanım süresi 12,5 ay (aralık: 5 – 33) idi. İlaçla ilişkili tam kontrolün en iyi lenfoproliferasyon (LP) ve kronik diarede sağlanırken, bunu immün disregülasyon (ID); özellikle otoimmün sitopenilerin izlediği görüldü (Şekil 41A). İmmün disregülasyon içerisinde en iyi yanıt hematolojik hastalıklarda olduğu saptandı (otoimmün sitopeniler), diğer ID’lerde ise (diyabet, alopesia, demiyelizan hastalık, intersitisyel akciğer hastalıkları) ilaca kısmı veya hiç yanıt vermediği görüldü (Şekil 41B). Abatacept tedavisinin haftalık veya iki hafta ara ile verilmesi, dört haftada bir tedavisine göre anlamlı olarak daha iyi hastalık kontrolü sağlamakta idi (Şekil 42A, B). Ayrıca bir hafta ara ile verilen ilaç tedavisinde tam yanıtılık oranı iki haftalık tedaviye göre anlamlı olarak daha yüksek idi (Şekil 42B). Çalışma boyunca abatacept ile ilişkili ciddi yan etki gözlenmedi. Daha önceki çalışmamızda, LRBA ve CTLA4 eksikliği olgularında cTFH arttığı ve bu artışın CTLA4 molekülünün azlığı nedeniyle olduğu ve *in-vitro* olarak CTLA4 verildiğinde TFH sayılarının azaldığı saptanmıştı (Alroqi FJ vd., 2018). Kısıtlı sayıdaki deneyimizin doğruluğunu daha fazla sayıda LRBA eksikliği olgusunda test etme şansını bu projemizde elde edebildik. Buna göre, kandan ölçülen cTFH’lerin sayısı hastalık aktivitesini göstermede başarılı idi ve tedavi ile anlamlı olarak düştüğü gözlemlendi (tedavi öncesi ve sonrası düzenli ölçüm yapılan hasta sayısı: 10) (Şekil 43A, B ve C). Ayrıca bu olgularda aktivasyon belirteci olarak ölçülen PD1 ifadesinin tedavi ile birlikte cTFH hücre popülasyonunda azaldığı belirlendi (Şekil 43D, E ve F). Abatacept tedavisi altında hastaların naif CD4 ve CD8+ T hücre yüzdelerinin anlamlı olarak arttığı görüldü. Diğer immün parametrelerde bir değişiklik saptanmadı. Çalışmamız TUBİTAK destekli olarak Eylül 2019 tarihinde ‘Journal of Allergy and Clinical Immunology-in practice’ dergisinde yayınlanmıştır (etki faktörü 7.6). Çalışmamız kısa sürede 20 adet atıf almıştır (Kiykim vd., 2019). Sonuçlarımız

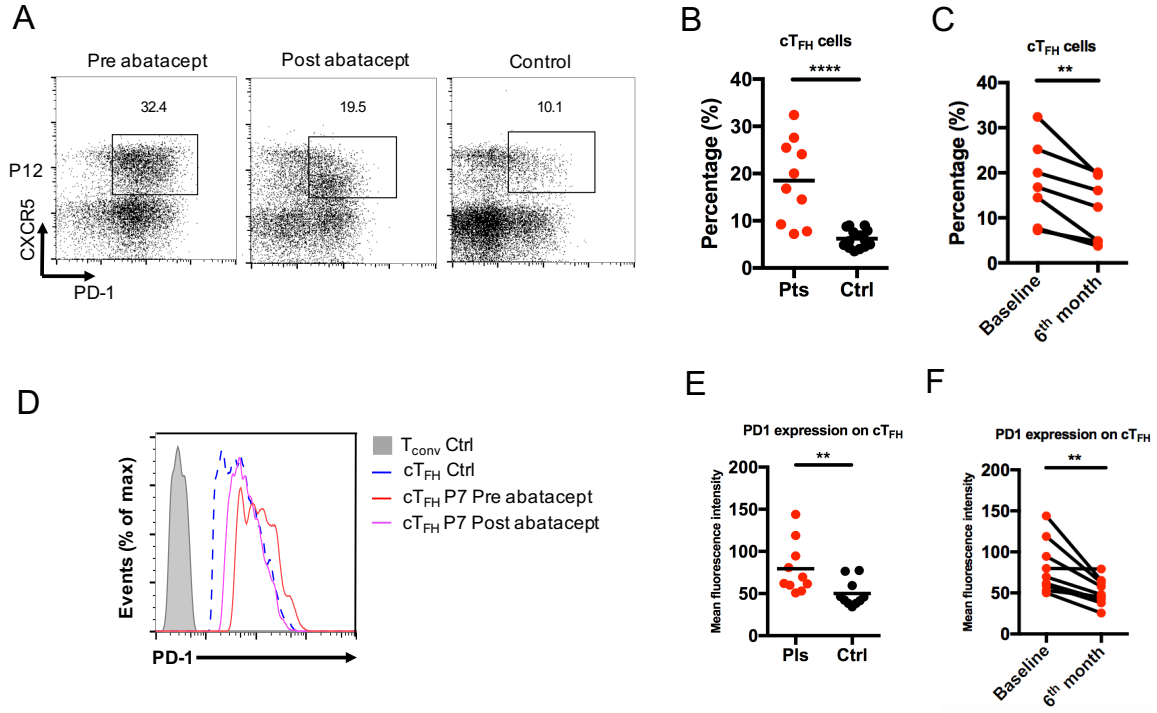
ayrıca 18-21 Ekim 2019 tarihinde TÜBİTAK desteği belirtilerek Brüksel’de gerçekleştirilen Avrupa İmmün Yetmezlik Kongresinde Sözlü Bildiri olarak sunulmuştur. Çalışmamızın son verileri 9-13 Kasım 2019 tarihinde Antalya’da gerçekleşen Ulusal Allerji ve İmmünoloji Kongresinde Sözlü Bildiri olarak sunuldu. Benzer şekilde 20-22 Şubat 2020’de gerçekleştirilen İstanbul’da yapılan 7. Marmara Pediatri Kongresin’de Sözlü bildiri olarak sunulmuş ve birincilik ödülü almıştır.



Şekil 41. LRBA eksikliğinde abatacept tedavisine verilen yanıt oranları (CR: Complete remission, PR: partial remission, NR: nonresponsive).



Şekil 42. LRBA eksikliğinde abatacept tedavisinin kullanım aralığına göre semptomların kontrol altına alınma süresi ve oranları.



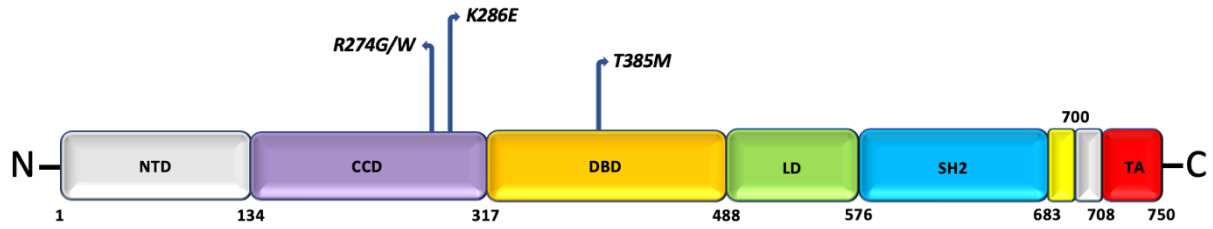
Şekil 43. LRBA eksikliğinde abatacept tedavisinin kullanımı ile foliküler T hücrelerinde ve PD1 protein ifadesinde oluşan değişiklikler.

4.2 STAT1 GOF Hastalarına Ait Bulgular

4.2.1 STAT1 GOF Hastalarının Teşhisi, Demografik Özellikleri ve Klinik Görünümleri

Çalışmaya Marmara Üniversitesi Pendik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Pediatrik Allerji ve immünoloji polikliniğine ve Türkiye'nin farklı illerindeki ilgili Çocuk İmmünoloji merkezlerine başvuran ve Sanger sekanslama yöntemi ile mutasyonu doğrulanarak tanısı yeni konulmuş veya daha önceden tanısı konularak takip edilen STAT1 GOF hastaları dahil edilmiştir (Şekil 44). *STAT1* geninde fonksiyon kazanımı mutasyonuna sahip olan hastalar prospektif olarak değerlendirilmiştir. Çalışma sırasında hastaların demografik, klinik ve immünolojik verileri toplanmıştır.

Çalışmaya katılan tüm hastalardan ve yaş uyumlu herhangi bir kronik hastalık öyküsü bulunmayan sağlıklı kontrollerden alınan periferik kan örnekleri; ayrıntılı immün fenotipleme, cTFH hücre sayımı, hücre içi sitokin ve p-STAT1 boyamalarını içeren immünolojik değerlendirme için Marmara Üniversitesi Çocuk Alerji ve İmmünoloji laboratuvarına ulaştırılmıştır.



Şekil 44. STAT1 GOF hastalarına ait mutasyonların protein domainleri üzerinde şematik gösterimi. *NTD*, N-terminal domain; *CCD*, Coiled-coil domain; *DBD*, DNA-binding domain; *LD*, Linker domain; *SH2*, Src homology 2 domain; *TA*, Transactivation domain.

Tablo 3. STAT1 GOF hastalarına ait demografik veriler ve klinik görünüm.

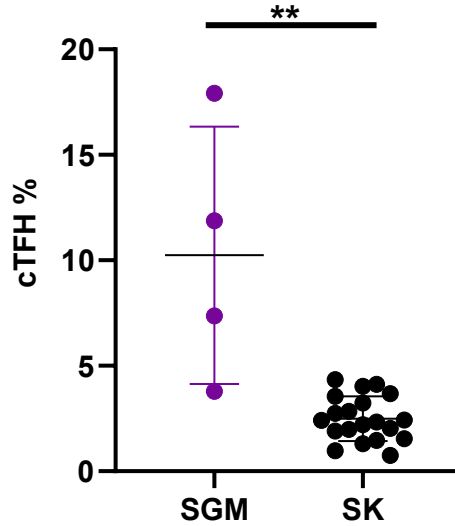
HASTA	SGM1	SGM2	SGM3	SGM4
Yaş (yıl)	10	14	14	16
Cinsiyet	E	E	E	E
Akrabalık	Yok	+	Yok	Yok
SBY (ay)	3	36	1	1
Tanı yaşı (ay)	84	144	144	49
Kronik mukokutanöz kandidiyazis	Oral, Özofageal	Oral, Özofageal	Oral	Oral, Özofageal, Tırnak
Diğer enfeksiyonlar	Diare (Shigella)	-	Pnömoni	-
Otoimmünite bulgusu	Vitiligo	-	Tiroid otoantikorları pozitif	-
Diğer bulgular	Erozif özofajit	-	Hepatospleno-megali, Büyüme gelişme geriliği, duodenit	-
Komplikasyonlar		Kandida özofajiti	Sol akciğer bronşektazi	Kandida özofajiti, Oral kandidiazis
Aldığı tedaviler	Flukanazol, IVIG, kolşisin	Flukanazol	IVIG, flukanazol	Itrokanazol, Fosakanzol, Triflukan Şu an vorikanazol
Mutasyon	c.856A>G, K286E heterozigot	c.820C>G, R274G heterozigot	c.1154C> T, T385M heterozigot	c.820G>A, R274W heterozigot
Sağkalım	Yaşıyor	Yaşıyor	Yaşıyor	Yaşıyor

B, bilinmiyor; *E*, Erkek; *SBY*, semptom başlama yaşı; *SGM*, STAT1 GOF mutant.

