



Primer İmmün Yetmezliklerde Akan Hücre Ölçer ile Hücre İçi Protein İfadesinin Tanısal Kullanımı; Marmara Deneyimi

Diagnostic Usage of Intracellular Protein Staining by Flow Cytometer in Primary Immune Deficiencies; Marmara Experience

İsmail ÖĞÜLÜR, Safa BARIŞ, Ahmet ÖZEN, Ercan NAIN, Ayça KIYKIM, Elif KARAKOÇ-AYDINER

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Pediatrik Allerji ve İmmünoloji Bilim Dalı, İstanbul, Türkiye
Division of Pediatric Allergy and Immunology, Marmara University, Faculty of Medicine, İstanbul, Turkey

ÖZ

Amaç: Çalışmamız kapsamında, akan hücre ölçer ile tek protokolde “dedicator of cytokinesis 8” (DOCK8), “LPS-responsive beige-like anchor protein” (LRBA), “SH2D1A/SLAM-associated protein” (SAP) ve “X-linked inhibitor of apoptosis protein” (XIAP) hücre içi protein ifadesinin sağlıklı kontrollerde optimizasyonu ve standardizasyonunun sağlanarak hastalarda bu yöntemin tanıda kullanılabilmesinin sağlanması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Heparinli tüplere alınan kanlardan periferik kan mononükleer hücreler izole edildi. Protein ifadeleri, izotipe göre ortalama floresan yoğunluğu farkına (Δ MFI) göre analiz edildi.

Bulgular: “Dedicator of cytokinesis 8” antikoruna için Δ MFI değerleri, sağlıklı kontrollerde CD3+ T hücrelerde 21.3 ± 4 iken CD20+ T hücrelerde 25 ± 3.3 olarak belirlendi. “Dedicator of cytokinesis 8” eksikliğinde protein ifadesinin çok azaldığı ya da tamamen kaybolduğu gözlemlendi. “LPS-responsive beige-like anchor protein” antikoruna için Δ MFI, sağlıklı kontrollerde lenfositlerde 36 ± 7.7 olarak gözlemlenirken, LRBA eksikliğinde lenfositlerde 5.9 ± 1.8 olarak çok düşük düzeyde belirlendi. “SH2D1A/SLAM-associated protein” ve “X-linked inhibitor of apoptosis protein” antikorları ile boyama sonucu sağlıklı kontrollerde Δ MFI değerleri sırasıyla, SAP için CD8+ T hücrelerde 30.2 ± 3 ve XIAP için ise CD3+ T hücrelerde 13.9 ± 3.2 , CD20+ B hücrelerde 14.6 ± 3.5 olarak gözlemlendi. Genetik mutasyonu gösterilebilen SAP ve XIAP eksikliği olan hasta olmadığı için kontrolle karşılaştırma yapılamadı.

Sonuç: Klinikte şüpheli DOCK8, LRBA eksikliği olgularında hızlı ve güvenilir sonuç vermesi nedeniyle öncelikle protein ifadelerinin akan hücre ölçer cihazında değerlendirilmesi uygundur. Aynı yöntemin SAP ve XIAP eksikliği düşünülen olgularda da kullanılabilmesi düşünülmektedir.

ABSTRACT

Objective: The aim of our study was the optimization and standardization of intracellular dedicator of cytokinesis 8 (DOCK8), LPS-responsive beige-like anchor protein (LRBA), SH2D1A/SLAM-associated protein (SAP) and X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) protein expressions in healthy controls with a single flow cytometer protocol and to concomitantly evaluate the possible use of this method for diagnosis.

Materials and Methods: Peripheral blood mononuclear cells were isolated from heparinized blood samples. Protein expressions were analyzed as mean fluorescein intensity difference (Δ MFI) according to the isotype.

Results: Δ MFI values obtained by DOCK8 antibody staining were 21.3 ± 4 in CD3+ T cells and 25 ± 3.3 in CD20+ T cells in healthy controls. These values in patients with DOCK8 deficiency were either very low or completely absent. Δ MFI values obtained by LRBA protein antibody staining were 36 ± 7.7 in healthy controls, while they were at the very low levels of 5.9 ± 1.8 in the LRBA protein deficiency patients. The values obtained by SAP and XIAP antibody staining were 30.2 ± 3 in CD8+ T cells for SAP, 13.9 ± 3.2 in CD3+ T and 14.6 ± 3.5 in CD20+ B cells for XIAP. Since the SAP and XIAP results were not confirmed by gene sequencing, the results were not compared to healthy controls.

Conclusion: Due to its rapid and reliable results in clinically relevant cases for DOCK8 and LRBA deficiencies, analysis of protein expression is primarily suitable to evaluate intracellular staining protocol by flow cytometer. In addition, this particular method could be suitable for patients considered to be SAP and XIAP deficient.

Anahtar kelimeler: Akan hücre ölçer, hücre içi protein ifadesi, ortalama floresan yoğunluğu, primer immün yetmezlik

Geliş Tarihi: 06/03/2017 • **Kabul Tarihi:** 03/07/2017

Key words: Flow cytometer, intracellular protein expression, mean fluorescence intensity, primary immunodeficiency

Received: 06/03/2017 • **Accepted:** 03/07/2017

GİRİŞ

Primer immün yetmezlikler (PİY), immün sistemin gelişimi ve/veya fonksiyonunu etkileyerek tekrarlayan enfeksiyonlara yatkınlık ile seyreden bir hastalık grubudur. Enfeksiyonlara ek olarak, PİY'ler otoimmün hastalıklar, enflamasyon ve malignitelere yatkınlığı içeren çeşitli klinik bulguları ile seyredebilmektedir (1). Primer immün yetmezliklerin prevalansı 1:10.000 ile 1:100.000 arasında bildirilmiştir (2), ancak akraba evlilikleri oranının yüksek olması (%20-40) nedeniyle genellikle otozomal çekinik geçiş gösteren bu hastalıkların ülkemizde çok daha sık olduğu düşünülmektedir (3). Bu hastalıklar hakkındaki farkındalığın az olması nedeniyle hastaların zamanında tanı ve tedavilerinin sağlanmasında ciddi sıkıntılar söz konusudur. Bu nedenle, çoğu hastada ilk klinik belirtilerin görülmesi ile kesin tanının konulması arasında uzun bir zaman aralığı oluşmaktadır (4,5).

Günümüzde, PİY'lerde 300'den fazla hastalık ile ilişkili gen tanımlanmıştır (6). Bu genlerden bir tanesi olan *dedicator of cytokinesis 8 (DOCK8)* genindeki bialelik mutasyonlar, akciğer ve cilt enfeksiyonları, yüksek serum IgE düzeyi, egzema ve gıda allerjisi ile karakterize bir kombine immün yetmezlik olan ve otozomal çekinik kalıtılan Hiper-IgE sendromuna neden olmaktadır. "Dedicator of cytokinesis 8" eksikliği enfeksiyonlara, otoimmüniteye ve maligniteye yatkınlıktan dolayı erken ölümlere yol açabilmektedir (7,8). Pai ve ark. (2014) bu hastalığın tanısında akan hücre ölçer ile protein ifadesinin hızlı ve güvenilir sonuç verdiğini, etkilenmiş hastaların ve aile üyelerindeki potansiyel taşıyıcıların bu yöntem ile teşhis edilebileceğini göstermiştir (9). Bu hastalık günümüzde hematopoetik hücre nakli ile tedavi edilmektedir (10).

