

T.C.  
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ  
MERAM TIP FAKÜLTESİ  
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

**PRİMER İMMÜN YETMEZLİĞE SAHİP HASTALARIN  
KLİNİK, İMMÜNOLOJİK VE MOLEKÜLER GENETİK  
DEĞERLENDİRİLMESİ VE YENİ TANIMLANAN  
VARYANTLAR**

DR. AHMET BURAK ARSLAN

UZMANLIK TEZİ

Danışman: PROF.DR. MAHMUT SELMAN YILDIRIM

**KONYA, 2023**

## TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim sürecinde sahip oldukları bilgi, tecrübe ve vizyonla yoluma ışık tutan değerli danışman hocam Prof. Dr. Mahmut Selman YILDIRIM ve Prof. Dr. Ayőe Gül ZAMANI'ye;

Tezime verdiği katkılarından dolayı Prof. Dr. İsmail Reisli'ye;

Eğitimim boyunca özveri ve anlayışla birlikte olduğum tüm çalışma arkadaşlarıma;

Yaşamım boyunca varlıklarıyla gurur duyduğum canım annem, babam, ve ablalarıma

Teşekkür ederim.

Mayıs, 2023

Ahmet Burak Arslan

Bu araştırma, Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir. Proje No: 221518017

## ÖZET

# PRİMER İMMÜN YETMEZLİĞE SAHİP HASTALARIN KLİNİK, İMMÜNOLOJİK VE MOLEKÜLER GENETİK DEĞERLENDİRİLMESİ VE YENİ TANIMLANAN VARYANTLAR

DR. AHMET BURAK ARSLAN, UZMANLIK TEZİ, KONYA, 2022

**Amaç:** Primer İmmün Yetmezlik Hastalığı (PİYH), bağışıklık sisteminde görev alan unsurların, doğumsal ya da primer gelişim ve olgunlaşma basamaklarını ilgilendiren bozukluklar nedeniyle meydana gelen, otoimmünite, immüendisregülasyon ve kronik ve/veya yineleyen enfeksiyonlarla sonuçlanan bir hastalık grubudur. Moleküler tanının zorluğu ve fenotipik sınıflandırmadaki değişiklikler nedeniyle özellikle farklı popülasyonlara ait genomik veri bugüne değin sınırlı kalmıştır. Bu çalışmada merkezimizce incelenen tüm hastaların fenotipik özellikleri ve genotipik altyapıları birlikte değerlendirilerek, Türk toplumunda görülen değişimlere dair fikir edinmek, insidental verilere ulaşmak, genotip-fenotip korelasyonuna dair içgörümüzü geliştirmek ve daha önce tanımlanmamış varyantları inceleyerek klinik veri ile korrelasyonlarını değerlendirmek amaçlanmıştır.

**Yöntem:** Çalışmamızda, 2017 ile 2021 yılları arasında Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Genetik Bölümü'ne immün yetmezlik ön tanısı ve/veya ilintili şikayetleriyle başvurmuş ve ön değerlendirmeden geçirdikten sonra, DNA izole edilmiş, ve immün yetmezliklerin tanı ve takibinde yeri olduğu gösterilmiş 64 adet geni içeren bir panel, NGS (Next Generation Sequencing – Yeni Nesil Dizileme) yöntemi ile genetik açıdan analiz edilmiş, ve nihayetinde hastaların fenotipik ve genotipik verileri değerlendirilmiştir. Buna ek olarak ebeveyn çalışmaları için belirlenen bölgelere Sanger dizi analizi çalışılmış ve analiz edilmiştir.

**Bulgular:** Bazı hastalarda birden çok gen değişimi raporlandığından, 224 hastada olası benign, önemi bilinmeyen varyant, olası patojenik ve patojenik sınıflarına dâhil olan toplam 354 varyant raporlandı. En sık raporlanan gen DOCK8 idi (36 hasta, 10,2%), bunu LRBA (25 hasta, 7.2%), ATM (24 hasta, 6.9%), TNFRSF13B (20 hasta, 5.8%) ve PRF1 (17 hasta, 4.9%) izlendi.

**Sonuç:** Çalışmamızda, immün sistem bozuklukları ile ilişkili genlerdeki değişimlerin kapsamlı bir değerlendirmesi yapılmış, patojenitesi bugüne değin netleşmemiş veya literatürde daha önce hiç bildirilmemiş varyantlar tartışılarak yeni genotip fenotip ilişkilendirmeleri yapılmıştır. Elde edilen veriler, literatüre sağlayacağı katkının yanında bu alanda gelecekte planlanacak araştırmalar ve hastalara yaklaşım için yol gösterici olabilir.

**Anahtar Kelimeler:** Genetik, Genotip-Fenotip Korelasyonu, Primer İmmün Yetmezlik, Varyant

**N.E.Ü. BAP Proje No:** 221518017

## ABSTRACT

### CLINICAL, IMMUNOLOGICAL AND GENETIC EVALUATION OF PATIENTS WITH PRIMARY IMMUNODEFICIENCY, WITH IDENTIFICATION OF NOVEL VARIANTS

**Background/Aim:** Primary Immunodeficiency defines a group of disorders that occur due to congenital, developmental and/or maturational disruptions of immune system elements; resulting in autoimmunity, immune dysregulation, and chronic/recurrent infections. Diseases in this group occur as a result of inherited gene defects that damage the production or structure of the components involved in the functioning of the immune system. The significance of genetic tests has been increasingly understood in regard with many aspects of primary immunodeficiencies; including making a definitive diagnosis, overseeing the prognosis, choosing the treatment procedure and determining the subtype and finally, genetics has become an indispensable mainstay in the evaluation of this group of patients in recent years. In this study, by concurrently evaluating the phenotypic features and the genotypic backgrounds of all patients we aimed to gain an idea about the changes seen in the Turkish population, to access incidental data, and also to improve our insight into the genotype-phenotype correlation by reviewing the previously undefined variants with their clinical data.

**Methods:** Patients that have applied to Necmettin Erbakan University Meram Medical Faculty Hospital, Department of Medical Genetics between 2017 and 2021 with pre-diagnosis of immunodeficiency and/or related complaints were included. After pre-evaluation step consisting of history and physical examination, patient DNAs were isolated using a previously defined DNA isolation method from at least 3cc blood in an EDTA tubes. After the isolation, NGS analysis was performed with the "Primary Immunodeficiency - Celemics Target Capture Kit" containing 64 genes that have been shown to be related with immunodeficiencies. The phenotypic and genotypic data of the patients were evaluated and were classified according to ACMG (American College of Medical Genetics) guidelines based on database searches and in-silico analyzes simulating protein function.

**Results:** As multiple gene alterations were reported in some samples, a total of 354 variants were reported in 224 patients, falling into the classes of likely benign, variants of unknown

significance, likely pathogenic, and pathogenic. The most frequently reported gene was DOCK8 (36 patients, 10.2%), followed by LRBA (25 patients, 7.2%), ATM (24 patients, 6.9%), TNFRSF13B (20 patients, 5.8%) and PRF1 (17 patients, 4.9%).

**Conclusion:** A comprehensive evaluation of the changes in the genes associated with immune system disorders was made, and new genotype phenotype associations were established by discussing the variants whose pathogenicity has not been clarified until now or have never been reported in the literature before. The data obtained can be a guide for future research and approach to patients in this field, in addition to its contribution to the literature.

**Keywords:** Genetics, Genotype-Phenotype Correlation, Primary Immune Deficiency, Variant

## İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR .....	II
ÖZET .....	III
İÇİNDEKİLER.....	VII
TABLolar.....	X
ŞEKİLLER.....	XI
KISALTMALAR ve SİMGELER.....	XII
1. GİRİŞ VE AMAÇ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	3
2.1 İmmün Sistem .....	3
2.1.1 Doğal Bağışıklık Sistemi.....	3
2.1.2 Edinsel Bağışıklık Sistemi.....	4
2.2 Primer İmmün Yetmezlik Hastalığı (PİYH) .....	5
2.2.1 PİYH Tanımı ve İnsidansı.....	5
2.2.2 Primer İmmün Yetmezlik Kategorileri ve Alt Sınıfları.....	6
2.3 Primer İmmün Yetmezlikler ve Genetik İlişkisi .....	14
2.4 Çalışılan Genler.....	17
3. GEREÇ VE YÖNTEM .....	46
3.1 Araştırmanın Tipi .....	46
3.2 Araştırma Bölgesi ve Zamanı.....	46
3.3 Araştırma Evreni ve Yeri .....	46
3.4 Örneklem Seçme Kriterleri .....	46
3.5 Çalışmanın Parçaları.....	47

3.6	Araştırma Grubuna Dâhil Etme Kriterleri.....	47
3.7	Araştırma Grubu Dışlama Kriterleri.....	48
3.8	Çalışma öncesi Bilgilendirme .....	48
3.9	Araştırmanın İzni ve Etik Durum .....	48
3.10	Kullanılan Cihazlar ve Kimyasallar.....	48
3.10.1	Kullanılan Cihazlar .....	48
3.10.2	Kullanılan Kimyasallar ve Gereçler.....	49
3.10.3	DNA İzolasyonu .....	49
3.10.4	Yeni Nesil DNA Dizi Analizi.....	51
3.11	Veri Analizi.....	56
3.12	Varyant Sınıflandırma .....	56
3.13	Sanger Sekanslama .....	57
3.13.1	PZR Protokolü .....	57
3.13.2	ExoSAP Protokolü .....	57
3.13.3	Sekans Protokolü .....	58
3.13.4	Safılaştırma Protokolü .....	58
4.	BULGULAR.....	59
4.1	Kohort Grubu .....	59
4.1.1	Yaş .....	59
4.1.2	Cinsiyet .....	63
4.1.3	Başvuru Nedeni .....	63
4.1.4	Genler.....	65
4.1.5	Varyant Tipleri .....	70
4.1.6	Patojenite.....	74
4.1.7	Genlere Göre İstatistikler .....	84
4.2	Araştırma Grubu.....	88

4.2.1	Tespit Edilen Dizi Analizi Varyantları.....	91
5.	TARTIŞMA.....	95
	Birer vakada görülen muhtelif diğer varyantlar .....	124
6.	KAYNAKLAR .....	131

## TABLULAR

Tablo 2.1: Primer İmmünyetmezlikler 2022 IUIS Sınıflandırması .....	7
Tablo 2.2: Çalışmaya dahil olan immünyetmezlik ilişkili genler.....	44
Tablo 3.1: DNA İzolasyon Kiti İçeriği .....	50
Tablo 3.2 : Amplifikasyon PZR Protokolü .....	53
Tablo 4.1: Hastaların başvuru nedenleri, sayıları ve yüzdeleri.....	65
Tablo 4.2: Tüm hastalarda saptanan varyantların gen dağılımına ait sayı ve yüzdeler.....	68
Tablo 4.3: Saptanan varyant tiplerinin sayısı ve yüzdeleri.....	70
Tablo 4.4: Saptanan missense varyantların patojeniteye göre tasnifleri.....	71
Tablo 4.5: Intronik varyantların patojeniteye göre tasnifleri.....	72
Tablo 4.6: Çerçeve kayması varyantların patojeniteye göre tasnifleri.....	73
Tablo 4.7: Sinonim varyantların patojeniteye göre tasnifi.....	74
Tablo 4.8: Tüm varyantların patojeniteye göre tasnif sayı ve yüzdeleri.....	75
Tablo 4.9: Patojenik varyantların varyant tiplerine göre istatistikleri.....	75
Tablo 4.10: Patojenik varyantların gen dağılım sayı ve yüzdeleri.....	76
Tablo 4.11: Patojenik varyant saptanan hastaların başvuru neden sayı ve yüzdeleri.....	77
Tablo 4.12: Olası patojenik varyantların varyant tipine göre sayı ve yüzdeleri.....	78
Tablo 4.13: Olası patojenik varyantların genlere göre dağılımlarına ait sayı ve yüzdeler.....	80
Tablo 4.14: Olası benign varyantların genlere göre dağılım sayı ve yüzdeleri.....	82
Tablo 4.15: Olası benign varyantların varyant tipi dağılımını gösteren grafik.....	83
Tablo 4.16: 10 defadan fazla izlenen genlerdeki varyantların patojenite sınıfı sayıları.....	84
Tablo 4.17: 10 defadan fazla izlenen genlerde saptanan varyant tiplerine dair sayılar.....	85
Tablo 4.18: Araştırma grubuna dahil edilen hastaların demografik özellikleri ve genler.....	90
Tablo 4.19: Tespit edilen varyantlar ve allelik durumları.....	92
Tablo 4.20: Varyantların gen bazında dağılımı.....	94

## ŞEKİLLER

Şekil 4.1: Hasta yaş dağılım grafiği.....	60
Şekil 4.2: Hastaların 18 yaş sınırına göre dağılım grafiği.....	60
Şekil 4.3: Hastaların cinsiyet dağılım yüzdesi.....	63
Şekil 4.4: Hastaların başvuru şikâyetlerini görselleştiren grafik.....	65
Şekil 4.5: Saptanan varyantların gen dağılımını görselleştiren grafik.....	68
Şekil 4.6: 18 yaş altındaki hasta grubunda saptanan genlerin dağılımını gösteren grafik.....	69
Şekil 4.7: 18 yaş üzerindeki hastaların raporlanan gen dağılımını gösteren grafik.....	69
Şekil 4.8: Saptanan varyant tiplerinin dağılımını gösteren grafik.....	71
Şekil 4.9: Missense varyantların patojenite dağılım grafiği.....	72
Şekil 4.10: Intronik varyantların patojenite dağılım grafiği.....	73
Şekil 4.11: Çerçeve kayması varyantların patojenite dağılım grafiği.....	73
Şekil 4.12: Sinonim varyantların patojenite dağılım grafiği.....	74
Şekil 4.13: Tüm varyantların bütünsel patojenite dağılımını gösteren grafik.....	75
Şekil 4.14: Patojenik varyantların varyant tipi dağılımı.....	76
Şekil 4.15: Patojenik varyantların yaş dağılımını gösteren grafik.....	77
Şekil 4.16: Olası patojenik varyantların yaş dağılımını gösteren grafik.....	78
Şekil 4.17: Olası patojenik varyantların varyant klasifikasyonuna göre dağılımları.....	79
Şekil 4.18: Olası patojenik varyantların gen dağılımını gösteren grafik.....	80
Şekil 4.19: Olası benign varyantların gen dağılımını gösteren grafik.....	83
Şekil 4.20: Olası benign varyantların varyant tipine göre dağılımını gösteren grafik.....	84
Şekil 4.21: 10 hastadan fazla kez varyant saptanan genlerin varyant dağılımı grafikleri.....	88
Şekil 4.22: Varyantların gen dağılımı.....	93
Şekil 4.23: Varyant tiplerinin dağılımı.....	95
Şekil 5.1-5.21: Hastalara ait sanger görüntüleri.....	102-129

## KISALTMALAR ve SİMGELER

**ABD:** Amerika Birleşik Devletleri

**ACMG:** American College of Medical Genetics and Genomics-Amerikan Tıbbi Genetik ve Genomik Topluluğu

**ALL:** Akut Lenfoblastik Lösemi

**ALPS:** Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome - Otoimmün Lenfoproliferatif Sendrom

**BAM:** Binary Alignment Map

**bç:** Baz çifti

**c.:** coding-kodlayan

**CD4:** Clusters of Differentiaon-4 – Farklılaşma Kümeleri -4

**CD8:** Cluster of Differentiation 8-Farklılaşma Kümesi 8

**CES:** Clinical Exome Sequencing – Klinik Ekzom Sekanslama

**CSF1:** Colony Stimulating Factor 1-Koloni Stimulan Faktör 1

**CVID:** Combined Variable İmmunodeficiency – Ağır Kombine İmmün Yetmezlik

**ddNTP:** Dideoksinükleotidler

**DNA:** Deoksiribonükleik Asit

**dNTP:** Deoksinükleotidler

**dsDNA:** Double-Strand DNA – Çift Zincirli DNA

**EDA-ID:** İmmünyetmezlik ve Anhidrotik Ektodermoplazi

**FHL:** Familial Hemofagocytic Lymphohistiocytosis - Ailesel Hemafagositik Lenfohistiositoz

**gnomAD:** The Genome Aggregation Database

**HGVS:** Human Genome Variation Society - İnsan Genom Varyasyon Cemiyeti

**IgA:** İmmünglobülin-A

**IgD:** İmmünglobülin-D

**IgE:** İmmünglobülin-E

**IgG:** İmmünglobülin-G

**IGV:** Integrative Genomics Viewer

**IL25:** Interleukin-25

**IUIS:** Uluslararası İmmünoloji Dernekleri Birliği

**MAPK:** Mitogen-Activated Protein Kinase-Mitojen-Aktive Protein Kinaz

**miRNA, miR:** MikroRNA

**MS:** Milattan Sonra

**NEUMTF:** Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Hastanesi

**NF-kB:** Nuclear Factor kappa-B-Nükleer Faktör kappa-B

**NGS:** Next Generation Sequencing (Yeni Nesil Dizileme)

**NK:** Natural Killer-Doğal Öldürücü

**p.:** protein

**PİYH:** Primer İmmün Yetmezlik Hastalığı

**PZR:** Polimeraz Zincir Reaksiyonu

**RNA:** Ribonükleik Asit

**RPMI1640:** Roswell Park Memorial Institute 1640

**STAT:** Signal Transducer and Activator of Transcription

**TGF-alfa:** Transforming Growth Factor alfa-Dönüştürücü Büyüme Faktörü alfa

**TGF-beta:** Transforming Growth Factor beta-Dönüştürücü Büyüme Faktörü beta

**TLR:** Toll- Like Receptor - Toll benzeri reseptör

**USER:** Uracil-Specific Excision Reagent

**V(D)J:** Variability, Diversity and Joining – Değişkenlik, Farklılık ve Birleşme

**WES:** Whole Exome Sequencing – Bütün Ekzom Sekanslama

**WGS:** Whole Genome Sequencing – Bütün Genom Sekanslama

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Bağıışıklık sistemi, insan vücudunu enfeksiyonlardan koruyan, 1800'den fazla gen tarafından kontrol edilen kompleks birçok mekanizmanın tamamına verilen addır (Fischer A. Ve ark., 2016). Primer İmmün Yetmezlik Hastalığı (PIYH), bağıışıklık sisteminde görev alan bu unsurların, doğumsal ya da primer gelişim ve olgunlaşma basamaklarını ilgilendiren bozukluklar nedeniyle meydana gelen, otoimmünite, immüdisregülasyon ve kronik ve/veya yineleyen enfeksiyonlarla sonuçlanan bir hastalık grubudur. Bu gruptaki hastalıklar, kalıtsal gen defektlerinin, immün sistemin işleyişinde görevli yapıların üretim veya yapısını bozması sonucu gerçekleşir ve büyük çoğunluğunun sorumlu gen değişimi tanımlanmıştır.

Son yıllarda hem sınıflandırmanın genişlemesi ve yeni hastalık tanımlamalarının bu spektruma eklenmesi, hem de moleküler genetik tetkiklerin yaygınlaşması ve bu hastalıklarla ilişkili olduğu gösterilmiş genlerin sayısının artmasıyla, primer immün yetmezliklerin sanılan aksine nadir bir hastalık grubu olmadığı ortaya çıkmıştır.

2022 yılında yapılan son sınıflandırmada primer immünyetmezlikler, fenotipik olarak 10 sınıfa ayrılmış bulunmaktadır (Tablo 2.1). 1970'den bugüne kadar sınıflandırmanın geçirdiği değişimler, tanımlanan gen sayısındaki masif artış, gruplandırma niteliğinin değişimi ve ayrntı seviyesi dikkate değerdir. Son sınıflandırmada kemik iliği yetmezliğine sebep olan hastalıklar ve genler ayrı bir tablo olarak yayınlanmıştır. Bu sınıflandırmada, çoğu çok nadir izlenmekle birlikte, bu hastalıklarla ilişkisi gösterilmiş 500'e yakın gen tanımlanmıştır.

Primer immün yetmezliklerin tanısının konulmasından başlayarak, prognoz tayini, tedavi sürecinin belirlenmesi ve alt tip belirlenmesinde genetik tetkiklerin önemi git gide artmış (Raje N ve ark., 2014; Picard C, Fischer A., 2014) ve nihayetinde bu grup hastaların değerlendirilmesinde genetik vazgeçilmez bir yer almıştır. Bu hastalık grubuyla ilişkilendirilmiş genetik defektlerin büyük çoğunluğunu nükleotit değişimleri oluşturmaktadır ve nükleotit değişimlerini göstermede en sık kullanılan ve değişimleri gösterme şansı en yüksek olan yöntem Yeni Nesil Dizileme (Next Generation Sequencing - NGS) tekniğidir. Öte yandan, NGS teknolojisinin yaygın olarak kullanımının yalnızca son birkaç senedir mümkün olması, ve fenotipik sınıflandırmadaki

değişiklikler nedeniyle özellikle farklı popülasyonlara ait genomik veri bugüne değin sınırlı kalmıştır. Bu çalışmada, immün yetmezlikle ilişkili genler arasından klinikte en çok karşılaştığımız genlerin büyük çoğunluğunun, tüm ekzon ve intronlarının en az 20x derinlikte analiz edilmesini içeren 64 genlik bir panel kullanılmıştır. (Tablo 2.2). Bu sayede primer immün yetmezlik kliniği olan hastaların fenotipik özellikleri ve genotipik altyapıları birlikte değerlendirilerek, Türk toplumunda görülen değişimlere dair fikir edinmek, insidental verilere ulaşmak, genotip-fenotip korelasyonuna dair içgörümüzü geliştirmek ve daha önce tanımlanmamış varyantları inceleyerek klinik veri ile korelasyonlarını değerlendirmek amaçlanmıştır. Ek olarak, genetik yapı toplumlar arasında önemli farklar gösterdiğinden, Türk toplumunda yapılmış böylesi bir çalışmanın, Anadolu'da yaşayan nüfusun primer immün yetmezlikle ilişkisi gösterilmiş genleri, bu genlerde en sık karşılaşılan değişimler ve diğer popülasyonlardan klinik ilişkilendirme açısından farkları anlamında önemli bir yeri olacaktır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1 İmmün Sistem

İmmünite kelimesi, kökenini latince “immunitas” sözcüğünden alır (“im” (olumsuzluk öncülü) ve “munis” (sorumlu olma); immunitas: sorumlu olmama hali, muaf olma durumu). Bu kelime milattan önceleri, Roma İmparatorluğu’nda yaşayan bir kimsenin, vergi ve diğer yükümlülüklerden muaf olma halini betimlemek için kullanılırken, tıp literatüründeki karşılığına yakın olan ilk kullanımına MS (milattan sonra) 60 yılında Romalı şair Marcus Annaeus Lucanus’un, Jül Sezar ile Gnaeus Pompeius Magnus arasında yaşanan savaşları anlattığı “Pharsalius” eserinde rastlanmaktadır; Lucanus burada; görünüşe göre yılan zehirlerine bağışıklığı olduğunu düşündüğü bir kuzey Afrika kabilesini anlatmaktadır.

Tıp terimi olarak kullanılmaya devam eden bu kelime ile oluşturulan “immün sistem” tabiri, günümüzde vücudun enfeksiyonlar ve vücut için “yabancı” olarak algılanan antijenik etmenlerle olan etkileşimine aracılık eden hücre, doku, organ ve bunların ürettikleri maddelerin toplamının oluşturduğu kompleks bir ağı tanımlar. Fizyolojik olarak; bir antijene immün sistemin yanıt verme durumunun öncülü; bu yapının vücudun kendinden olan ile kendinden olmayan ayrımının yapılmasıdır; bu ayrım her zaman kusursuz olmadığından ve kimi zaman immün sistem self antijenlere yanıt vererek otoimmünite cevabı oluşturduğundan, immün sistem tanımının yalnızca enfeksiyonlara verilen cevap ile sınırlı kalmadığına dikkat edilmelidir. Bu sistem, beyaz kan hücreleri, timus, dalak, tonsiller, lenf düğümleri, lenf damarları ve kemik iliği gibi lenf sisteminin organlarını ve dokularının tamamını içerir ve bu organ, yapı ve sistemler arasında karmaşık bir ağ bulunmaktadır. Bu ağ, temelde doğal ve edinsel bağışıklık sistemi olarak ikiye ayrılmaktadır.

#### 2.1.1 Doğal Bağışıklık Sistemi

Canlının hücrelerinde germline olarak kodlanmış, ve bir enfeksiyon veya antijen varlığından bağımsız olarak sürekli eksprese edilen, enfeksiyon daha meydana gelmeden var

olduğu için bu sayede yabancı ajanın vücut içerisine girişini takiben hızlı fakat spesifik olmayan bir şekilde yanıt verilebilmesini olanaklı kılan, non-klonal ve çeşitliliği sınırlı hücre ve sitokinler bütünü tanımlar. Bu sistemin, tam sayısı bilinmemekle birlikte 1000 kadar antijenik yapıyı tanıdığı düşünülmektedir. Doğal bağışıklık, temelde 1) Epitel ve epitel tarafından salgılanan antimikrobiyal kimyasallar, 2) Hücre elemanları ( makrofaj, nötrofil, dendritik hücreler, mast hücreleri, natural killer (NK) hücreler ve lenfoid serinin doğal bağışıklık elemanları) 3) Kompleman sistem ve inflamasyonun diğer mediatörlerini kapsayan kan proteinleri olarak ayrılmaktadır. Patojenler tarafından üretilen molekülleri ve doku hasarından sonra ortaya çıkan yıkım ürünlerini, birçok reseptör vasıtası ile tanıyarak, sitokinler, enzimler ve hücre fonksiyonları aracılığı ile cevap verir. Doğal bağışıklık sisteminin primer yanıtı akut inflamasyondur; bu yanıt, cevapta görevli lökositlerin ve plazma proteinlerinin ekstrasvazasyonu sonrası, sözkonusu dokuda birikmesi, ve doku yıkımı, düzenlenmesi, fagosit aracılıklı patojen yıkımı gibi lokal etkilerinin yanında, vücut sıcaklığının yükselmesi gibi sistemik efektör fonksiyonlarını göstermesi anlamına gelir [Sonnenberg GF, Artis D, 2015]. Doğal bağışıklık sisteminde görev alan proteinleri kodlayan birçok gen tanımlanmıştır; örneğin, çalışmamızın gen setinde de var olan ELANE geni, nötrofil ve diğer doğal hücrelerin yapısında bulunan nötrofil elastaz enzimini kodlar, bu enzim non spesifik doku düzenlenmesinde önemli görevler üstlenmektedir.

### 2.1.2 Edinsel Bağışıklık Sistemi

Adaptif immün sistem olarak da adlandırılan bu alt grup; lenfosit adı verilen hücrelerden ve bu hücrelerden salgılanan protein ve sitokinlerden oluşan doğal bağışıklık sistemine kıyasla yavaş fakat etkene spesifik yanıt oluşturan bir immün elemanlar bütünüdür. Kompleks yapıdaki sayısız antijenin determinant (epitop) adı verilen yapılarını tanıyan farklı klonal hücreler, antijenlerin tanınmasından sonra çoğalarak (klonal ekspansiyon) bu antijene karşı güçlü bir yanıt oluşturabilmenin yolunu açarlar. Sözkonusu klonal seçim ve ekspansiyon süreçleri tüm antijenler için tekrarlanabilir, bu da antijenlere özgü yanıtın oluşmasının temelini oluşturur. Edinsel (adaptif) bağışıklığın bir diğer temel ve kritik özelliği de hafıza fonksiyonu gösterebilmesidir. Doğal bağışıklık sisteminin aksine, uzun ömürlü hafıza B hücreleri sayesinde daha önceden karşılaşılmış bir antijene hızlı ve daha kuvvetli bir yanıt verilebilir. Edinsel immün sistem, yabancı antijenlere yanıt verirken, vücudun kendi antijenlerine karşı tepkisiz kalmalıdır

(tolerans), bu tolerans mekanizmasında yaşanabilecek her türlü aksaklık ve anormallik, otoimmün hastalıklar adı verilen ve vücudunkendinden olana yanıt vermesi esasına dayanan bir grup rahatsızlığın gelişimi ile sonuçlanabilir. Bu nedenle otoimmün hastalıklar immün sistem bozuklukları içerisinde tanımlanmaktadır.

## 2.2 Primer İmmün Yetmezlik Hastalığı (PİYH)

### 2.2.1 PİYH Tanımı ve İnsidansı

İnsan immün cevabında herhangi bir basamakta görevi olduğu bilinen 2000 kadar gen bulunmaktadır. 1970 yılında başlayan, ve en sonuncusu 2022’de yayınlanan Uluslararası İmmünoloji Dernekleri Birliği raporuna göre, (IUIS-PID Classification Committee) günümüzde bu grupta yer alan 485 farklı hastalık mevcuttur (Tangye SG ve ark., 2022). Yeni hastalıkların tanımlanması, genetik dizileme teknolojilerinin yaygınlaşması ve immünoloji alanında yapılan çalışmaların sayısı ve niteliğinin de artmasıyla birlikte, daha önce nadir hastalıklar olarak bilinen immün yetmezliklerin dünyadaki esas sıklıklarının 1/1000- 1/5000 kadar yüksek olabileceği gösterilmiştir (Zhang Q, ve ark., 2017) Çoğunluğu resesif kalıtmalı hastalıklar olduğundan, akraba evliliklerinin yaygın olduğu toplumlardaki görülme sıklıklarının özellikle yüksek olması beklenmektedir. Türkiye’de akraba evlilik oranı hakkında kapsayıcı bir veri bulunmamakla birlikte, daha önce bildirilen yayınlarda evliliklerin %35 kadarının akraba evliliği olduğu gösterilmiştir (Alper OM. Ve ark., 2004). Türkiye’de, genetik tetkiklerin henüz yaygınlaşmadığı yıllarda yapılan bir çalışmada primer immün yetmezlik sıklığının 3/10.000 olduğu gösterilmiş, (Kilic SS. Ve ark., 2013) ve aktüel oranın bunun üzerinde olduğu tahmin edilmektedir.