Çalışmaya alınan hastaların demografik özellikleri ve ana klinik bulguları Tablo 3’de gösterilmiştir. STAT1 GOF tanısı almış dört hastanın hepsi erkek idi (100%). Bu hastaların yaş ortalaması $13,50 \pm 2,18$ yıldır. Semptom başlangıç yaşları $0,85 \pm 1,24$ yıl iken, tanı yaşları $8,77 \pm 3,39$ yıl olarak gözlemlendi. STAT1 GOF hastalarından sadece SGM2 kodlu hastada (25%) akrabalık vardı. Bu hastaların hepsinde kronik mukokutanöz kandidiyazis bulgusuna rastlandı. En yaygın bulgu oral kandidiyazisti (100%). Özofageal kandidiyazis ise üç hastada (75%) gözlemlendi. Sadece bir hastada (SGM4 - 25%) tırnaklarda kandidiyazis bulgusu vardı. SGM1 kodlu hastada diyare (*Shigella*), erozif özofajit ve otoimmünite bulgusu olarak vitiligo mevcuttu. SGM3 kodlu ise diğer hastalardan farklı olarak; pnömoni, tiroid otoantikorlarında pozitiflik, hepatosplenomegali, büyüme gelişme geriliği, duodenit ve sol akciğerinde bronşektazi tespit edildi. Toplam sağkalım ise 100% idi.

4.2.2 STAT1 GOF Hastalarında Tedavi Öncesi TFH Yüzdesi Anlamlı Olarak Yüksek Saptandı.

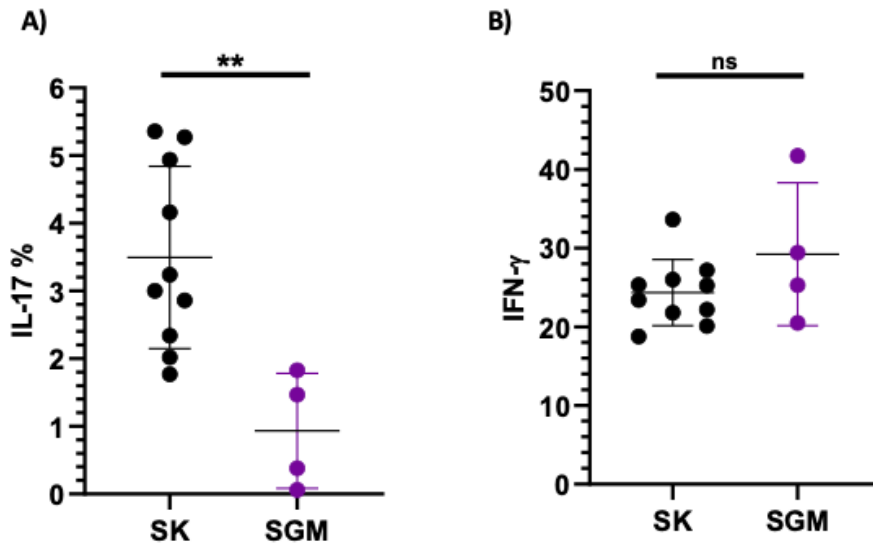
Tedavi öncesi tam kandan yüzey boyama protokolü ile değerlendirilen TFH yüzdesi sağlıklı kontrollere göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p < 0,0013$) (Şekil 45).



Şekil 45. STAT1 GOF hastalarında tedavi öncesi foliküler hücre oranının sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırılması. SK, sağlıklı kontrol; SGM, STAT1 GOF mutant.

4.2.3 STAT1 GOF Hastalarında Hücre İçi IL-17 Yüzdesi Anlamlı Olarak Yüksek Bulundu.

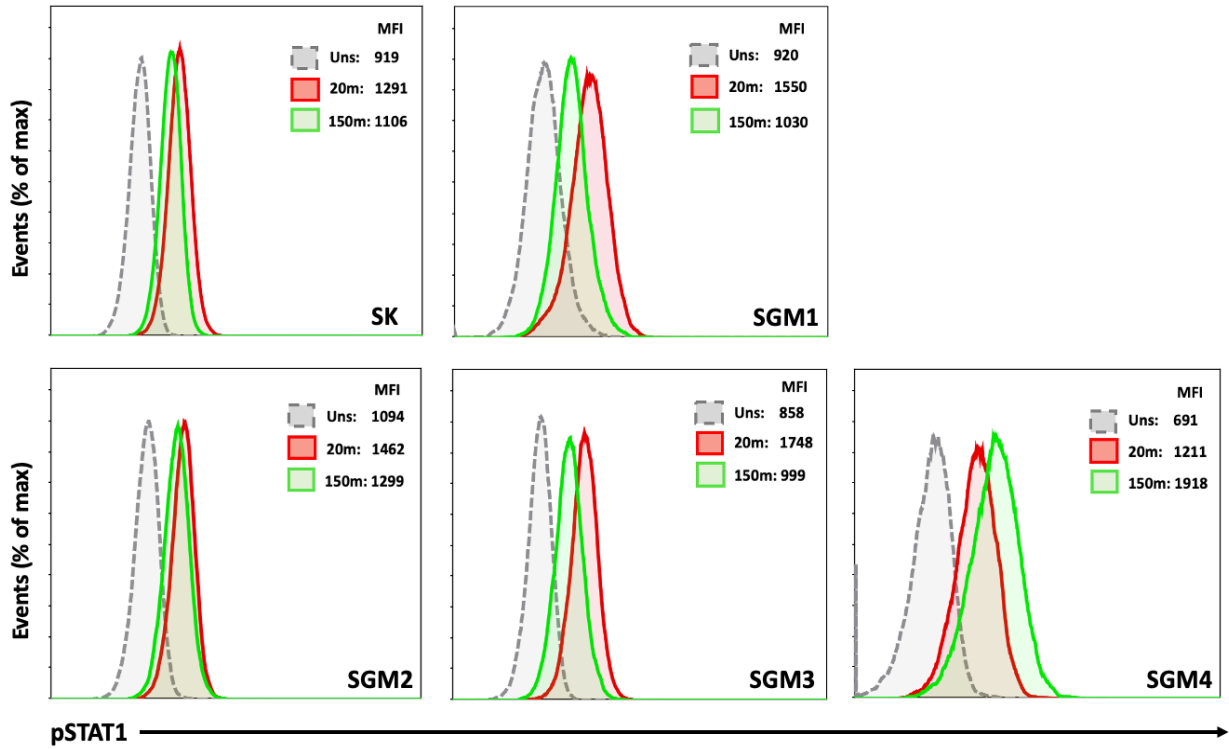
Tedavi öncesi tam kandan özel tüplerde boyama yapılarak, hafıza hücrelerindeki IL-17 ve IFN- γ hücre yüzde (%) oranları değerlendirildi. Buna göre IL-17 yüzdesi sağlıklı kontrollere göre anlamlı olarak yüksek bulunurken ($p<0,0040$) (Şekil 46A), IFN- γ hücre yüzdesi ile sağlıklı kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulunmadı (Şekil 46B). Hastalarda gözlenen düşük IL-17 düzeyleri STAT1 GOF için yol gösterici olup, hastalık mekanizması ile ilişkilidir. Düşük IL-17 düzeyleri mantar enfeksiyonlarına yatkınlığı açıklamaktadır.



Şekil 46. A) STAT1 GOF hastalarında tedavi öncesi IL-17 ve **B)** IFN- γ yüzdelерinin sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırılması. SK, *sağlıklı kontrol*; SGM, *STAT1 GOF mutant*.

4.2.4 STAT1 GOF Hastalarında p-STAT1 Protein İfadesi

Total lenfositler içerisinde seçilen single hücrelerden CD3+CD4+T hücre popülasyonu seçilerek bu hücre grubu içerisindeki p-STAT1 protein ifadesi histogram olarak görüntülendi ve farklı uyarım sürelerindeki MFI değerleri hesaplanarak sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırma yapıldı. Çalışmada görüldüğü üzere sağlıklı kontrollerde STAT1 fosforilasyonu 20. dakikada artarken 150. dakikalarda düşme görülmektedir. Hastalarda bu fosforilasyon paterninin bozukduğu görüldü (Şekil 47).

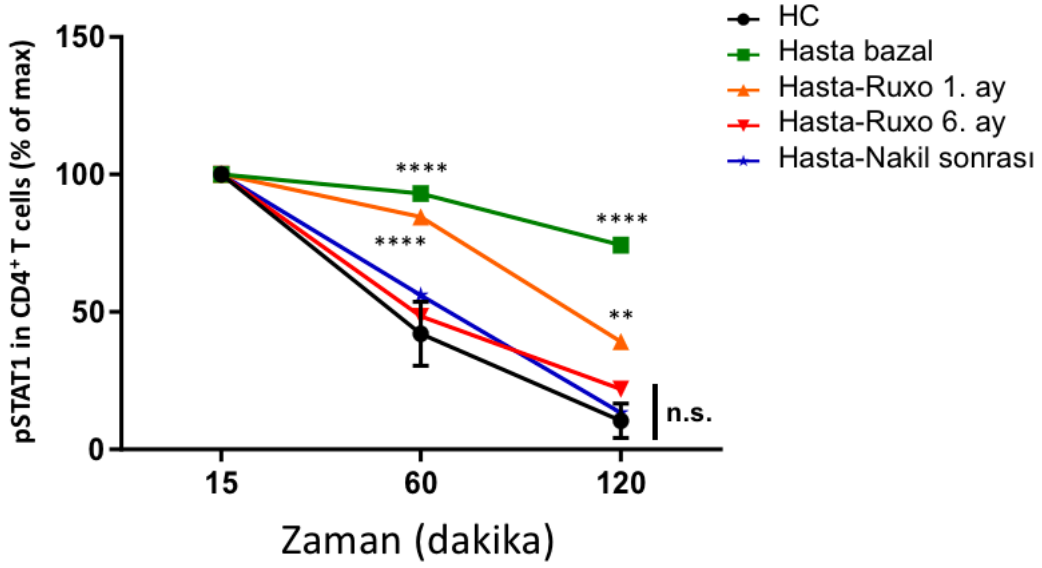


Şekil 47. Farklı IFN- β 1a uyarım sürelerindeki p-STAT1 hücre içi protein ifadelerinin karşılaştırılması.