LPS-responsive beige-like anchor protein (LRBA) eksikliği, *LRBA* geninde meydana gelen homozigot ya da birleşik (compound) heterozigot mutasyonlar sonucu, *LRBA* protein ifadesinin kaybı sonucu oluşmaktadır (11). "*LPS-responsive beige-like anchor*" geninde meydana gelen mutasyonlar otoimmüniteye, lenfoproliferasyona ve immün yetmezliğe neden olmaktadır (12). LPS-responsive

beige-like anchor protein mutasyonu belirlenen hastalarda akan hücre ölçer ile protein ifadesinde azalma saptanmış ve ön tanıya yöntemin uygun olduğu belirtilmiştir (12).

X'e bağlı geçiş gösteren lenfoproliferatif sendrom (XLP) ise Epstein Barr virüs (EBV) enfeksiyonuna bozulmuş immün yanıt ile karakterize PİY hastalığıdır. Majör klinik fenotipleri; fatal enfeksiyöz mononükleozis ya da EBV-ilişkili hemofagositik lenfositosis, lenfoproliferatif bozukluk ve disgamaglobulinemidir (13). Bu hastalıkla ilişkili ilk belirlenen sorumlu gen *SH2D1A/SLAM-associated protein (SAP)* genidir (14). İkinci belirlenen gen ise X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) kodlayan *XIAP* ya da *BIRC4* genidir (15). Yapılan çalışmalarda, *SAP* ve *XIAP* protein ifadelerinin akan hücre ölçer ile değerlendirilmesinin klinik yararlılığı gösterilmiş ve bu eksiklikler için hastaların hızlı bir şekilde taranabileceği belirtilmiştir (16-18). Hematopoetik kök hücre nakli bu hastalar için de tek küratif tedavi yöntemidir (19). Bu tedavi sonrasında, hastalarda meydana gelen protein ifadesindeki değişimi değerlendirmede akan hücre ölçer yöntemi bir seçenek olarak kullanılmaktadır (18).

Yukarıda adı geçen genlerin eksikliği sonucu oluşan PİY hastalıklarında uygun tanı ve tedaviye ulaşamayan hastalar için seyir ağır ve prognoz oldukça kötüdür. Gen dizileme ile mutasyon varlığının belirlenmesi bu hastalıklarda kesin tanı için gereklidir. Bu hastalıklarda ön tanı için daha hızlı sonuç veren yöntemler araştırılmaktadır. Günümüzde akan hücre ölçer cihazı ile ilgili protein ifadesinin araştırılması hızlı tanı ve tarama için kullanılmaktadır. Çalışmamız kapsamında ise akan hücre ölçer ile tek protokolda *DOCK8*, *LRBA*, *SAP* ve *XIAP* hücre içi protein ifadesinin sağlıklı kontrollerde optimizasyonu ve standardizasyonunun sağlanarak hastalarda bu yöntemin tanıdaki öneminin ülkemiz koşullarında belirlenmesi amaçlandı.

GEREÇ ve YÖNTEMLER

Çalışmaya, akan hücre ölçer ile protein ifadesinin optimizasyonu ve standardizasyonunda gönüllü olarak toplam 22 sağlıklı kontrol (*DOCK8*=10, *LRBA*=8, *SAP* ve *XIAP*=4) dahil edildi. Tüm gönüllülerden ya da

ebeveynlerden yapılacak işlem hakkında bilgilendirilerek yazılı onamları alındı.

Yöntemlerin uygulanabilirliği test edildikten sonra, genetik olarak DOCK8 eksikliği tanısı almış üç, LRBA eksikliği tanısı almış üç hastanın yanı sıra klinik olarak DOCK8 eksikliği düşünülen beş, LRBA eksikliği düşünülen dört, SAP veya XIAP eksikliği düşünülen iki hasta çalışmaya dahil edildi. Çocukların ebeveynlerinden ya da kendilerinden onamları uygulanacak işlem hakkında bilgi verilerek yazılı olarak alındı. Çalışma için etik kurulundan 09.2016.618 no ile onay alındı.

Tüm hastalıklar için standart bir protokol optimize edildi. Bu amaçla, öncelikle gönüllü sağlıklı kontrollerden heparinli tüplere 2 cc kan alındı ve bekletilmeden periferik kan mononükleer hücreler (PKMH) izole edildi. 100µl yıkama solüsyonu içerisinde $2-3 \times 10^5$ hücre süspansiyonu edildi. Yöntemin optimizasyonu sonrasında, hasta örnekleri için yapılan hücre içi boyamalar eş zamanlı aynı günde ve eş koşullarda sağlıklı kontrollere ait sonuçlarla karşılaştırmalı olarak değerlendirildi. DOCK8 ve XIAP örnekleri anti-CD3PE (BD Biosciences, Pharmingen, San Diego, ABD) ve anti-CD20PerCP (Biolegend, San Diego, ABD) monoklonal antikorları ile, SAP örnekleri ise anti-CD3PercP (BD Biosciences, Pharmingen, San Diego, ABD) ve anti-CD8APC (BD Biosciences, Pharmingen, San Diego, ABD) ile işaretlendi. "LPS-responsive beige-like anchor" protein örneklerine yüzey belirteç işaretlemesi yapılmadı ve LRBA protein ifadesi tüm lenfosit hücreleri üzerinden yapıldı. Hücre içi boyama aşamasına geçebilmek için, fiksasyon-permeabilizasyon kiti (BD Biosciences, Pharmingen, San Diego, ABD) üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda kullanıldı. Primer ve sekonder antikorlar ile işaretleme sonrası, hücreler akan hücre ölçer cihazında analiz edildi.

Farklı proteinler için sırasıyla belirtilen birincil ve ikincil antikorlar kullanıldı: DOCK8 için; birincil antikor; DOCK8 IgG1 (Santa Cruz Biyoteknoloji, Heidelberg, Almanya), ikincil antikor; anti-fare IgG1FITC (Biolegend, San Diego, ABD), LRBA için; birincil antikor; anti-insan LRBA (Sigma-Aldrich, Gallen, İsviçre), ikincil antikor; anti-tavşan IgG-FITC (Thermo Fisher Scientific, San Diego, ABD), SAP için; birincil antikor; anti-SAP PE (eBioscience, San Diego, ABD), XIAP için; birincil antikor; anti-XIAP (BD Biosciences, Pharmingen, San Diego, ABD), ikincil antikor; anti-fare IgG1FITC (Biolegend, San Diego, ABD) kullanıldı.