Sınıflandırmanın esasının genetik değişimlere göre oluşturulduğu, ve erken tanı ile erken başlangıçlı tedavinin sürviyi arttırdığı göz önüne alındığında (Modell ve ark.2016) ,tanıda en önemli yere sahip olan genetik tetkiklerin kritik önemi özellikle ön plana çıkmaktadır.

## 2.2.2 Primer İmmün Yetmezlik Kategorileri ve Alt Sınıfları

A. Kombine İmmün Yetmezlikler
<ol style="list-style-type: none"><li>1. T-B+ Ağır Kombine İmmün Yetmezlik</li><li>2. T-B- Ağır Kombine İmmün Yetmezlik</li><li>3. Kombine İmmün Yetmezlik, hafif seyirli</li></ol>
B. Sendromik Bulguların Eşlik Ettiği Kombine İmmün Yetmezlikler
<ol style="list-style-type: none"><li>1. Konjenital Trombositopeni Eşlikli İmmün Yetmezlikler</li><li>2. DNA Tamir Defektleri (A bendi kapsamında olmayanlar)</li><li>3. Konjenital Anomali Eşlikli Timik Defektler</li><li>4. İmmüno-osseöz Displaziler</li><li>5. Hiper-IgE Sendromları</li><li>6. Vitamin B12 ve Folat Metabolizması Defektleri</li><li>7. İmmünyetmezlik ve Anhidrotik Ektodermoplazi (EDA-ID)</li><li>8. Kalsiyum Kanal Defektleri</li><li>9. Diğer Defektler</li></ol>
C. Antikor Eksikliğinin Ön Planda Olduğu İmmünyetmezlikler
<ol style="list-style-type: none"><li>1. B hücrelerinin önemli ölçüde azaldığı veya olmadığı, tüm serum immünoglobulin izotiplerinde şiddetli azalma, agamaglobulinemi</li><li>2. En az 2 serum immünoglobulin izotipinde ciddi azalma, normal veya düşük sayıda B hücresi, CVID fenotipi</li><li>3. Normal sayıda B hücresi ile birlikte serum IgG ve IgA seviyelerinde ciddi azalma, normal / yüksek IgM seviyeleri</li><li>4. Normal sayıda B hücresi ile birlikte izotip, hafif zincir veya fonksiyon kusurları</li></ol>
D. İmmüendisregülasyon Hastalıkları
<ol style="list-style-type: none"><li>1. Ailesel Hemofagositik Lenfositosis (FHL) sendromu</li><li>2. Hipopigmentasyon eşlikli FHL sendromları</li><li>3. Regulator T hücre defektleri</li><li>4. Lenfoproliferasyon Eşlikli &amp; Lenfoproliferasyon Eşiksiz</li></ol>

Otoimmünite Bozuklukları
5. Kolit ile birlikte immün disregülasyon
6. Otoimmün Lenfoproliferatif Sendrom (ALPS, Canale- Smith Sendromu)
7. EBV enfeksiyonuna ve Lenfoproliferasyona Yatkınlık
E. Konjenital Fagosit Sayı ve Fonksiyon Bozuklukları
1. Konjenital Nötropeniler
2. Motilite Defektleri
3. Respiratuar Patlama Defektleri
4. Diğer Lenfoid olmayan defektler
F. İntrasek ve Doğuştan İmmünite Kusurları
1. Myobakteriyel enfeksiyonlara mendelyan yatkınlık
2. Epidermodisplazi Verrükiformis
3. Ağır Viral enfeksiyonlara yatkınlık
4. Herpes Simpleks Ensefaliti
5. İnvazif Fungal enfeksiyonlara yatkınlık
6. Mükokütanöz Kandidiasis Yatkınlığı
7. Bakteriyel Enfeksiyonlara Duyarlılık, Toll-Like Reseptör Sinyal Yolağı Defektleri
8. Non-Hematopietik Dokularla ilintili diğer doğuştan immünite kusurları
9. Lenfositlerle alakalı diğer doğuştan immünite kusurları
G. Otoinflamatuvar Hastalıklar
1. Tip 1 İnterferonopatiler
2. İnflammasome kompleksi ile alakalı bozukluklar
3. İnflammasome dışı bozukluklar
H. Kompleman Defektleri
I. Kemik İliği Yetmezlikleri
J. Doğuştan İmmünyetmezlikleri taklit eden fenokopiler

Tablo 2.1: Primer İmmünyetmezlikler 2022 IUIS Sınıflandırması (Tangye SG ve ark., 2022)

### *2.2.2.1 Kombine İmmünyetmezlikler*

Kombine İmmünyetmezlikler, B hücre sayı ve fonksiyonlarına göre ikiye ayrılır: Ağır Kombine İmmünyetmezlikler ve Daha hafif seyirli kombine immünyetmezlikler.

Ağır kombine immün yetmezlikler (SCID'ler), bozulmuş T lenfosit farklılaşması ile karakterize edilen bir grup kalıtsal hastalık içerir. Bu hastalıklar, DiGeorge sendromunda yaşandığı gibi, timus organogenezindeki başarısızlığın aksine, lenfosit farklılaşma sürecindeki intrensek bozukluklardan kaynaklanır. T yardımcı hücrelerinin yokluğu, B hücrelerinin normal antikor yanıtları oluşturmasını önleyerek, duruma adını veren hücrel ve hümoral, yani "kombine" defekte yol açar. Buna ek olarak B hücreleri de intrensek olarak etkilenebilir. Son 30 yılda, SCID'lerin genetik ve moleküler heterojenitesi giderek daha iyi karakterize edilmiştir. Tipik vakalar, gen kusuruna bağlı olarak diğer lenfosit alt gruplarında kusurlarla birlikte kan ve lenfoid organlarda T lenfositlerinin tamamen yokluğu ile karakterizedir. Hipomorfik mutasyonlara sahip bazı varyantlarda, T hücre farklılaşması kısmen korunur. (Fischer A. ve ark, 2015)

Hafif Seyirli Kombine İmmünyetmezlikler ise, bazı gen değişimleri, gerçek SCID kusurlarından farklı olarak, T hücrelerinin hayatta kalmasına ve sistemik dolaşımına izin verir, ancak T hücresi işlevini bozar (B hücreleri için yardımcı işlevleri dahil); ve nihayetinde ortaya çıkan bozukluklar kombine immün yetmezlikler olarak sınıflandırılır (Fischer A. ve ark, 2015).

### *2.2.2.2 Sendromik Bulguların Eşlik Ettiği Kombine İmmünyetmezlikler*

Sendromik immün yetmezliklerde, immün anormallikler genellikle sendrom teşhis edildikten sonra tanımlanır. İmmün yetmezlik başlıca klinik problemi temsil etmeyebilir ve immün defektler hepsinde mevcut olmayabilir. Wiskott-Aldrich sendromu ve ataksi telenjektazi gibi çeşitli genetik bozukluklar, hem birincil hem de sendromik immün yetmezlik kategorilerine girebilecek bozukluklar olarak nitelendirilebilir. Bu sendromlarda, hem karakteristik organ

disfonksiyon bulguları, hem de belirgin iyi tanımlanmış bir immünyetmezlik fenotipi bir arada görülür. Bu hastalıklar genelde bir klinik belirtiler spektrumu olarak tanımlanır; ve moleküler olarak patojenik bir varyant saptanan her birey sözkonusu hastalığı tüm belirtilerini bir arada göstermeyebilir; belirtiler bu hastaların varyanta ve diğer genetik değişimlere bağlı olarak değişmekle birlikte, yalnızca bir kısmında gözlenir. Bu fenotiplerdeki immünyetmezlik kliniği, hatalı embriyogenez, metabolik süreç dahil olmak üzere birçok farklı süreçteki bozukluğa bağlı olarak ortaya çıkabilir (Jyonouchi S ve ark, 2020)

### *2.2.2.3 Antikor Eksikliklerinin Baskın Olduğu İmmünyetmezlikler*

Serum proteinlerinin yaklaşık %20'si, enfeksiyon ajanlarına karşı yanıtta önemli yere sahip olan immünooglobulinlerdir. Bu fonksiyonel antikorlar, B hücrelerden salgılanır, ve B hücrelerinin gelişimi, B hücre uyarıcıları, B hücre reseptörü ve tüm bunların geri kalan immün sistem elemanları ile sağlıklı etkileşimi sonucu üretilebilirler; dolayısıyla immünooglobülin eksiklikleri ile B hücre defektleri iç içedir. Bu kusurlar, değişken derecelerde B-hücre kaybı, serum immünooglobulinlerinin azalması veya yokluğu ve/veya antikor fonksiyonunun kaybı ile sonuçlanır. Tüm immünooglobülin seviyeleri düşük saptanabileceği gibi, yalnızca bazı alt tiplerin yokluğu veya düşüklüğü ile karakterize sendromlar da mevcuttur ve bu parametre değişimleri ayırıcı tanıda önemli yer tutar. Primer olarak B-hücreleri ve immünooglobülinlerle ilintili immünyetmezlikler, genellikle başlangıç yaşı, klinik parametreler, şiddet ve kalıtım şekli ile diğer immün defektlerden ayırt edilebilir. Bu grup vakalarda tekrarlama eğilimi gösteren ve sıklıkla gözlenen enfeksiyonlar, daha çok fırsatçı bakteriler ve şiddetli viral enfeksiyonlarla karakterize T hücre ve / veya kombine immün yetmezliklerin aksine, kapsüllü bakteri enfeksiyonlarıdır (Smith T, Cunningham-Rundles C, 2019)

### *2.2.2.4 İmmün-disregülasyonlar*

İmmün disregülasyon olarak adlandırılan bu alt grupta, immün “yetmezlik”lerden farklı olarak, tekrarlayan enfeksiyonlar ve bunların oluşturduğu morbiditelerin aksine, immün sistemin işleyişindeki kusurlar ve direkt olarak bunlarla ilişkili bulgular ön plandadır. Bu, sözkonusu

hastalıklarda tekrarlayan enfeksiyon ve ağır kombine immün yetmezlik bulgularının tamamen olmadığı anlamına gelmemekle birlikte, bunlar izlense dahi şiddeti veya prognozu daha hafiftir. En başta da bahsedildiği gibi, ektrensek antijen yapılarını intrinsek olanlardan ayırmak immün sistemin en temel regülasyon basamaklarından biri olduğundan, bu ayrımın bozulması sonucu ortaya çıkan otoimmün hadiseler immüdisregülasyonlara temel bir örnek teşkil eder. Bir diğer mekanizma olan T-regülatuar hücre kusurları da, birden çok sistemde izlenebilecek muhtelif bulgular ortaya çıkarabilir. T-regülatuar hücre disfonksiyonu ile karakterize hastalıklara “tregopati”ler de denmektedir (Cepika AM ve ark, 2018). Bazı otoinflamatuvar ve hiperinflamatuvar tablolar da immüdisregülasyon kapsamına girer. Kimi vakalar atopik yanıtta artış ile karakterize iken, bazı immüdisregülasyonlarda temel hadise, “debrisopati” olarak da adlandırılmalarına yol açan, hücresel artıkların (debris) fagositler sitem elemanları tarafından ortadan kaldırılmasındaki kusurlardan kaynaklanır. Otoimmün lenfoproliferatif hastalık (ALPS) spektrumunda olduğu gibi, malign olmayan lenfosit sayısal artışları ve buna bağlı olarak ortaya çıkan bulgular da immüdisregülasyon çatısı altındaki bir diğer grubu teşkil eder. ALPS’lerde malign olmayan transformasyon sözkonusudur, ama bazı immüdisregülasyonlar hematolojik malinitelere de zemin hazırlayabilir ve bunlar açısından risk teşkil edebilir (Chandrakasan S ve ark, 2019) Bölgesel immün disregülasyonlar da kendilerine ait bir fenotipik örüntü oluşturabilir, intestinal immün disregülasyon sonucu ortaya çıkan monogenik inflamatuvar bağırsak hastalıkları bu grup için iyi bir örnektir. Son olarak, birden çok immüdisregülasyon yolağında ortaya çıkabilecek çoklu anomaliler, veya farklı regülasyon yollarının kesişiminde olduğundan tek başına multiple klinik bulgular ortaya çıkarabilecek defektler de bu alt grup içerisinde tanımlanan hastalıklarda izlenebilir (Chan AY ve ark, 2020).

#### *2.2.2.5 Fagosit sayısı ve/veya fonksiyonu ile ilgili konjenital bozukluklar*

Nötrofil ve makrofajların dahil olduğu immün sistem elemanları fagositler olarak isimlendirilir. Bu kelime, fago (antik yunancada “yemek” ) ve sit (hücre) kelimelerinin birleştirilmesinden türetilmiştir. Bu yanlış bir tanımlama da değildir, çünkü fagositlerin primer görevi, mikropların ve hasarlı dokuların ingesyonu ve ortadan kaldırılmasıdır. Bu süreç, fagositlerin enfeksiyon ve doku hasarı olan bölgeye toplanmaları ile başlar, daha sonra sözkonusu ajanların fagositozuna değin sürer. Fagositoza ek olarak, fagositler salgıladıkları sitokinlerle hem

diğer fagositlerin, hem de fagositer sistem dışında kalan diğer immün sistem elemanlarının yanıtlarını da düzenler (Abbas ve ark, 2018). Bu sistemin 2 temel bileşeni, nötrofiller ve monositlerdir. Her ikisi de kemik iliğinde üretilen, kana salınan ve nihayetinde inflamasyon bölgelerinde izlenen bu 2 hücre, bu benzerliklerinin yanısıra önemli farklılıklara da sahiptir. Nötrofillerin yanıtları hızlıdır ve yaşam süreleri kısadır, bu hızlı yanıtlarda temel olarak sitoskeletal yeniden düzenlenmeler ve enzimler işlev görür. Buna karşılık monositler, dokulara ekstravaze olup makrofajlara dönüşmeleri gerektiğinden yanıt süreleri daha uzundur, fakat dokudaki farklılaşmış makrofajların yaşam süreleri de nötrofillere göre belirgin derecede uzundur. Makrofajlar konağa yanıtta nötrofillerde olduğu gibi var olan hücre elemanlarının kombinasyonlarını değil, temel olarak gen düzeyinde kontrol edilen ve sözkonusu duruma özel olarak işleyebilen gen ifadelerini kullanırlar(Dale DC ve ark, 2008).

Fagosit kusurlarının en temel alt tipini, konjenital nötropeniler oluşturur. Bu hastalık, genetik kusurlardan kaynaklanan, ikincil bir sebebe bağımlı olmaksızın nötrofil sayısının periferik kanda  $1500/\text{mm}^3$ 'ün altına düşmesi olarak tanımlanır.  $1000/\text{mm}^3$ 'ün altındaki nötrofil sayısı orta şiddetli nötropeni olarak adlandırılırken,  $500/\text{mm}^3$  ve altı ağır nötropeni olarak tanımlanmaktadır. Hastalar sıklıkla, genel olarak mukozal yüzeylerde izlenen tekrarlayan bakteriyel enfeksiyon kliniği ile başvurur. Periodontit, aftöz stomatit, gingivitis ve absesler de sıklıkla izlenme eğilimi gösterir. Solunum yolu hastalıkları ve otit gibi komplikasyonlar da azımsanmayacak derecede sık gözlenebilir. Bazı konjenital nötropenilere nörolojik bulgular, gelişme geriliği ve intellektüel disabilite gibi sendromik bulgular da eşlik eder. Kimi nötropeniler kronik ve sabit bir seyir izlerken, bazıları relaps ve remisyonlarla ilerleyen siklik nötropeni fenotipi gösterebilirler (Sporr J ve ark, 2019).

#### *2.2.2.6 Doğal Bağışıklık Sistemi Bozuklukları*

Plasmodium Vivax, sıtma adıyla bilinen, ve insanlık tarihi boyunca en çok ölüme sebep olan Malaria hastalığının etkenidir. Bu parazit, eritrositler içerisinde geçirdiği yaşam döngüsü boyunca, onlara hasar vererek hastalığın ateşli nöbetleri başta olmak üzere karakteristik seyrine neden olur. İnsanlık tarihi boyunca onunla birlikte evrimleşen bu hastalığın etkeninin bir parazit olduğu ise ancak 20. yüzyılda tanımlanabilmiştir. Bu döneme kadar dışarıdan bakıldığında çok iyi bilinen gerçeklerden biri de, kimi insanların malaria enfeksiyonuna karşı dirençli olduğu, veya

çok hafif atlattığı idi. Bunun moleküler sebebi ile ilgili ilk açıklama ise, 1976 yılında, Miller ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada ortaya konmuştur, buna göre insan eritrositlerinde bir antijen olarak yer alan Duffy antijeninin determinanları eksprese edildiklerinde Plasmodium Vivax eritrosite penetre olabilmektedir, fakat bu antijenlerin sunulmadığı durumlarda Plasmodium Vivax enfeksiyonuna doğal bir direnç gösterilmektedir (Miller LH ve ark., 1976). Bu ve benzeri çalışmaların öncülük etmesiyle, geçen yıllar içinde birçok tek gen değişiminin yarattığı antijenik, moleküler ve proteomik farklılıklar nedeniyle kimi hastalıklara karşı direnç, kimi hastalıklara karşı da duyarlılık oluşturduğu gösterilmiş, ve nihayetinde bu ve benzeri doğal bağışıklık sistem kusurları,immünolojinin önemli alt başlıklarından biri haline gelmiştir (Casanova JL ve ark, 2015).

#### *2.2.2.7 Otoinflamatuvar Hastalıklar*

Doğal bağışıklık sistemi, organizmayı dıştan gelen tehditlere karşı koruyacak şekilde evrimleşmiştir. Tehdidin tanımlanması, ayrıştırılması, ona karşı tepki oluşturulması ve elenmesi gibi birbiri ardına gelen ve birçok farklı mekanizmayla kontrol edilen bu sürecin doğru başlaması için ilk adım, ekzojen ile endojen olanın, yani yabancı olan ile organizmanın kendisine ait olanın ayırt edilmesidir. İşte bu ayırt etme noktasından başlayarak, inflamasyon yanıtının nihai olarak verilmesi arasında geçen süreç boyunca, primer olarak adaptif immün sistem basamaklarında değil, doğal immünite basamaklarında gelişen ve sonuç olarak provoke edilmemiş bir otoinflamasyon yanıtına yol açan kusurların tamamına otoinflamatuvar hastalık adı verilmiştir (Ben-Cherit E ve ark, 2018). Primer kusurun doğal bağışıklık sistemi içerisinde olması koşulu önemlidir, çünkü adaptif immünitede oluşan ve benzer tablolarla sonuçlanan kusurlara otoimmünite terimi öteden beri kullanılmaktadır. Bu noktada otoimmünite ve otoinflamatuvar tabirlerinin ayrılmasında temel unsurun doğal-adaptif sistem ayrımı olduğu akılda tutulmalıdır. Klinik, “sebepsiz bir tepki” ile özetlenir, bu tepkinin en temel bileşeni, hastalıkların çoğunda görülen, ve değişen dereceler ve sıklıklarda ortaya çıkan ateştir. Abdominal bulgular, eklem şikayetleri ve kütanöz manifestasyonlar genel tablonun diğer karakteristik bileşenlerini özetler, bunlar bu grup hastaların çoğunda benzer şekilde izlenebildiğinden tanıyı zorlaştırabilir ve kafa karıştırıcı olabilir. Bu nedenle moleküler analiz vazgeçilmez bir öneme sahiptir. Çoğu durumda, otoinflamatuvar hastalıklar monogenik bir arka plana sahiptir ve son yıllarda gittikçe daha da

fazla tanımlanan patojenik mekanizmaların bilinirliğinin de artmasıyla moleküler tanıya gidilebilir, fakat bunun yanında bazı otoinflamatuvar tabloların multigenik veya multifaktöriyel olduğu, her ne kadar provokasyondan bağımsız olarak tanımlansalar da sürecin ekzojen uyarılarla başlayabildiği veya prognozunun değişebildiği unutulmamalıdır.

#### *2.2.2.8 Kompleman Sistemi Bozuklukları*

“Kompleman sistemi” tabiri, patojenleri opsonize etmek (işaretlemek) için, direkt olarak veya antikorlar tarafından uyarıldıktan sonra, bir dizi reaksiyona girip inflamasyonu indükte ederek enfeksiyonla savaşmaya yardımcı olan çok sayıda farklı plazma proteininin oluşturduğu kompleks bir ağı tanımlar. Bu sistem, doğal bağışıklığın temel elemanlarından biri olmasının yanısıra, adaptif bağışıklığa momentum kazandırmak suretiyle, bütüncül bir işlev edinir. Bakteri, virus, fungi gibi patojen organizmaların, veya apoptotik & nekrotik hücrelerin fragmanlarının opsonizasyonu, bu materyallerin fagositer sistem elemanları tarafından uzaklaştırılması için bir mihenk görevi görerek, süreci spesifikleştirmenin yanında, hızlandırır. T ve B hücrelerin aktivitelerini de düzenleyerek, doğal ve adaptif immün sistem arasında bir köprü görevi görür. Hasarlı dokuların yeniden inşası ve düzenlenmesinde de rol alır (Mayilyan KR ve ark, 2012).

Kompleman sistemi, mekanizma itibariyle üçe ayrılır. Bunlardan ilki olan klasik kompleman sistemi, bazı bakteri ve virüslerin vücuda girişiyle uyarılır. C1q kompleman proteini işaretçi olarak görev görür ve bir dizi kompleman protein aktivasyonunu tetikler. Bu süreç, membran atak kompleksinin oluşumu, ve nihayetinde patojenin ortadan kaldırılması ile sonuçlanır. İkinci kompleman mekanizması, sonu itibariyle birincisiyle aynı iken, başlangıcı ile ayrılır, bu kez tanıma molekülü C1q değil, fikolin grubu moleküllerdir: Bu moleküller kompleks pattern tanıma parçacıklarıdır ve geniş bir bakteri alt türü yelpazesinin hücre zarında karbonhidrat yapılarına bağlanmaları sonucu kompleman kaskadı başlatılmış olur. Üçüncü ve son mekanizma –alternatif kompleman yolağı olarak da adlandırılır-, bakteri, virus ve fungilere ek olarak IgG depozitleri tarafından da uyarılır, ve C3b proteininin akkümüülasyonu sonucu başlatılır. Tüm bu süreçler kompleman kaskadının birçok molekül ve 40’tan fazla gen tarafından kontrol edilen yollarını oluşturur.

### 2.2.2.9 Kemik İliği Yetmezlikleri

Primer immün yetmezliklerin bu sınıfı hematopoietik defektlerden kaynaklanan immün sistem elemanlarının sayı ve işlev azlıklarını tanımlar.

### 2.2.2.10 Primer İmmünyetmezliklerin Fenokopileri

İmmün yetmezlik benzeri klinik yapmasına rağmen immün sistemde moleküler kusur bulunmayan durumları tanımlar. Bu çalışmanın kapsamı içerisinde değildir.

## 2.3 Primer İmmün Yetmezlikler ve Genetik İlişkisi

Primer İmmün Yetmezlikler, tanımlanmış 400'den fazla gen ilişkilendirmesi ile birlikte, büyük bir genetik hastalık ailesini oluşturur, ve çoğunlukla, hastaların net tanısı için genetik yöntemlerle sorumlu gen değişiminin gösterilmesi gerekir. Saptanan genetik değişimin niteliğinin belirlenmesi, klinik yönetiminde de önemli bir rol oynar. 10 farklı gruba ayrılan primer immün yetmezlik hastalık ailesinin, her alt tipi içerisinde, birbirinden tanı, tedavi, prognoz ve takip anlamında önemli farklılıklar gösteren onlarca farklı klinik tablo mevcuttur, ve neredeyse her zaman bu spesifik fenotiplerin ayırımında yegane yol genetik mekanizmanın tanımlanmasıdır.

Genetik değişimler temelde 2'ye ayrılır: Dizi değişimleri, ve kopya sayısı değişimleri. Dizi değişimleri "genin niteliğindeki" değişimleri tanımlar: gen dizisi içerisindeki her koordinat pozisyonunda referans genoma göre bulunması gereken bir nükleotidin başka bir nükleotide dönüşü dizi değişimi olarak tanımlanır. Kopya sayısı varyantları ise "genin niceliğindeki değişimler" dir. Otozomlar üzerindeki her bölgeden 2 allel, cinsiyet kromozomlarında ise cinsiyete göre 1 veya 2 allel bulunmalıdır ve bu normdan sapmalar kopya sayısı değişimi olarak isimlendirilir.

Kopya sayısı değişimleri, primer immün yetmezliklerin tanısında birinci basamak, ya da en değerli tetkik olmasalar da, bazı hastalıkların tanısında kritiktir, örneğin sıklıkla karşılaşılan ve immün yetmezliklerin en bilinen sebeplerinden biri olan DiGeorge sendromunun tanısı için gereklidir. Yalnızca bununla da kalmaz, örneğin IL25 (interleukin-25) geninde yaşanan kopya

sayısı değişimlerinin de primer immün yetmezlik fenotipine yol açtığı gösterilmiştir (Green MR ve ark, 2011). Fakat bu az sayıdaki örnek ne kadar önemli olursa olsun, primer immün yetmezliklerin nedeni olan gen değişimlerinin, kopya sayısı değişimlerinden ziyade, çok büyük oranda dizi değişimi olduğu göz önüne alındığında, hastaların incelenmesinde esas kritik basamağın farklı dizi analizleri arasında seçim yapma gereği olduğu ortaya çıkar.

DNA'nın dizi değişimlerinin incelenmesinde 3 temel yöntem akışı söz konusudur. Bunlardan ilki olan Sanger dizileme, genomda spesifik olarak incelenmesi istenen ve PCR koşullarında stabil kalabilecek uzunlukta (geleneksel olarak 300-600 nt arası) bir bölgenin incelenmesi olanağını sağlar. Bu teknikte, polimerizasyon sırasında ortamda 4 temel element bulunur: izole DNA fragmentleri, araştırılacak bölgeye uygun primerler, florofor işaretli di-deoksinüklotidler (ddNTP) ve deoksinükleotidler (dNTP). ddNTP'lerin yapısında, dNTP'lere kıyasla, riboz alt birimlerinin 3 karbonundaki hidroksil grubu eksiktir. Bu eksiklik sonucu, zincir uzaması sırasında ddNTP bağlanmış bir zincire, DNA polimeraz bir sonraki nükleotidi bağlayacağı sözkonusu hidroksil grubunu bulamayacağından bu zincirin uzaması durur. Ortamdaki farklı zincirler, dNTP bağlanırken uzamaya devam eder, rastgele bir noktada ddNTP bağlandığında ise uzamaları bitecektir. Bu prensipten faydalanarak, yeterli sayıda siklus ve DNA fragmanı varlığında, her zincirin sonunda bir ddNTP molekülü olacak şekilde farklı uzunlukta zincirler elde edilir. Her ddNTP molekülü üzerinde, içerdiği baza (adenin, timin, guanin ve sitozin) göre değişkenlik gösteren bir florofor işaret bulunmaktadır. Bu, sözkonusu zincirin hangi nükleotidle bittiğini anlamaya yarar. Takip eden bir kapiller elektroforez basamağı ile zincir uzunluklarının da ayrılabilmesi sonucu, hangi uzunluk düzeyinde hangi nükleotidin olduğu anlaşılır, ve bunların uygun sıraya dizilmesi sonucu ortaya araştırılan bölgenin dizisi çıkmış olur. (Mullikin JC, McMurray AA, 1999). Sanger dizileme, neredeyse 40 senelik tarihinde hep kullanılagelmiştir, en başta tüm dizi analizlerinin temeli olmakla birlikte, tek seferde yalnızca kısıtlı bir bölgeyi dizileyebilmesi, emek-yoğun olması ve kısıtlılıkları nedeniyle son yıllarda yalnızca saptanan bölgelerin doğrulanmasında ve ebeveyn çalışmalarında kullanılmaktadır; bu çalışmalarda spesifik bölge belirli olduğundan ve koordinat aralığı itibariyle daha geniş bir alanın analizi gerekmediğinden bu yöntemi kullanmak akla yatkındır.