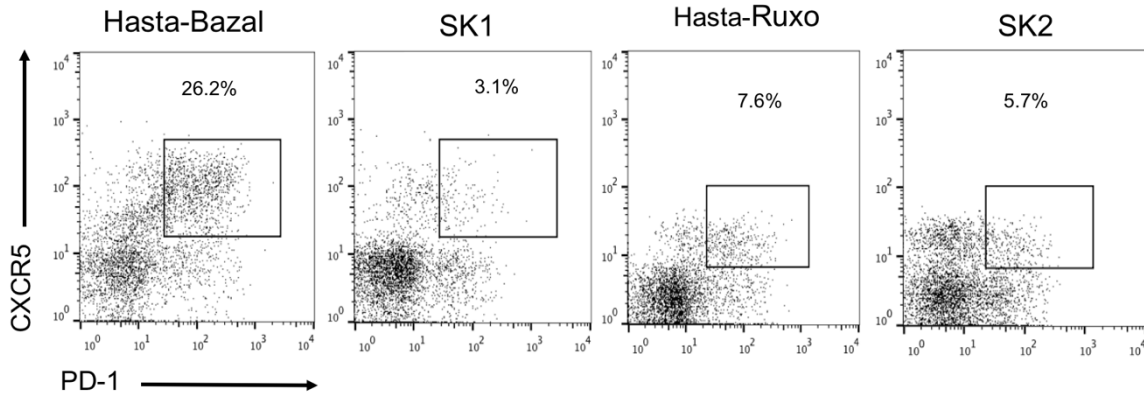
SK, Sağlıklı kontrol grubu; SGM, STAT1-Gof mutant.

4.2.5 Hedefe Yönelik İlaç Olan Ruxolitinib STAT1-GOF Hastalık Aktivitesini Kontrol Etmede Başarılıdır.

Çalışmamız sırasında bir kız olgumuza (SGM5) tanı konulduktan sonra dirençli otoimmün hemolitik anemi gelişmiştir. Bu olguda T385M mutasyonu bulunmakta idi. Dirençli candida enfeksiyonu (oral, laryngeal) olan ve izleminde CMV enfeksiyonu, steroide yanıtız otoimmün hemolitik anemi geliştirdiği saptandı. Hemolitik anemi'yi kontrol altına almak için 12 ay boyunca ruxolitinib tedavisi verildi. Ruxolitinib tedavisi gerek klinik bulguların kontrol altına alınmasında (mantar enfeksiyonu, hemolitik anemi) gerekse in-vitro anormal immün yanıtın düzelmesinde (uzamış p-STAT1 defosforilasyonun normalleşmesi-Şekil 48, cTFH sayısının normale dönmesi-Şekil 49) oldukça etkili olduğu saptandı. Klinik durumunda ruxolitinib ile düzelme sağlandıktan sonra olgumuza başarılı bir şekilde kemik iliği nakli yapıldı. Şuanda nakil sonrası ikinci yılında olup, donör kimerizm oranı %100 olarak devam etmektedir.



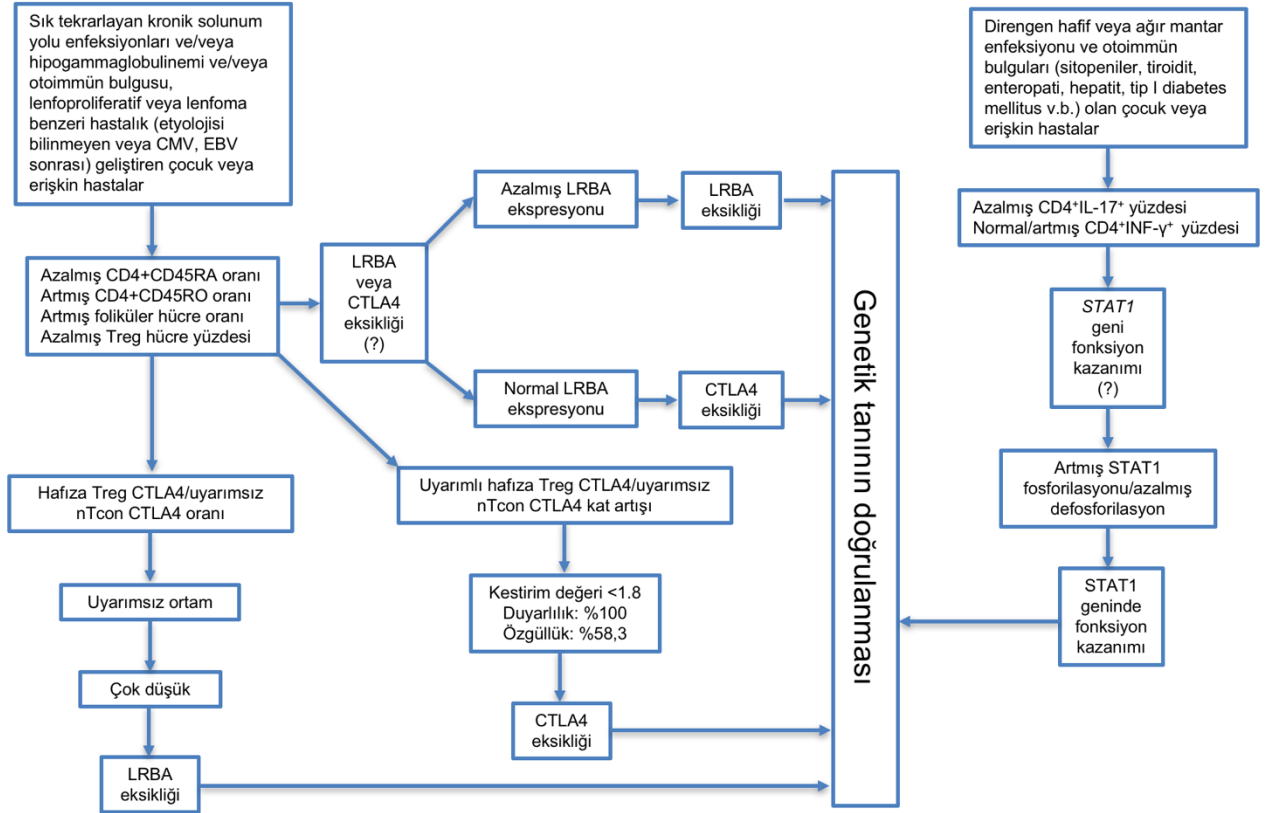
Şekil 48. Farklı zaman aralıklarında p-STAT1 in defosforilasyon eğrisi. Ruxolitinib tedavisi ile anlamlı düzelme gösterilmektedir.



Şekil 49. Ruxolitinib öncesi ve sonrası cTFH oranları. Ruxolitinib tedavisi ile anlamlı düzelme gösterilmektedir.

4.3 Çalışma Sonuçlarımıza Göre Geliştirilen Tanı Algoritması

Çalışmamızda elde edilen sonuçlara göre hastaların tanısı için yol gösterici olması açısından algoritma geliştirilmiştir. Geliştirilen akan hücre ölçer temelli algoritmamıza göre hastaların genetik tanıları için öncelikli genler seçilebilir (Şekil 50).



Şekil 50. LRBA ve CTLA4 eksikliği, STAT1 fonksiyon kazanımı hastalarında klinik şüphe durumunda genetik tanı için yol gösterici akan hücre ölçer tabanlı tanı algoritması.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmaya prospektif çalışma örneği olarak kliğimize ve Türkiye'nin farklı illerindeki ilgili merkezlere başvuran ve takip edilen 29 LRBA eksikliği, 12 CTLA-4 eksikliği ve 5 STAT1 GOF hastası dahil edildi. Hastaların klinik ve immünolojik verileri değerlendirildi. Çalışmamızın en özgün yönü nadir olan bu hastalıkların hızlı ve erken tanınması için gerekli olan immünolojik testlerin uygulanabilirliğinin ve başarısının ortaya konulmasıdır. Bunun yanında, son yıllarda hastalıkların immünopatogenezinin bilinmesi ile birlikte hedefe yönelik ilaç tedavilerin kullanımı gündeme gelmektedir. Çalışmamızda kişiselleştirilmiş tedavilerin kullanımı ile hastalık aktivitesinin başarılı bir şekilde kontrol altına alındığı görülmüştür. Özellikle bu tür tedavilerin diğer klasik tedavilere göre daha etkili oldukları ve hastanın var olan bulgularını daha iyi kontrol altına aldıkları çalışmamızda gösterilmiştir. Bu yaklaşım hem hastaların yaşam kalitesini olumlu yönde etkilemekte, hem de prognozlarının daha iyi olmasını sağlamaktadır.

Primer immün yetmezlikler nadir hastalıklar olarak değerlendirilse de akraba evliliğinin sık olduğu ülkemizde daha yüksek oranda görülmektedir. Türkiye'de sadece Ege ve Marmara bölgelerini kapsayan bir çalışmada primer immün yetmezlik görülme sıklığı 30.5/100.000 olarak saptanmıştır (Kilic ve ark., 2013). Bu nedenle hastalıkların ciddi seyri düşünüldüğünde genetik tanıyı öngörebilecek erken tanı parametrelerinin olması klinikte hasta ve hekim adına yarar sağlayacaktır. Buna yönelik olarak çalışmamızda LRBA ve CTLA-4 eksikliği hastalıkları için cTFH yüzey boyaması, sCD25 düzeyi ölçümü, LRBA, CTLA-4 ve FOXP3 protein ifadelerinin değerlendirilmesi ve STAT1 GOF hastaları için ise cTFH yüzey boyaması, hücre içi sitokin (IFN- γ ve IL-17) tayini ve p-STAT1 protein ifadesinin ölçülmesine yönelik laboratuvar belirteçlerini içeren bir tanı algoritması oluşturulmayı planladık.