Analiz için BD FACS Calibur cihazı ve Cellquest yazılım programı kullanıldı (BD Biosciences, Pharmingen, San Diego, ABD). Lenfosit hücreleri etrafında oluşturulan kapılama ile hücre dağılımı histogram olarak görüntüldü. Elde edilen histogramlar yardımıyla hücre içi protein ifadeleri, birincil antikor ile işaretli örneklerin MFI değerlerinden, izotip kontrol veya birincil antikor kullanılmadan sadece ikincil antikor kullanılarak ölçüm yapılan negatif kontrol MFI değerleri çıkarılarak, bulunan Δ MFI farkına göre hesaplandı.

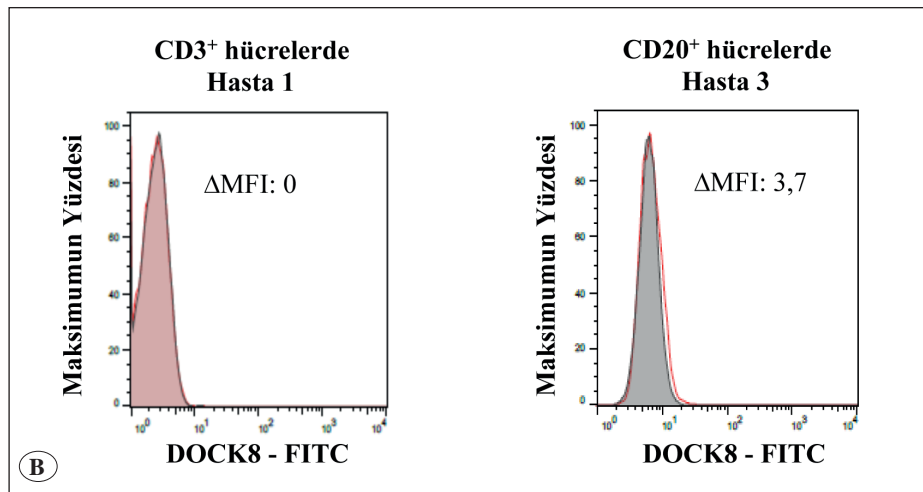
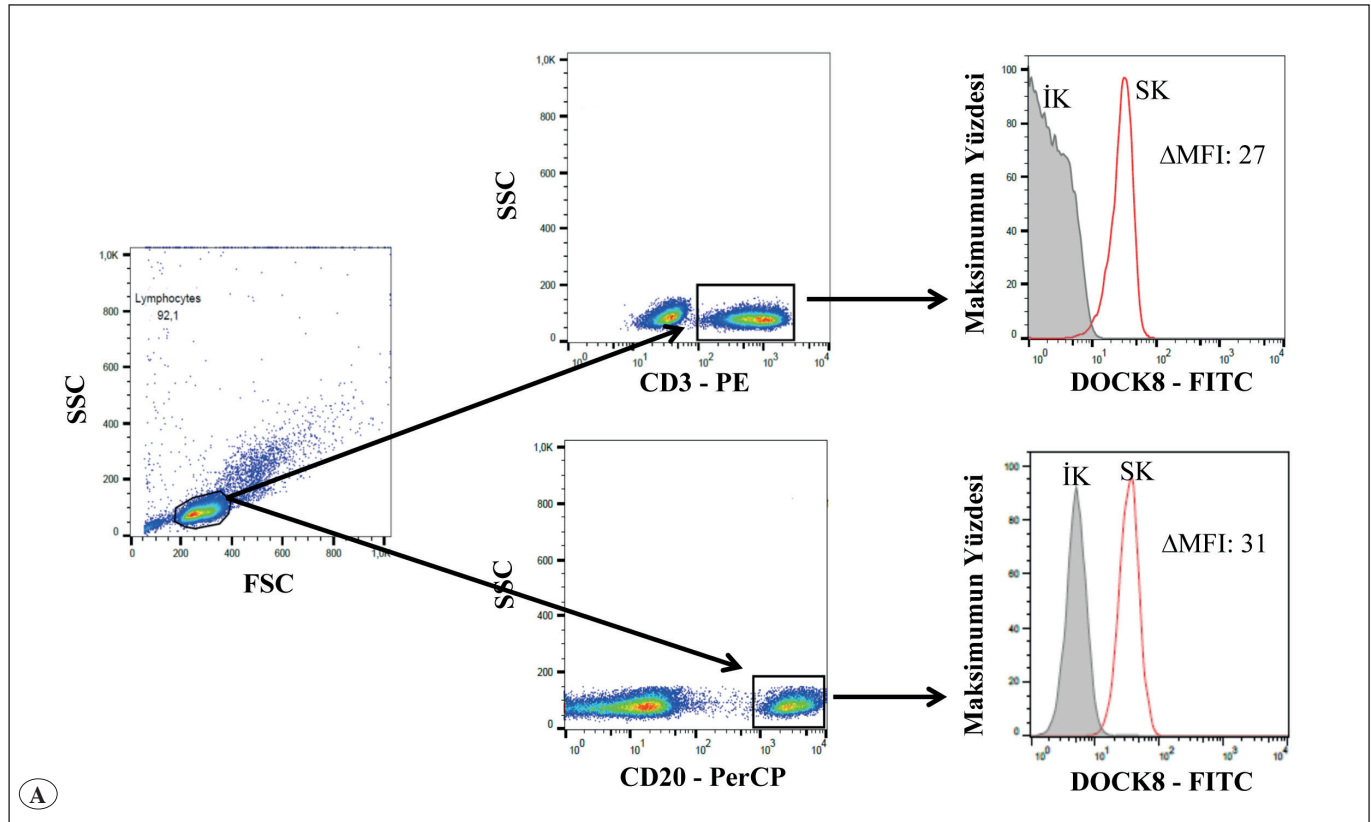
BULGULAR

Sağlıklı kontroller ve hastalarda DOCK8 protein ifadesi

Sağlıklı kontrollerde DOCK8 protein ifadesinin belirlenmesi için, yaşları 2 ile 50 arasında değişen, PİY uyarıcı bulgusu ve kronik hastalığı olmayan 10 sağlıklı gönüllü (yaşları ortalama \pm standart sapma: 22.9 ± 15 yıl) çalışmaya alındı. DOCK8 protein ifadesi, canlı lenfosit hücrelerde CD3⁺ T hücreler ve CD20⁺ B hücreler kapılanarak elde edilen histogram görüntülerindeki MFI değerlerine göre belirlendi (Şekil 1A). Sağlıklı bireylerde izotip kontrol MFI değeri CD3⁺ T hücrelerde 3.75 ± 2 iken CD20⁺ B hücrelerde 10.7 ± 4.3 olarak bulundu. Sağlıklı bireylerde DOCK8 antikoruna ile işaretlenen hücrelerde ise; Δ MFI değeri CD3⁺ T hücrelerde 21.3 ± 4 iken CD20⁺ B hücrelerde 25 ± 2.8 olarak gözlemlendi.