Fakat insan vücudundaki genler, binlerce nükleotid uzunluğunda olabilir, ve genetik hekiminin günlük pratiğinde araştırılan hastalıkların büyük bir kısmı, bir genin tek bir bölgesine bakılarak tanı koyulabilecek hastalıklar değildir. Bir genin tamamı, bir gen ailesi, belli bir

hastalıktan sorumlu birçok gen, veya bilinen fonksiyonel genlerin tamamının dizilenmesi gerektiğinde, sanger sekansın yetersizliği ortaya çıkar; bu nedenle dizileri elde etmede hem maliyeti, hem zamanı, hem de emeği azaltacak yeni teknolojilere ihtiyaç duyulmuştur. İşte tam da bu sebeple, dizileme işleminin paralelleştirilmesine dayanarak binlerce hatta milyonlarca dizinin aynı anda okunmasına olanak tanıyan yüksek performanslı “Yeni Nesil Dizileme” (NGS) ortaya çıkmıştır. (Garrido-Cardenas JA ve ark, 2017). Günümüzde, kütüphane tasarımı, sekans reaksiyonu, sinyal tespit metodolojisi, performans, okuma uzunluğu ve derinliği, kapsam, üniformite ve kullanılan ekipmanlar gibi pek çok açıdan farklılıklar arzeden birçok NGS platformu bulunmaktadır. Hepsinin ortak noktası aynı anda birden çok koordinat aralığının incelenmesine izin vermek olduğundan, hangi NGS teknolojisi kullanılırsa kulanılsın, birçok gen aynı anda dizilenebilir. Bu prensip 2 temel şekilde pragmatize edilebilir, bunlardan ilki ve nispeten geleneksel olanı, ön tanıya göre hazırlanan “gen setleri” (panel, kit, set dizaynı gibi isimlerle de adlandırılır) nin çalışılmasıdır. Çalışmamıza sözkonusu hastalık grubu ele alınacak olursa, tekrarlayan enfeksiyon şikayeti olan bir hastada, immünyetmezliklerden sorumlu genlerin aynı çalışmada dizilenecek hastanın moleküler mekanizmasının araştırılması buna örnek olarak verilebilir. Böylesi bir metod hedefe yönelik genleri içerip diğerlerini içermediğinden maliyet-etkinlik açısından başarılı olmakla birlikte, gen setine dahil edilecek olan genlerin seçimi, bunların sözkonusu hastalıkla uyum sağlayıp sağlamayacağı ve gen setinde olmayan bir değişimin görülememesi gibi önemli dezavantajlara da sahiptir. Bu noktada iyi çalışılmış bir genetik hastalık ailesi olması, hakkında düzenli yayınlanan uzlaşma raporları ile sorumlu genlerin oldukça net bir şekilde ortaya konması ve bunların dışında kalan genlerle immünyetmezlikler arasında ilişki kurulmaması sebebiyle harici genlerin ihmal edilebilirliğinin yüksek oluşundan dolayı bu tip çalışmalar immünyetmezlik hastaları için uygun olarak kabul edilebilir. Fakat kompleks sendromik olgular, net bir fenotiple örtüşmeyen dismorfolojik tablolar ve literatürde yeterince iyi tanımlanmadığı düşünülen hastalıklarda, NGS tabanlı ikinci temel bakış açısı olan geniş çaplı dizileme analizleri önemli yararlar sağlayabilir. Bu analizler de kendi içinde 3 temel sınıfa ayrılmaktadır: Genotip fenotip korelasyonu nispeten daha iyi olan genlerin seçilerek (yaygın olarak 3000-6000 gen arası) bunların ekzonlarının incelenmesi prensibine dayanan CES (Clinical Exome Sequencing – Klinik Ekzom Sekanslama), tüm genlerin ekzonik kısımlarının incelenmesine olanak tanıyan WES (Whole Exome Sequencing / Bütün Ekzom Dizileme) ve tüm genlerin ekzonik ve intronik kısımlarının incelenmesi anlamına gelen WGS (Whole Genome

Sequencing, Bütün Genom Dizileme). Bu metotlar, nispeten maliyeti yükselmekle birlikte, bahsedilen dezavantajların aşılması noktasında kıymet arz eder. Bazı araştırmacılar, immün yetmezlikli olgularda da CES/WES/WGS temelli yaklaşımlar benimsemiştir, ve yaygın pratik kullanımda da karşılık görmüştür.

Yukarıda sayılan, proband özelindeki tüm bu kazanımları sağlamasının yanında genetik yöntemler, doğası gereği, kalıtımın anlaşılmasına giden yolda anahtar rol üstlenir. Saptanan bir genetik değişimin kalıtım gözüyle değerlendirilmesi oldukça önemlidir; öncelikle ve en basit olarak, bu değişime sahip başka bir aile bireyi varsa onun da tanı alabilmesine yarar. Yalnızca bununla da kalmaz, var olan değişimin nasıl bir kalıtım desenine sahip olduğunu bilmek, değişimin kendi doğası hakkındaki fikirleri de etkiler. Bir çocukta izlenen monoallelik bir değişimin, ailenin başka sağlıklı bireylerinde de izlendiğini görmek, bu varyantın monoallelik durumda hastalık ortaya çıkarmayabileceği ile alakalı kıymetli bir veri sunabilir. Veya monoallelik formda hastalık ortaya çıkarmadığı ve bu durumdaki birçok bireyin sağlıklı olduğu izlenen bir varyantın 3. Dereceden akraba ebeveynlerin benzer fenotip gösteren 2 çocuğunda homozigot olarak izlenmesi, kuvvetli bir tanıya yardımcı olabilir. Çalışmamıza sanger analizinin dâhiledilmesi ve bireylerin ebeveynlerinin sözkonusu varyant açısından incelenmesi, bu ve buna benzer niteliklerin göz ardı edilmemesine katkıda bulunmuştur.

Tüm bu veriler ışığında, immünyetmezliklerin doğasının anlaşılmasında genotip verisinin en önemli parametre olduğu görülmektedir. Bu amaçla çalışmamızda, toplumda görülme sıklıkları, takip ve prognoz parametrelerinde değişkenlik oluşturabilme potansiyelleri, ayırıcı tanıların kritik basamaklarında rol oynayabilmeleri ve tedaviye giden yolda yol göstericilik sağlamaları gibi pragmatik özellikleri nedeniyle seçilen 64 genlik bir panel kullanılmıştır. Sözkonusu genler ve özellikleri aşağıdaki gibidir.

## 2.4 Çalışılan Genler

Çalışmamıza dahil olan genlerden RAG1 ve RAG2 genleri, V(D)J rekombinasyonunda kilit rol oynar, dolayısıyla immunoglobulin ve T-hücre reseptör üretiminde rol alırlar. (Schatz DG, Oettinger MA, Baltimore D., 1989). RAG1, rekombinasyon sürecinde direkt ve aktif bir görev üstlenir. Hem çift zincir kırığı oluşumu ve neticesinde süregiden rekombinasyon çatalına

izin verilmesi, hem de bu rekombinasyon sürecinde kritik olduğu gösterilmiş H3K4 trimetilasyonuna, kromatin 3 boyutlu yapısını değiştirerek zemin hazırlaması, onu bu sürecin vazgeçilmez bir komponenti yapar. RAG2 bu aksiyona direkt katılmamakla birlikte, RAG1 ile bir kompleks oluşturur ve varlığı tüm katalitik aktiviteler için gereklidir. İşte bu şekilde oluşan sözkonusu Rag kompleksi yalnızca VDJ rekombinasyonunda görev almakla kalmayıp, aynı zamanda B hücre allelik eksklüzyon sürecine dahil olarak, B hücre olgunlaşması sırasında tek bir immünglobülin eksprese edilmesi ve nihayetinde monoklonalite oluşumu sürecinde de önemli bir rol alır, bu, literatürde B hücre ilintili fenotiplerle ilişkilendirilmesinin de temelini oluşturur. Bu genler literatürde Omenn Sendromu, B hücre negatif Ağır Kombine İmmün Yetmezlik, granülomlarla ilerleyen kombine immün yetmezlik ve otoimmünite ile ilişkilendirilmiştir (Corneo, B ve ark. 2001; De Ravin, S ve ark., 2010). Omenn sendromu, klinikte önemli kabul edilen, ve hipereozinofili ile ilerlemesi bakımından, kan parametreleri ile ayırıcı tanıya gidilebilen önemli bir fenotip olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu kompleks defektlerinde görülen otoimmüniteye, ağır sitomegalovirüs enfeksiyonlarının da eşlik edebildiğinin gösterilmesi, not düşülmesi gereken bir diğer önemli klinik özelliktir. Clinvar ve Uniprot gibi veritabanları incelendiğinde, bu gendeki patojenik varyantların büyük çoğunluğunun missense varyantlar olduğu izlenmektedir.

Bir diğer çalışılan gen olan ATM geni, fosfatidilinositol-3 kinaz ailesine mensup DNA tamiri ve hücre siklus kontrolünde görevli bir protein olan “Ataksi Telenjiektazide Mutant Protein” ikodlar. Bu protein esasında, güneş ışığı, apoptoz, ve muhtelif genotoksik streslere yanıt olarak TP53 gibi tümör süpresör proteinleri harekete geçirerek bir nevi DNA hasar sensörü gibi görev yapan bir serin-treonin kinazdır. DNA’da bir çift zincir kırığı saptadığında, histon H2AX’I fosforile edip, BRCA, MRN kompleks ve TP53 gibi proteinleri sözkonusu bölgeye intikal ettirmek suretiyle çift zincir tamir sürecini başlatır. Buna ek olarak fosforile ederek düzenlediği 20’den fazla gen üzerinden, vezikül taşınımı, T hücre gelişimi, nörolojik fonksiyonlar, histon mRNA degradasyonu ve kromatin yeniden düzenlenmesinde de görev almaktadır. Ayrıca, her bir B-lenfosit üzerinde eksprese edilen B-hücresi antijen reseptörü (BCR) klonalitesini ve neticesinde monospesifik tanıma sürecini gerçekleştirmek için tek bir immünoglobulin ağır zincir alelinin ekspresyonunu gerektiren bir süreç olan B hücre allelik eksklüzyonunda da rol oynar. ATM geninin homozigot germline patojenik varyantları ataksi telenjiektazi kliniğine yol açar. Ataksi-telenjiektazi kliniği, esas olarak merkezi sinir ve bağışıklık sistemlerini etkileyen bir

tablodur. Bu bozukluk, erken çocukluk döneminde, genellikle 5 yaşından önce başlayan koordinasyon hareketlerinde ilerleyici zorluk (ataksi) ile karakterize edilir. Etkilenen çocuklar tipik olarak yürüme güçlüğü, denge ve el koordinasyonunda sorunlar, istemsiz sarsıntılı hareketler (kore), kas seğirmeleri (myoklonus), ve sinir fonksiyonlarında bozukluklara sahiptirler. Buna ek olarak ataksi-telanjiektazili kişilerde genellikle zayıflamış bir bağışıklık sistemi vardır ve çoğu kronik akciğer enfeksiyonu geliştirir. Ayrıca, neoplazilere, özellikle de hematopoietik hücre neoplazilerine yakalanma riskleri de yüksektir. Etkilenen bireyler, tıbbi röntgenler de dahil olmak üzere radyasyona maruz kalmanın etkilerine karşı çok hassastır. (Vorechovsky ve ark., 1997; Stredrick ve ark., 2006). Clinvar ve Uniprot gibi veritabanları incelendiğinde, bu gende klinikle ilişkilendirilmiş varyantların büyük çoğunluğunun fonksiyon kaybı yaratan varyantlar olduğu görülmektedir, birçok missense varyant da tanımlanmıştır.

MRE11/RAD50 çift zincir kırığı tamir kompleksi ünitelerinden biri olan p95-nibrin proteinini kodlayan NBN geni de çalışmamızda incelenmiştir (Carney J. ve ark., 1998). NBN, MRE11 ve RAD50 genleri, birlikte baş harflerinin akronimi olan MRN kompleksini oluşturur; bu kompleks, tek zincir endonükleaz ve 3-5' spesifik ekzonükleaz aktivitesi göstererek, çift zincir kırık tamiri, DNA rekombinasyon düzenlenmesi, telomer bütünlüğünün korunması ve hücre siklus kontrolünde kritik görevler üstlenir. NBN genindeki patojenik varyantların 3 farklı fenotiple ilişkisi gösterilmiştir. Bunlardan en kritik ve kapsamlı olanı Nijmegen Breakage Sendromudur (NBS) (Varon R ve ark., 1998), bu sendrom kısa boy, mikrosefali, intellektüel disabilite, bazı dismorfik bulgular ve immünyetmezlik ile karakterizedir. İmmün sistemdeki defekt, kan parametrelerine bakıldığında kendini özellikle IgG ve IgA seviyelerinde düşüklük ile belli eder. Etkilenmiş bireylerin T hücre sayıları da düşük olabilir. Tüm bunların nihai klinik yansıması en sık tekrarlayan üst solunum yolu enfeksiyonları olarak vücut bulur. Bunlara ek olarak, nibrin proteininin defektif olduğu böylesi bir sendromda DNA tamir mekanizmasında da bozukluklar olması neticesinde, bu hastaların neoplazilerle karşılaşma ihtimalleri de belirgin bir biçimde artmıştır (rölatif risk 50 olarak bildirilmektedir). Hastaların yarısına yakını, genelde 15 yaşından da önce non-hodgkin lenfoma tanısı alırlar. Bunun dışında medulloblastom, gliom ve rabdomyosarkom gelişimine karşı da tetikte olunmalıdır. Kadın hastalarda primer amenore gelişimi de beklenmektedir. NBN geni aynı zamanda aplastik anemi (Shimada H ve ark. 2004) ve Akut Lenfoblastik Lösemi (Varon R. ve ark., 2001) fenotipleri ile de klinik olarak

ilişkilendirilmiştir. Bu gende tanımlı varyantların neredeyse tamamı fonksiyon kaybı yaratan frameshift gibi varyantlardır.

TBX1 geni, ortak bir DNA bağlayıcı domain paylaştıkları için bu adla isimlendirilen T-box genlerinden biridir. Sözkonusu T-box genleri, gelişimsel süreçlerin düzenlenmesinde yer alan önemli bazı transkripsiyon faktörlerini kodlar. Embryolojik gelişimin erken basamaklarından itibaren farengial arkus gelişiminde, özellikle de bu bölgedeki kan damarlarının doğru 3 boyutlu konumlandırılmasında kritik yeri vardır. Önemli bir sendromik immün yetmezlik sebebi olan DiGeorge sendromu ile ilişkilendirilmiştir. Bu sendrom temelde farengial arkus gelişiminin bozulmasının sonuçlarının bir kombinasyonudur: bunlar arasından paratiroid hipoplazisi, buna bağlı gelişen hipokalsemi, timik gelişim defekti ve kalp çıkış yolu anomalileri hastalığın temel özelliklerini tanımlar (Chieffo C ve ark., 1997). İlk ve en iyi tanımlanan fenotipik gösterim bahsedilen Di George sendromu olmakla birlikte, TBX1 gen defektleri esasen farengial arkus gelişim defekti neticesinde ortaya çıkan bir spektrum oluşturur ve bu nedenle bu genin kliniği tanımlanırken, son yıllarda ortaya çıkabilecek klinik özelliklerin akroniminden oluşan CATCH22 ifadesi literatürde sıklıkla yer bulmuştur (İngilizce karşılıkları ile CATCH22: kardiyak defektler, anormal yüz özellikleri, timik hipoplazi, yarı damak, hipokalsemi ve 22.kromozom ilintisi). TBX1 geninin üzerinde bulunduğu 22. Kromozom koordinat aralığı, proksimal ve distal uçlarında içerdiği lokus kontrol bölgeleri kombinasyonları nedeniyle non-allel homolog rekombinasyon gelişimine nisbi ölçüde yatkın olduğundan delete olabilir, ve TBX1 delesyonu ile benzer bir klinik kombinasyon ortaya çıkabilir. Bu nedenle NGS yöntemiyle TBX1 geninde defekt saptanmamasının, CATCH22 kısaltmasında verilen fenotipleri karşılayan hastalarda kliniği dışlayıcı olmadığı, ve böylesi bir senaryoda mikro dizinleme gibi kopya sayısı değişimlerini gösterebilen bir tetkikin endike olduğu akılda tutulmalıdır.

Sitokin aktivasyonunu takiben, tüm STAT ailesi üyelerinde olduğu gibi çekirdeğe migrasyon göstererek spesifik DNA elementleriyle etkileşime giren ve sitokin aracılı değişikliklerde kritik rol oynayan 7 transkripsiyon faktöründen birini kodlayan STAT3 geni de klinikle sıklıkla karşılaşıldığından dolayı çalışmamızda dâhil edilmiştir (Milner JD et al., 2015). Bu transkripsiyon faktör ailesi (STAT'lar: sinyal transdüserleri ve transkripsiyon aktivatörleri), birçok sitokin reseptörü için sinyal iletim mekanizmasının temelini oluşturan JAK-STAT sinyal zincirinin parçasıdır. Bu ailedeki proteinler, IFN'ler, EGF, IL5, IL6, HGF, LIF ve BMP2 dahil

olmak üzere çeşitli sitokinlere ve büyüme faktörlerine yanıt olarak, JAK'lar tarafından fosforilasyon yoluyla aktive edilir. Literatürde 2 fenotip ile ilişkilendirilmiştir. Bunlardan ilki olan “infantil başlangıçlı multisistemik otoimmün hastalık”, insüline bağımlı diabetes mellitus, otoimmün enteropati ve çölyak hastalığı dahil olmak üzere birçok organı etkileyen bir otoimmün belirtiler spektrumunun erken çocuklukta başlaması ile karakterizedir. Etkilenmiş bireylerde kısa boy, spesifik olmayan dermatit, hipotiroidizm, otoimmün artrit ve puberte tarda da izlenebilir. (Flanagan, S ve ark., 2014). Bu genin sebep olduğu bir diğer klinik ise Hiper İmmunglobulin E tekrarlayan enfeksiyon sendromu” dur. Bu tablo, immün yetmezlik, kronik eozinofili, kaba yüz görünümü, anormal diş gelişimi, eklem esnekliğinde artış ve tekrarlayan kemik fraktürleri ile karakterize nadir bir bağışıklık ve bağ dokusu bozukluğudur. (Minegishi Y ve ark., 2007). Bu gende tanımlı varyantların neredeyse tamamını missense varyantlar oluşturmaktadır.

PGM3 geni, bir glikozilasyon enzimi olan ve insan vücudundaki proteoglikanların oluşumunda önemli görevler üstlenen fosfoglukomutaz -3 enzimini kodlar. Bu enzim hem glikojen oluşumu, hem de onun metabolik yollarda kullanılmasını sağlar. Bu gendeki defektlerle birlikte oluşan proteoglikan defekti sonucu vücuttaki birçok sistemin etkilendiği, ve immün sistem hücrelerinin maturasyon ve fonksiyonunun da altere olduğu gösterilmiştir. İlişkili fenotiplerden ilki, immünyetmezlik-23 fenotipidir. Bu tablo, kombine bir immünyetmezliğin yanı sıra, lökopeni, kemik iliği yetmezliği, iskelet sistemi defektleri, büyüme gelişme geriliği, bazı dismorfik yüz özellikleri, ve persistan enfeksiyonlar ile karakterizedir. Bu hastalarda aynı zamanda IgE ve IgA seviye artışları, bunlara bağlı atopik dermatit ve egzema gibi bulgular, ve nötrofil kemotaksis bozuklukları da gösterilmiştir (Stray-Pedersen A. Ve ark., 2014). Literatürde oldukça az sayıda tanımlı varyant mevcuttur, ve bunlar fonksiyon kaybı yaratan varyantlar ile missense varyantlardır.

BTK geni, B lenfosit gelişimi, farklılaşması ve sinyal yolları için vazgeçilmez bir non-reseptör tirozin kinaz olan Bruton Tirozin Kinazı kodlar. Antijenlerin B hücresi antijen reseptörüne (BCR) bağlanması sonrası, fosfolipaz-C'yi çeşitli bölgelerde fosforile eder, ve nihai olarak kalsiyum mobilizasyonu yoluyla protein kinaz-c ailesi proteinlerinin aktivasyonu ile sonuçlanacak bir sinyal yolağını başlatır. BTK, aynı zamanda, Toll benzeri reseptör (TLR) yolağının bir bileşeni olarak bağışıklık hücrelerinin işlevinde önemli bir rol oynar. TLR yolu, patojenlerin tespiti ve konak savunmasının aktivasyonu için çok önemlidir. Özellikle dalak B

hücrelerinde TLR9 aktivasyonunun düzenlenmesinde kritik bir moleküldür. BTK'nın immün sistem için bir diğer önemi de, yüzlerce genin ekspresyonunu düzenlemede rol alan NF-kappa-B transkripsiyonunu da regüle etmesidir. X'e bağımlı agammaglobülinemi kliniği ile ilişkilendirilmiştir (Vetrie D ve ark., 1993). Literatür incelendiğinde, tanımlı varyantlar arasında hem missense, hem de fonksiyon kaybı varyantları bulunduğu görülmektedir.

TNFRSF13B (Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 13b) diğer adıyla TACI (Transmembrane activator and caml interactor) geni, tümör nekrosis faktör reseptör ailesinin bir üyesidir. NF-kappa-B ve AP-1'in aktivasyonuna aracılık eder. B ve T hücre fonksiyonunun uyarılması ve humoral bağışıklığın düzenlenmesinde rol oynar. (Wu Y ve ark., 2000). Hipogamaglobulinemi, tekrarlayan bakteriyel enfeksiyonlar ve antikor yanıtı oluşturmada eksiklik ile karakterize bir primer immün yetmezlik olan yaygın değişken immünyetmezlik 2 (Castigli E ve ark., 2005) ile ilişkilendirilmiştir. Fenotip, B hücresi farklılaşmasının başarısızlığından ve immünglobulinlerin salgılanmasının bozulmasından kaynaklanır; dolaşımdaki B hücrelerinin sayısı genellikle normal aralıktadır, ancak düşük de olabilir. Aynı zamanda IgA eksikliği-2 fenotipi ile de ilişkisi mevcuttur (Castigli E ve ark., 2005). Veritabanlarında tanımlı az sayıda varyant mevcuttur, daha önce hiçbir kodlanmayan varyantın saptanmaması dikkate değer olmakla birlikte, en sık varyantların da fonksiyon kaybı yaratan varyantlar olduğu izlenmiştir.

FOXP3 geni, bir transkripsiyon regülatörü olan Forkhead Box Protein B3'ü kodlar. Düzenleyici T hücrelerinin (Treg) gelişimi ve inhibe edici işlevi için çok önemli bir modülatördür. (Bettelli E ve ark., 2005) Treg hücrelerinin tam baskılayıcı işlevi ve stabilitesinin yanı sıra, diğer T hücrelerinin gelişimi ve işlevini doğrudan modüle ederek bağışıklık sisteminin homeostazının sürdürülmesinde önemli bir rol oynar. (McMurchy AN ve ark., 2013). Diğer transkripsiyon faktörleri, histon asetilazlar ve deasetilazlar ile etkileşimlerine bağlı olarak bazen transkripsiyon inhibitör, bazen de transkripsiyonel aktivatör olarak hareket edebilir (Li B. ve ark., 2007). Bu gendeki biallelik patojenik varyantların, yenidoğan başlangıçlı insüline bağımlı diabetes mellitus, tekrarlayan enfeksiyonlar, sekretuar diyare, trombositopeni, anemi ve egzama bulguları ile karakterize "Immunodysregulation, polyendocrinopathy, and enteropathy, X-linked (IPEX)" fenotipine neden olduğu gösterilmiştir (Kobayashi I ve ark., 2001). Bu gende tanımlı varyantların önemli bir bölümünü missense varyantların oluşturması dikkate değerdir.

CTLA4 geni, T hücre yanıtlarının ana negatif düzenleyicisi olarak işlev gören inhibe edici bir reseptör olan Sitotoksik T-lenfosit protein 4'ü kodlar (Teft WA ve ark., 2006). Bu reseptörün ligandlarıyla olan etkileşimi, T hücre fonksiyonlarını sınırlandırıcı, ve bir inflamasyon durumunu bu mekanizma sayesinde regüle edici bir fonksiyon gösterir. Literatürde Diabetes mellitus, çölyak, hashimoto tiroiditi ve sistemik lupus eritematosusa yatkınlık gibi birçok fenotiple ilişkilendirilmesinin yanı sıra, immunolojik olarak, bu gendeki monoallel patojenik varyantların otoimmünite, immün yetmezlik, lenfoproliferasyon ve immün düzensizlik (IDAIL) 'e neden olabildiği de gösterilmiştir (Schubert D ve ark., 2014). İmmunolojik fenotip olan IDAIL, oldukça değişken prezentasyon ve klinik belirtileri olan otozomal dominant kompleks bir immün bozukluktur. Öne çıkan özellikler arasında sıklıkla hipogamaglobulinemi ile ilişkili tekrarlayan enfeksiyonlar, otoimmün sitopeniler gibi otoimmün bulgular, akciğerler, beyin ve gastrointestinal sistem dahil olmak üzere lenfoid olmayan organların anormal lenfositik infiltrasyonu yer alır. Laboratuvar çalışmaları sıklıkla lenfopeni ve anormal T veya B hücre alt grupları varlığını gösterir. Sözkonusu tüm bu değişken özellikler, immün homeostazda rol oynayan Treg hücrelerinin işlev bozukluğunun nihai bir sonucudur. Fonksiyon kaybı yaratan varyantlar, bu gende tanımlı patojenik varyantların büyük bölümünü oluşturur; missense ve kodlanmayan varyantlar da tanımlanmıştır.

LRBA geni, bağışıklık sisteminde görevli efektör proteinlerin polarize sekresyonunu ve / veya membran birikimini sağlamak için sinyal transdüksiyonu ve vezikül trafiğini koordine etmede rol alan bir protein olan "Lipopolisakkarite duyarlı beige benzeri Protein"i kodlar (Wang JW ve ark., 2001). Ekspresyonu B hücrelerinde ve makrofajlarda bakteriyel lipopolisakkaritler tarafından indüklenir. Kodlanan protein, protein kinaz A ile birleşir ve hücre içi veziküllerin, immün efektör moleküllerin salgılanmasına ve/veya zarfa birikmesine yardımcı olan aktive edilmiş reseptör komplekslerine yönlendirilmesinde yer alır. Bu gendeki biallelik patojenik değişimler, otoimmünite eşlikli yaygın değişken immün yetmezlik – 8 kliniği ile ilişkilendirilmiştir. Etkilenen kişilerde erken çocukluk döneminde tekrarlayan enfeksiyonlar, özellikle de solunum yolu enfeksiyonları görülür ve ayrıca idiyopatik trombositopenik purpura, otoimmün hemolitik anemi ve inflamatuvar barsak hastalığı dâhil olmak üzere çeşitli otoimmün bozukluklar gelişir. Fenotip, aileler içinde bile oldukça değişkendir. Laboratuvar çalışmaları CD4+ T düzenleyici hücre eksikliği, azalmış B hücreleri ve hipogamaglobulineminin de aralarında yer aldığı değişken bulgular gösterir. (Lopez-Herrera G ve ark., 2012). Bu gende

tanımlı varyantların çok büyük bir çoğunluğu fonksiyon kaybı yaratıcı olmakla birlikte, kodlanmayan varyant sıklığının missense varyantlara göre daha fazla oluşu dikkate değerdir.

F12 geni, kan pıhtılaşması, fibrinoliz, bradikinin üretimi ve anjiyotensin oluşumunun başlatılmasına katılan bir serum glikoproteini olan faktör 12'yi (Hageman Faktörü) kodlar (Cool DE.ve ark., 1987).. Pıhtılaşma faktörleri VII ve XI'i aktive eder.Bu gendeki monoallelilik patojenik değişimlerin herediter anjiyoödem tip 3'e neden olduğu bildirilmiştir. Bu tablo, sadece kadınlarda görülen kalıtsal bir anjiyoödem tablosudur. Üst solunum yolu ve gastrointestinal traktın, yüzün, ekstremitelerin ve genital organların subkütan veya submukoz dokusunu tutan epizodik lokal şişlik ile karakterize otozomal dominant bir hastalıktır. Kalıtsal anjiyoödem tip 3, C1 esteraz inhibitörünün hem konsantrasyonunun hem de fonksiyonunun normal olması bakımından tip 1 ve 2'den farklıdır. Bu tablo, yüksek östrojen seviyeleri ile hızlandırılır veya kötüleştirilir. F12 değişimleri, sözkonusu bu tablo ile otozomal dominant olarak ilişkilendirilmiştir (Dewald G, Bork K., 2006).Bu gende tanımlı varyantların önemli bir çoğunluğu missense varyanttır.

SERPING1 geni, plazma protez C1 inhibitör proteinini kodlar. C1 kompleksinin aktivasyonu, C1-inhibitörünün kontrolü altındadır. C1r veya C1s proteazları ile proteolitik olarak inaktif bir stokiyometrik kompleks oluşturur. Kompleman aktivasyonu, kan pıhtılaşması, fibrinoliz ve kinin oluşumu dahil olmak üzere önemli fizyolojik yolların düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. Aynı zamanda FXIIa, kimotripsin ve kallikreini inhibe eder (Aulak KS ve ark. 1993). Literatürde 2 farklı klinik ile ilişkilendirilmiştir. Bunlardan ilki, üst solunum yolu ve gastrointestinal yolağın, yüzün, ekstremitelerin ve genital organların subkütan veya submukoz dokusunda, epizodik lokal şişlikler ile karakterize otozomal dominant bir bozukluk olan herediter anjiyoödem tablosudur. C1 esteraz inhibitörü eksikliğine bağlı bu kalıtsal anjiyoödem kliniği, bulguları itibariyle ayırt edilemeyen iki formdan oluşur. Kalıtsal anjiyoödem tip 1'de C1 esteraz inhibitörünün serum seviyeleri azalırken, tip 2'de seviyeler normal veya yüksektir, ancak protein fonksiyonel değildir (Davis AE 3<sup>rd</sup> ve ark, 1993). Tanımlı patojenik varyantlar missense ve fonksiyon kaybı yaratıcı olabilmektedir.