Klinikte ilk değerlendirmede Gamez-Diaz ve arkadaşlarının (2016) yaptığı çalışmaya benzer şekilde LRBA eksikliğinde tekrarlayan solunum yolu enfeksiyonları, immün disregülasyon ve lenfoproliferasyon bulgularının oldukça yüksek olduğu gözlemlendi (Şekil 20). CTLA-4 eksikliği hastalarının kliniğine bakıldığında, iki ayrı çalışmada (Kuehn vd., 2014; Schubert vd., 2014) olduğu gibi immün disregülasyon, tekrarlayan solunum yolu enfeksiyonları ve lenfoproliferasyon bulguları hakimdi (Şekil 21). Ortak fenotiplere sahip olan ve kötü seyirli bu iki hastalığın bulgularındaki benzerliklerden dolayı birbirinden ayırt edilebilmesi ve erken teşhisi oldukça önemlidir.

Lopez-Herrera ve arkadaşlarının (2012) çalışmasında olduğu gibi LRBA eksikliğinin tekrarlayan enfeksiyonlar ve otoimmün belirtilerinin yanı sıra erken başlangıçlı hipogamaglobulinemiye yol açtığı gösterilmiştir. LRBA hastalarımızın immüoglobulin seviyelerine bakıldığında Alkhairy ve arkadaşlarının (2016) çalışmasına benzer şekilde 23 (82,1%) hasta ile en fazla IgA seviyesi düşük bulundu. Yine aynı çalışmada sadece 3 hastada düşük bulunan IgM seviyesi LRBA hastalarımızın 14'ünde (50,0%) düşük bulundu. IgG seviyesi de 14 (50,0%) hastada düşüktü.

Çalışmaya alınan LRBA ve CTLA-4 eksikliği hastalarının lenfosit alt gruplarındaki değişim incelendi. LRBA hastalarının alt gruplarına bakıldığında hücre oranları genellikle normal değerler arasındayken; Gamez-Diaz ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada olduğu gibi B hücre ve alt gruplarında düşüklük gözlemlendi. Çalışmamızda Alkhairy ve arkadaşlarının (2016) çalışmasına benzer şekilde en düşük hücre grubu sınıf değişimi yapmamış (unclass switched) B hücrelerdi (CD27+IgD+). Ayrıca, sınıf dönüşümü yapmış (class switched) B hücrelerde de (CD27+IgD-) düşüklük gözlenirken, Gamez-Diaz ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada en düşük hücre grubu aktive olmuş B hücrelerdi (CD27^{low}IgD^{low}). Benzer şekilde Naive B hücrelerinde artış mevcuttu. Bizim çalışmamızda ayrıca naive T hücre ve recent timik emigrants hücrelerinde de düşüklükler saptandı. Charbonnier ve arkadaşlarının LRBA eksikliği hastaları ve Schubert ve arkadaşlarının CTLA-4 eksikliği hastaları ile yaptıkları çalışmalarda hastaların naive T hücresinde azalma ve bellek T hücrelerinde artış gözleniyordu. Biz bu değişimi CTLA-4 eksikliği hastalarımızda belirgin şekilde gözlemledik. Naive (CD4+CD45RA+) hücrelerde yüksek oranda düşüklük ve bellek T hücrelerinde (CD4+CD45RO+) hücrelerde artış mevcuttu. Bunun yaşla ilişkili olabileceği düşünüldü. CTLA-4 eksikliği olguları, LRBA eksikliğine göre daha ileri yaşa sahiptiler bu da immün fenotipin daha belirgin olmasına neden olmaktadır. LRBA eksikliğinde olduğu gibi CTLA-4 eksikliğinde de B lenfositlerde düşüklük vardı. Özellikle sınıf değişimi yapmamış (unclass switched) B hücrelerde (CD27+IgD+) ve sınıf dönüşümü yapmış (class switched) B hücrelerde (CD27+IgD-) düşüklük gözlenirken, otoimmünite ile ilişkili olan aktive olmuş B hücrelerde (CD27^{low}IgD^{low}) artış mevcuttu (Kuehn vd., 2014; Schubert vd., 2014).

Kohortumuza alınan LRBA ve CTLA-4 eksikliği hastalarında daha önceki yapılan çalışmamıza (Alroqi vd., 2018) benzer şekilde, otoimmünite ile ilişkili olduğu düşünülen dolaşımdaki cTFH oranının tedavi öncesi sağlıklı bireylere oranla hastalarda daha yüksek olması nedeniyle çalışma boyunca hastalığın kontrolü için biyobelirteç olarak kullandık. Hem LRBA eksikliği hem de CTLA-4 eksikliği hastalarında abatacept tedavisi öncesi sağlıklı kontrol grubuna kıyasla cTFH oranı belirgin şekilde yüksek bulundu. Tedaviyle birlikte cTFH oranının düşerek sağlıklı kontrollere yakın olduğu görüldü. Bazı hastalarda tedavinin ilk aylarında cTFH

oranı hala yüksek olsa da tedavinin ilerleyen aylarında yapılan değerlendirmelerde düştüğü görüldü.

Bununla birlikte anormal regülasyona bağlı olarak TFH oranları gibi sCD25 gibi inflamasyon belirteçi olan protein konsantrasyonunda artış saptanmaktadır (Charbonnier vd., 2015). Bu nedenle cTFH ile ilişkili olan immün disregülasyon belirteçlerinden sCD25 konsantrasyonu düzeyini bu hastalıkların hızlı tanısında rol gösterici olabilir. Uzun dönem takip ettiğimiz tedavi altındaki hastalarımızdan topladığımız plazma örneklerinde sCD25 konsantrasyonu düzeyini de inceledik. Buna göre yine Alroqi ve arkadaşlarının (2018) yaptığı çalışmada olduğu gibi LRBA eksikliğinde abatacept tedavisi öncesi sCD25 konsantrasyonunun cTFH oranı gibi sağlıklı kontrollere kıyasla yüksek olduğu gördük. Tedavi sonrası hastalar değerlendirildiğinde bu konsantrasyonun düştüğünü ve sağlıklı kontrol değerlerine yaklaştığını gördük. Bu anlamda cTFH ve sCD25 konsantrasyonunun tedavi boyunca değerlendirilmesi hastalığın şiddeti ve hedeflenmiş tedavinin etkinliğini göstermede başarılı olduğu saptandı.

Hastaları hızlı tanıya ulaştırabilecek diğer immünolojik parametrenin de hücre içi LRBA protein ifadelerinin ölçülmesi olduğunu öngördük. Grubumuzun takip ettiği genetik mutasyonu bilinen 22 LRBA eksikliği hastası (Kiykim vd., 2019) ve 5 LRBA eksikliği olan hasta kohotu (Öğülür vd., 2019) çalışmalarında LRBA eksikliği hastalarında sağlıklı kontrollere göre LRBA protein ifadesi değerlendirildiğinde anlamlı olarak düşük olduğu gözlemlendi ve testin duyarlılığını arttırmak için LRBA protein ifadesi için kestirim değerleri belirlendi (Kiykim vd., 2019). Bundan yola çıkarak laboratuvarımızda hem LRBA hem de CTLA-4 eksikliği hastalarımızın LRBA protein ifadesini hassaslığı ve doğruluğu yüksek olan hücre içi LRBA protein testi ile değerlendirdik. Benzer şekilde LRBA eksikliği hastalarımızdaki LRBA protein ifadesinin sağlıklı kontrollere kıyasla anlamlı olarak düşük olduğunu bulduk. Bu sonuç Lo ve arkadaşlarının (2015) yaptığı çalışmada LRBA hastalarında LRBA protein ifadesinin sağlıklı kontrollere göre düşük olması ile uyumludur. Diğer yandan beklenen şekilde CTLA-4 eksikliği hastalarımızda LRBA protein ifadesinin sağlıklı kontroller gibi yüksek ve normal olduğunu gözlemledik. LRBA ve CTLA-4 eksikliği arasındaki bu farkın hızlı tanı için önemli bir ayırt edici özellik olduğu söylenebilir.

Primer immün yetmezliklerde otoimmüniteden sorumlu görülen başlıca mekanizmalar arasında; programlı hücre ölümünü etkileyen yollarda bozukluk, organizmanın hücrelerine reaksiyon gösteren T hücrelerinin santral ve çevresel baskılayıcı basamaklardan kaçması, düzenleyici T hücrelerin anormal işlev göstermesi, anormal B hücrelerin kemik iliği ya da çevre dokularda yok edilememesi yer alır (Amaya vd., 2019; Saifi ve Wysocki, 2015; Bussone ve

Mouthon, 2009). Otozomal çekinik kalıtım özelliği gösteren LRBA eksikliği ve otozomal dominant CTLA-4 eksikliği hastalarında Treg hücreler ise merkezi rol oynar ve bu eksikliklerde Treg hücre sayısında ve fonksiyonunda azalma gözlenmiştir (Cunningham-Rundles, 2011; Amaya vd., 2019; Schmidt vd., 2017). Bunun yanında aktive olmuş T hücrelerde CTLA-4 proteininde düşüklük gösterilmiştir (Lo vd., 2015). Tüm bu bilgilerden yola çıkarak diğer bir aşamada genetik olarak tanısı doğrulanmış *LRBA* ve *CTLA-4* mutasyonuna sahip olan hastalarda Treg yüzdeleri ve CD25, FOXP3 ve CTLA-4 proteinlerin ifadelerinin ölçülmesine ve sağlıklı kontroller ile karşılaştırılmasına yönelik geliştirdiğimiz immünolojik testin hızlı tanı için yol gösterici olabileceğini düşündük. Tam kandan izole edilen PKMH'ların uyaransız ve 16 saatlik uyaranlı ortamda hücre oranlarını ve hücre içi protein ifadelerini değerlendirdik. Treg yüzde oranlarının belirlenmesinde Treg hücre belirteçlerini seçtik ve bunun için CD4+CD25+FOXP3+ ve CD4+FOXP3+ hafıza hücrelerin yüzdelerini değerlendirdik. Hasta gruplarının ve sağlıklı kontrollerin hem uyaransız hem de uyaranlı ortamdaki kendi içlerindeki hücre artışını görebilmek amacıyla kendi içlerinde, hem de sağlıklı kontroller ile hasta grupları arasındaki farklı anlayabilmek amacıyla birbirleriyle kıyasladık. CD25+FOXP3+ Treg hücre yüzdelerine baktığımızda uyaransız ortamda her iki hastalık grubunda sağlıklı kontrole göre düşüklük saptandı. Kısa süreli 16 saat uyarımın ardından sağlıklı kontroller, LRBA eksikliği ve CTLA-4 eksikliği hastalarının hepsinin Treg hücre yüzdesinde kendi içlerinde artış gözlemlendi. Ancak LRBA eksikliği ve CTLA-4 eksikliği hastalarında CD25+FOXP3+ Treg hücre popülasyonuna bakıldığında uyarımdan sonra sağlıklı kontrollere kıyasla yine de anlamlı olarak düşük bulundu. Sonuçlarımız literatürde saptanan düşük Treg hücre oranlarıyla uyumlu olarak saptandı (Charbonnier vd., 2015; Lo vd., 2015). Ancak çalışmamızda Hou ve arkadaşlarının gösterdiği gibi uyarımla beraber artan ve kontrole göre daha yüksek düzeye ulaşan Treg hücre oranları görülemedi (Hou vd., 2017). LRBA ve CTLA-4 olgularında bazal seviyede Treg hücreleri sağlıklı kontrole göre düşük iken, uyarımla fazla oranda Treg artışı bozulmuş olan CTLA-4 sinyalizasyonu ile açıklanabilir. Buna göre CTLA-4 yeterince fonksiyon gösteremediğinden, CD28 sinyalizasyonunda artış oluşarak Treglerin aşırı çoğalmasına neden olabilir. Ancak bu konuda daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir.