DOCK8 eksikliği saptanmış üç hastada protein ifadesine bakıldığında ve sağlıklı kontroller ile karşılaştırıldığında, DOCK8 protein ifadesinin Δ MFI değerine göre çok azaldığı ya da tamamen kaybolduğu gözlemlendi (Şekil 1B, Tablo I).

Kesin tanısı olmayan fakat klinik özelliklerine göre DOCK8 eksikliği düşünülen beş hastada protein ifadesine bakıldığında, bunların üç tanesinde Δ MFI değerinin sağlıklı kontrollere göre düşük olmakla beraber CD3⁺ T hücrelerde 14.2 ± 1.3 ve CD20⁺ B hücrelerde 14 ± 3.1 olduğu gözlemlendi (Tablo I). İki hastada ise Δ MFI değerleri, CD3⁺ T hücrelerde 5.6 ve 7.9, CD20⁺ B hücrelerde ise 6.7 ve 6.4 olarak çok daha düşük olduğu bulundu. Fakat DOCK8 geni ekzom dizilemesi yapılan bu hastalarda mutasyon belirlenemedi, geniş delesyonlar açısından değerlendirmeler sürmektedir.



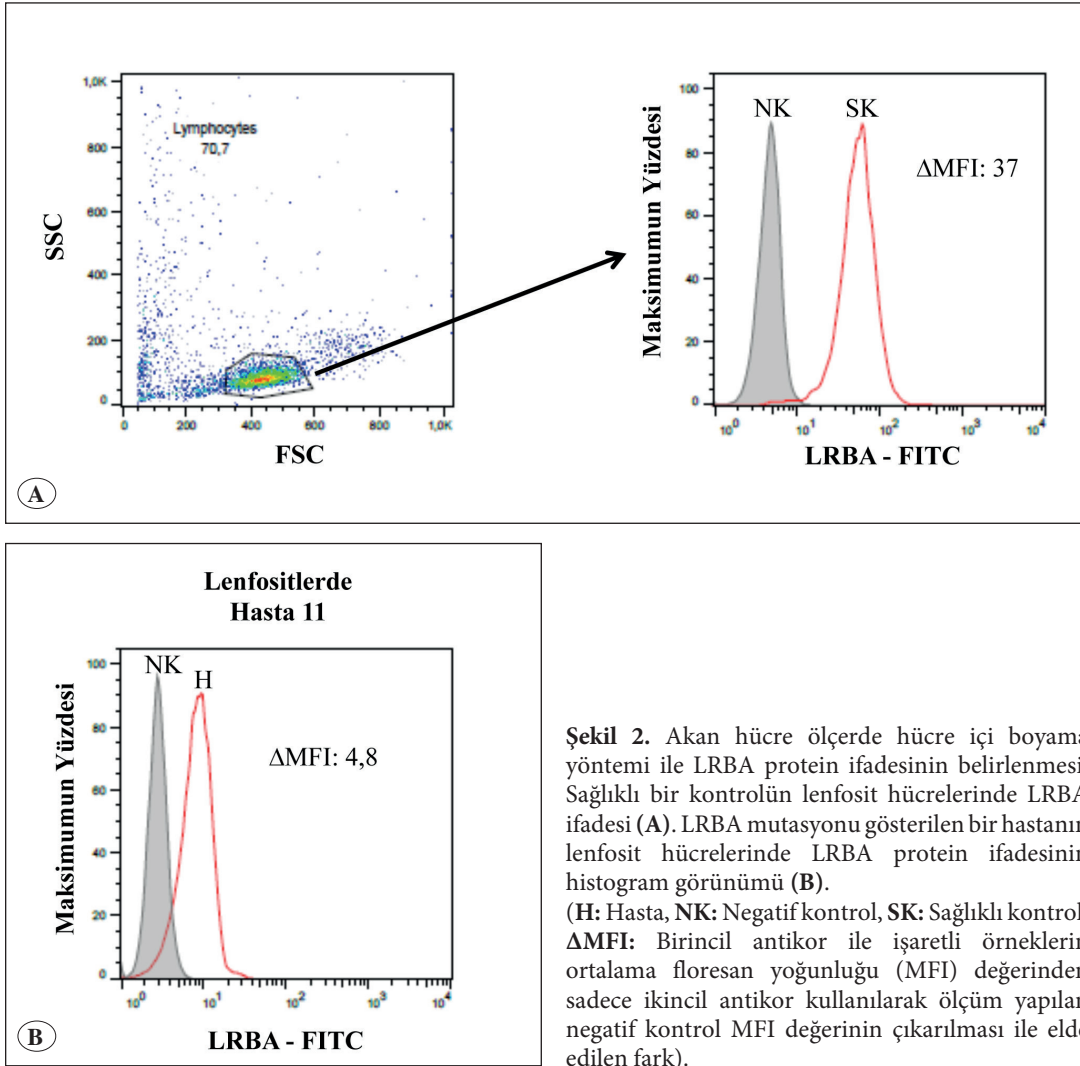
Şekil 1. Akan hücre ölçerde hücre içi boyama yöntemi ile DOCK8 protein ifadesinin belirlenmesi: Sağlıklı bir kontrolün CD3+ ve CD20+ hücrelerinde DOCK8 ifadesi (A). DOCK8 mutasyonu gösterilen iki hastanın CD3+ ve CD20+ hücrelerinde DOCK8 protein ifadesinin histogram görünümü (B).

(İK: İzotip kontrol, SK: Sağlıklı kontrol, ΔMFI: Birincil antikor ile işaretli örneklerin ortalama floresan yoğunluğu (MFI) değerinden izotip kontrol MFI değerinin çıkarılması ile elde edilen fark).

Sağlıklı kontroller ve hastalarda LRBA protein ifadesi

Sağlıklı kontrollerde LRBA protein ifadesinin belirlenmesi için, yaşları 15 ile 50 arasında değişen PİY uyarıcı bulgusu ve kronik hastalığı olmayan 8 sağlıklı gönüllü (yaşları ortalama \pm standart sapma: 28.3 ± 12 yıl) çalışmaya alındı. LRBA protein ifadesi, canlı lenfosit

hücreler etrafında oluşturulan kapılama ile hücre dağılımlarında elde edilen histogram görüntülerindeki MFI değerlerine göre belirlendi (Şekil 2A). Sağlıklı bireylerde MFI değeri izotip kontrolde 3.2 ± 0.6 , LRBA antikoruna ile işaretlenen hücrelerde ise Δ MFI değeri 36 ± 4.9 olarak bulundu.