GF11 geni, histon deasetilazların aktivasyonu yoluyla hematopoietik sistemde görev alan birçok genin regülasyonu vasıtasıyla bu hücrelerin gelişim ve farklılaşmasını denetleyen, bir transkripsiyon repressörüdür (Zweidler-Mckay PA ve ark., 1996). Nötrofil farklılaşmasını düzenler, lenfoid hücrelerin çoğalması ve granülosit gelişimi için gereklidir. RELA (RELA

Proto-Oncogene, NF-KB Subunit) 'yı antagonize ederek endotoksin aracılı Toll like reseptör (TLR) enflamatuar yanıtını düzenler (Sharif-Askari E ve ark., 2010). Bu gendeki monoallelizm veya biallellik patojenik varyantlar, periferik kan nötrofil sayılarında düşüş ( $< 0.5 \times 10^9$ ), granülopoezde promiyelosit seviyesinde olgunlaşma arresti ve erken başlangıçlı şiddetli bakteriyel enfeksiyonlar ile karakterize bir hematopoez hastalığı olan “Otozomal dominant ağır konjenital nötropeni” kliniği ile ilişkilendirilmiştir (Person RE ve ark., 2003). Yine bu genin patojenik varyantları ile yetişkinlerde izlenen, ilkinde nazaran daha hafif bir nötropeni kliniği ile seyreden, ancak bazı hastalarda lösemi riskini arttırdığı tespit edilen “Yetişkin başlangıçlı dominant non-immün kronik nötropeni” kliniği ile ilişki de bildirilmiştir (Person RE ve ark., 2003). Veritabanlarında oldukça az sayıda varyant tanımlanmış bu gende, tanımlanan varyantların tamamının missense varyantlardan oluştuğu görülmektedir.

JAGN1 geni “protein jagunal homolog –1” ad verilen bir endoplazmik retikulum transmembran proteinini kodlar. Nötrofil işlevi için gerekli olan vezikül aracılı taşınmada rol oynar. Vezikül aracılı transporttaki rolü nedeniyle nötrofil fonksiyonunun bir düzenleyicisi olarak hareket eder. Glikozilasyon ve / veya nötrofillerin yaşayabilirliğine ve göçüne katkıda bulunan proteinlerin hedeflenmesini düzenler, bu fonksiyonu nedeniyle fungal patojenlere karşı savunmada ve granülosit koloni uyarıcı faktöre (GM-CSF) cevapta rol alan sinyal yolağında önemlidir. Literatürde, erken başlangıçlı bakteriyel enfeksiyonlar ve düşük absolut nötrofil sayıları ile karakterize edilmiş “Otozomal resesif ağır konjenital nötropeni – 6 kliniği ile ilişkilendirilmiştir (Boztug K ve ark., 2014). Missense varyantlar ve fonksiyon kaybı yaratıcı varyantlar, bu gende tanımlanmış patojenik varyant tipleridir.

USB1 geni, pre-U6 snRNA molekülündeki son nükleotidlerin poli (U) traktının kesilerek çıkartılmasından sorumlu olan bir ekzoribonükleaz (RNaz) gibi davranır ve 2', 3'-siklik fosfat ile sonlandırılmış olgun U6 snRNA 3' oluşumunu sağlar (Mroczek S ve ark., 2012) Poikiloderma, pachyonychia ve kronik nötropeni ile karakterize bir genodermatoz olan “Poikiloderma eşlikli nötropeni” kliniği ile ilişkilendirilmiştir (Volpi L ve ark., 2010). Bozukluk, yaşamın ilk yılında uzuvlarda papüler eritemli bir döküntü olarak başlar. Yavaş yavaş merkezci olarak yayılır ve papüler döküntü düzeldikçe hipo ve hiperpigmentasyon, telanjiektazilerin gelişmesiyle sonuçlanır. Başka bir cilt bulgusu tırnak distrofidir, ancak alopesi ve lökoplaki

belirgin bir şekilde yoktur. Hastalarda genellikle reaktif hava yolu hastalığı ve / veya kronik öksürük ile sonuçlanan tekrarlayan pnömoniler vardır. En önemli ekstrakütan semptomlardan biri enfeksiyonlara duyarlılığın artmasıdır, bu da başlıca olarak kronik nütropeni ve nötrofil fonksiyonel kusurlarına bağlı olarak solunum sistemini etkiler. Kemik iliği anormallikleri nütropeniden sorumludur ve nihayetinde miyelodisplaziye dönüşebilir. Rothmund-Thomson sendromu ile fenotipik örtüşme gösterir. Tanımlanmış patojenik varyantların önemli bir çoğunluğunu fonksiyon kaybı yaratan varyantlar oluşturmaktadır ve oldukça az sayıda missense varyant tanımlanmıştır.

CSF3R geni, granülosit koloni stimüle edici faktör reseptör proteinini kodlar. Granülositik olgunlaşma için, özellikle promyelosit evresinde gereklidir. Nötrofil hücrelerinin çoğalmasında, farklılaşmasında ve hayatta kalmasında çok önemli bir rol oynar. Ek olarak, hücre yüzeyindeki bazı adezyon veya tanıma olaylarında işlev görmektedir (Dong F ve ark., 1994). Bu gendeki biallelik patojenik varyantların, nötrofil sayısında azlıkla karakterize “Ağır konjenital nütropeni – 7 kliniğine neden olduğu gösterilmiştir. Bu hastalarda, karakteristik olarak kemik iliği biyopsisi normal granülosit olgunlaşması göstermesine rağmen, promyelosit seviyesinde nötrofil olgunlaşma defekti yarattığından, periferik nütropeni vardır. Nütropeni G-CSF ile tedaviye yanıtızsızdır, ancak GM-CSF'ye yanıt verebilir (Triot A ve ark., 2014). Tanımlanmış patojenik varyantların önemli bir çoğunluğunu fonksiyon kaybı yaratan varyantlar oluşturmaktadır ve oldukça az sayıda missense varyant tanımlanmıştır.

WAS geni, aktin filament polimerizasyonu ve reorganizasyonunu denetleyen bir protein olduğu gösterilmiş olan “Wiskott-Aldrich sendromu proteini”ni kodlar (Symons M ve ark., 1996). Bu protein aynı zamanda lenfosit ve platelet fonksiyonlarının da önemli bir regülatörüdür (Ramesh N ve ark., 1997). Patojenik bakterilerin yaptığı enfeksiyon sonrasında bu hücrelerde yaşanması gereken hücre içi iskelet değişimlerini aktin üzerinden kontrol eder (Cheng HC. Ve ark, 2008). Sitoplazmik hücre iskeletindeki rolüne ek olarak, çekirdekte aktin polimerizasyonunu da düzenleyerek, hasarlı DNA'nın gen transkripsiyonunu ve onarımında etkiler oluşturur. (Taylor MD. Et al, 2010). Tekrarlayan enfeksiyonlara sahne olduğu bilinen Wiskott-Aldrich sendromuna neden olduğunun gösterilmesine (Kwan SP ve ark., 1995) ek olarak, bu gendeki hemizigot ve homozigot patojenik değişimler “X’e bağımlı ağır konjenital nütropeni”ye de neden

olabilmektedir (Devriendt K. Ve ark., 2001). Missense varyantlar ve fonksiyon kaybı yaratıcı varyantlar, bu gende tanımlanmış patojenik varyant tipleridir.

G6PC3 geni, Glukoz-6 fosfataz 3 enzimini kodlar. Endoplazmik retikulum lümeninde yerleşik olan bu enzim, glukoz-6 fosfatın glukoza dönüşümünü katalizler. (Martin CC ve ark, 2002). Bu gen literatürde 2 farklı klinik ile ilişkilendirilmiştir. Bunlardan ilki, aralıklı tekrarlayan nötropeni, lenfopeni, monositoz ve anemi bulguları ile giden Dursun sendromudur. Periferik kan mutlak nötrofil sayısı  $0,5 \times 10(9)/L$ 'nin altında olan, promyelositer seviyede granülopoez olgunlaşmasının durması ile karakterize bir hematopoez bozukluğudur. Hastalarda ciddi tekrarlayıcı bakteriyel enfeksiyonlar, pulmoner arterial hipertansiyon, sekundum tipi atrial septal defekt başta olmak üzere kardiyak anomaliler, aralıklı tekrarlayan nötropeni, lenfopeni, monositoz ve anemi izlenir (Banka S ve ark., 2010). İkincisi ise esasen nötrofil bozukluğu ile karakterize “Otozomal resesif ağır konjenital nötropeni-4” kliniğidir. Periferik kan ve kemik iliğinde tipik olarak şiddetli nötropeni belirgin bir yüzeyel ven paterni ile birlikte tekrarlayan, yaşamı tehdit eden bakteriyel enfeksiyonlara karşı artan duyarlılık ile karakterize edilir. Kardiyak malformasyonlar (örn. atriyal septal defektler, patent duktus arteriozus, kapak kusurları), ürogenital anomaliler (kriptorşidizm dâhil), büyüme ve gelişme geriliği, fasiyal dismorfizm (örn. frontal çıkıntı, kalkık burun, malar hipoplazi) ve aralıklı trombositopeni sıklıkla izlenen diğer bulgular arasındadır. Missense varyantlar ve fonksiyon kaybı yaratıcı varyantlar, bu gende tanımlanmış patojenik varyantlar içerisinde benzer oranlarda izlenmektedir ve diğer varyant tipleri daha önce hiç tanımlanmamıştır.

VPS45, trans-golgi ağında görev alan ve vezikül aracılı transportta işlev gören “Vaküol ilişkili seçici protein -45”i kodlar. Vezikül aracılı protein sekresyonu ve hücre içi moleküllerin farklı organellere taşınımında önemli bir rol oynar. Mayadaki genetik çalışmalar, veziküllerin vakuollere taşınmasında yer alan 40'tan fazla vakuolar protein sekresyon (VPS) geninin tanımlanması ile sonuçlanmıştır. Sözkonusu VPS45 geni, Sec1 ailesinin bir üyesidir ve fare, sıçan ve maya Vps45'lerine yüksek derecede dizi benzerliği gösterir. Bu genlerin işlevleri bir grup olarak nispeten daha iyi tanımlanmış olmakla birlikte, bu genin bireysel işlevi tam olarak bilinmemektedir, ancak periferik kan mononükleer hücrelerindeki yüksek ekspresyonu, enflamatuar mediatörler de dahil olmak üzere protein trafiğinde kritik bir rolü olduğunu düşündürmektedir. Bu gendeki biallelik patojenik varyantlar, başlıca nötropeni ve nötrofil

disfonksiyonu, G-CSF'ye yanıtızsızlık, yaşamı tehdit eden enfeksiyonlar, kemik iliği fibrozu ve renal ekstramedüller hematopoez ile karakterize edilen “Otozomal resesif konjenital nütropeni – 5” kliniği ile ilişkilendirilmiştir (Vilboux T ve ark., 2013). Veritabanlarında oldukça az sayıda varyant tanımlanmış bu gende, tanımlanan varyantların tamamının missense varyantlardan oluştuğu görülmektedir.

ELANE geni, önemli bir vücut savunma enzimi olan nütrofil elastazı kodlar. Doğal öldürücü hücrelerin, monositlerin ve granülositlerin yapısında bulunur. C5a'ya bağımlı nütrofil enzim salımını ve kemotaksisi inhibe eder. Aktivasyonun ardından bu proteaz, azurofil granülleri olarak adlandırılan özel nütrofil lizozomları içindeki proteinleri ve ayrıca hücre dışı matrisin proteinlerini hidrolize eder. Enzim, kollajen-IV ve elastinin proteolizi yoluyla konak savunmasına katkıda bulunur. Bu protein aynı zamanda E. coli'nin dış zar proteini A'yı (OmpA) ve Shigella, Salmonella ve Yersinia gibi bakterilerin virülans faktörlerini de yıkar. (Belaouaj ve ark., 2000). Literatürde siklik nütropeni (Duan Z ve ark., 2004) ve “Otozomal resesif ağır konjenital nütropeni-1 “ kliniği ile ilişkilendirilmiştir. (Dale DC. Ve ark., 2000). Siklik nütropeni tablosunda, nütropeni atakları doğumda veya hemen sonrasında başlar. Etkilenen bireylerin çoğunda, nütropeni her 21 günde bir tekrar eder ve yaklaşık 3 ila 5 gün sürer. Nütropeni, vücudun bakteri ve virüsler gibi patojenlerle savaşmasını zorlaştırır, bu nedenle siklik nütropenisi olan kişilerde tipik olarak tekrarlayan sinüs, solunum yolu enfeksiyonları gelişir. Ek olarak, bu rahatsızlığı olan kişilerde sıklıkla ağızda ve kolonda ülserler, farenjit, dış eti iltihabı, tekrarlayan ateş veya karın ağrısı gelişir. Siklik nütropenisi olan kişilerde bu sağlık sorunları yalnızca nütropeni epizotları sırasında görülür. Nütrofil seviyelerinin normal olduğu zamanlarda, enfeksiyon ve iltihaplanma riskinde artış yoktur. Bu genin ilişkilendirildiği bir diğer fenotip olan otozomal resesif ağır konjenital nütropeni-1, periferik kan mutlak nütrofil sayısı  $0,5 \times 10^9/l$ 'nin altında olan ve erken başlangıçlı ciddi bakteriyel enfeksiyonların olduğu, promyelositler seviyesinde granülopoezi olgunlaşmasının durması ile karakterize heterojen bir hematopoez bozukluğudur. Etkilenen Avrupa ve Orta Doğu kökenli bireylerin yaklaşık %60'ında, dominant ELANE varyantları vardır. Missense varyantlar tanımlı patojenik varyantların büyük çoğunluğunun oluştururken, bunu sırasıyla fonksiyon kaybı yaratıcı varyantlar ve kodlanmayan varyantlar takip etmektedir.

HAX1 geni, bir tirozin kinaz substratı olan HCLS1 assosiye proteini kodlar. Bu protein hücre içi aktin iskeletinin düzenlenmesinde, kltrin kaplı veziküler transportta, hücre migrasyonunda ve bazı önemli sinyal yollarında görev almaktadır (Suzuki Y ve ark., 1997). Bu gendeki biallelik varyantlar, nötropeniye ve tekrarlayan enfeksiyonlara ek olarak bazı hastalarda nörolojik bulguların da eşlik etmesiyle karakterize edilen “Otozomal resesif ağır konjenital nötropeni –3” kliniği ile ilişkilendirilmiştir [Germeshausen M ve ark. 2008]. Bu gende tanımlı patojenik varyantların büyük çoğunluğunu fonksiyon kaybı yaratan varyantlar oluşturmaktadır.

CYBA geni, fagositlerdeki respiratuvar patlamadan sorumlu olan membrana bağımlı NOX kompleksinin içindeki önemli bir komponent olan sitokrom-B enziminin alfa subuniti (hafif zincir olarak da tanımlanmıştır) kodlar (Ueno N ve ark., 2005). Bu gen defektleri, bu enzimin eksikliğine bağlı olarak, fagositlerin respiratuvar patlamalarında eksiklik sonucu tekrarlayan bakteriyel ve fungal enfeksiyonlar ve kronik granülom oluşumları ile sonuçlanan “Kronik granümatöz hastalık – 4 “ fenotipi ile sonuçlanır (Dinauer MC ve ark., 1990). Bu gende sinonim varyantlar hariç tüm varyant tipleri patojenik olarak tanımlanmıştır.

CYBB geni, yukarıda bahsedilen sitokrom-B'nin beta subunitini (ağır zincir olarak da tanımlanmaktadır) kodlar. Fagosit membranlarının polarizasyonu ve süperoksit üretimi için kritik rol üstlenir. Süperoksit üreten fagositlerin zara bağlı oksidazı yapısında, tek elektronları sitoplazmik NADPH'den plazma zarı boyunca dış taraftaki moleküler oksijene aktaran bir solunum zincirinin uç bileşenidir. Ayrıca, dinlenme halindeki fagositlerin H(+) akımlarına aracılık eden voltaj kapılı bir proton kanalı olarak işlev görür. Hücresel pH'ın düzenlenmesine katılır ve çinko tarafından bloke edilir. Bu gen X kromozomu üzerinde yerleşik olduğu için, bu şekilde adlandırılan, “X'e bağlı kronik granümatöz hastalık” fenotipi ile ilişkilendirilmiştir (Royer-Pokora B. Ve ark., 1986).Bu, yaşamın ilk aylarında veya yıllarında semptomların başlamasıyla karakterize edilen bir primer immün yetmezlik tablosudur. Hastalar tekrarlayan enfeksiyonlar, lenfadenopati, enflamatuar barsak hastalığı, granümatöz kolit, ateş, cilt enfeksiyonları, osteomyelit ve/veya apseler ile başvurur. Enfeksiyöz organizmalar genellikle Staphylococcus aureus, Burkholderia cepacia, Serrata, Salmonella, mikobakteriler ve muhtelif mantar türleridir. Bu gende sinonim varyantlar hariç tüm varyant tipleri patojenik olarak tanımlanmıştır.

NCF1 geni, fagosit süperoksit üretiminde rol alan bir diğer komponent olan “nötrofil sitozol faktör-1”i kodlar. Latent NADPH oksidazın aktivasyonu için oldukça kritik önem arzeder (Volpp BD. Ve ark, 1989). Bu gendeki biallelik patojenik varyantlar, literatürde, tekrarlayan bakteriyel enfeksiyonlar ve granülom oluşumları ile karakterize “otozomal resesif kronik granüloamatöz hastalık -1” kliniği ile ilişkilendirilmiştir. (Noack D. Ve ark, 2001). Bu gende az sayıda varyant tanımlanmıştır ve bunlar benzer oranlarda missense ile fonksiyon kaybı yaratan varyantlardır.

NCF2, yukarıda bahsedilen NCF1 geni gibi, fagosit membranlarında latent durumda bulunan NADPH oksidazın aktivasyonunda görev alır. Nötrofillerde bulunan çok proteinli NADPH oksidaz kompleksinin 67 kilodaltonluk sitozolik alt birimi olan nötrofil sitozolik faktör 2'yi kodlar. Bu oksidaz, nötrofil fagozomunun lümenine iletilen bir süperoksit patlaması üretir. (Yoshida L ve ark., 2003). Kronik granüloamatöz inflamasyon belirtileri ile birlikte şiddetli tekrarlayan bakteriyel ve fungal enfeksiyonlar ile karakterize, fagositlerin patojenlere tepki olarak bir reaktif oksijen türü patlaması oluşturma yeteneğinin bozulmasından kaynaklanan “Otozomal Resesif Kronik Granüloamatöz hastalık tip-2” kliniği ile ilişkilendirilmiştir (de Boer M ve ark., 1994). Bu gende az sayıda varyant tanımlanmıştır ve bunlar benzer oranlarda missense ile fonksiyon kaybı yaratan varyantlardır.

XK geni, nötral aminoasit ve peptidlerin membrandan taşınımında rol aldığı gösterilmiş bir protein olan XK membran transport proteinin kodlar. Kırmızı kan hücrelerinin membranında Kell kompleksi yapısında da yer aldığı bildirilmiştir. (Ho M ve ark., 1994). Bu gendeki patojenik varyantların, Kell antijeni yokluğu, akantosis, kompanse hemoliz ve nörolojik bulgularla karakterize McLeod sendromuna neden olduğu gösterilmiştir. Bazı hastalarda bu fenotipe kronik granüloamatöz hastalık kliniğinin de eşlik ettiği yönünde vaka raporları mevcuttur (Marsh W ve ark., 1978). Tanımlı az sayıdaki patojenik varyantların büyük bir çoğunluğunu fonksiyon kaybı yaratan varyantlar oluşturmaktadır.

NOD2 geni, nükleotid bağlayıcı oligomerizasyon bölgesi içeren protein-2'yi kodlar. Özellikle gastrointestinal konak yanıtında önemli bir protein olan bu yapı, bakteri duvarında bulunan bir proteoglikan olan muramil dipeptit ile uyarıldıktan sonra, NF-Kappa-B sinyal yolağını aktive eder, ve bu suretle immün sistemde görevli yüzlerce geni aktive etmiş olur (Hsu LC ve ark., 2008). Aynı zamanda viral ss-RNA tanınmasında da önemli rolü olduğu

bilinmektedir (Sabbah A ve ark., 2009). Bu gendeki patojenik varyantlar, granülomlarla ilerleyen inflamatuvar bir sendrom olan Blau Sendromu (Miceli-Ricard C ve ark., 2001), periyodik ateş, poliartrit, dermatit ve bacaklarda inflamatuvar şişlikler ile giden bir otoinflamatuvar sendrom olan Yao Sendromu (Yao Q ve ark., 2011) ve İnflamatuvar Bağırsak Hastalığı kliniği ile ilişkilendirilmiştir. (Hugot CP ve ark., 2001). Gende tanımlı az sayıda patojenik varyant bulunmaktadır, ve neredeyse tamamı missense olarak izlenmektedir.

NCF4 geni, fagosit oksidasyonunda görevli bir diğer protein olan nötrofil sitosol faktör-4 proteinini kodlar (Wientjes FB ve ark., 1993). Bu gen tarafından kodlanan protein, konak savunması için önemli olan çok bileşenli bir enzim sistemi olan süperoksit üreten fagosit NADPH-oksidadın sitosolik düzenleyici bir bileşenidir. Bu protein ağırlıklı olarak miyeloid kökenli hücrelerde eksprese edilir. Küçük G proteini RAC1 ile daha fazla etkileşime giren ve hücre uyarımı üzerine zara doğru yer değiştiren nötrofil sitozolik faktör 1 (NCF1/p47-phox) ile bir kompleks oluşturmak için öncelikle nötrofil sitozolik faktör 2 (NCF2/p67-phox) ile etkileşime girer. Bu kompleks daha sonra enzim sisteminin zara entegre katalitik çekirdeği olan flavositokrom b'yi aktive eder. Bu proteinin fosforilasyonunun enzim aktivitesini negatif olarak düzenlediği gösterilmiştir. Farklı izoformları kodlayan alternatif transkript varyantları gözlemlenmiştir. Bir diğer kronik granülomatöz hastalık kliniği olan Otozomal Resesif Kronik Sitokrom B3 pozitif granülomatöz hastalık ile ilişkilidir (Matute JD ve ark, 2009). Genellikle yaşamın ilk on yılında başlayan tekrarlayan piyojenik enfeksiyonlar ve granülomatöz inflamasyon ile karakterizedir. Çoğu hasta kolit ve inflamatuvar barsak hastalığı özellikleri ile başvurur. Diğer yaygın belirtiler arasında lupus benzeri deri lezyonları, deri granülomları, Stafilokokal apseler, oral ülserler ve periodontitis bulunur. Hastalar genellikle invaziv enfeksiyonlara sahip değildir ve mantar enfeksiyonlarına belirgin şekilde duyarlı değildir. Bozukluk, NADPH oksidaz işlev bozukluğuna bağlı olarak değişen fagosit süperoksit üretimi kaybından kaynaklanır; genellikle diğer genetik CGD türlerinden daha az şiddetlidir. Gende tanımlı az sayıda patojenik varyantın neredeyse tamamı fonksiyon kaybı yaratan varyantlardır.

FAS, Fas ligand reseptörünü kodlar. Membran yapısında aktive olduğunda kaspaz-8'i aktive ederek, ekstremsel apoptoz yolacağını başlatır (Cascino I ve ark., 1995). Bu gendeki patojenik varyantlar ile otoreaktif lenfositlerin akkümüülasyonu, non-malign lenfadenopati, hepatosplenomegali, otoimmün hemolitik anemi, trombositopeni ve nötropeni ile karakterize

“Otoimmün lenfoproliferatif sendrom tip 1A” fenotipi arasında ilişki kurulmuştur (Del-Rey MJ ve ark., 2007). Veritabanlarında tanımlı varyantlara bakıldığında, patojenik varyantlar içerisinde missense ve fonksiyon kaybı yaratıcı varyantların benzer oranlarda dağıldığı izlenmektedir.

FASLG, Hücre sitotoksik yanıtı, NK-hücre aracılı sitotoksik yanıt, T hücre gelişimi ve en önemlisi de tüm bunlar sırasında FAS reseptörüne bağlanarak ekstrensek apoptoz yolunu başlatan, Fas-Ligand sitokin proteinin kodları (Alderson MR ve ark., 1995). FASLG aracılı apoptoz, periferik toleransın indüklenmesinde de rol sahiptir. Bu gendeki patojenik varyantlar ile “otoimmün lenfoproliferatif sendrom tip 1B” arasında ilişki gösterilmiştir (Wu J ve ark., 1996). Lenfoproliferasyon, lenfadenopati, hepatomegali ve splenomegali hastalığın kardinal bulgularıdır. ALPS'de otoimmün bozukluklar da yaygındır, bu bozuklukların çoğu hematopoietik sistem elemanlarını hedef alan niteliktedir, otoimmün hemolitik anemi, otoimmün nötropeni ve otoimmün trombositopeni bunlara örnek verilebilir. Daha az sıklıkla, glomerülonefrit, otoimmün hepatit, üveit ve Guillain-Barre gibi diğer organları ve dokuları etkileyen otoimmün bozukluklar da beklenebilir. Longitudinal olarak incelendiğinde, lenfoproliferasyon sıklıkla çocukluk döneminde belirginleşirken, otoimmün bozukluklar tipik olarak birkaç yıl sonra gelişir ve en sık olarak Evans sendromu olarak da adlandırılan hemolitik anemi ve trombositopeninin bir kombinasyonu olarak ortaya çıkar. ALPS'nin bu klasik formuna sahip kişiler genellikle normale yakın bir yaşam süresine sahiptir, ancak genel popülasyona kıyasla lenfoma gelişimi riskleri oldukça yüksektir. Veritabanlarında çok az sayıda tanımlı varyant bulunmaktadır ve bunların çoğunluğu fonksiyon kaybı yaratıcıdır.

CASP10 apoptoz aktivasyonu ve regülasyonunda çok önemli bir yeri olan, kaspaz 3, 6, 7,8 ve 9'u aktive etmek suretiyle apoptozda kilit rol oynayan kaspaz-10 proteinini kodlar (Wang J ve ark., 2001). Bazı izoformlarının NF-Kappa-B aktivitesini de arttırdığı gösterilmiştir (Wang H ve ark., 2007). Kaspazlar, aktif enzimi oluşturmak için dimerize olan büyük ve küçük 2 alt birim bileşinceye değin inaktif proenzimler olarak bulunur; inflamasyon, septik şok ve yara iyileşmesi gibi süreçlerde bu inaktif kaspazların ardışık aktivasyonu, hücre apoptozunun yürütülmesinde merkezi bir rol oynar. Söz konusu ardışık süreç içerisinde CASP10, kaspaz 8 tarafından aktive edildikten sonra kaspaz 3 ve 7'yi aktive eder. Bu gendeki patojenik varyantlar, erken çocukluk döneminde ortaya çıkan ve otoreaktif lenfositlerin birikmesiyle sonuçlanan, hepatosplenomegali, non-malign lenfadenopati, otoimmün hemolitik anemi, trombositopeni ve nötropeni ile

karakterize “Otoimmün Lenfoproliferatif Sendrom tip 2A”ya neden olur (Wang J ve ark., 1999). Veritabanlarında tanımlı varyanlara bakıldığında, az sayıda tanımlı varyant olduğu ve patojenik varyantlar içerisinde missense ve fonksiyon kaybı yaratıcı varyantların benzer oranlarda dağıldığı izlenmektedir

PRKCD geni, kalsiyumdan bağımsız, “fosfolipid- ve diasilgliserol (DAG) -bağımlı serin / treonin-protein kinaz”ı kodlar. DNA hasarına bağlı apoptoz sırasında pro-apoptotik,, bir anti-sitokin reseptörü tarafından başlatılan hücre ölümü sırasında apoptotik bir rol üstlenir. Tümör süpresyonunda ve birkaç NADPH oksidaz tarafından oksijen radikali üretiminde rol oynar. Trombosit fonksiyonel yanıtlarında pozitif veya negatif düzenleyici olarak işlev görür. B hücresi proliferasyonunu negatif olarak düzenler ve B hücresi tolerans indüksiyonunda önemli bir işleve sahiptir Bu gendeki patojenik varyantlar, antikör yanıtlarında defekt, hipogammaglobülinemi, dolaşımdaki B hücre sayısında azalma ve B hücre gelişim defekti ile karakterize edilen “Otoimmün Lenfoproliferatif Sendrom tip 3” kliniği ile sonuçlanır (Salzer E ve ark., 2013). Bu gende tanımlı az sayıdaki patojenik varyanta bakıldığında büyük çoğunluğunun fonksiyon kaybı yaratan varyantlar olduğu izlenmektedir.