Aynı şekilde uyarımdan sonra hem LRBA eksikliğinde hem de CTLA-4 eksikliğinde CD4+FOXP3+ hafıza Treg hücre yüzdesinin de sağlıklı kontrollere göre anlamlı olarak düşük olduğu gözlemlendi. CD25+FOXP3+ Treg hücreler ve CD4+FOXP3+ hafıza Treg hücrelerde en düşük Treg hücre yüzdesi CTLA-4 eksikliği hastalarına aitti. LRBA eksikliği hastalarının Treg yüzdeleri uyarım ile sağlıklı kontrollere yaklaşıp da yine de anlamlı olarak düşük olduğu gözlemlendi.

Bir başka aşamada CD4+FOXP3+ hafıza Treg hücrelerden CD25 ve FOXP3 protein ifadelerinin MFI değerleri değerlendirildi. Uyaransız koşulda sadece CD25 protein ifadesinde sağlıklı kontrol grubu ile LRBA eksikliği arasında anlamlı bir fark varken, FOXP3 protein ifadesine bakıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamadı. On altı saatlik uyarımın ardından CD25 ve FOXP3 protein ifadelerinin MFI değeri en çok sağlıklı kontrol grubunda artış gösterdi. Uyarımla beraber LRBA eksikliğin CD25 ve FOXP3 protein ifadelerinde de artış gözlenirse de sağlıklı kontrollere kıyasla anlamlı olarak düşük bulundu. Charbonnier ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada CD4+FOXP3+ T hücre popülasyonundan değerlendirilen CD25 ve FOXP3 protein ifadeleri çalışmamızdakine benzer şekilde kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak düşük bulunmuştur (Charbonnier vd., 2015). CTLA-4 eksikliğinde ise CD25 protein ifadesinde uyarımla birlikte artış gözlenmedi. FOXP3 ifadesinin MFI değeri ise uyarımla birlikte daha çok artış gösterip sağlıklı kontrollere yaklaşırsa da hem CD25 hem de FOXP3 protein ifadesi sağlıklı kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak düşük bulundu. Benzer şekilde Kuehn ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada CD4+FOXP3+ T hücre popülasyonundan değerlendirilen CD25 ve FOXP3 protein ifadelerinin de CTLA-4 eksikliği hastalarında sağlıklı kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak düşük olduğu gözlenmiştir (Kuehn vd., 2014). Özet olarak her iki hastalık grubunda bilinen en çarpıcı sonucun Treg hücrelerinin düşük FOXP3 ve CD25 ifade etmesidir ki bu bulgular çalışmamızda gösterildi.

Son aşamada CD4+FOXP3+ hafıza Treg hücrelerden CTLA-4 protein ifadesi incelendi. Hücrelerdeki protein ifadesini değerlendirebilmek amacıyla Hou ve arkadaşlarının (2017) çalışmasına benzer şekilde CTLA-4'ü oldukça az miktarda ifade eden uyaransız CD45RA+FOXP3- (nTcon) hücreler iç kontrol olarak kullanıldı (Hou vd., 2017). Her bir gruptaki protein ifadesinin MFI değeri kendi nTcon MFI değerine bölünerek normalleştirme yapıldı. Bunun sonucunda uyaransız koşullarda CTLA-4 protein ifadesi sağlıklı kontrol grubuna kıyasla en düşük LRBA eksikliğinde bulundu. On altı saatlik T hücre boncuk uyarımdan sonra en çok artış sağlıklı kontrol grubundaydı. Uyaransız koşulda en düşük olan LRBA eksikliği hastalarının MFI değeri uyarım ile artmış olsa da sağlıklı kontrollere kıyasla yine de anlamlı olarak düşük bulundu. En az CTLA-4 eksikliği hastalarının CTLA-4 protein ifadesine artış gözlemlendi. Bu nedenle sağlıklı kontrol grubuna göre değerlendirildiğinde anlamlı olarak daha düşük bulundu. Benzer olarak Schubert ve arkadaşlarının CTLA-4 eksikliği olgularında CD3/CD28 uyarım boncuğu ile 16 saatlik uyarım gerçekleştirerek yaptığı bir çalışma sonucunda CD4+FOXP3+ Treg hücrelerdeki CTLA-4 protein ifadesi uyarımın ardından, sağlıklı kontrol grubuna kıyasla çalışmamızdakine benzer şekilde düşük bulunmuştur (Schubert vd., 2014).

Çalışmamızda ayrıca T hücre aktivasyon boncukları ile 16 saatlik uyarımdan sonra CD4+FOXP3+ hafıza Treg hücrelerdeki hücre içi CTLA-4 protein ifadesindeki kat artışı incelendi. Her bir grubun uyarımlı ortamdaki CTLA-4 protein ifadesi değeri, aynı grubun uyarımsız ortamdaki CTLA-4 protein ifadesi değerine bölündü ve elde edilen oranlar karşılaştırıldı. Buna göre CTLA-4 protein ifadesindeki en fazla artış sağlıklı kontrol grubundaydı. Sağlıklı kontrol grubu ile LRBA eksikliği ve CTLA-4 eksikliği hastaları ayrı ayrı karşılaştırıldığında; LRBA eksikliği hastalarındaki CTLA-4 protein ifadesindeki artış CTLA-4 eksikliğine kıyasla daha fazla bulundu. Çalışmamızın sonuçları Hou ve arkadaşlarının çalışması ile değerlendirildiğinde uyarımsız ortamda sonuçlarımız benzerken, uyarım ile Hou ve arkadaşlarının çalışmasından farklı bulgular elde edilmiştir. Hou ve arkadaşları LRBA eksikliği olan olgularda CTLA-4 ifadesinin uyarım ile 20-30 kat arttığını ve sağlıklı kontrollere göre daha fazla CTLA-4 ifade ettikleri gösterilmiştir (Hou vd., 2017). Çalışmamızda ise benzer uyarım koşulları kullanılmasına rağmen LRBA eksikliğinde 2 katlık artış görüldü ve uyarım sonrası sağlıklı kontrollerden düşük saptandı. Çalışmalar arası farklılık, deneylerin yapıldığı laboratuvar şartlarının farklılığına, kanların merkeze ulaşmasındaki durumuna, kullanılan sağlıklı kontrollerin ve çalışan araştırmacının deneyimine bağlı olarak değişebilmektedir.

Sonuç olarak klinik bulgularındaki benzerliğin yanında hem LRBA eksikliği hem de CTLA-4 eksikliği hastalıklarında; cTFH ve sCD25 düzeylerinde yükseklik, Treg yüzdelерinde, CD25, FOXP3 ve CTLA-4 protein ifadelerinde ise sağlıklı kontrollere kıyasla düşüklük saptandı. Bu bilgiler klinikte görülen otoimmünite ve lenfoproliferasyonun nedenini açıklamaktadır. İki hastalığı karşılaştırdığımızda, uyarımsız koşullarda CTLA-4 düzeyinin LRBA eksikliği hastalarında daha fazla düşük iken, uyarım ile birlikte LRBA eksikliği hastalarında CTLA-4 kat artışının daha belirgin olduğu saptandı. İmmün disregülasyon ile seyreden LRBA ve CTLA-4 eksikliği olgularında klinik verilerle birlikte akan hücre ölçer bulgularının birlikte değerlendirilmesi hem erken tanı hem de hedefe yönelik gen dizileme için yol göstericidir.

IFN- α , IFN- β ve IFN- γ reseptörlerinin uyarılması STAT1 fosforilasyonu sağlar. Nükleusa geçmeden önce homodimerize ve heterodimerize olan STAT1 birçok önemli sitokinin işlevini yönlendirerek virüslere ve hücre içi bakterilere karşı doğal ve edinsel immün yanıtı yönlendirir (Casanova vd., 2012; Sampaio vd., 2013). Otozomal dominant kalıtım gösteren STAT1 GOF hastaları kronik mukokutanöz kandidiyazis, artmış STAT1 fosforilasyonu ve/veya bozulmuş STAT1 defosforilasyonu ve azalmış IL-17 sitokini ile ilişkilendirilmiştir (Baris vd., 2016, van de Veerdonk vd., 2011). Çalışmamızda da benzer şekilde hastalarda gözlenen en belirgin bulgu kronik mukokutanöz kandidiyazistir. Çalışmaya alınan hastalarda daha yaygın olarak oral kandidiyazis görülse de ikinci sıklıkla kandida özafajiti ve bir hastada ise tırnakta kandidiyazis bulgusuna rastlandı. Tekrarlayan oral kandidiyazise; HIV ve glukokortikoidler

veya antibiyotikler gibi ilaçların uzun süreli kullanımı neden gösterilsede, son zamanlarda yapılan çalışmalarda nadir gen mutasyonlarının da kandidiyazise neden olduğu gösterilmiştir (Yao vd., 2019). Vargas-Hernández ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada büyüme gelişme geriliği diğer klinik bulgulardan daha az sayıda (16 hastadan 3'ünde) bulunmuştur. Çalışmamızda da sadece bir hastada büyüme gelişme geriliği gözlenmiştir. Yine çalışmada olduğu gibi hepatosplenomegali bulgusuna yalnızca bir hastada rastlanmıştır.