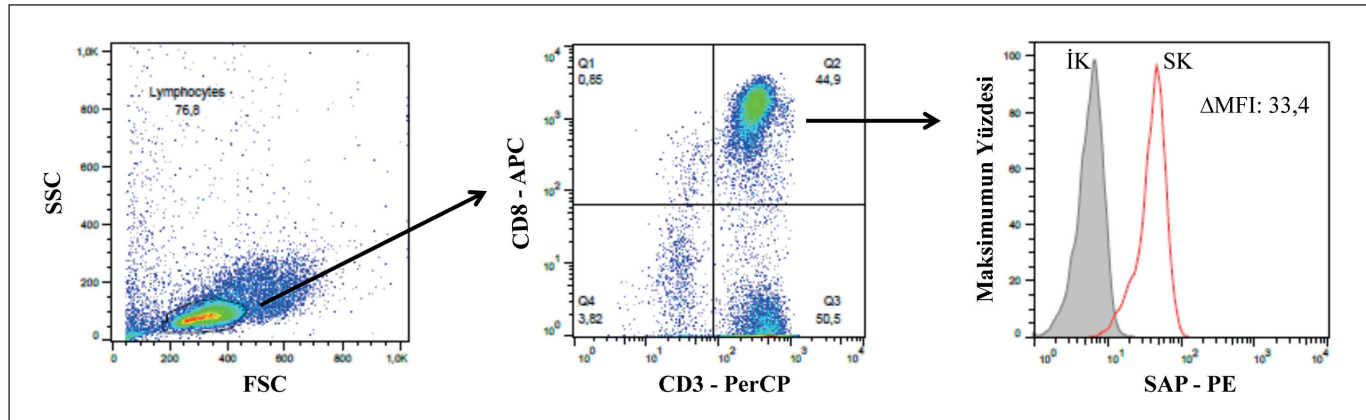


Şekil 2. Akan hücre ölçerinde hücre içi boyama yöntemi ile LRBA protein ifadesinin belirlenmesi: Sağlıklı bir kontrolün lenfosit hücrelerinde LRBA ifadesi (A). LRBA mutasyonu gösterilen bir hastanın lenfosit hücrelerinde LRBA protein ifadesinin histogram görünümü (B).

(H: Hasta, NK: Negatif kontrol, SK: Sağlıklı kontrol, ΔMFI: Birincil antikor ile işaretli örneklerin ortalama floresan yoğunluğu (MFI) değerinden sadece ikincil antikor kullanılarak ölçüm yapılan negatif kontrol MFI değerinin çıkarılması ile elde edilen fark).

Tablo I. DOCK8 hastalarının ve DOCK8 şüpheli hastaların demografik, klinik bulguları ve ΔMFI değerleri

Hasta	Yaş (yıl)	Cinsiyet	Tanı	CD3 ⁺ T Hücre		CD20 ⁺ B Hücre	
				ΔMFI	ΔMFI	ΔMFI	ΔMFI
				Hasta / Kontrol	Hasta / Kontrol	Hasta / Kontrol	Hasta / Kontrol
1	11,5	Kadın	DOCK8	0 / 20.1	0 / 24.6	0 / 24.6	0 / 24.6
2	11	Erkek	DOCK8	0 / 18.9	0 / 24.2	0 / 24.2	0 / 24.2
3	5	Kadın	DOCK8	2.1 / 227	3.7 / 31	3.7 / 31	3.7 / 31
4	8	Erkek	DOCK8 şüphesi	5.6 / 21.2	6.7 / 24.3	6.7 / 24.3	6.7 / 24.3
5	9	Erkek	DOCK8 şüphesi	14 / 19.7	12.6 / 22.5	12.6 / 22.5	12.6 / 22.5
6	30	Erkek	DOCK8 şüphesi	13.1 / 19.3	11.9 / 22.9	11.9 / 22.9	11.9 / 22.9
7	12	Kadın	DOCK8 şüphesi	7.9 / 18.7	6.4 / 23.3	6.4 / 23.3	6.4 / 23.3
8	1	Kadın	DOCK8 şüphesi	15.6 / 25.5	17.6 / 27.2	17.6 / 27.2	17.6 / 27.2



Şekil 3. Akan hücre ölçerde hücre içi boyama yöntemi ile SAP protein ifadesinin belirlenmesi: Sağlıklı bir kontrolün CD3+CD8+ hücrelerinde SAP ifadesi. (İK: İzotip kontrol, SK: Sağlıklı kontrol, ΔMFI: Birincil antikor ile işaretli örneklerin ortalama floresan yoğunluğu (MFI) değerinden izotip kontrol MFI değerinin çıkarılması ile elde edilen fark)

Tablo II. LRBA hastalarının ve LRBA şüpheli hastaların demografik, klinik bulguları ve ΔMFI değerleri

Hasta	Yaş (yıl)	Cinsiyet	Tanı	Lenfositlerde ΔMFI Hasta/Kontrol
9	10	Erkek	LRBA	8 / 35.2
10	11	Erkek	LRBA	4.8 / 26.7
11	4.5	Erkek	LRBA	4.8 / 37
12	29	Erkek	LRBA şüphesi	14.5 / 39.2
13	11	Erkek	LRBA şüphesi	14 / 34.9
14	3	Erkek	LRBA şüphesi	10.2 / 36.5
15	16	Erkek	LRBA şüphesi	29.5 / 42.7

Gen dizileme ile LRBA mutasyonu saptanmış üç hastada protein ifadesine bakıldığında ise, bu hastalarda ΔMFI değeri 5.9 ± 1.8 olarak çok düşük düzeyde belirlendi (Şekil 2B, Tablo II). Genetik tanısı olmayan klinik şüphe nedeniyle değerlendirmeye alınan hastalardan LRBA protein ifadesi, sağlıklı kontrollere göre düşük olanlarda ise (Tablo II), gen dizileme sonucu herhangi bir mutasyon saptanmadı.