IRAK4, Toll-Like-Reseptör ve IL-1B yolaklarında görev alan bir serin-treonin protein kinaz olan “Interleukin-1 reseptör assosiyasyon kinaz-4” adlı proteini kodlar (Li S ve ark., 2002). İnfant veya çok erken çocukluk dönemlerinden başlayarak ağır ve tekrarlayıcı bakteriyel enfeksiyonlara sahip olan ve ölümcül seyreden İmmünyetmezlik-67 fenotipi ile ilişkisi mevcuttur. Etkilenen bireylerde ajan olarak saptanan en yaygın organizmalar Streptococcus pneumoniae ve Staphylococcus aureus'tur; Pseudomonas ve atipik Mikobakteriler de görülebilir. İlk invaziv enfeksiyon tipik olarak 2 yaşından önce ortaya çıkar ve menenjit, bakteriyel enfeksiyonların %41'ini oluşturur. Erken çocukluk döneminde ölüm oranı yüksektir ve çoğu ölüm 8 yaşından önce meydana gelir. Eritrosit sedimentasyon hızı (ESR) ve C-reaktif protein yüksekse de, etkilenen bireylerde ateş yanıtında bozulma ve nötropeni başta olmak üzere enfeksiyona karşı bozulmuş bir inflamatuvar yanıt vardır. Genel immünolojik inceleme, normal seviyelerde B hücreleri, T hücreleri ve NK hücreleri gösterme eğilimindedir. Bununla birlikte, daha ayrıntılı çalışmalar, lipopolisakarit (LPS) ve IL1B uyarısına karşı bozuk sitokin yanıtı olduğunu ortaya koyar. Pnömonokok aşısı dışında, aşı yanıtı normaldir. Viral, fungal ve parazitik enfeksiyonlar genellikle görülmez. IVIg veya bazı antibiyotiklerle profilaktik tedavi etkili

olduğundan, erken çocukluk döneminde erken teşhis çok önemlidir; bozukluk adolesan dönemde doğal seyri içinde dahi iyileşme eğilimindedir. (Medvedev AE ve ark., 2003). Literatürde bildirilmil patojenik varyantların büyük çoğunluğu fonksiyon kaybı yaratan varyantlardır.

DOCK8 geni, GDP-GTP dönüşümünü sağlayarak GTPase'ı aktive eden bir guanin değişim faktörüdür. İmmün sistemde interstisyel dendritik hücrelerin ve CD4+ T hücrelerin migrasyonlarını sağlar, aynı zamanda NK hücrelerin mikrotübül polimerizasyonu ve polarizasyonu üzerine de önemli etkileri vardır (Harada Y ve akr. 2012; Ham H ve ark. 2015; Xu X ve ark, 2017). Bu gendeki biallelik patojenik varyantlar, immün yetmezlik, tekrarlayan enfeksiyonlar, egzama, serum IgE artışı, eozinofili, bağ dokusu defektleri ve iskelet tutulumu ile karakterize nadir bir bozukluk olan Hiper IgE sendromu ile ilişkilendirilmiştir (Zhang Q ve ark, 2009). Tanımlı patojenik varyantların neredeyse tamamını fonksiyon kaybı yaratan varyantlar oluşturmaktadır.

IL10 geni, inflamasyonun neden olduğu doku bozulmasını sınırlayan, ileri derecede anti-enflamatuar fonksiyonlara sahip bağışıklık sisteminin birçok hücrelerine etki eden majör immün düzenleyici bir sitokin olan interleukin-1 proteinini kodlar. IL10RA ve IL10RB adı verilen subünitlerden oluşan reseptörüne bağlanması, STAT3 aktivasyonu ve STAT3'ün çekirdekte gösterdiği transkripsiyonel bazı baskılamalar ile anti-enflamatuar bir etki ile sonuçlanır. Makrofajlar gibi antijen salgılayan hücreleri hedefler ve proinflammatuar moleküllerin salınımını inhibe eder. Salınımlarını inhibe etmenin yanı sıra MHC sınıf 2 moleküllerinin ekspresyonunu ve onların ko-stimülatörlerini de bloklayarak T-hücre aracılı yanıtın azalmasında da rol oynar. mTOR sinyal yolağını da regüle ettiği ve bu yolak üzerinden de immün sisteme etkileri olduğu bildirilmiştir. Genin promotörü birçok varyasyon gösterebilir, farklı düzeyde salınımlarından sorumlu olduğu ifade edilmiştir. (de Waal Malefyt R, 1991; Frei K ve ark, 1994). Klinik ilişkilendirilmeleri farklı bazı çalışmalar üzerinden olmuştur; bu gendeki bazı varyantların immün baskılanmayı arttırmak suretiyle graft versus host reaksiyon oluşumunu riskini azalttığı, bazı varyantların HIV enfeksiyonu progresyonunu arttırıcı etki gösterdiği, ve Romatoid Artrit gibi otoimmün hastalıkların prognozunda etkili olduğu bildirilmiştir (Shin HD ve ark, 2000; Lard LR ve ark, 2003). Clinvar ve Uniprot gibi veritabanları incelendiğinde, bu gende net bir şekilde klinikle ilişkilendirilmiş bir varyantın henüz tanımlanmadığı görülmektedir, bu durum

çalışmamızda yapılabilecek genotip fenotip ilişkilendirilmelerini literatüre katkısı itibariyle daha kıymetli bir hale getirmektedir.

IL10Ra ve IL10Rb genleri, yukarıda bahsedilen IL10 sitokininin hücre yüzeyi reseptör kompleksinin parçalarıdır (sırasıyla alfa ve beta subunit) (Usacheva A ve ark, 2002). Bu kompleks, IL10'un anti-inflamatuar etkilerinin hücre düzeyinde ortaya çıkışından sorumludur. Bu genlerde mevcut patojenik varyantlar, İnflamatuar Barsak hastalığı patogenezinde gösterilmiştir (Glocker EO ve ark, 2009). Bildirilmiş patojenik varyantlar incelendiğinde, en sık missense varyantlar göze çarpmakla birlikte, fonksiyon kaybı yaratan varyantların ve kodlanmayan değişimlerin de veritabanlarında yer aldığı görülmektedir.

STXBP2 geni; hücre içi vezikül trafiğine ve membranlarla vezikül füzyonunda etkili, “soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor (SNARE)” proteinleri ile etkileşim yoluyla granül ekzositoz mekanizmasına katkıda bulunan, ve doğal öldürücü (NK) hücrelerde sitotoksik granül ekzositozunu düzenlemeye yardımcı olan “Syntaxin-bağlayıcı protein-2”yi kodlar. Hipersitokinemi ile giden bir immün disregülasyon, doğal öldürücü hücre işlevlerinde defekt, aktive lenfositler ve makrofajlar tarafından çeşitli organların kitlesel infiltrasyonu ile karakterize nadir görülen bozukluk olan “Hemafagositik Lenfositosis” kliniği ile ilişkilendirilmiştir. Hastalığın seyrinde ateş, hepatosplenomegali, sitopeniler, sinirlilik hali, hipotoni, nöbetler, kraniyal sinir defisitleri ve ataksi gibi daha nadir görülen nörolojik ve biyokimyasal bulgular da izlenebilir (zur Stadt U ve ark, 2009). Patojenik varyantların veritabanlarındaki dağılımı incelendiğinde fonksiyon kaybı yaratan ve missense varyantların benzer oranlarda olduğu görülmektedir.

STX11 geni, endozomlarda ve trans-golgi ağında görevli bir protein olan “Syntaxin-11”i kodlar. Bu gen, sintaksin ailesinin bir üyesidir, sintaksinler hücre içi veziküllerinin taşınması, hedeflenmesi ve füzyonunda rol alan SNARE proteinleridir. Bu karmaşık ağ içinde STX11 spesifik olarak incelendiğinde, geç endozomlar ve trans-Golgi ağı arasındaki protein taşınmasını düzenlediği ortaya çıkmıştır (Müller ML ve ark, 2014). Literatürde Hemofagositik lenfositosis-4 kliniği ile ilişkilendirilmiştir (zur Stadt U ve ark., 2005). Ateş, splenomegali, bisitopeni, hipertrigliseridemi ve/veya hipofibrinojenemi, hemofagositoz, düşük veya hiç olmayan NK hücre aktivitesi, hiperferritinemi ve yüksek çözünür IL2 reseptör seviyeleri (IL2R) olarak listelenen 8 ölçüt en az 5'inin varlığında klinik olarak tanı alabilen hiperinflamatuar bir

bozukluktur. Tipik olarak bebeklik veya erken çocukluk döneminde ortaya çıkar. Kemoterapi veya immünoterapi ile kalıcı remisyona nadiren sağlanır; hematopoietik kök hücre nakli tek tedavidir. Tanımlı patojenik varyantların neredeyse tamamını fonksiyon kaybı yaratan varyantlar oluşturmaktadır.

PRF1, hücre ölümünde ve virüs bulaşmış / neoplastik hücrelere karşı savunmada anahtar rol oynayan, salgı granülleri ile hedef hücreye salgılanarak bu hücrede gözenek oluşturmak suretiyle hücre ölümü sağlayan, bu nedenle konak savunmasının en önemli enzimlerinden biri olan “Perforin-1” enzimini kodlar. Bu enzim kalsiyuma bağlı hali ile hedef hücre membranına tutunur ve büyük gözenekler açar, bu sayede sitoliz yaratır (Vergelli M ve ark,1997). Yapılan çalışmalar (Stepp SE ve ark., 1999) , bu gendeki patojenik varyantların hemofagositik lenfositosis -2 kliniğine neden olduğunu göstermiştir. Missense ve fonksiyon kaybı yaratan bazı varyantlar benzer oranlarda veritabanlarında yer almakla birlikte, daha önce hiçbir kodlanmayan ve sinonim varyant bu gende tanımlanmamıştır.

UNC13D geni, lenfositlerin sitotoksik granüllerinin ekzositozu için, bu granüllerin salgılanmadan hemen önce immünolojik sinaps zarına yapışma ve yerleşmelerini kontrol eden bir kompleksin parçasıdır. Endozomların perforin kaplı veziküllerle birleşerek ekzositoz için işaretlenmelerinde rol oynar. Aynı zamanda mast hücrelerinde de kalsiyum bağımlı ekzositozu regüle ettiği bildirilmiştir (Neeft M ve ark, 2004). Bu gendeki biallelik patojenik varyantların, hipersitokinemi, immün disregülasyon, doğal öldürücü hücrenin kusurlu işlevi, aktive edilmiş lenfositler ve makrofajlar tarafından birçok organın yoğun infiltrasyonu, ateş, hepatosplenomegali, nöbetler, kranial sinir kusurları ve ataksiye gibi bulguların izlendiği “Ailesel hemofagositik lenfositosis -3” kliniğine neden olduğu gösterilmiştir (Feldmann J ve ark, 2003). Bildirilmiş patojenik varyantlar incelendiğinde, en sık fonksiyon kaybı yaratan varyantlar göze çarpmakla birlikte, missense varyantların ve kodlanmayan değişimlerin de veritabanlarında yer aldığı görülmektedir.

IL12B geni, aktive edilmiş T ve NK hücreleri için bir büyüme faktörü görevi görebilen, NK hücrelerin litik aktivitesini arttıran ve IFN-gama üretimini uyaran bir sitokin olan İnterleukin-12'nin beta alt ünitesini kodlar. Bu alt ünite, aynı zamanda, IL23A ile kompleks oluşturarak, yine proinflatuar yanıtla sonuçlanan kaskadları harekete geçiren bir diğer interleukin olan IL-23'ü oluşturur (Gubler U ve ark, 1991; Oppmann B ve ark, 2000). Bu gendeki patojenik varyantlar,

İnterferon-gama aracılı bağışıklığın bozulmasının neden olduğu, hem diğer mikobakteri türleri hem de *Mycobacterium tuberculosis*'e yatkınlık ile karakterize “İmmünyetmezlik -29” fenotipine yol açabilir (Picard C ve ark, 2002). Veritabanlarındaki patojenik varyant dağılımı incelendiğinde hiç missense varyant izlenmediği, en sık fonksiyon kaybı yaratan varyantların tanımlandığı ve bunu kodlanmayan varyantların takip ettiği görülmektedir.

ISG15 geni, interferon alfa ve beta tarafından aktive edildikten sonra, özellikle antiviral cevapta görev alan birçok protein ve yolağın harekete geçirilmesine aracılık eden bir protein olan “Ubikitin benzeri protein –ISG15”i kodlar (Zhao C ve ark, 2005). İnterferon etkilerine aracılık etmesini bozması nedeniyle, bu gende meydana gelen patojenik varyantların, mikobakteri enfeksiyonlarına artmış yatkınlık, bazal ganglia kalsifikasyonları ve lenfadenopatilerle karakterize bir hastalık olan “İmmünyetmezlik – 38”e neden olduğu gösterilmiştir (Bogunovic D ve ark, 2012). Tanımlı az sayıdaki patojenik varyantların tamamını fonksiyon kaybı yaratan varyantlar oluşturmaktadır.

IKBKG geni, işlevi NF-Kappa-B inhibitörlerinin fosforile edilmesi ve nihayetinde degradasyonunu sağlamak olan İKB Kinase (İKK) kompleksinin düzenleyici bir altbirimi olan “Nf-Kappa-B-Esansiyel modülatör” proteinini kodlar. Bu proteinin bu komplekse katılımının, kompleksi farklı yollar üzerinden aktive ettiği literatürde gösterilmiştir. Toll-Like Reseptör-3 aracılı viral yanıtta da önemli olduğu anlaşılmıştır. (Zhou H ve ark, 2004, Zeng W ve ark, 2009). Bu gendeki varyantlar, immünolojik klinik ile ilişkili 3 farklı fenotip ile ilişkilendirilmiştir. Bunlardan ilki, ter bezlerinin gelişim bozukluğu, seyrek saçlar, konik dişler ve ağır tekrarlayan enfeksiyonlarla karakterize bir ektodermal gelişim bozukluğu olan “Ektodermal Displazi ve İmmünyetmezlik (EDAID)” hastalığıdır (Zonana J ve ark, 2000). Yine bu gen, erken başlangıçlı, özellikle *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus Influenzae* ve atipik mikobakteri enfeksiyonları ile karakterize “İmmünyetmezlik – 33” kliniği ile de ilişkilendirilmiştir. Bu hastaların büyük çoğunluğunda ağır ektodermal bozukluklar izlenmemekle birlikte bazılarında konik diş gibi bulguların görüldüğü de raporlanmıştır (Orange JS ve ark, 2004). Ek olarak, özellikle erkeklerde letal seyreden, perinatal inflamatuvar veziküller, verrüköz yamalar, hiperpigmentasyon ve skarlaşmalar ile karakterize “İncontinentia Pigmenti” kliniğinin de sorumlu geni olarak tanımlanmıştır (Aradhya S ve ark, 2001). Literatürde, her tipte varyantın değişken oranlarda patojenik olarak tanımlandığı izlenmiştir.

IFNGR1 ve IFNGR2 genleri, immün sistemin en kritik sitokinlerinden biri olan interferon gama'nın reseptörünü oluşturan 2 protein altbirimini kodlarlar. Bu sitokinin bağlanmasını takiben JAK-STAT yolağını harekete geçirmek suretiyle immün sistemi harekete geçirirler (Aguet M ve ark, 1988). Literatürde IFNGR1 geni, "İmmünyetmezlik-27a ve İmmünyetmezlik 27b" klinikleri ile ilişkilendirilmiştir (Levin M ve ark, 1995; Jouanguy E ve ark, 1999). Aynı zamanda bu gendeki patojenik varyantların *Helicobacterium Pylori* enfeksiyonlarına duyarlılığı arttırdığı (Thye T ve ark, 2003), ve tüberküloz enfeksiyonu riskini yükselttiği (Cooke GS ve ark, 2006) de gösterilmiştir. IFNGR2 geni ise, yine benzer özelliklere sahip bir immünyetmezlik fenotipi olan "İmmünyetmezlik – 28" kliniği ile ilişkilendirilmiştir (Dorman SE ve ark, 1998). Patojenik varyantların veritabanlarındaki dağılımı incelendiğinde fonksiyon kaybı yaratan ve missense varyantların benzer oranlarda olduğu görülmektedir.

STAT1 geni, birçok sitokin, interferon ve büyüme faktörüne cevapta kullanılan bir hücre içi sinyal yolağı olan JAK-STAT yolağında, sinyal iletici ve transkripsiyonel aktivatör olarak görev yapan "Signal transducer and activator of transcription-1 (STAT1)" proteinini kodlar. Nükleusa migrasyon gösterip direkt olarak transkripsiyonel düzenleme yaptığı bilinmektedir (Rosenzweig ve ark, 2005). Kompleks immünolojik klinikler olan İmmünyetmezlik 31A (Dupuis S ve ark, 2001), 31B (Dupuis S ve ark, 2003) ve 31C (van de Veerdonk FL ve ark, 2011) fenotipleri ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Tanımlı patojenik varyantların büyük çoğunluğunu missense varyantlar oluştururken, bunu fonksiyon kaybı yaratan varyantlar takip etmektedir.

IL6 geni, İnterleukin-6 proteinini üretir. İnterleukin-6, akut faz reaksiyonunun güçlü bir indükleyicisidir. Enfeksiyon ve doku hasarı sırasında hızlı bir şekilde üretilen IL6, konak savunmasına katkıda bulunur, ancak aşırı IL6 sentezi fazladan doku hasarı oluşumunda da rol oynar. Doğal bağışıklık yanıtında, Toll-like reseptörler (TLR'ler) yoluyla patojenlerin tanınması sonrası, makrofajlar ve dendritik hücreler gibi miyeloid hücreler tarafından sentezlenir. Adaptif immün sistemde ise, B hücrelerinin immünoglobulin salgılayan hücrelere farklılaşması için gereklidir. CD4 + T hücre alt kümelerinin farklılaşmasında önemli bir rol oynar, germinal merkez oluşumunun indüksiyonu için gerekli olan T foliküler yardımcı (Tfh) hücrelerinin gelişimi için de vazgeçilmez önemi olan bir faktördür (Kang S ve ark, 2019). Literatürde birkaç farklı klinik ile ilişkilendirilmiştir. Crohn Hastalığına bağlı büyüme ve gelişme geriliğinin bir prediktörü olarak gösterilmiştir (Sawczenko ve ark, 2005). Sistemik Jüvenil Romatoid Artrit ile de ilişkisi

saptanmıştır (Rooney M ve ark, 1995). Bunun dışında tip1 ve tip2 diyabet patogenezinde de rol alabildiği ifade edilmiştir (Kristiansen OP ve ark, 2003; Möhlig M ve ark, 2004). Clinvar ve Uniprot gibi veritabanları incelendiğinde, bu gende net bir şekilde klinikle ilişkilendirilmiş bir varyantın henüz tanımlanmadığı görülmektedir, bu durum çalışmamızda yapılabilecek genotip fenotip ilişkilendirmelerini literatüre katkısı itibariyle daha kıymetli bir hale getirmektedir.

RECQL3 (diğer adıyla BLM) geni, DNA çift zincir hasarı onarımında görevli olduğu gösterilmiş bir protein olan Bloom Sendromu Proteini'ni kodlar. DNA'da holliday-kavşağı dissolüsyonu, kardeş kromatid eşlenmesi, replikasyon çatalının devamı gibi birçok rol üstlendiği de bildirilmiştir (Newman JA ve ark, 2015; Kim YM ve ark, 2010; Langland G ve ark, 2002). Patojenik varyantları sonucu, güneş sensitif hipo-ve hiperpigmente lezyonlar, pre ve postnatal büyüme gecikmesi, kromozomal instabilite ve bu nedenle maliniteye predispozisyon ile karakterize edilen "Bloom Sendromu" ile ilişkilendirilmiştir (Ellis NA ve ark,1995). Tanımlanmış patojenik varyantların önemli bir çoğunluğunu fonksiyon kaybı yaratan varyantlar oluşturmaktadır, ve oldukça az sayıda missense varyant tanımlanmıştır.

MYD88; doğal bağışıklık yanıtında Toll benzeri reseptör ve IL-1 reseptörü sinyal yolağında yer alan adaptör proteindir (Von Bernuth ve ark, 2008). IL-18 aracılı sinyal yolağında yer alır. IFN-beta, NOS2/INOS ve IL12A genlerinin indüklenmesine aracılık etmek için IRF1 proteininin çekirdeğe göçünü sağlar (Campbell GR ve ark, 2021). Bunlara ek olarak, bağırsak epitel hücrelerinde MyD88 aracılı sinyaller, bağırsak homeostazının korunması için çok önemlidir ve ince bağırsakta antimikrobiyal lektin REG3G ekspresyonunu kontrol eder. Literatürde, her tipte varyantın değişken oranlarda patojenik olarak tanımlandığı izlenmiştir.

IRAK1, yabancı patojenlere karşı doğuştan gelen bağışıklık tepkisini başlatmada kritik bir rol oynayan bir serin/treonin-protein kinazı kodlar. Toll benzeri reseptör (TLR) ve IL-1R sinyal yollarında yer alır. TLR aktivasyonu sonrası, MYD88 aracılığı ile hızlı bir şekilde reseptör sinyal kompleksine alınır. MYD88 ile olan bu etkileşimi, IRAK4 aracılıklı IRAK1 fosforilasyonuna ve ardından otofosforilasyon ve kinaz aktivasyonuna yol açar. Aktivasyonunu ve çekirdeğe translokasyonunu indüklemek için interferon düzenleyici faktör 7'yi (IRF7) fosforile eder, bu durum IFN genlerinin transkripsiyonel aktivasyonu ile sonuçlanır, ve nihayetinde hücreyi antiviral yanıtı hazır hale getirir (Jensen LE, ve ark, 2001; Aisling Dunne ve ark, 2010).

Clinvar ve Uniprot gibi veritabanları incelendiğinde, bu gende net bir şekilde klinikle ilişkilendirilmiş bir varyantın henüz tanımlanmadığı görülmektedir.

IL7, lenfoid progenitörlerin proliferasyonunu uyarabilen hematopoietik büyüme faktörü olan interleukin-7'yi kodlar. T ve B hücresi proliferasyonu ve olgunlaşmasının belirli aşamalarında kritik öneme sahiptir (Goodwin RG ve ark, 1989). Kritik bir örnek olarak, Pre-pro-B hücrelerinin pro-B hücrelerine farklılaşması, IL7 ve bir 30-kD proteinden oluşan pre-pro-B hücre büyüme uyarıcı faktörün (PPBSF) aracılığı ile olur (Lai L ve ark, 2001). HPV enfeksiyonu ile ilişkili siğiller, verrüköz veya plak benzeri cilt lezyonları, CD4+ T hücre lenfopenisi, deride malignite riski artışı ve immün disfonksiyon bulgularının görüldüğü ve otozomal resesif geçişli olduğu gösterilmiş "Epidermodisplazi verruciformis-5" kliniği ile ilişkilendirilmiştir (Liran Horev ve ark, 2015). Clinvar ve Uniprot gibi veritabanları incelendiğinde, bu gende net bir şekilde klinikle ilişkilendirilmiş bir varyantın henüz tanımlanmadığı görülmektedir.

IL7R, interleukin-7 proteininin reseptörüdür (Goodwin RG ve ark, 1990). Ayrıca timik stromal lenfopoietin (TSLP) için bir reseptör görevi görür. TSLP, monositlerden. T hücrelerin o bölgeye göçünü hızlandıran kemokinlerin salınımını indükleyen ve özellikle CD11c+ dendritik hücrelerin olgunlaşmasını artıran bir sitokindir. Mast hücrelerini doğrudan aktive ederek alerjik inflamasyonu indükleyebilir. Bu açıdan, IL7R'nin dolaylı olarak bu işlevlerle de ilintili olduğu sonucu çıkmaktadır. IL7R genindeki patojenik varyantlar, "immün yetmezlik-104 (IMD104)" fenotipi ile ilişkilendirilmiştir. Bu sendrom, erken bebeklik döneminde tekrarlayan enfeksiyonların başlaması ile karakterize otozomal resesif geçişli bir hastalıktır. Belirtiler arasında oral pamukçuk, ateş ve gelişme geriliği sayılabilir. Bazı hastalarda lenfadenopati ve hepatosplenomegali bulunurken, diğerlerinde lenf düğümleri ve timik gölge izlenmez. Laboratuvar çalışmaları, belirgin olarak azalmış T hücre, normal veya artmış B hücresi seviyeleri, değişken hipogamaglobulinemi ve normal NK hücreleri gösterir. Patojenik varyantların veritabanlarındaki dağılımı incelendiğinde fonksiyon kaybı yaratan ve missense varyantların benzer oranlarda olduğu görülmektedir.

MCM2 geni (CDCL1 ve BM28 olarak da adlandırılır), hücre döngüsünün 2 önemli adımında; DNA replikasyonunun başlamasında (S fazına giriş) ve bölünme aşamasında (bölünme sürecinin inisiasyonu), önemli rol oynayan bir insan nükleer proteindir (Mincheva ve ark, 1994). Erken S-faz proteinleri ailesinin üyelerine benzer. Ökaryotik hücrelerde 'hücre döngüsü başına bir

kez' DNA replikasyonunun başlatılması ve uzaması için gerekli temel replikatif helikaz olan MCM2-7 kompleksinin (MCM kompleksi) bileşeni olarak işlev görür. Kokleada yerleşik sil hücrelerinin gelişiminde , özellikle terminal farklılaşma aşamasında rol oynar ve ayrıca hücrelerin apoptozisini indüklemekte görev alır (Todorov IT ve ark, 1994). Bu gendeki patojenik değişimler, postlingual başlangıç gösteren yavaş progresif bir sensörinöral işitme kaybı sendromu “Otozomal dominant işitme kaybı-70” kliniği ile ilişkilendirilmiştir. Yaşanan bu sensörinöral işitme kaybı, iç kulaktaki nöral reseptörlerin, buradan kortekse ulaşan sinir yollarının veya işitme korteksinin hasarı sonucu ortaya çıkar(Gao J ve ark., 2015). Oldukça az sayıda tanımlanan patojenik varyantlarda, missense varyantlar nispeten ön plana çıkmaktadır.

ZNF341, immün homeostazın merkezi bir düzenleyicisi olan STAT3'ün ekspresyonunu düzenleyen bir nükleer çinko parmak transkripsiyon faktörüdür (Frey-Jakobs S ve ark, 2018). Özellikle Staphylococcus aureus kökenli cilt bakteriyel enfeksiyonları, kronik mukokutanöz kandidiyazis gibi fungal enfeksiyonlara duyarlılık, atopik dermatit, tekrarlayan solunum yolu enfeksiyonları, bronşektazi ve artmış serum IgE ve IgG ile karakterize, erken çocukluk çağı başlangıç eğilimi gösteren immünolojik bir bozukluk olan “Otozomal resesif hiper-IgE tekrarlayan enfeksiyon sendromu 3” ile ilişkisi gösterilmiştir. Hastalarda sıklıkla CD4+ T hücrelerinin T-helper-17 hücrelerine farklılaşmasının bozulduğu, hafıza B hücrelerinin azaldığı ve NK hücrelerinin azaldığı gösterilmiştir. Bazı hastalarda dismorfizm, anormal diş yapısı, alopesi, eklem hipermobilitesi ve tekrarlayan fraktürler gibi ekstrasemopoietik özellikler de görülür. Hastalık başlangıcı erken çocuklukta (Béziat V ve ark, 2018). Veritabanlarındaki az sayıdaki patojenik varyant incelendiğinde en sık karşılaşılanın fonksiyon kaybı yaratan varyantlar olduğu izlenmektedir.

STK4, kaspaz tarafından indükte edildikten sonra, hücre çekirdeğine girip kromatin kondenzasyonu süreçlerinde histon H2B üzerindeki serin-14'ü fosforile ederek, epigenetik olarak programlanmış hücre ölümü yolağında görev alan bir pro-apoptotik serin-protein kinazdır. Organ büyüklüğünün sınırlandırılmasında ve tümör süpresyonunda rol alan “hippo” sinyal yolağının anahtar bir bileşenidir. Bu gendeki patojenik varyantlar, progresif naïve T hücre kaybı, tekrarlayan bakteriyel, viral ve fungal enfeksiyonlar, abseler, otoimmün manifestasyonlar ve kardiyak malformasyonlar ile karakterize “Tekrarlayan enfeksiyon, otoimmünite ve kardiyak malformasyon eşlikli T hücre immünyetmezliği” fenotipi ile ilişkilendirilmiştir.

Veritabanlarındaki az sayıdaki patojenik varyant incelendiğinde en sık karşılaşılanın fonksiyon kaybı yaratan varyantlar olduğu izlenmektedir.