Bu hastalarda artmış STAT1 fosforilasyonuna veya defosforilasyonda gecikmelere bağlı olarak abartılı IFN- γ yanıtı olduğu ve bunun sonucunda Th1 hücrelerinde artış ve Th17 hücrelerinde azalma saptanmıştır (Baris vd., 2016). Weinacht ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada da benzer şekilde artmış Th1 ve TFH düzeyi ve baskılanmış Th17 yanıtı gözlemlendi. Çalışmamızda da benzer şekilde yüzey boyama protokolü ile değerlendirilen TFH (CXCR5+PD1+) hücre oranı sağlıklı kontrollere kıyasla anlamlı olarak daha yüksek bulundu.

Barış ve arkadaşları (2016) tarafından daha önce STAT1 GOF mutasyonu hastalar ile yapılan çalışmada sağlıklı kontrol grubuna göre hastalarda IL-17 düzeyi anlamlı olarak düşük, IFN- γ düzeyi ise anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Çalışmamızda ise beklenen şekilde IL-17 düzeyi sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük iken, IFN- γ yüzde oranı yüksek görülsede anlamlı bir fark bulunamamıştır. CD3+CD4+ T hücrelerden farklı sürelerdeki uyarımı değerlendirilen p-STAT1 protein ifadesi analizinde p-STAT1 protein ifadesi iki hastada (SGM1 ve SGM3) 20. dakika uyarım ile artmış fosforilasyon bulunurken defosforilasyon paterni normal olarak saptandı. SGM2 ve SGM4 kodlu hastalarda ise artmış fosforilasyon ve azalmış defosforilasyon defekti görüldü.

Sonuç olarak immün yetmezlikler ve otoimmün hastalıklar iç içe olabilmektedir. Yukarıda tanımlanan yeni immün yetmezliklerde klinik bulgular benzer olmasına rağmen hastalıktan sorumlu genler farklıdır. Klinikte sık karşılaşılan bazı otoimmün hastalıklarda, yeni tanımlanmış immün yetmezliklerin bir takım immün belirteçlerden (TFH, LRBA, CTLA-4, FOXP3, fosfo-STAT1 hücre içi boyama, Th1/Th17 hücre oranı ve sCD25 düzeyi) oluşan tanı algoritması sayesinde erken tanınması mümkün olabileceğini düşünmekteyiz. Erken tanı sayesinde hedefe yönelik tedavilerin (abatacept, ruxolitinib) başlanması, komplikasyon gelişmeden hastalığın kontrolünü sağlayabilecek ve gereksiz diğer ilaçların kullanımını engelleyebilecek ve hastaların iyi bir şekilde kemik iliği nakli gibi nihai tedavilerin daha iyi bir şekilde sunulmasını sağlayabilecektir. Ayrıca foliküler hücre ve sCD25 düzeylerinin takip sırasında izlenmesi hastalıkların kontrol düzeyleri hakkında bilgi verebilecektir. Çalışmamız sayesinde, genetik tanının her zaman mümkün olamadığı ülkemiz koşullarında bir takım tarama yöntemleriyle bu hastalıkların tanısının erken koyulması ve komplikasyon gelişmeden

hedefe yönelik tedavi seçeneklerinin daha hızlı başlanmasını sağlayacağını düşünmekteyiz. Hastalar arasındaki fenotipik değişkenliğin ve tedaviye verilen yanıt farklılığının neden olduğu üzerinde çalışmalarımız devam etmektedir.

6. KAYNAKLAR

Abbas, A. K., Lichtman, A. H., Pillai, S. 2015. Basic Immunology (5th Edition). Elsevier.

Abbas, A. K., Lichtman, A. H., Pillai, S. 2017. Cellular and Molecular Immunology (9th Edition). Elsevier.

Agarwal, S., Cunningham-Rundles, C. 2019. "Gastrointestinal Manifestations and Complications of Primary Immunodeficiency Disorders", Immunology and Allergy Clinics of North America, 39, 81-94.

Aggarwal, B. B. 2003. "Signalling pathways of the TNF super family: a double-edged sword", Nature Reviews Immunology, 3, 745-756.

Agnello, D., Lankford, C. S., Bream, J., Morinobu, A., Gadina, M., O'Shea, J. J., Frucht, D. M. 2003. "Cytokines and transcription factors that regulate T helper cell differentiation: new players and new insights", Journals of Clinical Immunology, 23, 147-161.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. 2015. Molecular Biology of The Cell (6th Edition). New York and Abingdon: Garland- Science.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. 2008. Hücrenin Moleküler Biyolojisi (4. Baskı). Ankara: TUBA Yayınları.

Alkhairy, O. K., Abolhassani, H., Rezaei, N., Fang, M., Andersen, K. K., Chavoshzadeh, Z., Mohammadzadeh, I., El-Rajab, M. A., Massaad, M., Chou, J., Aghamohammadi, A., Geha, R. S., Hammarström, L. 2016. "Spectrum of phenotypes associated with mutations in LRBA", Journal of Clinical Immunology, 36, 33-45.

Alroqi, F. J., Charbonnier, L. M., Baris, S., Kiykim, A., Chou, J., Platt, C. D., Algassim, A., Keles, S., Al Saud, B. K., Alkuraya, F.S., Jordan, M., Geha, R. S., Chatila, T. A. 2018. "Exaggerated follicular helper T-cell responses in patients with LRBA deficiency caused by failure of CTLA4-mediated regulation", Journal of Allergy and Clinical Immunology, 141, 1050-1059.e10.

Amaya-Urbe, L., Rojas, M., Azizi, G., Anaya, J. M., Gershwin, M. E. 2019. "Primary immunodeficiency and autoimmunity: A comprehensive review", Journal of Autoimmunity, 99, 52-72.

Anderton, S. M., Wraith, D. C. 2002. "Selection and fine tuning of the autoimmune T cell repertoire", *Nature Reviews Immunology*, 2, 487-498.

Arason, G. J., Jorgensen, G. H., Ludviksson, B. R. 2010. "Primary Immunodeficiency and Autoimmunity: Lessons From Human Diseases", *Scandinavian Journal of Immunology*, 71, 317-328.

Azizi, G., Yazdani, R., Rae, W., Abolhassani, H., Rojas, M., Aghamohammadi, A., Anaya, J. M. 2018. "Monogenic poly autoimmunity in primary immuno deficiency diseases", *Autoimmunity Reviews*, 17, 1028-1039.

Bajic, G., Degn, S. E., Thiel, S., Andersen, G. R. 2015. "Complement activation, regulation, and molecular basis for complement-related diseases", *EMBO Journal*, 34, 2735-2757.

Baris, S., Alroqi, F., Kiykim, A., Karakoc-Aydiner, E., Ogulur, I., Ozen, A., Charbonnier, L. M., Bakır, M., Boztug, K., Chatila, T. A., Barlan, I. B. 2016. "Severe Early-Onset Combined Immunodeficiency due to Heterozygous Gain-of-Function Mutations in STAT1", *Journal of Clinical Immunology*, 36, 641-648.

Baumgarth, N. 2000. "A two-phase model of B-cell activation", *Immunological Reviews*, 176, 171-180.

Bayramgürler, D., Odyakmaz-Demirsoy, E. 2013. "Mast hücreleri ve aktivasyonu", *Türkderm-Deri Hastalıkları ve Frengi Arşivi Dergisi*, 47, 37-40.

Bonilla, F. A., Oettgen, H. C. 2010. "Adaptive immunity", *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125, 33-40.

Borish, L., Steinke, J. W. 2003. "Cytokines and chemokines", *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 111, 460-475.

Borregaard, N. 2010. "Neutrophils, from Marrow to Microbes", *Immunity*, 33, 657-670.

Broere, F., Apasov, S. G., Sitkovsky, M. V., van Eden, W. 2011. A2 T cell subsets and T cell-mediated immunity (3rd Edition). Birkhäuser Basel.

Browne, V. W., McClain, K. L., Talpaz, M., Ordonez, N., Estrov, Z. 1997. "Physiology and pathophysiology of dendritic cells", *Human Pathology*, 28, 563-579.

Buchbinder, E.L., Desai, A. 2016. "CTLA-4 and PD-1 Pathways: Similarities, Differences, and Implications of Their Inhibition", *American Journal of Clinical Oncology*, 39, 98-106.

Bussone, G., Mouthon, L. 2009. "Autoimmune manifestations in primary immunodeficiencies", *Autoimmunity Reviews*, 8, 332-336.

Camcıoğlu, Y., Deniz, G. 2007. *Temel İmmünoloji İmmün Sistemin İşlev ve Bozuklukları*. İstanbul: İstanbul Medikal Yayıncılık.

Casanova, J. L., Holland, S. M., Notarangelo, L. D. 2012. "Inborn Errors of Human JAKs and STATs", *Immunity*, 36, 515-528.

Charbonnier, L. M., Janssen, E., Chou, J., Ohsumi, T. K., Keles, S., Hsu, J. T., Massaad, M. J., Garcia-Lloret, M., Hanna-Wakim, R., Dbaibo, G., Alangari, A. A., Alsultan, A., Al-Zahrani, D., Geha, R. S., Chatila, T. A. 2015. "Regulatory T-cell deficiency and immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked-like disorder caused by loss-of-function mutations in LRBA", *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 135, 217-227.

Chatila, T. A. 2005. "Role of regulatory T cells in human diseases", *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 116, 949-959.

Cheung, Y. F., Tsang, H. Y. H., Kwok, J. S. Y. 2002. "Immunologic Profile of Patients with Protein-Losing Enteropathy Complicating Congenital Heart Disease", *Pediatric Cardiology*, 23, 587-593.

Cunningham-Rundles, C. 2011. "Autoimmunity in primary immunodeficiency: taking lessons from our patients", *Clinical and Experimental Immunology*, 164, 6-11.

Delves, P. J., Roitt, I. M. 2000. "The immune system. First of two parts", *New England Journal of Medicine*, 343, 37-49.

Delves, P. J., Roitt, I. M. 2000. "The immune system. Second of two parts", *New England Journal of Medicine*, 343(2):108-117.

Delves, P. J. 2014. *Innate and Adaptive Systems of Immunity. The Autoimmune Diseases* (5th Edition). San Diego: Academic Press.

Elgueta, R., Benson, M. J., De Vries, V. C., Wasiuk, A., Guo, Y., Noelle, R. J. 2009. "Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system", *Immunological Reviews*, 229, 152-172.

Farag, S. S., Caligiuri, M. A. 2006. "Human natural killer cell development and biology", *Blood Reviews*, 20, 123-137.