Sağlıklı kontrollerde SAP ve XIAP protein ifadeleri

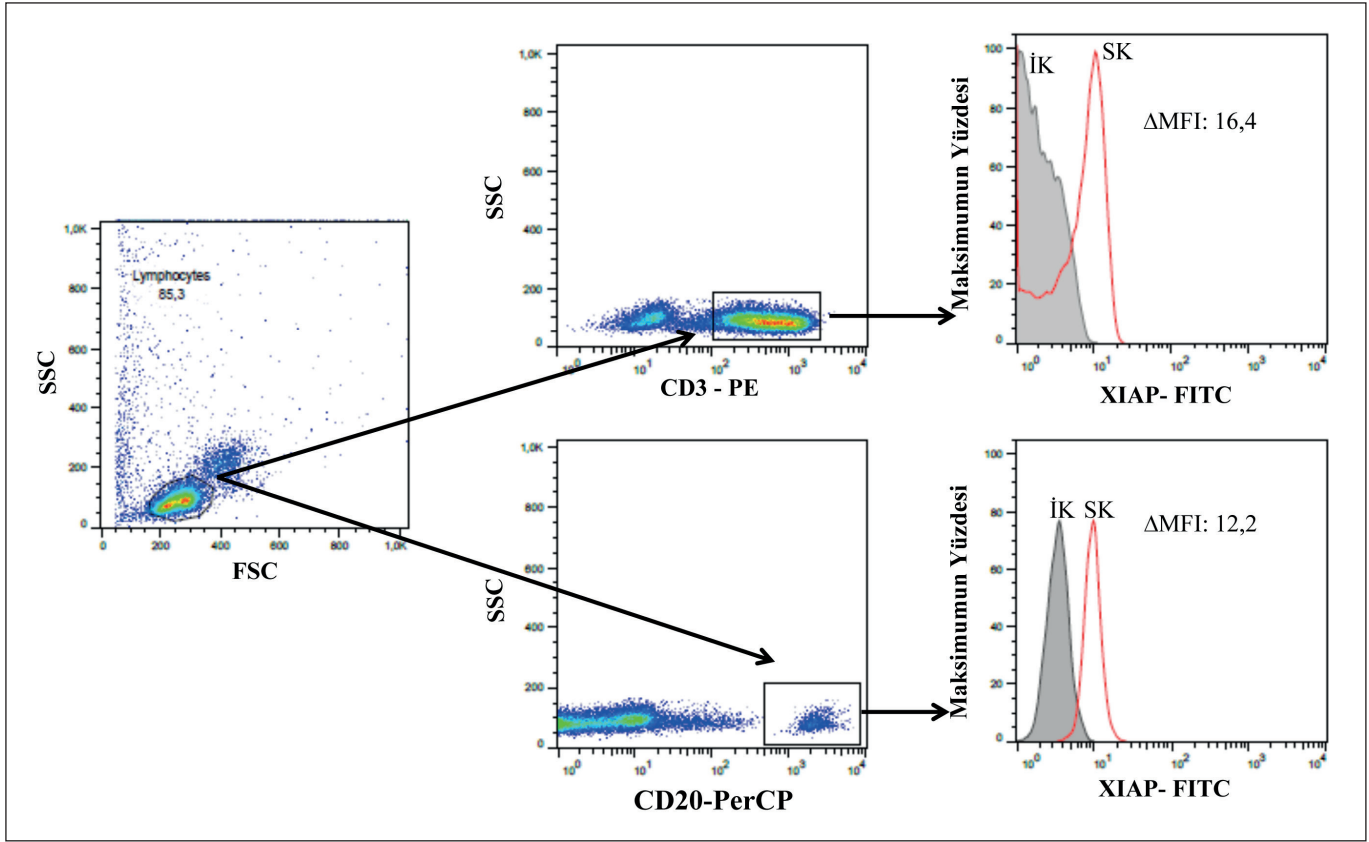
Sağlıklı kontrollerde SAP ve XIAP protein ifadelerinin belirlenmesi için, yaşları 10 ile 33 arasında değişen, PİY uyarıcı bulgusu ve kronik hastalığı olmayan dört sağlıklı gönüllü (yaşları ortalama \pm standart sapma: 28.3 ± 12 yıl) çalışmaya alındı. SAP protein ifadesi, canlı lenfosit hücreler etrafında oluşturulan kapılama sonrası CD3+CD8+ T hücrelerde, hücre dağılımlarında elde edilen histogram görüntülerindeki MFI değerlerine göre

belirldi (Şekil 3). Sağlıklı bireylerde MFI değeri izotip kontrol CD3+CD8+ hücrelerde 3.2 ± 1 , SAP antikoruna ile işaretlenen hücrelerde ΔMFI değeri ise 30.2 ± 3 olarak bulundu. XIAP protein ifadesi, canlı lenfosit hücreler etrafında oluşturulan kapılama sonrası CD3+ T hücreler ve CD20+ B hücrelerde, hücre dağılımlarında elde edilen histogram görüntülerindeki geometrik MFI değerlerine göre belirlendi (Şekil 4). Sağlıklı bireylerde izotip kontrol MFI değeri CD3+ T hücrelerde 4.7 ± 1 , CD20+ B hücrelerde 5 ± 2.8 olarak bulundu. XIAP antikoruna ile işaretlenen hücrelerde ise; ΔMFI değeri CD3+ T hücrelerde 13.9 ± 3.2 , CD20+ B hücrelerde 14.6 ± 3.5 olarak gözlemlendi.

Birimimizde gen dizileme yöntemi ile SAP ya da XIAP mutasyonu belirlenen hasta bulunmadığı için, kliniği bu mutasyonlar için şüpheli olarak görülen iki hastada SAP, yine diğer iki hastada ise XIAP hücre içi protein ifadesi belirlendi. Hem SAP hem de XIAP düşünülen hastalarda, protein ifadesi mevcut olmasına rağmen (SAP düşünülen hastalarda CD8+ T hücre ΔMFI: 22.6 ve 20.8; XIAP düşünülen hastalarda CD3+ T hücre ΔMFI: 7.14 ve 9.7, CD20+ B hücre ΔMFI: 11.9 ve 10.4) eş zamanlı kontrollere göre bir miktar düşük olarak gözlemlendi. Bu hastalarda genetik olarak mutasyon belirlenemedi.

TARTIŞMA

Primer immün yetmezlik (PİY) hastalıkları Türkiye’de ciddi bir halk sağlığı sorunu oluşturmaktadır. Akriba evliliklerinin ülkemizde yaygın (%20-40) olması dolayısıyla PİY’ler batılı ülkelere göre çok daha sık görülmektedir. Hastaların birçoğunun geç tanı alması veya tanı alamadan kaybedilmesi dolayısıyla, PİY’lerin prevalansı tam olarak



Şekil 4. Akan hücre ölçerde hücre içi boyama yöntemi ile XIAP protein ifadesinin belirlenmesi: Sağlıklı bir kontrolün CD3+ ve CD20+ hücrelerinde XIAP ifadesi. (İK: İzotip kontrol, SK: Sağlıklı kontrol, Δ MFI: Birincil antikor ile işaretli örneklerin MFI değerinden izotip kontrol MFI değerinin çıkarılması ile elde edilen fark)

bilinememektedir. Bu hastaların doğru teşhis edilmesi tedavi için kritiktir ve hem hasta hem de ailesi için uygun genetik danışmanlığa fırsat sağlamaktadır. Ayrıca erken tedavi, hastalığa bağlı ölümlerin engellenmesi için çok önemlidir (20). Bu bağlamda akan hücre ölçer ile protein ifadesinin ölçülmesi oldukça hızlı ve günümüzde yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Çalışmamızda, Pai ve ark. (9) tarafından DOCK8 protein ifadesinin belirlenmesinde oluşturulan basit ve etkili akan hücre ölçer yöntemi, DOCK8, LRBA, SAP ve XIAP hücre içi protein ifadelerinin tek bir yöntem ile belirlenmesi için optimize edildi ve laboratuvarımızda standardizasyonu sağlandı. Standardize edilen bu yöntemin gen dizilimi ile DOCK8 ve LRBA eksikliği gösterilen hastalarda kullanılmasıyla, akan hücre ölçer ile protein ifadesi yönteminin hızlı tanıda önemi gösterildi.