ADA (Adenozin Deaminaz), adenozinin 2-hidroksideadenozine yıkılmasını katalizleyen enzim olan adenozin deaminazı kodlar (Lindley ER, Pisoni RL, 1993) Adenozin homeostazi, ve dolayısıyla purin metabolizmasında kritik öneme sahiptir. Hücresel sinyal yollarına, hücre dışı adenozin sinyalini de regüle edeceği için, indirekt ama önemli etkilerde bulunur. DPP4'e bağlanarak, T hücre koaktivasyonunun pozitif bir düzenleyicisi görevini üstlenir (Ginés S, ve ark, 2002) Bu bağlanma aynı zamanda lenfosit-epitel adezyonunu da düzenler. Dendritik hücrelerin sitokin sekresyonunu artırır, CD4+ T hücre proliferasyonunu ve farklılaşmasını arttırıcı yönde etki gösterir. Aynı zamanda, plazminojen aktivasyonunu da uyarır. Parsiyel eksikliği daha hafif bir klinikle ilişkili olmak üzere; bu genin fonksiyonunu bozan varyantların, “T, B ve NK hücre negative Ağır Kombine İmmün Yetmezlik” tablosuna yol açtığı gösterilmiştir (Arredondo-Vega FX ve ark, 1994). Veritabanlarındaki patojenik varyantlar incelendiğinde en sık karşılaşılanın fonksiyon kaybı yaratan varyantlar olduğu izlenmektedir.

IL2RG, 6 farklı interlökin reseptörünün alfa subuniti ile heterodimer yapısı oluşturarak (IL2RA, IL4RA, IL7RA, IL9RA, IL15RA, and IL21RA) bu reseptörlerin fonksiyonunda görevler üstlenen “interlökin reseptör 2/ortak gama zinciri” proteinini kodlar. İnterlökinler immün sistemin işleyişinde major görevler üstlenen sitokinler olduğundan, bu yapıların bozukluğundan ağır kombine immün yetmezlik görülmesi beklenir. Nitekim IL2RG genindeki patojenik varyantların “T hücre negatif B hücre pozitif NK hücre negatif X bağımlı Ağır Kombine İmmün Yetmezlik “ kliniğine yol açtığı gösterilmiştir (Jones AM, ve ark, 1997). Literatürde, her tipte varyantın değişken oranlarda patojenik olarak tanımlandığı izlenmiştir, en sık olarak karşılaşılan ise fonksiyon kaybı yaratan varyantlardır.

DCLRE1C geni, “Artemis” olarak da adlandırılan, DNA onarımında önemli bir süreç olan “non-homologous end joining (NHEJ)” mekanizmasında kritik bir nükleazı kodlar. (Moshous D ve ark, 2001). Bu DNA onarım modalitesi, çift zincir hasarlarının onarımı ve V(D)J rekombinasyonu için gereklidir (Ma Y ve ark, 2002). V(D)J rekombinasyonu, bölgeye özgü DNA çift zincir kırıkları (DSB'ler) oluşturan lenfoid spesifik RAG endonükleaz kompleksi tarafından başlatılır, bu DSB'ler iki tip DNA uç yapısı sunar: hairpin yapıları ile kapatılmış kodlama uçları ve fosforile sinyal uçları. Bu uçlar, sırasıyla kodlama ve sinyal bağlantıları

oluşturmak için homolog olmayan uç birleştirme (NHEJ) yolu tarafından bağımsız olarak onarılır. V(D)J rekombinasyon süreci, immünooglobulin ve T hücre antijen reseptörlerini kodlayan genlerin somatik çeşitlenmesini sağladığından, bu mekanizma bozukluklarında immün sistem önemli bir biçimde etkilenir. Bu gendeki değişimler, 2 farklı fenotip ile ilişkilendirilmiştir. Bunlardan ilki, Omenn sendromudur; bu hastalık eritrodermi, hepatosplenomegali, lenfadenopati ve alopesi bulguları izlenebilen, otozomal resesif bir ağır kombine immün yetmezlik (SCID) tablosudur. B hücreleri çoğunlukla yoktur, T-hücre sayıları normalden daha fazladır fakat kısıtlı bir T-hücre reseptörü (TCR) repertuarını eksprese ederler. Bu gendeki bozukluklar ile ilişkilendirilmiş bir diğer entite “Athabasca tipi ağır kombine immün yetmezlik”tir. Athabasca dili konuşan yerli Amerikalılarda bir “founder varyant” gerçekleşmesi sonrası nesilden nesile kalıtıldığı düşünüldüğü için bu isim verilmiştir. Hastalığın karakteristik özelliği iyonize radyasyona karşı radyo-sensitivitedir. Veritabanlarındaki az sayıdaki patojenik varyant incelendiğinde en sık karşılaşılanın fonksiyon kaybı yaratan varyantlar olduğu izlenmektedir, bunu missense varyantlar takip etmektedir.

FCHO1, hücre yüzeyi proteinlerinin ve moleküllerinin endositozunda ve takip eden hücre içi transportunda temel mekanizma olan klatrin kaplı veziküllerin oluşumunda ve olgunlaşmasında yer alan bir proteini kodlar (Calzoni ve ark, 2019). Hücre membranına yapışma ve membranı vezikül oluşumu sırasında bükme aktivitesine ek olarak, fonksiyonel klatrin kaplı çukurların oluşumu için gerekli proteinleri ortama çekme görevine de sahiptir. Bmp reseptörlerinin klatrin kaplı vezikül aracılı endositozunu düzenleyerek Bmp sinyal yolağını düzenleyici etki de gösterir. T-hücre poliferasyonu ve aktivasyonunun düzenlenmesinde rol alır. TCR (T hücre reseptör)lerinin de internalizasyonunu düzenlediğinden, reseptör aktivasyonu sonrası TCR fonksiyonlarına dolaylı olarak etkide bulunur (Łyszkiewicz M ve ark, 2020). Bu genle ilişkilendirilmiş olan “İmmün yetmezlik-76 (IMD76) sendromu”, erken çocukluk döneminde tekrarlayan bakteriyel, viral ve fungal enfeksiyonlar ile karakterize otozomal resesif geçişli bir primer immünolojik hastalıktır. Laboratuvar çalışmaları, T hücre lenfopenisine ek olarak, değişken B hücre ve immünooglobulin anormallikleri gösterebilir. Bazı hastalarda lenfoma ve nörolojik bulgular da izlenebilir. Hastalık otozomal resesif kalıtım patternine uygun olarak kalıtılmaktadır. Veritabanlarındaki az sayıdaki patojenik varyant incelendiğinde en sık karşılaşılanın fonksiyon kaybı yaratan varyantlar olduğu izlenmektedir, bunu missense varyantlar takip etmektedir.

CD3G, T-lenfosit hücre yüzeyinde bulunan ve adaptif immün yanıtta önemli bir rol oynayan TCR-CD3 kompleksinin parçasıdır. Antijen sunan hücreler (APC'ler) T hücre reseptörünü (TCR) aktive ettiğinde, TCR aracılı sinyaller hücre zarı boyunca CD3 zincirleri (CD3D, CD3E, CD3G ve CD3Z) tarafından iletilir. Tüm CD3 zincirleri, sitoplazmik alanlarında immünoresptör tirozin bazlı aktivasyon motifleri (ITAM'ler) içerir. TCR bağlanması üzerine, bu motifler, Src ailesi protein tirozin kinazlar tarafından fosforile olur ve bu da takip eden hücre içi sinyal yollarının aktivasyonu ile sonuçlanır (Barber EK ve ark, 1989). T hücresi aktivasyonunda sinyal iletiminin bu rolüne ek olarak, CD3G, hücre yüzeyinde TCR ekspresyonunun dinamik düzenlenmesinde önemli bir rol oynar (Dietrich J ve ark, 1994). Tanımlı az sayıdaki varyantların tamamını fonksiyon kaybı yaratan varyantlar oluşturuyor gibi gözükmektedir.

IL2 geni, interleukin-2 proteinini kodlar. Literatürde daha önceleri “T-hücre büyüme faktörü” olarak da geçen Interlökin-2 (IL2), aktive olmuş T hücreleri tarafından üretilen güçlü bir bağışıklık düzenleyici lenfokindir (Lowenthal ve ark, 1985; Smith, 1988). T-hücre farklılaşmasının moleküler doğasının araştırılmasında sıklıkla kullanılmıştır. Aynı zamanda, tıpkı interferonlar gibi, NK hücre aktivitesini artırır. Kendisinin hedef reseptörü (IL2R) ile etkileşimi sonrası, IL2R alt birimlerinde oligomerizasyona ve konformasyon değişikliklerine yol açarak, nihayetinde JAK1 ve JAK3'ün fosforilasyonu ile başlayan hücre içi sinyal yollarının aktivasyonuna neden olur (Miyazaki T ve ark, 1994). Tanımlı az sayıdaki varyantların tamamını fonksiyon kaybı yaratan varyantlar oluşturuyor gibi gözükmektedir.

**Tablo 2.2:** Çalışmadaki analize dahil edilecek primer immün yetmezlik kliniği ile ilişkilendirilmiş genler

RAG1, RAG2, ATM, NBN, TBX1, STAT3, PGM3, BTK, TAC1 (TNFRSF13B), FOXP3, CTLA4, LRBA, F12, SERPING1 (C1NH), GFI1, JAGN1, USB1, CSF3R, WAS, G6PC3, VPS45A (VPS45), ELANE, HAX1, CYBA, CYBB, NCF1, NCF2, XK, NOD2, NCF4, FAS, FASLG, CASP10, PRKCD, IRAK4, MYD88, IRAK1, DOCK8, IL10, IL10Ra, IL10Rb, STXBP2, STX11, PRF1, UNC13D, IL12B1 (IL12B), ISG15, IKBKG, IFNGR2, IFNGR1, STAT1, IL6, RECQL3 (BLM), IL7, IL7R, MCM2, ZNF341, STK4, ADA, IL2RG, DCLRE1C, FCHO1, CD3G, IL2

Primer İmmünyetmezlikler bütün dünyada önemli bir morbidite ve mortalite sebebidir. Sık görülmeleri ve neredeyse tüm enfeksiyonlarla ilişkili olmaları nedeniyle erken ve efektif tanı ve takipleri çok büyük önem arz etmektedir. Son yıllarda yayınlanan konsensüs bildirilerinde immün yetmezlik tanı ve sınıflandırılmaları tamamen genetik tetkikler üzerinden tarif edilmektedir. Fakat 400'den fazla tanımlanmış gende ortaya çıkabilecek sayısız genetik değişim ile fenotip arasında kapsayıcı bir ilişki kurulması günümüze değin mümkün olmamıştır.

Yeni nesil dizileme teknolojisi, tek bir örnekten alınan milyonlarca parçaya ayrılmış bir DNA molekülünün her bir parçasının aynı anda ve uyum içerisinde paralel olarak işlenmesini temel alan bir dizileme yöntemidir. Beraberinde getirdiği avantajlar ile pek çok alanda yürütülen biyolojik araştırmaların vazgeçilmez bir parçası haline gelmiştir. Daha önceki genetik dizileme tekniklerden farklı olarak, paralel birçok dizileme reaksiyonu aynı anda yapılarak yüksek hacimde ve hızlı sonuç alınmaktadır. Yüksek hacimli bir analiz yöntemi olmasının yanı sıra barkod yöntemi ile DNA parçalarının hangi örneğe ait olduğu kolayca takip edilmekte ve bu sayede aynı reaksiyonda onlarca örnek bir arada çalışılıp birim zamanda alınan verim arttırılabilmektedir (Behjati S. Ve ark., 2013). Primer İmmün Yetmezlikli Hastalarda, bu hastalıklar için tanımlanmış genler için dizayn edilmiş paneller oluşturularak yapılan klinik çalışmalarda, tanı başarısının önceki tetkiklere ve geçmiş yıllara oranla belirgin bir biçimde arttığı gösterilmiştir (Rae W. Ve ark. 2018). Farklı yayın ve çalışmalarda, 15%'ten %70'e kadar değişkenlik gösteren tanı başarıları elde edilmiştir (Abolhassani H. Ve ark., 2018). Ülkemizde immünyetmezliklerin genotip fenotip korelasyonu ile ilgili yeterli veri olmadığının görülmesi, immün sistemle alakalı fenotiplerin tanımlanmasında en önemli basamağın genotip verisi olması, immünyetmezliklerle ilişkilendirilmiş ve çalışmamıza dâhil edilen genlerde saptanan varyantların büyük çoğunluğunun günümüze değin üzerinde konsensüs oluşacak bir şekilde tanımlanamamalarından dolayı önemi bilinmeyen varyant olarak kabul edilmeleri ve bu grup hastalıkların genotip fenotip ilişkilendirilmesinde en başarılı yöntemin, yukarıda bahsedildiği üzere NGS oluşu verileri göz önünde bulundurularak, kliniği immünyetmezlikle uyumlu hastaların immünyetmezlikle ilintili seçilen genleri yeni nesil dizileme yöntemi ile analiz edilmiş ve sonuçlar tartışılmıştır.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1 Araştırmanın Tipi

Araştırma retrospektif şekilde dizayn edilmiş klinik bir çalışmadır.

#### 3.2 Araştırma Bölgesi ve Zamanı

Araştırma 2017-2021 yılları arasında Konya bölgesi ve çevre illerden Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Hastanesi (NEUMTF) 'ne başvuran hastaları içermektedir.

#### 3.3 Araştırma Evreni ve Yeri

Araştırma NEUMTF Pediatrik Allerji ve İmmünoloji Kliniği ve Dâhiliye Anabilim Dalı Allerji İmmünoloji bilim dalı birimlerinde Primer İmmünyetmezlik tanısı ile takip edilen ve bu klinik tablonun moleküler nedeninin anlaşılabilmesi ve net tanı koyulabilmesi amacıyla NEUMTF tıbbi genetik bölümüne yönlendirilen hastalardan oluşmaktadır. Çalışma basamakları, NEUMTF Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Laboratuvarları'nda gerçekleştirilmiştir.

#### 3.4 Örneklem Seçme Kriterleri

Çalışmamızda, 2017 ile 2021 yılları arasında Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Genetik Bölümü'ne immün yetmezlik ön tanısı ve/veya ilintili şikâyetleriyle başvurmuş ve ön değerlendirmeden geçirildikten sonra Primer İmmün Yetmezliklere yönelik genetik araştırma gerekli görülen 224 hasta değerlendirilmiştir. Bunlar arasından, aşağıda belirtilen dâhil etme ve dışlama kriterlerine göre seçilen 48 genotip fenotip korelasyonu, bu hastalarda tespit edilen varyantlar ve hastaların kliniği bir arada değerlendirilerek yapılmıştır. Buna ek olarak, bu hastaların varyantlarının aile içindeki segregasyonunun değerlendirilmesi ve varyantların de novo olup olmadıklarına bakılabilmesi için bu hastaların anne ve babalarına Sanger dizileme yöntemiyle hastada belirlenen varyant açısından tarama yapılmıştır.

### 3.5 Çalışmanın Parçaları

Çalışma, esasta 2 parçadan oluşmaktadır.

1) 2017 ile 2021 yılları arasında, genetik açıdan tablo 2.2’de belirtilen genleri dizilenecek çalışılmış tüm hastaların değerlendirilmesi yapılmıştır. Bu grup “kohort grubu” olarak adlandırılmıştır

2) 3.6 ve 3.7 bölümlerinde belirtilen kriterlere göre seçilen hastalar için genotip-fenotip ilişkilendirilmesi yapılmıştır. Bu grup “araştırma grubu” olarak adlandırılmıştır

Genotip-fenotip ilişkilendirmesine yardımcı olması açısından, çalışmaya katılmaya istekli olan ve analiz için kan vermek amacıyla bölümümüze gelebilen ailelerden de, sözkonusu varyantların analizi için sanger analizi yapılmıştır.

### 3.6 Araştırma Grubuna Dâhil Etme Kriterleri

a. Hastada saptanan (en az bir) varyant, literatür verilerine göre daha önce net bir şekilde patojenik veya benign olarak sınıflandırılmamış olmalıdır. Bu varyantlara “Önemi Bilinmeyen Varyant” adı verilmektedir.

b. Her hasta için, bireyde saptanan “Önemi Bilinmeyen Varyant”ın içinde bulunduğu gen ile hastanın kliniği arasında ilinti olmalıdır. İmmünyetmezliklerin değişken doğası ve genetik değişimlerin fenotipe yansımaları ile alakalı değişkenlikler göz önünde bulundurulduğunda, hasta kliniğinin gen ile ilintili hastalıkla “birebir” örtüşme göstermesi değil, genel bir klinik korelasyona sahip olması ölçüt olarak alınmıştır.

c. Önemi bilinmeyen varyanta sahip bu hastalarda, immün yetmezlikle ilişkili çalışılan başka bir gende patojenik bir varyant bulunmamalıdır.

### 3.7 Araştırma Grubu Dışlama Kriterleri

- a. Herhangi bir varyant tespit edilmeyen hastalar çalışmaya dâhil edilmemiştir.
- b. Patojenik olduğu literatür bilgileriyle net bir şekilde belirlenmiş olan varyantları taşıyan hastalar araştırma grubunadâhil edilmemiştir.
- c. Saptanan varyantlar ile klinik arasında korelasyon gözlenmeyen hastalar araştırma grubunadâhil edilmemiştir.
- d. Kliniği hakkında net veri elde edilemeyen hastalar çalışmaya dâhil edilmemiştir.

### 3.8 Çalışma öncesi Bilgilendirme

Örnekleme seçme kriterlerini karşılayan hastalara araştırmanın konusu ile ilgili genel bilgiler ve araştırma ile ilgili ayrıntılı bilgi verilmiştir. Araştırmada segregasyon analizi için saptanan varyantlar açısından anne ve babaya aynı gen bölgesi için Sanger dizileme yapılacağı, yapılacak analizde periferik kandan izole edilecek olan hasta DNA'sının kullanılacağı ve araştırma için hastaya herhangi bir ek medikal işlem uygulanmayacağı anlatılmıştır. Araştırmanın uzmanlık tezi olarak projelendirildiği ve Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğüne finanse edildiği anlatılmıştır. Yapılan bilgilendirme sonrası araştırmaya katılmaya gönüllü olan hastalara bilgilendirilmiş gönüllü onam formu okutulmuş ve onayladıklarına dair imzaları alınmıştır (Ek-1).

### 3.9 Araştırmanın İzni ve Etik Durum

NEÜMTF etik kuruluna araştırma öncesinde gerekli belgeler sunulmuş ve araştırmamız 05.11.2021 tarihli 2021/3472 sayılı kararla etik kurul onayı almıştır (Ek-2).

### 3.10 Kullanılan Cihazlar ve Kimyasallar

#### 3.10.1 Kullanılan Cihazlar

- Yeni Nesil Dizileme cihazı (İllumina Miniseq)
- PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) cihazı (Thermo Fisher Scientific SimpliAmp Thermal Cyclers)
- Mikrosantrifüj (Biosan)
- 4°C buzdolabı (Beko)
- -20°C soğutucu (Regal®)
- -80°C soğutucu (New Brunswick U570)
- Spektrofotometre (Thermo Scientific NanoDrop 2000)
- Otomatik mikropipetler
- Vorteks karıştırıcı
- Kuru ısı bloğu
- Rotatör

### 3.10.2 Kullanılan Kimyasallar ve Gereçler

- DNA izolasyon kiti (Roche Diagnostics High Pure PCR Template Preparation Kit)
- Yeni nesil dizileme kiti (Celemics Primary Immunodeficiencies Kit)
- KAPA kütüphane amplifikasyon karışımı (Roche Molecular Systems, Pleasanton, Kaliforniya, ABD)
- İzopropanol
- %80'lik etanol
- PZR kartuşu
- Steril, filtreli pipet uçları
- Filtre tüpü
- Toplama tüpleri
- Eppendorf tüpleri
- ddH<sub>2</sub>O, nükleaz içermeyen saf, steril su

### 3.10.3 DNA İzolasyonu

Periferik kandan DNA izolasyonu, High Pure PZR Template Preparation Kit (Tablo 3.1) (Roche, ABD) ticari kiti kullanılarak aşağıdaki protokol ile elde edildi.

1. 200 µl hasta periferik kan numunesi, 200 µl Binding Buffer ve 40 µl proteinaz K; 1,5 ml'lik eppendorf tüplere eklendi. Sonrasında 70 santigrat derecede 10 dakika inkübe edildi.
2. İnkübasyon sonrasında karışıma İzopropanol (100 µl) eklendi. Bu karışım filtrelili tüplere aktarıldı ve 1 dk boyunca 8000 g'de santrifüje tabi tutuldu.
3. Santrifüjü takiben, tüplerin alt kısmı yavaşça boşaltıldı. Her tüpe "Inhibitor Removal Buffer" (500 µl) eklenip 8000 g'de 1 dk. santrifüje tabi tutuldu. Bu aşama 2 kez tekrarlandı.
4. Santrifüjü takiben tüplerin alt kısmı boşaltıldı, sonrasında 500 µl Wash Buffer eklenen tüpler 8000 g'de 1 dk. Santrifüje tabi tutuldu ve tüplerin alt kısmı boşaltıldı.
5. 13000 g'de 10 sn. santrifüje tabi tutuldu ve tüplerin alt kısmı boşaltıldı.
6. Geriye kalan filtreler yeni tüplere aktarılarak üzerlerine Elution Buffer (200 µl) eklendi ve 8000 g'de 1 dk. Santrifüje tabi tutularak nihai DNA, tüplerin alt kısmında elde edildi. İzole edilen DNA örneklerinin miktar ve saflık tayini, NanoDrop ND-2000c spektrofotometrede ölçülerek yapıldı.

<b>Kit İçeriği</b>	<b>Kullanılan Miktar (Her Bir Örnek İçin)</b>
Yıkama tamponu	1000 µl
Proteinaz K	40 µl
Bağlama tamponu	200 µl
İnhibitör uzaklaştırma tamponu	500 µl
Lizis tamponu	200 µl
Elüsyon tamponu	200 µl

Tablo 3.1: DNA İzolasyon Kiti İçeriği

#### 3.10.4 Yeni Nesil DNA Dizi Analizi

##### *DNA Fragmentasyonu*

Nükleik asit saflık oranları yeterli görülen DNA'dan 8 µL alınarak üzerine, 1 µL dsDNA fragmentaz (Celemics, Seul, Güney Kore) ve 1 µL fragmentaz tamponu (Celemics, Seul, Güney Kore) eklendi. 37°C'da 25 dakika inkübe edildi.

##### *Saflaştırma*

Celemics DNA saflaştırma boncukları (Celemics, Seul, Güney Kore) ile fragmente edilen DNA 1.8:1 oranında 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne konuldu. Vorteks ve spin edildikten sonra 5 dakika oda ısısında inkübe edildi. Tüpler manyetik ayrıştırıcıya alındı ve 5 dakika bekletildi. Manyetik ayrıştırıcıdaki tüplerden süpernatant alınarak atıldı. Tüplere 500µL %80'lik etanol eklendi. 30 saniye oda ısısında inkübasyon sonrası süpernatant atıldı. Etanol yıkaması (önceki iki basamak) tekrar edildi. Spin edildi ve etanolün kalanı atıldı. 2 dakika boyunca oda ısısında bekletildi. 37 µL nükleaz içermeyen saf su eklendi. Tüpler manyetik ayrıştırıcıdan alındı vorteks ve spin sonrasında oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edildi. Tüpler tekrar manyetik ayrıştırıcıya yerleştirildi ve 2 dakika bekletildi. Süpernatant çekilerek PZR tüpüne alındı.

##### *Uç Tamiri ve A-Tailing*

5 µl 10x ERA tampon (Celemics, Seul, Güney Kore) ve 35 µl saflaştırılmış DNA PZR tüpüne alındı. 10µL 5x ER/A-Tailing enzim karışımı (Celemics, Seul, Güney Kore) tüplere eklendi. Tüpler spin edildi ve 4°C'deki termal cyclus alındı ve 4 derecede 1 dakika, 20 derecede

30 dakika ve 65 derecede 30 dk'dan oluşan bir döngü uygulandı. PZR bittiğinde tüpler buz tamponu üzerine alındı.

### *Adaptör Ligasyonu*

10 µL Adaptör (Celemics, Seul, Güney Kore), PZR tüplerindeki uç tamiri ve A-tailing yapılmış DNA üzerine eklendi. 40 µL ligasyon reaksiyon karışımı (Celemics, Seul, Güney Kore) eklendi. 20°C'de 15 dakika boyunca inkübe edildi. 3 µL USER enzimi (Celemics, Seul, Güney Kore) eklendi. 15 dakika boyunca 37°C'de inkübe edildi.

### *Saflaştırma*

Adaptör ligasyonu yapılan DNA üzerine 100 µL Celemics DNA saflaştırma boncukları (Celemics, Seul, Güney Kore) eklendi. Vorteks ve spin sonrasında 5 dakika oda ısısında inkübe edildi. Tüpler manyetik ayrıştırıcıya alındı ve 5 dakika bekletildi. Manyetik ayrıştırıcıdaki tüplerden süpernatant atıldı. Tüplere 500µL %80'lik etanol eklendi. 30 saniye oda ısısında inkübasyon sonrası süpernatant atıldı. Etanol yıkaması (önceki iki basamak) tekrar edildi. Spin yapıldı ve etanolün kalanı atıldı. 2 dakika oda ısısında bekletildi. 32 µL nükleaz içermeyen saf su eklendi. Tüpler manyetik ayrıştırıcıdan alındı vorteks ve spin sonrasında oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edildi. Tüpler manyetik ayrıştırıcıya yerleştirildi ve 2 dakika bekletildi. Süpernatant çekilerek PZR tüplerine alındı.

### *Amplifikasyon*

15 µL Adaptör ligasyonu yapılmış DNA üzerine, 5 µL PZR İndeks Primer (Celemics, Seul, Güney Kore) ve 30 µL Master karışımı (Celemics, Seul, Güney Kore) eklendi ve spin edildi. PZR tüpleri PZR cihazına (Thermo Fisher Scientific, SimpliAmp Thermal Cycler) yerleştirildi ve Tablo 3.2'deki protokol uygulanarak amplifikasyon yapıldı.

İşlem	Sıcaklık °C	Süre	Döngü sayısı	Analiz modu
Denatürasyon	98	45 sn	1	Polimeraz aktivasyonu
Amplifikasyon	98	15 sn	10	Denatürasyon
	65	30 sn		Bağlanma
	72	60 sn		Uzama
Erime Eğrisi	72	10 dk	1	Özgüllük kontrolü
Soğutma	4	1 dk	1	

Tablo 3.2 : Amplifikasyon PZR Protokolü

### *Saflaştırma*

Amplifiye edilen DNA'dan 50 µL 1.5 mL'lik tüpe alındı ve üzerine 50 µL Celeemics DNA saflaştırma boncukları (Celeemics, Seul, Güney Kore) eklendi. Vorteks ve spin sonrasında 5 dakika oda ısısında inkübe edildi. Tüpler manyetik ayrıştırıcıya alındı ve 5 dakika bekletildi. Manyetik ayrıştırıcıdaki tüplerden süpernatant atıldı. Tüplere 500µL %80'lik etanol eklendi. 30 saniye oda ısısında inkübasyon sonrası süpernatant atıldı. Etanol yıkaması (önceki iki basamak) tekrar edildi. Spin yapıldı ve etanolün kalanı atıldı. 2 dakika oda ısısında bekletildi. 32 µL nükleaz içermeyen saf su eklendi. Tüpler manyetik ayrıştırıcıdan alındı vorteks ve spin sonrasında oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edildi. Tüpler manyetik ayrıştırıcıya yerleştirildi ve 2 dakika bekletildi. Süpernatant çekilerek PZR tüplerine alındı.

### *DNA Saflık Kontrolü*

Saflaştırma işleminden sonra DNA'nın kalitesi Thermo Scientific Nanodrop 2000 Spektrofotometre (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Amerika Birleşik Devletleri) cihazı ile değerlendirildi. 260/280 ve 260/230 nm nükleik asit saflık oranları normal sınırlarda saptandı (sırasıyla 1.7-2.0 ve 2.0-2.2). Bahsedilen saflık kontrol oran parametreleri dâhilinde olmayan örnekler elimine edilerek, sözkonusu hastalardaki DNA izolasyonu baştan itibaren tekrarlandı.

### *Hibridizasyon ve Yıkama*

Her bir kolonda 8 kuyucuk bulunan PZR kartuşunun ilk kolonundaki her bir kuyucuğa 5.6 µL Block karışımı (Celemics, Seul, Güney Kore) eklendi. Block karışımı eklene kuyucuklara hazırlık basamakları tamamlanan ve kalite kontrolden geçen DNA'dan 3.4 µL eklendi ve pipetaj yapıldı. PZR kartuşu kapatıldı ve santrifüj edildi. Termal döngü cihazına konuldu ve 95°C sıcaklıkta 5 dakika bekletildikten sonra 65°C'ye getirildi. PZR kartuşunun ikinci kolonunun her bir kuyucuğa 65°C'de 5 dakika bekletilmiş Hibridizasyon Tamponundan (Celemics, Seul, Güney Kore) 25 µL eklendi. Kartuşun kapağı kapatılarak 65°C'de 5 dakika inkübe edildi. PZR kartuşunun ikinci kolonunun her bir kuyucuğa 7 µL Capture kütüphane karışımı (Celemics, Seul, Güney Kore) eklendi. Kartuşun kapağı kapatılarak 65°C'de 2 dakika inkübe edildi. Kartuşun ikinci kolonundaki Hibridizasyon Tamponundan 16'şar µL çekilerek üçüncü kolondaki kuyucuklara eklendi ve pipetaj yapıldı. PZR kartuşunun birinci kolonundaki DNA'dan 9'ar µL çekilerek üçüncü kolondaki kuyucuklara eklendi ve pipetaj yapıldı. Kartuşun kapağı kapatılarak 65°C'de 24 saat inkübe edildi.