Fazilleau N, Mark L, McHeyzer-Williams LJ, McHeyzer-Williams MG. Fazilleau, N., Mark, L., McHeyzer-Williams, L. J., McHeyzer-Williams, M. G. 2009. "Follicular helper T cells: lineage and location", *Immunity*, 30, 324-335.

Fuss, I. J., Strober, W., Cuccherini, B. A., Pearlstein, G. R., Bossuyt, X., Brown, M., Horgan, K. 1998. "Intestinal lymphangiectasia, a disease characterized by selective loss of naive CD45RA⁺ lymphocytes into the gastrointestinal tract", *European Journal of Immunology*, 28, 4275-4285.

Gámez-Díaz, L., August, D., Stepensky, P., Revel-Vilk, S., Seidel, M. G., Noriko, M., Morio, T., Worth, A. J. J., Blessing, J., Van de Veerdonk, F., Feuchtinger, T., Kanariou, M., Schmitt-Graeff, A., Jung, S., Seneviratne, S., Burns, S., Belohradsky, B. H., Rezaei, N., Bakhtiar, S., Speckmann, C., Jordan, M., Grimbacher, B. 2016. "The extended phenotype of LPS-responsive beige-like anchor protein (LRBA) deficiency", *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 137, 223-230.

Gialeli, C., Gungor, B., Blom, A. M. 2018. "Novel potential inhibitors of complement system and their roles in complement regulation and beyond", *Molecular Immunology*, 102, 73-83.

Guermonprez, P., Valladeau, J., Zitvogel, L., Théry, C., Amigorena, S. 2002. "Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells", *Annual Review of Immunology*, 20, 621-667.

Hirahara, K., Vahedi, G., Ghoreschi, K., Yang, X. P., Nakayamada, S., Kanno, Y., O'Shea, J. J., Laurence, A. 2011. "Helper T-cell differentiation and plasticity: insights from epigenetics", *Immunology*, 134, 235-245.

Hou, T. Z., Verma, N., Wanders, J., Kennedy, A., Soskic, B., Janman, D., Halliday, N., Rowshanravan, B., Worth, A., Qasim, W., Baxendale, H., Stauss, H., Seneviratne, S., Neth, O., Olbrich, P., Hambleton, S., Arkwright, P. D., Burns, S. O., Walker, L. S., Sansom, D. M. 2017. "Identifying functional defects in patients with immunodysregulation due to LRBA and CTLA-4 mutations", *Blood*, 129:1458-1468.

Inman, K. S., Francis, A. A., Murray, N. R. 2014. "Complex role for the immune system in initiation and progression of pancreatic cancer", *World Journal of Gastroenterology*, 20, 11160-11181.

Iwasaki, A., Medzhitov, R. 2015. "Control of adaptive immunity by the innate immune system", *Nature Immunology*, 16, 343-353.

Josefowicz, S. Z., Lu, L. F., Rudensky, A. Y. 2012. "Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function", *Annual Review of Immunology*, 30, 531-564.

Kilic, S. S., Ozel, M., Hafizoglu, D., Karaca, N. E., Aksu, G., Kutukculer, N. 2013. "The prevalences and patient characteristics of primary immunodeficiency diseases in Turkey-two centers study", *Clinical Immunology*, 33, 74-83.

Kiykim, A., Charbonnier, L. M., Akcay, A., Karakoc-Aydiner, E., Ozen, A., Ozturk, G., Chatila, T. A., Baris, S. 2019. "Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Patients with Heterozygous STAT1 Gain-of-Function Mutation", *Journal of Clinical Immunology*, 39, 37-44.

Kiykim, A., Ogulur, I., Dursun, E., Charbonnier, L. M., Nain, E., Cekic, S., Dogruel, D., Edeer Karaca, N., Cogurlu, M. T., Arman Bilir, O., Cansever, M., Kapakli, H., Baser, D., Kasap, N., Kutlug, S., Ufuk Altintas, D. U., Al-Shaibi, A., Agrebi, N., Kara, M., Guven, A., Somer, A., Aydogmus, C., Aktay Ayaz, N., Metin, A., Aydogan, M., Uncuoglu, A., Patiroglu, T., Yildiran, A., Nail Guner, S., Keles, S., Reisli, I., Aksu, G., Kutukculer, N., Kilic, S. S., Yilmaz, M., Karakoc-Aydiner, E., Lo, B., Ozen, A., Chatila, T. A., Baris, S. 2019. "Abatacept as a Long-Term Targeted Therapy for LRBA Deficiency", *Journal of Allergy and Clinical Immunology-In practice*, 7, 2790-2800.

King, C., Tangye, S. G., Mackay, C. R. 2008. "T follicular helper (TFH) cells in normal and dysregulated immune responses", *Annual Review of Immunology*, 26, 741-766.

Kitcharoensakkul, M., Cooper, M. A. 2019. "Rheumatologic and autoimmune manifestations in primary immunodeficiency", *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 19, 545-552.

Kolev, M., Le Friec, G., Kemper, C. 2014. "Complement—tapping into new sites and effector systems", *Nature Reviews Immunology*, 14, 811-820.

Kuehn, H. S., Ouyang, W., Lo, B., Deenick, E. K., Niemela, J. E., Avery, D. T., Schickel, J. N., Tran, D. Q., Stoddard, J., Zhang, Y., Frucht, D. M., Dumitriu, B., Scheinberg, P., Folio, L. R., Frein, C. A., Price, S., Koh, C., Heller, T., Seroogy, C. M., Huttenlocher, A., Rao, V. K., Su, H. C., Kleiner, D., Notarangelo, L. D., Rampertaap, Y., Olivier, K. N., McElwee, J., Hughes, J., Pittaluga, S., Oliveira, J. B., Meffre, E., Fleisher, T. A., Holland, S. M., Lenardo, M. J., Tangye, S. G., Uzel, G. 2014. "Immune dysregulation in human subjects with heterozygous germline mutations in CTLA4", *Science*, 345, 1623-1627.

Kumar, V., Sharma, A. 2010. "Neutrophils: Cinderella of innate immune system", *International Immunopharmacology*, 10, 1325-1334.

LeBien, T. W., Tedder, T. F. 2008. "B lymphocytes: how they develop and function", *Blood*, 112, 1570-1580.

Lehman, H., Gordon, C. 2019. "The Skin as a Window into Primary Immune Deficiency Diseases: Atopic Dermatitis and Chronic Mucocutaneous Candidiasis", *Journal of Allergy and Clinical Immunology-In practice*, 7, 788-798.

Leiding, J. W., Forbes, L. R. 2019. "Mechanism-Based Precision Therapy for the Treatment of Primary Immunodeficiency and Primary Immunodysregulatory Diseases", *Journal of Allergy and Clinical Immunology-In practice*, 7, 761-773.

Littman, D. R., Rudensky, A. Y. 2020. "Th17 and regulatory T cells in mediating and restraining inflammation", *Cell*, 140, 845-858.

Lo, B., Fritz, J. M., Su, H. C., Uzel, G., Jordan, M. B., Lenardo, M. J. 2016. "CHAI and LATAIE: new genetic diseases of CTLA-4 check point insufficiency", *Blood*, 128, 1037-1042.

Lo, B., Zhang, K., Lu, W., Zheng, L., Zhang, Q., Kanellopoulou, C., Zhang, Y., Liu, Z., Fritz, J. M., Marsh, R., Husami, A., Kissell, D., Nortman, S., Chaturvedi, V., Haines, H., Young, L. R., Mo, J., Filipovich, A. H., Bleesing, J. J., Mustillo, P., Stephens, M., Rueda, C. M., Chougnet, C. A., Hoebe, K., McElwee, J., Hughes, J. D., Karakoc-Aydiner, E., Matthews, H. F., Price, S., Su, H. C., Rao, V. K., Lenardo, M. J., Jordan, M. B. 2015. "Patients with LRBA deficiency show CTLA-4 loss and immune dysregulation responsive to abatacept therapy", *Science*, 349, 436-440.

Lopez-Herrera, G., Tampella, G., Pan-Hammarström, Q., Herholz, P., Trujillo-Vargas, C. M., Phadwal, K., Simon, A. K., Moutschen, M., Etzioni, A., Mory, A., Srugo, I., Melamed, D., Hulténby, K., Liu, C., Baronio, M., Vitali, M., Philippet, P., Dideberg, V., Aghamohammadi, A., Rezaei, N., Enright, V., Du, L., Salzer, U., Eibel, H., Pfeifer, D., Veelken, H., Stauss, H., Lougaris, V., Plebani, A., Gertz, E. M., Schäffer, A. A., Hammarström, L., Grimbacher, B. 2012. "Deleterious mutations in LRBA are associated with a syndrome of immune deficiency and autoimmunity", *The American Journal of Human Genetics*, 90, 986-1001.

Lundegaard, C., Lund, O., Kesmir, C., Brunak, S., Nielsen, M. 2007. "Modeling the adaptive immune system: predictions and simulations", *Bioinformatics*, 23, 3265-3275.

Magdo, H. S., Stillwell, T. L., Greenhawt, M. J., Stringer, K. A., Yu, S., Fifer, C. G., Russell, M. W., Schumacher, K. R. 2015. "Immune abnormalities in fontan protein-losing enteropathy: A case-control study", *Journal of Pediatrics*, 167(2), 331-337.

Malmgaard, L. 2004. "Induction and Regulation of IFNs During Viral Infections", *Journal of Interferon&Cytokine Research*, 24, 439-454.

Marshall, J. .S, Jawdat, D. M. 2004. "Mast cells in innate immunology", *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 114, 21-27.

Mathern, D. R., Heeger, P. S. 2015. "Molecules Great and Small: The Complement System", *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 10, 1636-1650.

McHeyzer-Williams, L. J., McHeyzer-Williams, M. G. 2005. "Antigen-specific memory B cell development", *Annual Review of Immunology*, 23, 487,513.

Merle, N. S., Church, S. E., Fremeaux-Bacchi, V., Roumenina, L. T. 2015. "Complement system part I – molecular mechanisms of activation and regulation", *Frontiers in Immunology*, 6, 262.

Mesquita Júnior, D., Araújo, J. A., Catelan, T. T., Souza, A. W., Cruvinel, W. de M., Andrade, L. E., Silva N. P. 2010. "Immune system -part II: basis of the immunological response mediated by T and B lymphocytes", *Revista Brasileira de Reumatologia*. 50, 552-580.

Miossec, P., Korn, T., Kuchroo, V. K. 2009. "Interleukin-17 and type 17 helper T cells", *New England Journal of Medicine*, 361, 888-898.