Akan hücre ölçer ile protein ifadesi tekniğinin başarılı ve güvenilir bir şekilde kullanılması dört ana basamağın doğru bir şekilde gerçekleştirilmesine bağlıdır: (i)

bu yöntem ile tanımlanmış bir hücre grubunun elde edilmesi, (ii) hücrelerin etkili bir şekilde fiksasyon ve permeabilizasyonu, (iii) en uygun izotip kontrolün seçilmesi, (iv) en uygun primer ve sekonder antikorların belirlenmesi (21). Çalışmamızda, DOCK8, LRBA, SAP ve XIAP hücre içi protein ifadelerinin belirlenmesi lenfosit hücre popülasyonu üzerinden gerçekleştirildi ve ticari olarak temin edilebilen en uygun reaktifler kullanıldı.

Hücre içi protein ifadesinin belirlenmesinde Western blot (WB) yöntemi de kullanılmaktadır. Tam kandan ve periferik mononükleer kan hücrelerinden çalışılan akan hücre ölçer ile protein tayininin avantajı, protein lizatı ile çalışılan WB ile karşılaştırılınca, daha az zamanda sonuç elde edilmesi ve daha az malzemeye ihtiyaç duyulması dolayısıyla maliyet-etkin olmasıdır (21). Diğer bir önemli yararları hücrelerin ise tek tek çalışılabilmesi ve lökosit ve lenfosit alt tiplerinin belirlenebilmesidir (17). Çalışmamızda, DOCK8 protein ifadesi CD3⁺ T hücreler ve CD20⁺ B hücreler içerisinde belirlendi. Ayrıca, SAP protein

ifadesi CD8⁺ T hücreler, XIAP protein ifadesi ise CD3⁺ T hücreler ve CD20⁺ B hücreler içerisinde MFI değerlerinin değişimine göre hesaplandı. LRBA protein ifadesi ise lenfosit hücrelerden kapılama yapılarak belirlendi. Hücre içi protein tayini yöntemlerinde lenfosit alt tiplerinin belirlenmesinde literatürde yayınlanmış bilimsel yazılar temel alındı (9,18).

Çalışmamızda, akan hücre ölçer ile DOCK8 protein ifadesine bakıldığında, genetik analiz ile mutasyon belirlenerek kesin tanı alan hastalarda, daha önceki çalışmalara benzer olarak (9), DOCK8 proteininin ya hiç ifade edilmediği ya da çok düşük miktarda ifade edildiği gözlemlendi. LRBA protein ifadesine bakıldığında, gen dizileme ile mutasyon belirlenen üç hastada ortalama Δ MFI değeri 5.9 ± 1.8 olarak, sağlıklı kontrollerdeki protein ifadesine göre oldukça düşük olarak belirlendi. Bu ortalama değer çok daha üzerinde gözlenen, fakat sağlıklı kontroller ile karşılaştırıldığında LRBA protein ifadesi azalan hastalara ise gen dizileme yapıldığında bir mutasyon saptanmadı. Elde ettiğimiz sonuçlar, literatür ile de uyumlu olarak (12,22), akan hücre ölçer ile protein ifadesine bakıldığında eş zamanlı kontrollerdeki LRBA ifadelerine göre büyük bir azalma olduğunda mutasyon belirlenebildiğini gösterdi. Klinik olarak SAP ve XIAP eksikliği düşünülen hastalarda, hücre akan ölçer ile protein ifadelerine bakıldığında ise, sağlıklı kontrollerde göre az bir düşme gözlenmesine rağmen, bu proteinler ile ilgili herhangi bir mutasyon saptanmadı. Bu proteinler ile ilgili yapılan araştırmalarda, mutasyon saptanan hastaların akan hücre ölçer analizinde protein ifadelerinin belirgin miktarda azaldığı gösterilmiş (16,17) ve bu şekilde yine sonuçlarımızın literatür ile uyumlu olduğu belirlenmiştir.

Buna ek olarak, akan hücre ölçer yöntemi heterozigot taşıyıcıların belirlenmesinde, kemik iliği nakli sonrasında protein ifadesi tayininde ve revertant mozaizm gösterilmesinde kullanılmaktadır (17,18). Jing ve ark. (23), yapmış oldukları çalışmada akan hücre ölçer ile hücre içi protein ifadesi tayini yöntemini kullanarak, 34 DOCK8 hastasından 17 tanesinde somatik reversiyon olduğunu göstermişler ve bunu DNA dizi analizi ile kanıtlamışlardır. Bu çalışmada, protein ifadesini CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, naif CD4⁺ ve CD8⁺ T hücreler, CD19⁺ B hücreler ve CD56⁺ doğal öldürücü (NK) hücreler içerisinde, uygun hücre yüzey belirteçleri kullanılarak lenfosit hücrelerini kapılayarak belirlemişlerdir. Bu çalışma, hastalar arasında fenotipik değişkenlikler gösteren çeşitli PİY hastalıklarında, ön tanının konmasında bu yöntemin kullanılabileceğini

göstermektedir (23). Çalışmamızda, klinik olarak DOCK8 düşünülen fakat genin ekzon bölgelerine özgü primerler ile sekans analizi sonucu mutasyon belirlenemeyen iki hasta bulunmaktadır (Hasta 4 ve 7). Her iki hastaya da uygulanan akan hücre ölçer yöntemi sonucunda DOCK8 protein ifadelerinde sağlıklı kontrollere göre belirgin bir azalma gösterildi. Hem CD3⁺ T hücreler hem de CD20⁺ B hücrelerde gözlenen ifadelerdeki bu azalma, bize her iki hastada da intronik mutasyon ya da somatik reversiyon olabileceğini düşündürdü ve her iki hastanın da DOCK8 genom sekanslanmasına karar verilmiştir.

Bu çalışmada hücre içi boyama yöntemi ile protein ifadesi çalışılarak kendi laboratuvarımıza ait optimizasyon ve standardizasyon verilerimiz sunulmaktadır. Daha hızlı ve daha çok sayıda hastaya tanı imkanı sağlayabilmek ve diğer laboratuvarlara esin kaynağı olmak amacıyla yöntemsel ve sonuçlara ait detaylar bu makale kapsamında tartışılmıştır. Ancak, SAP ve XIAP protein ifadelerine ilişkin çalışmaların daha çok sayıda hasta ve kontrolde sürdürülmesi gerekmektedir.