### *Streptavidin Boncuk Solüsyonunun Hazırlanması*

1,5 mL'lik tüpe 50 µL streptavidin boncuk (Celemics, Seul, Güney Kore) eklendi. Tüpe, 200 µL yıkama tamponu -1 (Celemics, Seul, Güney Kore) eklendi. Vortekslenildikten sonra tüp manyetik ayırıştırıcıya konuldu ve süpernatant atıldı. Önceki iki basamak işlem iki kez tekrar edildi. Tüpe, 200 µL yıkama tamponu -1 eklenerek 250 µL'ye tamamlandı.

### *Target Captured Kütüphanenin Seçilmesi*

Hibridizasyon basamağından elde edilen DNA'yı içeren karışım 65°C'ye getirildi ve hazırlanan 250 µL streptavidin boncuk solüsyonu içeren 1,5 mL'lik tüplerin üzerine eklendi. Elde edilen solüsyon 30 dakika rotatörde karıştırıldı ve sonrasında spin edildi. Tüpler, manyetik ayırıştırıcıya konuldu ve süpernatant atıldı. Manyetik ayırıştırıcıdan alınan tüplere 500 µL yıkama tamponu -2 (Celemics, Seul, Güney Kore) eklendi. Vortekslenildikten sonra spin edildi. 15 dakika

boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi. Tüpler, manyetik ayrıştırıcıya konuldu ve süpernatant atıldı. 500 µL 70°C'ye ısıtılmış yıkama tamponu -3 (Celemics, Seul, Güney Kore) eklendi. Vortekslendi ve spin edildi. 10 dakika boyunca 70°C'deki ısı bloğunda inkübe edildi. Tüpler, manyetik ayrıştırıcıya konuldu ve süpernatant atıldı. Yıkama tamponu -3 ile yıkama işlemi (önceki dört basamak) üç kez tekrarlandı. Tüplere 30 µL nükleaz içermeyen saf su eklendi. Vortekslendi ve spin edildi.

### *Captured Kütüphanenin Amplifikasyonu*

0.2 mL'lik PZR tüpüne 15 µL On-beads Captured DNA, 5 µL nükleaz içermeyen saf su, 2.5 µL Capture sonrası PZR forward primeri (Celemics, Seul, Güney Kore), 2.5 µL Capture sonrası PZR reverse primeri (Celemics, Seul, Güney Kore), ve 25 µL KAPA kütüphane amplifikasyon karışımı (Roche Molecular Systems, Pleasanton, Kaliforniya, ABD) eklendi. PZR tüpleri PZR cihazına (SimpliAmp Thermal Cycler, Thermo Fisher Scientific Waltham, Massachusetts, ABD) yerleştirildi ve amplifikasyon yapıldı.

### *Saflaştırma*

Amplifiye edilen DNA'dan 50 µL 1.5 mL'lik tüpe alındı ve üzerine 90 µL Celemics DNA saflaştırma boncukları (Celemics, Seul, Güney Kore) eklendi. Vorteks ve spin sonrasında 5 dakika oda ısısında inkübe edildi. Tüpler manyetik ayrıştırıcıya alındı ve 5 dakika bekletildi. Manyetik ayrıştırıcıdaki tüplerden süpernatant atıldı. Tüplere 500µL %80'lik etanol eklendi. 30 saniye oda ısısında inkübasyon sonrası süpernatant atıldı. Etanol yıkaması (önceki iki basamak) tekrar edildi. Spin yapıldı ve etanolün kalanı atıldı. 2 dakika oda ısısında bekletildi. 32 µL nükleaz içermeyen saf su eklendi. Tüpler manyetik ayrıştırıcıdan alındı vorteks ve spin sonrasında oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edildi. Tüpler manyetik ayrıştırıcıya yerleştirildi ve 2 dakika bekletildi. Süpernatant çekilerek PZR tüplerine alındı.

### *DNA Saflık Kontrolü*

Saflaştırma işleminden sonra DNA'nın kalitesi Thermo Scientific Nanodrop 2000 Spektrofotometre (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, ABD) cihazı ile değerlendirildi. 260/280 ve 260/230 nm nükleik asit saflık oranları normal sınırlarda saptandı (sırasıyla 1.7-2.0 ve 2.0-2.2).

### *Kütüphanenin Dizilenmesi*

Kalite kontrolü yapılan amplifiye edilmiş kütüphane, köprü PZR tabanlı yeni nesil dizileme yöntemiyle çalışan Illumina Miniseq Platformu (Illumina, San Diego, Kaliforniya, ABD)'na yüklendi. Dizileme esnasında ortaya çıkan optik görüntülerden dönüştürülen FASTQ formatındaki veri setleri elde edildi.

#### 3.11 Veri Analizi

FASTQ formatındaki veri setlerine GRCh37(h19) referans genomu üzerinden SEQ (Genomize, İstanbul, Türkiye) platformu kullanılarak hizalama yapıldı. Bu işlem sonrasında elde edilen BAM formatındaki dizi verileri Integrative Genomics Viewer (IGV) 2.8.6 programı kullanılarak değerlendirildi. Okumaların, genlerin tüm ekzonlarını ve ekzon-intron bileşkelerini x20 okuma derinliğinde kapladığı kontrol edilerek doğrulandı. Referans genomdan farklı olan varyantlar IGV 2.8.6. programı üzerinden kontrol edilerek doğrulandı. Germline değişimler için allel fraksiyonu %35-65 arası olan varyantlar heterozigot, >%65 olan varyantlar homozigot olarak kabul edildi. Tespit edilen varyantlar, İnsan Genom Varyasyon Cemiyeti (HGVS) Dizi Varyantı Adlandırma kurallarına uygun olarak isimlendirildi.

#### 3.12 Varyant Sınıflandırma

Belirlenen varyantların popülasyon frekansları, gnomAD (Karczewski vd., 2020), TOPMed Bravo, GME Variome (Scott vd., 2016) popülasyon veritabanları üzerinden

değerlendirildi. Ayrıca Clinvar ve COSMIC veritabanlarından tespit edilen varyantlar ile ilgili daha önceden bildirilmiş klinik bilgiler tarandı. Bu veri tabanlarında herhangi bir klinik veri bulunmayan varyantlar için olası klinik ve/veya fonksiyonel yayınlar açısından varyanta özel literatür taraması yapıldı. Ayrıca, tespit edilen varyantlar in-siliko analiz algoritmalarında değerlendirildi. Missense değişimler için: SIFT (Sim vd., 2012), PolyPhen2 (Adzhubei vd., 2010), FATHMM (Shibab vd., 2013), DANN (Quang vd., 2015), REVEL (Ioannidis vd., 2016); splicing varyantları için SpliceAI (Jaganathan vd., 2019), ve dbScSNV (Jian ve Liu, 2017) kullanıldı. Elde edilen veriler eşliğinde tespit edilen varyantlar, Amerikan Tıbbi Genetik ve Genomik Topluluğu (ACMG) tarafından belirlenen standartlara (Richards vd., 2015) uygun şekilde “benign”, “muhtemel benign”, “önemi bilinmeyen varyant”, “muhtemel patojenik” veya “patojenik” olarak sınıflandırıldı.

### 3.13 Sanger Sekanslama

#### 3.13.1 PZR Protokolü

3.10.3’te belirtilen protokole göre izole edilen hasta DNA’sından 1 mikrolitre alınarak, üzerine:

- 6 mikrolitre PCR Master Mix (AmpliTaq Gold, Applied Biosystems)
- 1 mikrolitre distile su
- 1 mikrolitre Enhancer (TuneUp Solution, Nanohelix)
- 1 mikrolitre bölgeye özgün kullanılacak PCR primerleri eklenerek;95 santigrad

derece x 10 dakika PZR protokolüne tabi tutuldu. Elde, 35 döngü boyunca, 95 santigrad derece x 40 saniye, 60 santigrad derece x 1 dakika ve 72 santigrad derece x 50 saniyelik PZR protokolüne tabi tutuldu. Bu 3 aşamadan oluşan 35 döngü bittiğinde, elde, 72 santigrad derecede 7 dakika daha bekletildi.

#### 3.13.2 ExoSAP Protokolü

PZR protokolü sonrası elde edilen karışıma, 2 mikrolitre ExoSAP (Nanohelix ExoSAP solution) karışımı eklenmiştir. Bu karışım, exoSAP eklendikten sonra, 37 santigrad derece x 30 dk ve 80 santigrad derece x 15 dakikalık PZR protokolüne tabi tutulmuştur. Nihai elde 4 derecede kullanılana değin saklanabilme özelliğine sahiptir.

### 3.13.3 Sekans Protokolü

Elde edilen PCR ürününden 2 mikrolitre alınarak, üzerine

- 2 mikrolitre distile su eklendi
- 2 mikrolitre 5x Boya (Applied Biosystems) eklendi
- 2 mikrolitre 1x dilution buffer (Applied Biosystems) eklendi
- 1 mikrolitre Big Dye (Nanohelix) eklendi.
- 1 mikrolitre Bright Dye (Nanohelix) eklendi
- 1 mikrolitre kullanılacak ve bölgeye özgü sekans primerleri eklendi

Bu karışım sırasıyla; 95 santigrad derece x1 dakika, 96 santigrad derece x 10 saniye, 50 santigrad derece x 5 saniye ve 60 santigrad derece x 4 dakika süren PZR protokolüne tabi tutuldu. Bu karışım nihai haliyle bir sonraki basamak yapılarına değin +4 derecede saklanabilmektedir.

### 3.13.4 Saflaştırma Protokolü

Sekans PZR protokolü biten karışımların üzerine, 180 mikrolitre Sequencing Binding Buffer (Zymo Research) eklendi

Örnekler filtreli atık tüplerine aktarıldı ve bu tüpler içerisinde iken 10000 rpm X 1 dakika santrifüje tabi tutuldu

Filtredeki kısım alınıp, başka bir koleksiyon tüpüne aktarıldıktan sonra, üzerine 180 mikrolitre “Sequencing Wash Buffer” (ZymoResearch) eklendi. Bu haldeyken 2 kez 10000 rpm X 1 dk’lık santrifüjlere tabi tutuldu.

Daha sonra filtre kolonu alınarak, 1.5 mL'lik ependorflara yerleştirildi. Bunu takiben üzerlerine 25 mikrolitre distile su eklendi. Bu halde tekrar 10000 rpm X 1 dakika santrifüje edildi.

Nihayetinde ependorfta kalan kısım alınarak, 3130x1 kapiller elektroforez cihazı (Applied Biosystems, Hitachi) cihaz plate düzlemi üzerine aktarılarak, cihaz talimatlarına göre performe edilen kapiller elektroforez süreci yürütüldü.

## 4. BULGULAR

Bulgular, 2 grupta özetlenmiştir.

Grup 1: Hastaların tamamı (Kohort)

Grup 2: Saptanan varyantlarla genotip fenotip ilişkisi kurulmaya çalışılan hastalar (Araştırma)

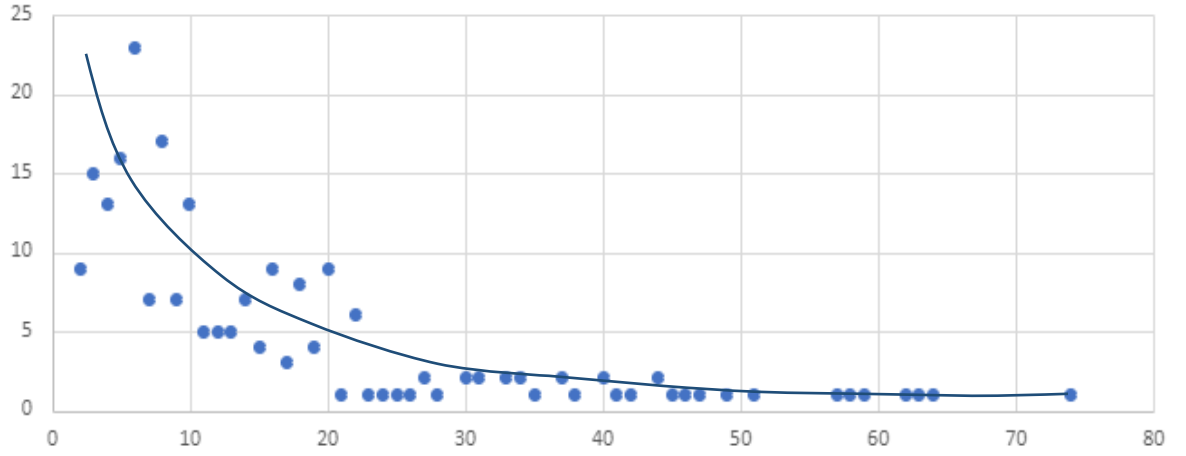
### 4.1 Kohort Grubu

Kohort grubu, immün yetmezlik saptanması nedeniyle tarafımıza yönlendirilen 224 hastadan oluşmaktadır.

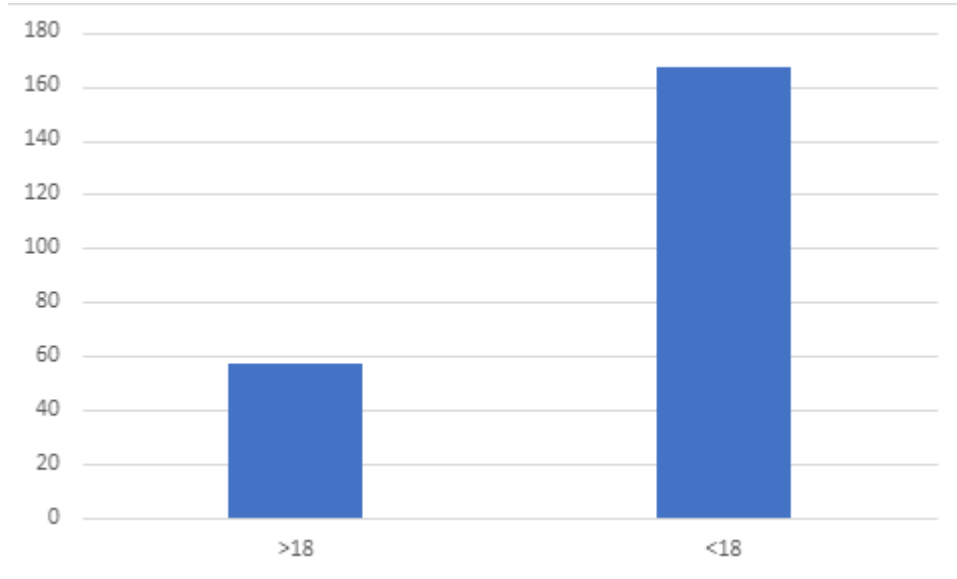
#### 4.1.1 Yaş

Hasta yaşları 2-74 arasında olup (Şekil 4.1) , ortalama yaş 14,7 olarak hesaplandı. En sık başvuru yaşı 6, hasta yaşlarının standart sapma değeri ise 13.7 idi. Hastaların 167 tanesi 18 yaşın altında idi (74.5%), 57 hasta ise 18 yaş ve üzerinde başvurmuştu (25.5%) (Şekil 4.2).

YAŞ DAĞILIM GRAFİĞİ



Şekil4.1: Hasta yaş dağılım grafiği. X eksenini hasta yaşlarını, Y eksenini ise hasta sayısını göstermektedir. Bu grafikten de anlaşıldığı gibi, genç yaşta başvurular, ileri yaşlara göre belirgin olarak daha fazladır.



Şekil4.2:Hastaların 167 tanesi 18 yaşın altında idi (74.5%), 57 hasta ise 18 yaş ve üzerinde başvurmuştu (25.5%)

GEN (>18 YAŞ)	SAYI	GEN (<18 YAŞ)	SAYI

DOCK8	16	YOK	39
YOK	11	DOCK8	20
LRBA	10	ATM	19
PRF1	9	LRBA	16
TNFRSF13B	8	TNFRSF13B	12
PRKCD	5	UNC13D	11
NOD2	5	BLM	10
ATM	5	NOD2	9
PGM3	4	CSF3R	8
IL10RB	4	PRKCD	8
CASP10	4	STAT1	8
SERPING1	3	IRAK1	7
IFNGR1	3	NCF1	7
UNC13D	2	PRF1	7
TBX1	2	NBN	6
STAT3	2	SERPING	5
RAG1	2	IL10RA	4
NBN	2	NCF4	4
IRAK1	2	VPS45	4
IL10RA	2	BTK	3
IFNGR2	2	CASP10	3
FOXP3	2	CD3G	3
BLM	2	CYBA	3
ZNF341	1	IRAK4	3
WAS	1	MYD88	3
VPS45	1	PGM3	3
USB1	1	RAG1	3
STXBP2	1	RAG2	3

STX11	1	STXBP2	3
RAG2	1	ZNF341	3
PGM	1	F12	2
NCF2	1	FOXP3	2
NCF1	1	G6PC3	2
MYO88	1	GFI1	2
IRAK4	1	IFNGR2	2
IL7	1	IL10	2
IL2RG	1	NCF2	2
IL10	1	POLD1	2
IKBKG	1	TBX1	2
F12	1	USB1	2
ELANE	1	WAS	2
CSF3R	1	CTLA4	1
BTK	1	ELANE	1
		FAS	1
		HAX1	1
		IFNGR1	1
		IKBKG	1
		IL10RB	1
		IL12B	1
		IL7R	1
		JAGN1	1
		MCM2	1
		STAT3	1
		STX11	1

Tablo 23: 18 yaşın altında ve üstünde başvuran hastalarda saptanan gen değişimlerinin sayıları. Buna göre her iki grupta da en sık DOCK8 gen değişimlerinin raporlanması dikkat

çekicidir. Ek olarak TNFRSF13B ve LRBA varyantları her 2 grupta siktir. ATM gen varyantları 18 yaş altı grupta daha önemli bir miktarda izlenirken, PRF1 varyantları da 18 yaş üzeri grupta, 18 yaş altı gruba göre daha önemli bir oranda izlenmektedir.

#### 4.1.2 Cinsiyet

Kliniğimizde değerlendirilen 224 hastanın 123'ü erkek (55%), 101 tanesi ise kadını (45%) (Şekil4.3)



Şekil4.3: Hastaların cinsiyet dağılım yüzdesi

#### 4.1.3 Başvuru Nedeni

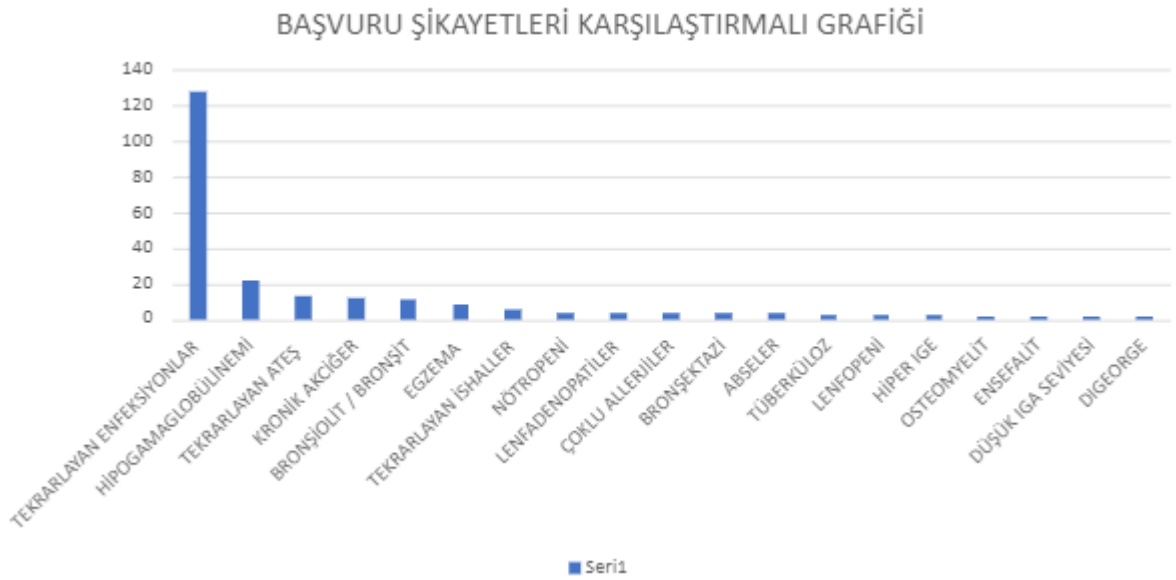
Kliniğimize yönlendirilen hastalar içerisinde, en sık başvuru nedeni tekrarlayan enfeksiyon öyküsü idi (128 hasta, 57,1%). Bunu hipogamaglobülinemi (22 hasta, 9,8%), tekrarlayan ateş (13 hasta, 5,8%), kronik akciğer (12 hasta, 5,3%), ve bronşiolit izledi (11 hasta, 4,9%). (Şekil 4.4, Tablo 4.1)

BAŞVURU NEDENİ	SAYI	YÜZDE
TEKRARLAYAN ENFEKSİYONLAR	128	57.1%

HİPOGAMAGLOBÜLİNEMİ	22	9.8%
TEKRARLAYAN ATEŞ	13	5.8%
KRONİK AKCİĞER	12	5.4%
BRONŞİOLİT / BRONŞİT	11	4.9%
EGZEMA	8	3.6%
TEKRARLAYAN İSHALLER	5	2.2%
NÖTROPENİ	4	1.8%
LENFADENOPATİLER	4	1.8%
ÇOKLU ALLERJİLER	4	1.8%
BRONŞEKTAZİ	4	1.8%
ABSELER	4	1.8%
TÜBERKÜLOZ	3	1.3%
LENFOPENİ	3	1.3%
HİPER IGE	3	1.3%
OSTEOMYELİT	2	0.9%
ENSEFALİT	2	0.9%
DÜŞÜK IGA SEVİYESİ	2	0.9%
DIGEORGE	2	0.9%
UK	1	0.4%
TEKRARLAYAN YUMUŞAK DOKU ENFEKSİYONLARI	1	0.4%
SARI-GRİ RENKLİ SAÇLAR	1	0.4%
PRİMER SİLİYER DİSKİNEZİ	1	0.4%
PNÖMONİ	1	0.4%
NK EKSİKLİĞİ	1	0.4%
LARENJİT	1	0.4%
KRONİK ÖKSÜRÜK	1	0.4%
İKTİYOSİS	1	0.4%

HÜS	1	0.4%
HEREDİTER ANJİOÖDEM	1	0.4%
CROHN HASTALIĞI	1	0.4%
BRONKOJENİK KİST	1	0.4%
BİSİTOPENİ	1	0.4%
ATAKSİ TELENJİEKTAZİ	1	0.4%
ALBİNİZM	1	0.4%
AGAMAGLOBÜLİNEMİ	1	0.4%

Tablo 4.1: Hastaların başvuru nedenleri, sayıları ve yüzdeleri



Şekil4.4: Hastaların başvuru şikâyetlerini görselleştiren grafik. Grafiğin anlaşılabilirliğinin artması için, 2 veya daha fazla kez izlenen başvuru nedenleri dâhil edilmiştir. Bu grafiğe dâhil edilmeyen, ama tablo 19’da listelenen başvuru nedenleri toplamda 1 hastada izlenmiştir.

#### 4.1.4 Genler

Bazı hastalarda birden çok gen değişimi raporlandığından, 224 hastada olası benign, önemi bilinmeyen varyant, olası patojenik ve patojenik sınıflarına dâhil olan toplam 354 varyant raporlandı.

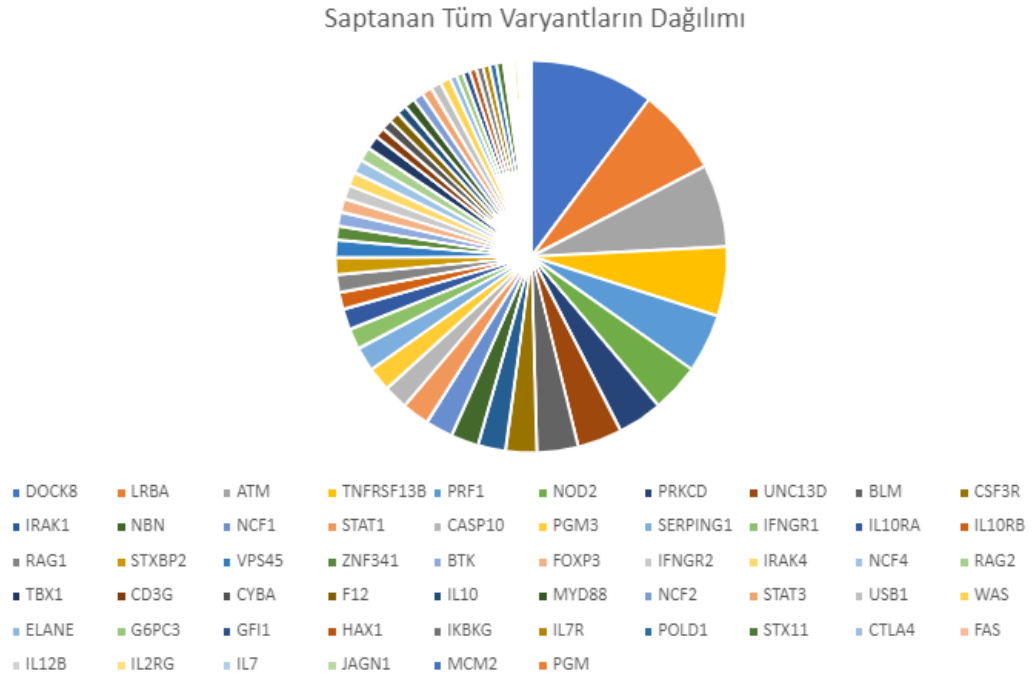
En sık raporlanan gen DOCK8 idi (36 hasta, 10,2%), bunu LRBA (25 hasta, 7.2%), ATM (24 hasta, 6.9%), TNFRSF13B (20 hasta, 5.8%) ve PRF1 (17 hasta, 4.9%) izledi. Saptanan genlerin sayı ve yüzdelerinin tamamı tablo 4.2’de ve şekil 4.5’te özetlenmiştir.

GEN	SAYI	YÜZDE
DOCK8	36	% 10
LRBA	25	% 7
ATM	24	% 7
TNFRSF13B	20	% 6
PRF1	17	% 5
NOD2	14	% 4
PRKCD	13	% 4
UNC13D	13	% 4
BLM	12	% 3
CSF3R	9	% 3
IRAK1	8	% 2
NBN	8	% 2
NCF1	8	% 2
STAT1	8	% 2
CASP10	7	% 2
PGM3	7	% 2
SERPING1	7	% 2
IFNGR1	6	% 2
IL10RA	6	% 2

IL10RB	5	% 1
RAG1	5	% 1
STXBP2	5	% 1
VPS45	5	% 1
ZNF341	4	% 1
BTK	4	% 1
FOXP3	4	% 1
IFNGR2	4	% 1
IRAK4	4	% 1
NCF4	4	% 1
RAG2	4	% 1
TBX1	4	% 1
CD3G	3	<% 1
CYBA	3	<% 1
F12	3	<% 1
IL10	3	<% 1
MYD88	3	<% 1
NCF2	3	<% 1
STAT3	3	<% 1
USB1	3	<% 1
WAS	3	<% 1
ELANE	2	<% 1
G6PC3	2	<% 1
GFI1	2	<% 1
HAX1	2	<% 1
IKBKG	2	<% 1
IL7R	2	<% 1
POLD1	2	<% 1

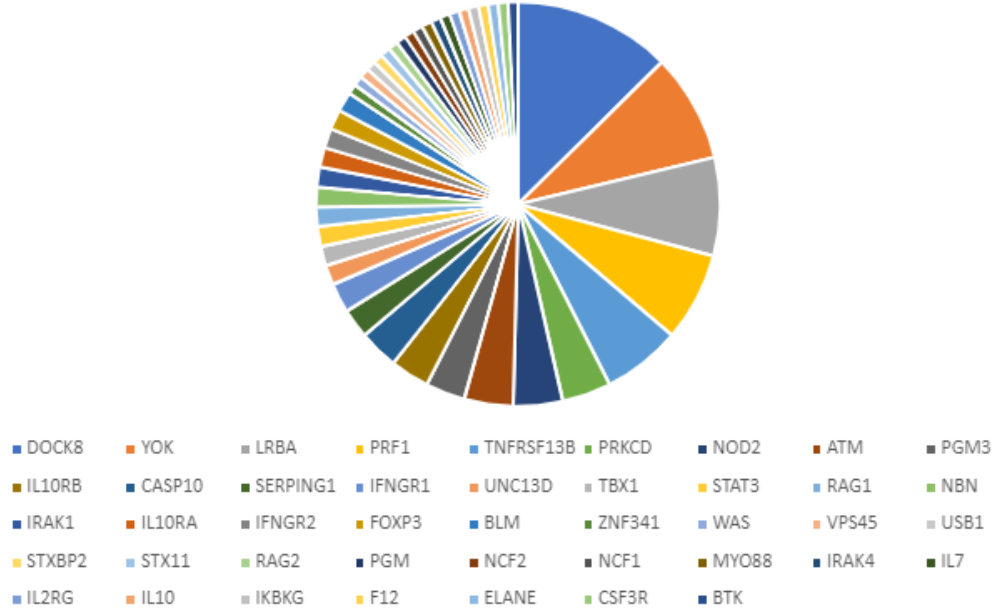
STX11	2	<% 1
CTLA4	1	<% 1
FAS	1	<% 1
IL12B	1	<% 1
IL2RG	1	<% 1
IL7	1	<% 1
JAGN1	1	<% 1
MCM2	1	<% 1
PGM	1	<% 1

Tablo 4.2: Tüm hastalarda saptanan varyantların gen dağılımına ait sayı ve yüzdeler.