Mitsuiki, N., Schwab, C., Grimbacher, B. 2019. "What did we learn from CTLA-4 insufficiency on the human immune system?", *Immunological Reviews*, 287, 33-49.

Moretta, A., Bottino, C., Mingari, M. C., Biassoni, R., Moretta, L. 2002. "What is a natural killer cell?", *Nature Immunology*, 3, 6-8.

Murphy, K. M., Reiner, S. L. 2002. "The lineage decisions of helper T cells", *Nature Reviews Immunology*, 2:933-944.

O'Garra, A., Vieira, P. 2004. "Regulatory T cells and mechanisms of immune system control", *Nature Medicine*, 10, 801-805.

Ogurlur, I., Kiykim, A., Nain, E., Somer, A., Guven, A., Baris, S., Ozen, A., Karakoc-Aydiner, E. 2017. "Protein Expression in the Diagnosis of LRBA Deficiency by Flow Cytometer", *Asthma Allergy Immunology*, 15, 123-128.

Pancer, Z., Cooper, M.D. 2006. "The evolution of adaptive immunity", *Annual Review of Immunology*, 24, 497-518.

Pieper, K., Grimbacher, B., Eibel, H. 2013. "B-cell biology and development", *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 131, 959-971.

Reiner, S. L. 2007. "Development in motion: helper T cells at work", *Cell*, 129, 33-36.

Saifi, M., Wysocki, C. A. 2015. "Autoimmune Disease in Primary Immunodeficiency: At the Crossroads of Anti-Infective Immunity and Self-Tolerance", *Immunology and Allergy Clinics of North America*, 35, 731-52.

Sakaguchi, S., Miyara, M., Costantino, C. M., Hafler, D. A. 2010. "FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system", *Nature Reviews Immunology*, 10, 490-500.

Sampaio, E. P., Hsu, A. P., Pechacek, J., Bax, H. I., Dias, D. L., Paulson, M. L., Chandrasekaran, P., Rosen, L. B., Carvalho, D. S., Ding, L., Vinh, D. C., Browne, S. K., Datta, S., Milner, J. D., Kuhns, D. B., Long Priel, D. A., Sadat, M. A., Shiloh, M., De Marco, B., Alvares, M., Gillman, J. W., Ramarathnam, V., de la Morena, M., Bezrodnik, L., Moreira, I., Uzel, G., Johnson, D., Spalding, C., Zerbe, C. S., Wiley, H., Greenberg, D. E., Hoover, S. E., Rosenzweig, S. D., Galgiani, J. N., Holland, S. M. 2013. "Signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) gain-of-function mutations and disseminated coccidioidomycosis and histoplasmosis", *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 131, 1624-1634.

Schmidt, R. E., Grimbacher, B., Witte, T. 2017. "Autoimmunity and primary immunodeficiency: two sides of the same coin?", *Nature Reviews Rheumatology*, 14, 7-18.

Schrezenmeier, E., Jayne, D., Dörner, T. 2018. "Targeting B Cells and Plasma Cells in Glomerular Diseases: Translational Perspectives", *Journal of the American Society of Nephrology*, 29, 741-758.

Schubert, D., Bode, C., Kenefeck, R., Hou, T. Z., Wing, J. B., Kennedy, A., Bulashevskaya, A., Petersen, B. S., Schäffer, A. A., Grüning, B. A., Unger, S., Frede, N., Baumann, U., Witte, T., Schmidt, R. E., Dueckers, G., Niehues, T., Seneviratne, S., Kanariou, M., Speckmann, C., Ehl, S., Rensing-Ehl, A., Warnatz, K., Rakhmanov, M., Thimme, R., Hasselblatt, P., Emmerich, F., Cathomen, T., Backofen, R., Fisch, P., Seidl, M., May, A., Schmitt-Graeff, A., Ikemizu, S., Salzer, U., Franke, A., Sakaguchi, S., Walker, L. S. K., Sansom, D. M., Grimbacher, B. 2014. "Autosomal dominant immunodysregulation syndrome in humans with CTLA-4 mutations", *Nature Medicine*, 20, 1410-1416.

Shlomchik, M. J., Weisel, F. 2012. "Germinal center selection and the development of memory B and plasma cells", *Immunological Reviews*, 247:52-63.

Simbirtsev, A. S., Kozlov, I. G. 2012. Cytokine system. In: Kamkin A, Kiseleva I, eds. Mechanical stretch and cytokines. Mechanosensitivity in cells and tissues (5th Edition). New York: Springer.

Sina, C., Kemper, C., Derer, S. 2018. "The intestinal complement system in inflammatory bowel disease: Shaping in testinal barrier function", *Seminers in Immunology*, 37, 66-73.

Smith-Garvin, J.E., Koretzky, G. A., Jordan, M. S. 2009. "T Cell Activation", *Annual Review of Immunology*, 27, 591-619.

Spendlove, I., Sutavani, R. 2010. "The role of CD97 in regulating adaptive T-cell responses", *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 706, 138-148.

Songu, M., Katılmış, H. 2012. "Enfeksiyondan korunma ve immün system", *Journal of Medicine Updates*, 2, 31-42.

Takaoka, A., Yanai, H. 2006. "Interferon signalling network in innate defence", *Cellular Microbiology*, 8, 907-922.

Tarlinton, D. 2006. "B-cellmemory: are subssets necessary?", *Nature Reviews Immunology*, 6, 785-790.

Tangye, S.G., Al-Herz, W., Bousfiha, A., Chatila, T., Cunningham-Rundles, C., Etzioni, A., Franco, J.L., Holland, S.M., Klein, C., Morio, T., Ochs, H.D., Oksenhendler, E., Picard, C., Puck, J., Torgerson, T.R., Casanova, J.L., Sullivan, K.E. 2020. "Human Inborn Errors of Immunity: 2019 Update on the Classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee", *Journal of Clinical Immunology*, 40, 24-64.

Taylor, P. R., Martinez-Pomares, L., Stacey, M., Lin, H. H., Brown, G. D. 2005. "Macrophage receptors and immune recognition", *Annual Reviews of Immunology*, 23, 901-944.

Thaiss, C. A., Zmora, N., Levy, M., Elinav, E. 2016. "The microbiome and innate immunity", *Nature*, 535, 65-74.

Thakur, A., Mikkelsen, H., Jungersen, G. 2019. "Intracellular Pathogens: Host Immunity and Microbial Persistence Strategies", *Journal of Immunology Research*, 2019, 1356540.

Thurman, J. M., Nester, C. M. 2016. "All Things Complement", *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 11, 1856-1866.

Tisoncik, J. R., Korth, M. J., Simmons, C. P., Farrar, J., Martin, T. R., Katze, M. G. 2012. "Into the eye of the cytokine storm", *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 76, 16-32.

Toubiana, J., Okada, S., Hiller, J., Oleastro, M., Lagos Gomez, M., Aldave Becerra, J. C., et al. 2016. "Heterozygous STAT1 gain-of-function mutations underlie an unexpectedly broad clinical phenotype", *Blood*, 127, 3154-3164.

Van de Veerdonk, F. L., Plantinga, T. S., Hoischen, A., Smeekens, S. P., Joosten, L. A. B., Gilissen, C., Arts, P., Rosentul, D. C., Carmichael, A. J., Smits-van der Graaf, C. A. A., Kullberg, B. J., van der Meer, J. W. M., Lilic, D., Veltman, J. A., Netea, M. G. 2011. "STAT1 mutations in autosomal dominant chronic mucocutaneous candidiasis", *New England Journal of Medicine*, 365, 54-61.

Vargas-Hernández, A., Mace, E. M., Zimmerman, O., Zerbe, C. S., Freeman, A. F., Rosenzweig, S., Leiding, J. W., Torgerson, T., Altman, M. C., Schussler, E., Cunningham-Rundles, C., Chinn, I. K., Carisey, A. F., Hanson, I. C., Rider, N. L., Holland, S. M., Orange, J. S., Forbes, L. R. 2018. "Ruxolitinib partially reverses functional natural killer cell deficiency in patients with signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) gain-of-function mutations", *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 141, 2142-2155.e5.

Verma, N., Burns, S. O., Walker, L. S. K., Sansom, D. M. 2017. "Immunodeficiency and autoimmunity in patients with CTLA-4 (CD152) mutations", *Clinical and Experimental Immunology*, 190, 1-7.

Vignes, S., Carcelain, G. 2009. "Increased surface receptor Fas (CD95) levels on CD4+lymphocytes in patients with primary intestinal lymphangiectasia", *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 44, 252-256.

Yao, Y. L., Shen, X. M., Shi, L. J., Li, C. X., Wu, L. 2019. "Chronic mucocutaneous candidiasis with *STAT1* gain-of-function variant: a case report and review of the literature", *Frontiers of Oral and Maxillofacial Medicine*, 1, 8.

Walker, L. S., Sansom, D. M. 2015. "Confusing signals: Recent progress in CTLA-4 biology", *Trends in Immunology*, 36, 63-70.

Weinacht, K. G., Charbonnier, L. M., Alroqi, F., Plant, A., Qiao, Q., Wu, H., Ma, C., Torgerson, T. R., Rosenzweig, S. D., Fleisher, T. A., Notarangelo, L. D., Hanson, I. C., Forbes, L. R., Chatila, T. A. 2017. "Ruxolitinib reverses dysregulated T helper cell responses and controls autoimmunity caused by a novel signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) gain-of-function mutation", *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 139, 1629-1640.e2.

Zhang, J. M., An, J. 2007. "Cytokines, Inflammation and Pain", *International Anesthesiology Clinics*, 45, 27-37.

Zhang, N., Bevan, M. J. 2011. "CD8(+) T cells: footsoldiers of the immune system", *Immunity*, 26, 161-168.

Ziegler, J. B., Ballou, M. 2019. "Primary Immunodeficiency: New Approaches in Genetic Diagnosis, and Constructing Targeted Therapies", *Journal of Allergy and Clinical Immunology-In practice*, 7, 839-841.

Zipfel, P. F., Skerka, C. 2009. "Complement regulators and inhibitory proteins", *Nature Reviews Immunology*, 9, 729-740.

Zoroğlu, S. S., Yürekli, M., Meram, I., Söğüt, S., Tutkun, H., Yetkin, O., Sivasli, E., Savaş, H. A., Yanik, M., Herken, H., Akyol, O. 2003. "Pathophysiological role of nitric oxide and adreno-medullin in autism", *Cell Biochemistry and Function*, 21, 55-60.