Sonuç olarak; klinikte şüpheli olgularda hızlı ve güvenilir sonuç vermesi nedeniyle DOCK8, LRBA, SAP ve XIAP protein ifadelerinin akan hücre ölçer cihazında hücre içi boyama tekniği ile değerlendirilmesi uygundur. Bu proteinler için tek bir yöntem ile protein ifadeleri kolayca belirlenebilmektedir ve protein ifadesi sağlıklı kontrolden anlamlı düşük hastalarda tanı koymak mümkündür. Bu hastalarda uygun gen dizileme ile mutasyon veya delesyonlar gösterilerek tanı doğrulanmalıdır. Genetik sonuçlar elde edilene kadar akan hücre ölçer ile hücre içi protein ifadesinin belirlenmesi ile hastalara hızlı ve etkin tanı, dolayısı ile de uygun tedavi imkanı sunulabilmektedir.

TEŞEKKÜR

Hücre içi boyama yöntemi ile protein ifadelerinin belirlenmesi konusunda protokollerin elde edilmesi, optimizasyonu ve standardizasyonunda çok büyük emekleri geçen ve DOCK8 protein ifadesinin akan hücre ölçer ile belirlenmesine ülkemizde öncülük eden değerli hocamız Prof. Dr. Işıl Berat Barlan'ı saygı ve özlemle anıyoruz. Akan hücre ölçer ile DOCK8 protein ifadesi protokolünü ve antikorlarını sağlayan Doç. Dr. Sevgi Keleş'e ve Prof. Dr. Talal Chatila'ya teşekkür ediyoruz.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Bu yazının hazırlanması ve yayınlanması aşamasında herhangi bir çıkar çatışması bulunmamaktadır.

KAYNAKLAR

1. Bonilla FA, Geha RS. 12. Primary immunodeficiency diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111:S571-S81.
2. Durandy A, Kracker S, Fischer A. Primary antibody deficiencies. *Nat Rev Immunol* 2013;13:519-33.
3. Sanal O, Tezcan I. Thirty years of primary immunodeficiencies in Turkey. *Ann N Y Acad Sci* 2011;1238:15-23.
4. Yüksek M, İkinciogulları A, Doğu F, Elhan A, Yüksek N, Reisli İ, et al. Primary immune deficiency disease awareness among a group of Turkish physicians. *Turk J Pediatr* 2010;52:372-7.
5. Dotta L, Badolato R. Primary immunodeficiencies appearing as combined lymphopenia, neutropenia, and monocytopenia. *Immunol Lett* 2014;161:222-5.
6. Bousfiha A, Jeddane L, Al-Herz W, Ailal F, Casanova JL, Chatila T, et al. The 2015 IUIS Phenotypic Classification for Primary Immunodeficiencies. *J Clin Immunol* 2015;35:727-38.
7. Zhang Q, Davis J, Lamborn I, Freeman A, Jing H, Favreau A, et al. Combined immunodeficiency associated with DOCK8 mutations. *N Engl J Med* 2009;361:2046-55.
8. Engelhardt KR, McGhee S, Winkler S, Sassi A, Woeliner C, Lopez-Herrera G, et al. Large deletions and point mutations involving the dedicator of cytokinesis 8 (DOCK8) in the autosomal-recessive form of hyper-IgE syndrome. *J Allergy Clin Immunol* 2009;124:1289-302.
9. Pai SY, de Boer H, Massaad MJ, Chatila TA, Keles S, Jabara HH, et al. Flow cytometry diagnosis of dedicator of cytokinesis 8 (DOCK8) deficiency. *J Allergy Clin Immunol* 2014;134:221-3.
10. Bittner TC, Pannicke U, Renner ED, Notheis G, Hoffman F, Belohradsky BH, et al. Successful long-term correction of autosomal recessive hyper-IgE syndrome due to DOCK8 deficiency by hematopoietic stem cell transplantation. *Klin Pediatr* 2010;222:351-5.
11. Lopez-Herrera G, Tampella G, Pan-Hammarstrom Q, Herholz P, Trujillo-Vargas CM, Phadwal K, et al. Deleterious mutations in LRBA are associated with a syndrome of immune deficiency and autoimmunity. *Am J Hum Genet* 2012;90:986-1001.
12. Lo B, Zhang K, Lu W, Zheng L, Zhang Q, Kanellopoulou C, et al. Autoimmune disease. Patients with LRBA deficiency show CTLA4 loss and immune dysregulation responsive to abatacept therapy. *Science* 2015;349:436-40.
13. Seemayer TA, Gross TG, Egeler RM, Pirruccello SJ, Davis JR, Kelly CM, et al. X-linked lymphoproliferative disease: Twenty-five years after the discovery. *Pediatr Res* 1995;38:471-8.
14. Sayos J, Wu C, Morra M, Wang N, Zhang X, Allen D, et al. The X-linked lymphoproliferative-disease gene product SAP regulates signals induced through the co-receptor SLAM. *Nature* 1998;395:462-9.
15. Rigaud S, Fondaneche MC, Lambert N, Pasquier B, Mateo V, Soulas P, et al. XIAP deficiency in humans causes an X-linked lymphoproliferative syndrome. *Nature* 2006;444:110-4.
16. Kanegane H, Yang X, Zhao M, Yamato K, Inoue M, Hamamoto K, et al. Clinical features and outcome of X-linked lymphoproliferative syndrome type I (SAP deficiency) in Japan identified by the combination of flow cytometric assay and genetic analysis. *Pediatr Allergy Immunol* 2012;23:488-93.
17. Marsh RA, Villanueva J, Zhang K, Snow AL, Su HC, Madden L, et al. A rapid flow cytometric screening test for X-linked lymphoproliferative disease due to XIAP deficiency. *Cytometry B Clin Cytom* 2009;76:334-44.
18. Marsh RA, Blessing JJ, Filipovich AH. Using flow cytometry to screen patients for X-linked lymphoproliferative disease due to SAP deficiency and XIAP deficiency. *J Immunol Methods* 2010;362:1-9.
19. Lankester AC, Visser LF, Hartwig NG, Bredius RG, Gaspar HB, van der Burg M, et al. Allogeneic stem cell transplantation in X-linked lymphoproliferative disease: Two cases in one family and review of the literature. *Bone Marrow Transplant* 2005;36:99-105.
20. Oliveira JB, Fleisher TA. Laboratory evaluation of primary immunodeficiencies. *J Allergy Clin Immunol* 2010;125:S297-S305.
21. Koutna I, Simara P, Ondrackova P, Tesarova L. Flow Cytometry Analysis of Intracellular Protein. In: Schmid I, (ed). *Flow Cytometry - Recent Perspectives*. Rijeka: InTech, 2012: 421-38.
22. Gamez Diaz L, August D, Stepensky P, Revel-Vilk S, Seidel MG, Noriko M, et al. The extended phenotype of LPS-responsive beige-like anchor protein (LRBA) deficiency. *J Allergy Clin Immunol* 2016;137:223-30.
23. Jing H, Zhang Q, Zhang Y, Hill BJ, Dove CG, Gelfand EW, et al. Somatic reversion in DOCK8 immunodeficiency modulates disease phenotype. *J Allergy Clin Immunol* 2014;133:1667-75.