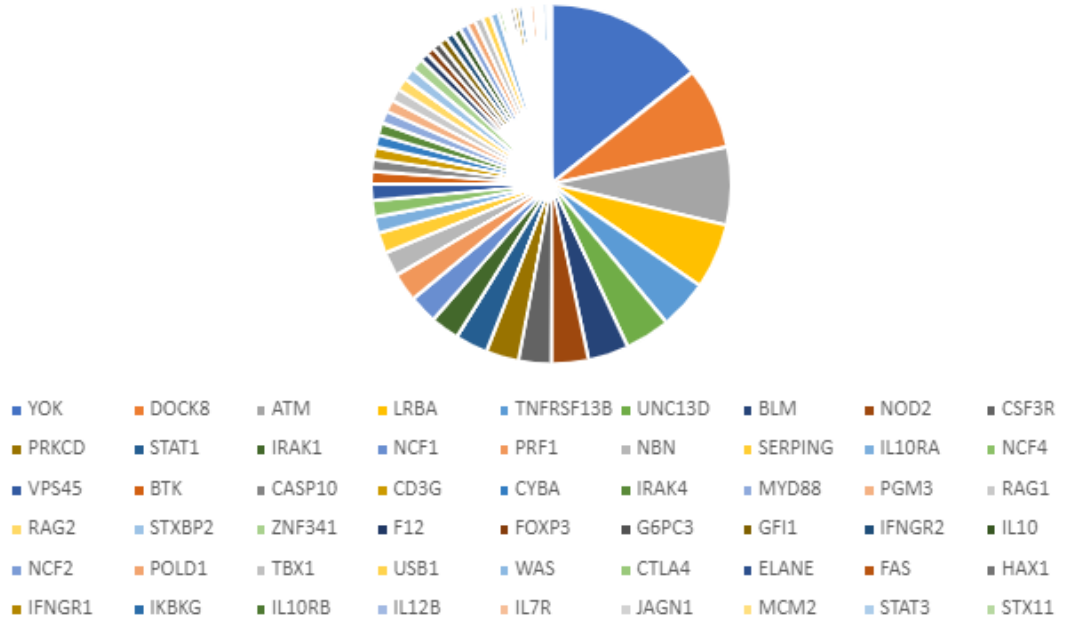
Şekil 4.5: Saptanan varyantların gen dağılımını görselleştiren grafik.

#### <18 YAŞ GEN DAĞILIMI



Şekil 4.6: 18 yaş altındaki hasta grubunda saptanan genlerin dağılımını gösteren grafik.

#### >18 YAŞ GEN DAĞILIMI



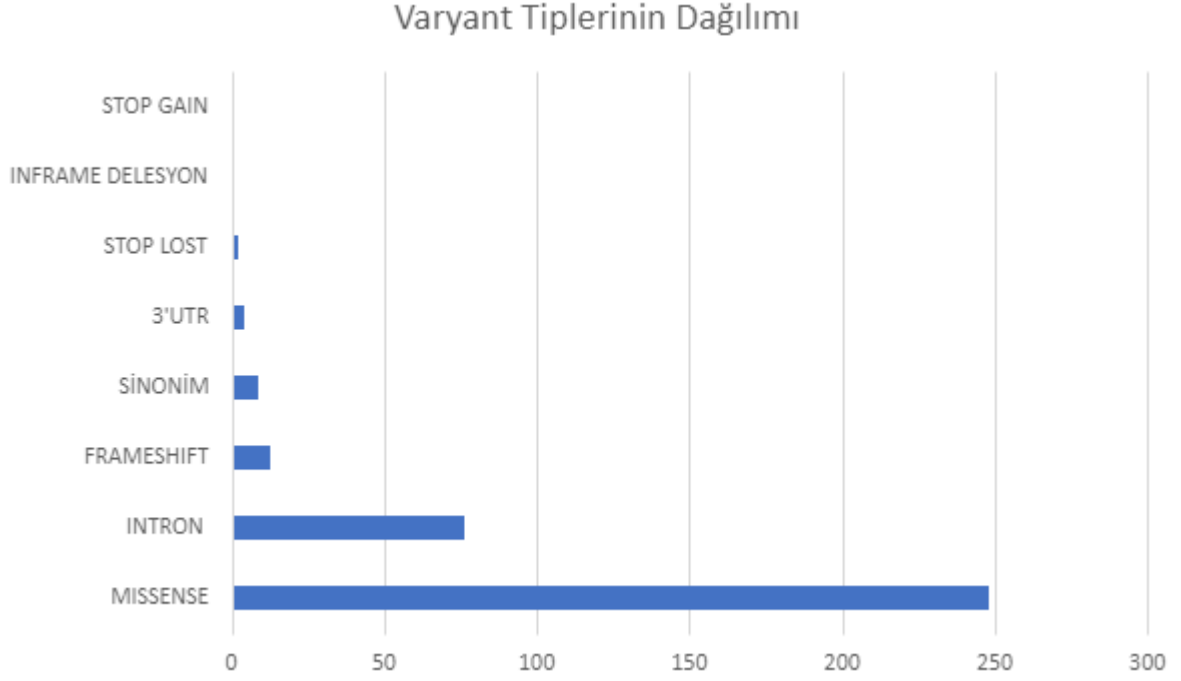
Şekil 4.7: 18 yaş üzerindeki hastaların raporlanan gen dağılımını gösteren grafik.

#### 4.1.5 Varyant Tipleri

Saptanan 354 varyanttan büyük çoğunluğu missense (yanlış anlamlı) varyant idi (248 varyant, 70%). Bunu intronik varyantlar (76 varyant, 21.4%), frameshift varyantlar (13 varyant, 3.6%) ve sinonim değişiklikler izledi (9 varyant, 2.5%). (Tablo 4.3 ve şekil 4.8)

MISSENSE	248	70.0%
INTRON	76	21.4%
FRAMESHIFT	13	3.6%
SİNONİM	9	2.5%
3'UTR	4	1.1%
STOP LOST	2	0.5%
INFRAME DELESYON	1	0.2%
STOP GAIN	1	0.2%

Tablo 4.3: Saptanan varyant tiplerinin sayısı ve yüzdeleri.



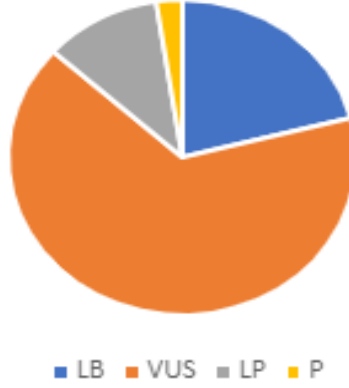
Şekil4.8: Saptanan varyant tiplerinin dağılımını gösteren grafik.

#### *Missense Varyantların İstatistikleri*

PATOJENİTE	Olası Benign	Önemi Bilinmeyen Varyant	Olası Patojenik	Patojenik
SAYI	52	163	27	6
YÜZDE	20.9%	65.7%	10.8%	2.4%

Tablo 4.4: Saptanan missense varyantların patojeniteye göre tasnifleri

## MISSENSE VARYANTLARIN PATOJENİTE DAĞILIMI

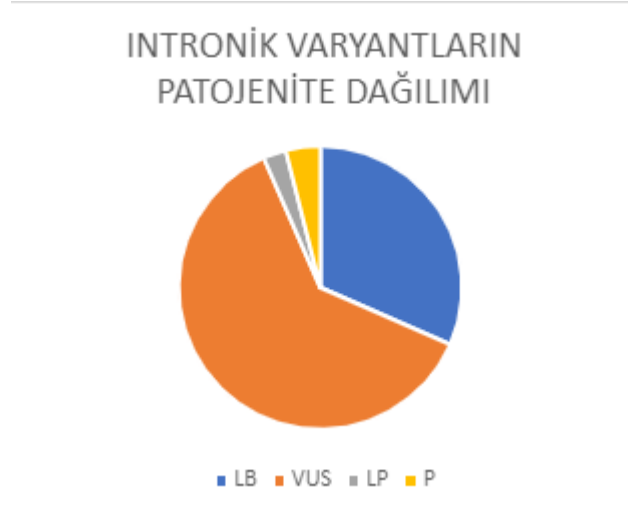


Şekil 4.9: Missense varyantların patojenite dağılım grafiği.

### *Intronik varyantların istatistikleri*

PATOJENİTE	Olası Benign	Önemi Bilinmeyen Varyant	Olası Patojenik	Patojenik
SAYI	24	47	2	3
YÜZDE	31.5%	61.8%	2.6%	3.9%

Tablo 4.5: Intronik varyantların patojeniteye göre tasnifleri.



Şekil 4.10: Intronik varyantların patojenite dağılım grafiği

*Çerçeve Kayması Varyantların İstatistikleri*

PATOJENİTE	Olası Benign	Önemi Bilinmeyen Varyant	Olası Patojenik	Patojenik
SAYI	0	3	4	6
YÜZDE		23%	30%	46%

Tablo 4.6: Çerçeve kayması varyantların patojeniteye göre tasnifleri

**FRAMESHIFT VARYANTLARIN  
PATOJENİTE DAĞILIMI**



Şekil4.11: Çerçeve kayması varyantların patojenite dağılım grafiği

#### *Sinonim Varyantların İstatistikleri*

PATOJENİTE	Olası Benign	Önemi Bilinmeyen Varyant	Olası Patojenik	Patojenik
SAYI	5	5	0	0
YÜZDE	50%	50%		

Tablo 4.7: Sinonim varyantların patojeniteye göre tasnifi.



Şekil 4.12: Sinonim varyantların patojenite dağılım grafiği

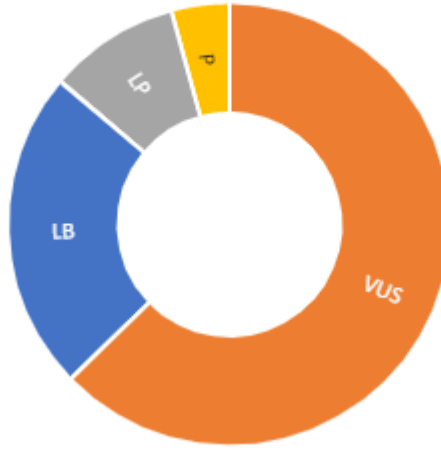
#### 4.1.6 Patojenite

354 varyantın büyük çoğunluğu beklenildiği şekilde önemi bilinmeyen varyant kategorisine dahil edilmişti (222, 62.7%). 2. en sık kategori olası benign olarak izlendi (83, 23.4%). 34 varyant olası patojenik (9.6%), 15 varyant da patojenik olarak sınıflandırıldı (4.2%). (Tablo 4.8ve figür 4.13)

PATOJENİTE	Olası Benign	Önemi Varyant	Bilinmeyen	Olası Patojenik	Patojenik
SAYI	83	222		34	15
YÜZDE	23.4%	62.7%		9.6%	4.2%

Tablo 4.8: Tüm varyantların patojeniteye göre tasnif sayı ve yüzdeleri.

TÜM VARYANTLARDA RAPORLANAN PATOJENİTE DAĞILIMI



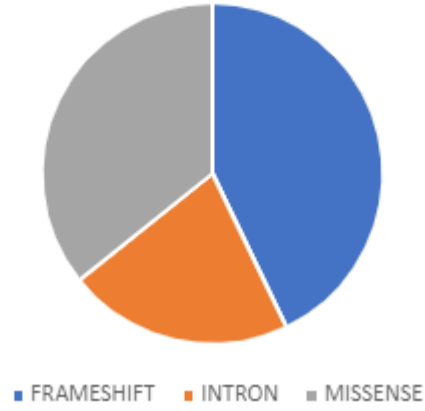
Şekil4.13: Tüm varyantların bütünsel patojenite dağılımını gösteren grafik.

*Patojenik Varyantlar*

	FRAMESHIFT	INTRON	MISSENSE
SAYI	6	3	5
YÜZDE	42.8%	21.4%	35.7%

Tablo 4.9: Patojenik varyantların varyant tiplerine göre istatistikleri

PATOJENİK VARYANTLARIN VARYANT TİPİ  
DAĞILIMI



Şekil 4.14: Patojenik varyantların varyant tipi dağılımı

GEN	SAYI	YÜZDE
TNFRSF13B	8	57,14
SERPING1	2	14,29
NOD2	1	7,14
ATM	1	7,14
LRBA	1	7,14
DOCK8	1	7,14
NOD2	1	7,14

Tablo 4.10: Patojenik varyantların gen dağılımı sayısı ve yüzdeleri



Şekil 4.15: Patojenik varyantların yaş dağılımını gösteren grafik. Buna göre varyantlardan 7 tanesi (53,15%) 18 yaşın altında saptanmışken, 6 tanesi (46,15%) 18 yaştan sonra saptanmıştır.

BAŞVURU NEDENİ	SAYI	YÜZDE
TEKRARLAYAN ENFEKSİYONLAR	8	61,54
BİSİTOPENİ	1	7,69
HEREDİTER ANJİOÖDEM	1	7,69
TEKRARLAYAN ABSELER	1	7,69
TEKRARLAYAN ENFEKSİYONLAR, ÇOKLU ALLERJİ, EGZEMA	1	7,69
UK, TEKRARLAYAN ENFEKSİYONLAR	1	7,69

Tablo 4.11: Patojenik varyant saptanan hastaların başvuru neden sayısı ve yüzdeleri.

#### *Olası Patojenik Varyantlar*

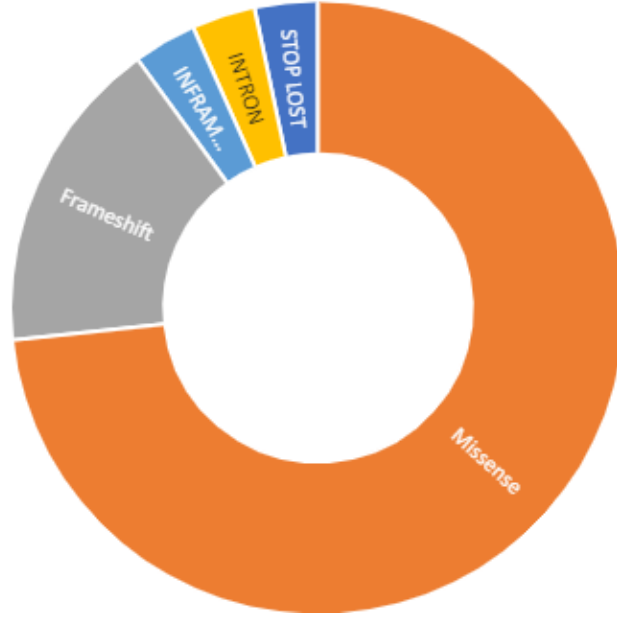


Şekil 4.16: Olası patojenik varyantların yaş dağılımını gösteren grafik. Buna göre bu varyantların 70%i 18 yaşın altında saptanmıştı.

VARYANT TİPİ	SAYI	YÜZDE
Missense	22	73,33
Frameshift	5	16,67
STOP LOST	1	3,33
INTRON	1	3,33
INFRAME DELESYON	1	3,33

Tablo 4.12: Olası patojenik varyantların varyant tipine göre sayı ve yüzdeleri.

## OLASI PATOJENİK VARYANTLARIN VARYANT TİPİ DAĞILIMI



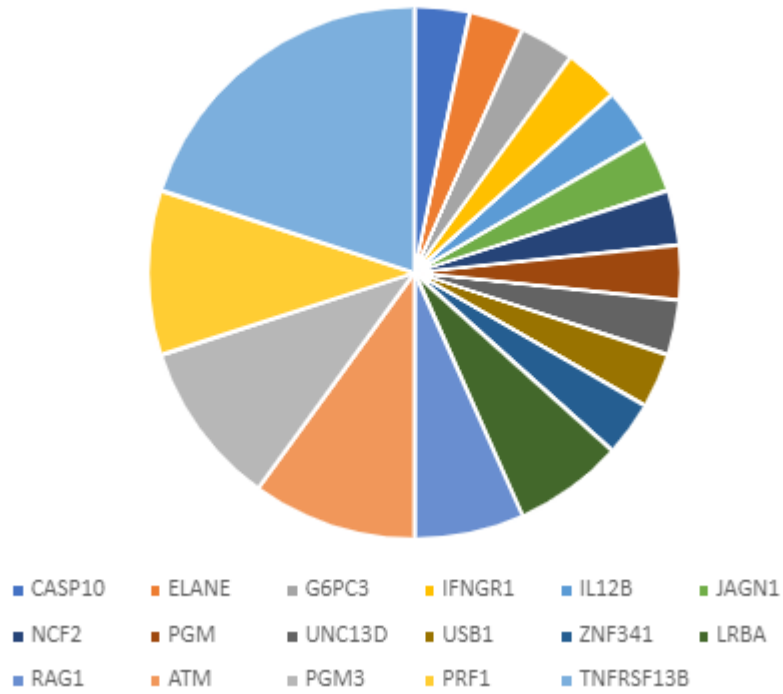
Şekil 4.17: Olası patojenik varyantların varyant klasifikasyonuna göre dağılımları. Patojenik varyantlara göre daha az frameshift izlenirken, ağırlığı missense varyantlar oluşturmaktadır (73.33%).

GEN	SAYI	YÜZDE
TNFRSF13B	6	20,00
ATM	3	10,00
PGM3	3	10,00
PRF1	3	10,00
LRBA	2	6,67
RAG1	2	6,67
CASP10	1	3,33
ELANE	1	3,33
G6PC3	1	3,33
IFNGR1	1	3,33

IL12B	1	3,33
JAGN1	1	3,33
NCF2	1	3,33
PGM	1	3,33
UNC13D	1	3,33
USB1	1	3,33
ZNF341	1	3,33

Tablo 4.13: Olası patojenik varyantların genlere göre dağılımlarına ait sayı ve yüzdeler.

#### OLASI PATOJENİK VARYANTLARIN GEN DAĞILIMI



Şekil 4.18: Olası patojenik varyantların gen dağılımını gösteren grafik. Buna göre olası patojenik varyantların en sık izlendiği gen TNFRSF13B olup, bunu PRF1, PGM3 ve ATM takip etmektedir.

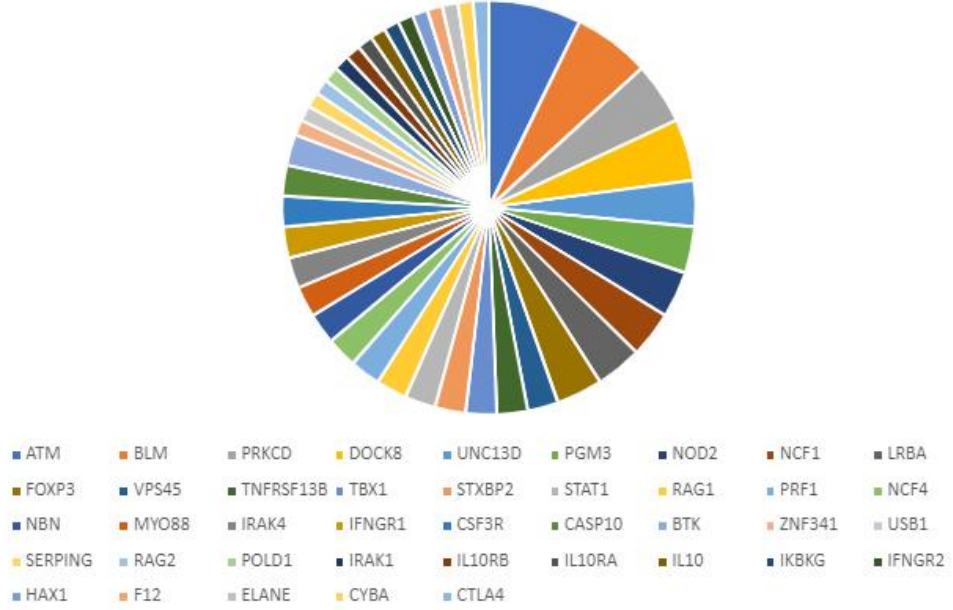
*Olası Benign Varyantlar*

GEN	SAYI	YÜZDE (%)
ATM	6	7,23
BLM	5	6,02
PRKCD	4	4,82
DOCK8	4	4,82
UNC13D	3	3,61
PGM3	3	3,61
NOD2	3	3,61
NCF1	3	3,61
LRBA	3	3,61
FOXP3	3	3,61
VPS45	2	2,41
TNFRSF13B	2	2,41
TBX1	2	2,41
STXBP2	2	2,41
STAT1	2	2,41
RAG1	2	2,41
PRF1	2	2,41
NCF4	2	2,41
NBN	2	2,41
MYO88	2	2,41
IRAK4	2	2,41
IFNGR1	2	2,41
CSF3R	2	2,41
CASP10	2	2,41
BTK	2	2,41

ZNF341	1	1,20
USB1	1	1,20
SERPING	1	1,20
RAG2	1	1,20
POLD1	1	1,20
IRAK1	1	1,20
IL10RB	1	1,20
IL10RA	1	1,20
IL10	1	1,20
IKBKG	1	1,20
IFNGR2	1	1,20
HAX1	1	1,20
F12	1	1,20
ELANE	1	1,20
CYBA	1	1,20
CTLA4	1	1,20

Tablo 4.14: Olası benign varyantların genlere göre dağılım sayısı ve yüzdeleri. Buna göre en sık olası benign varyantın izlendiği gen ATM olup, bunu BLM ve PRKCD takip etmektedir.

#### OLASI BENİNG VARYANLARIN GEN DAĞILIMI

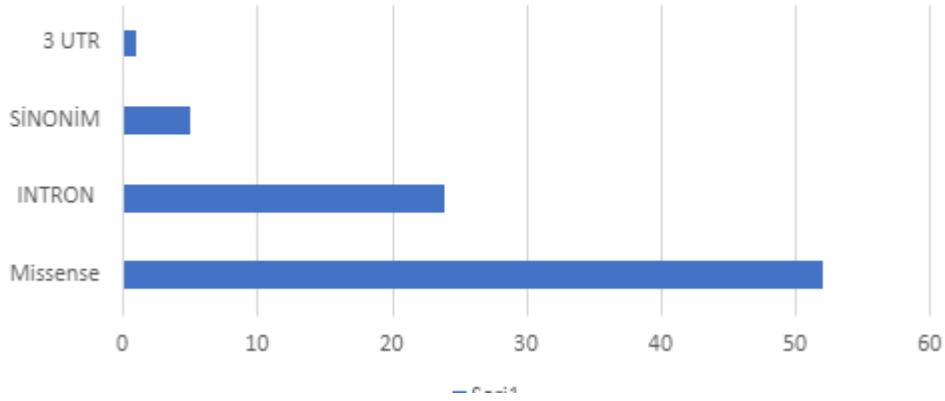


Şekil 4.19: Olası benign varyantların gen dağılımını gösteren grafik.

VARYANT TİPİ	SAYI	YÜZDE
Missense	52	63,41
İntron	24	29,27
Sinonim	5	6,10
3 UTR	1	1,22

Tablo 4.15: Olası benign varyantların varyant tipi dağılımını gösteren grafik. Patojenik ve olası patojenik varyantlara oranla, olası benign varyantlarda beklenildiği üzere intronik varyant oranının belirgin hale (29.27%) geldiğine dikkat edilmelidir.

### OLASI BENİGN VARYANTLARIN VARYANT TİPİ DAĞILIMI



Şekil 4.20: Olası benign varyantların varyant tipine göre dağılımını gösteren grafik.

#### 4.1.7 Genlere Göre İstatistikler

10 defadan fazla izlenen genlerin varyantları için saptanan varyant tipleri ve patojenite ile alakalı istatistikler aşağıdaki gibi gerçekleşmişti. Patojenite itibariyle, TNFRSF13B geninde en sık izlenen varyant sınıfı patojenik, BLM geninde en sık izlenen varyant sınıflandırılması olası patojenik, listedeki geri kalan tüm genlerde ise önemi bilinmeyen varyant olarak gerçekleşmişti (Tablo 4.16)

	LB	VUS	LP	P
DOCK8	4	31	0	1
LRBA	3	19	2	1
ATM	6	13	4	1
TNFRSF13B	2	4	5	9
PRF1	2	12	2	0
NOD2	3	10	0	1
PRKCD	4	9	0	0
UNC13D	3	9	1	0
BLM	0	5	7	0

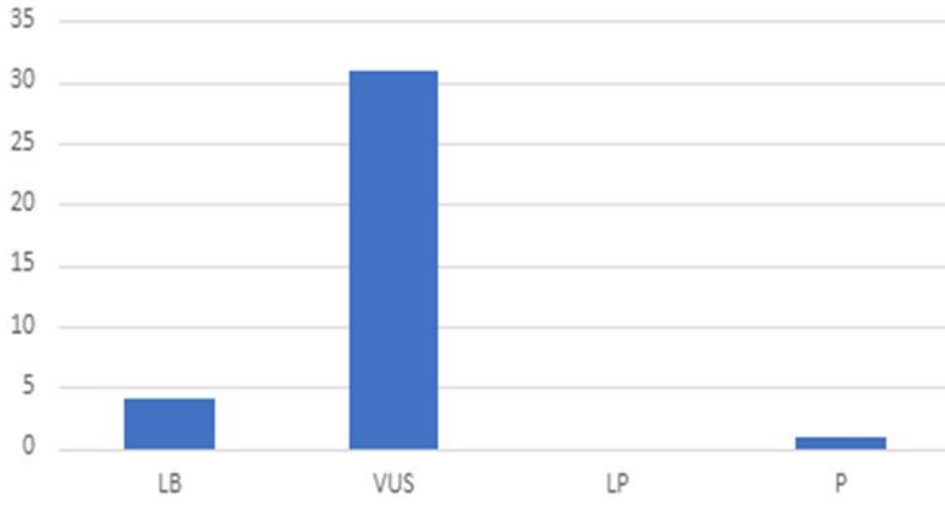
Tablo 4.16: 10 defadan fazla izlenen genlerdeki varyantların dâhil edildiği patojenite sınıfı sayıları.

Bu genlerdeki varyant tipi dağılımı incelendiğinde, PRKCD geninde en sık izlenen değişimin intronik değişimler olduğu, TNFRSF13B geninde ise en sık frameshift varyantların izlendiği not edilmelidir. Bunun dışında kalan genler ise en fazla missense varyantlara sahiplik yapmışlardı.

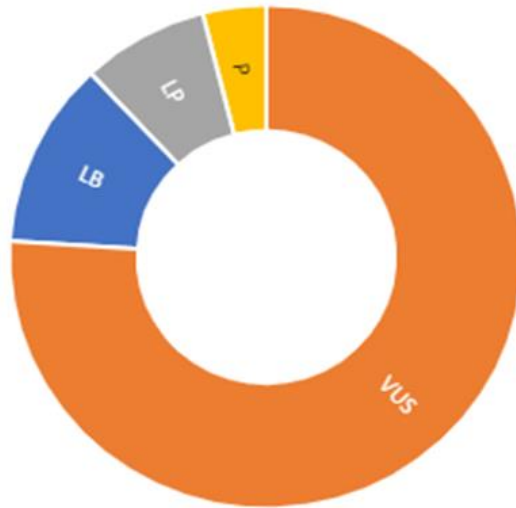
	Missense	Intron	Sinonim	Frameshift	Stop Lost	3'UTR
DOCK8	28	5	3	0	0	0
LRBA	19	6	0	0	0	0
ATM	16	5	1	0	2	0
TNFRSF13B	13	1	0	6	0	0
PRF1	16	0	0	0	0	0
NOD2	10	1	0	2	0	1
PRKCD	4	9	0	0	0	0
UNC13D	10	3	0	0	0	0
BLM	11	1	0	0	0	0

Tablo 4.17: 10 defadan fazla izlenen genlerde saptanan varyant tiplerine dair sayılar.

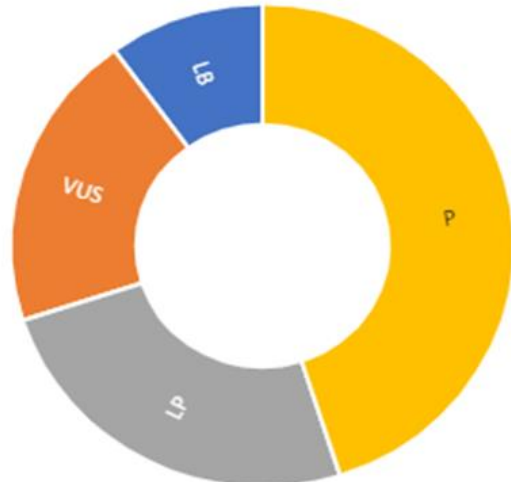
## DOCK8 Varyantlarının Patojenite Dağılımı



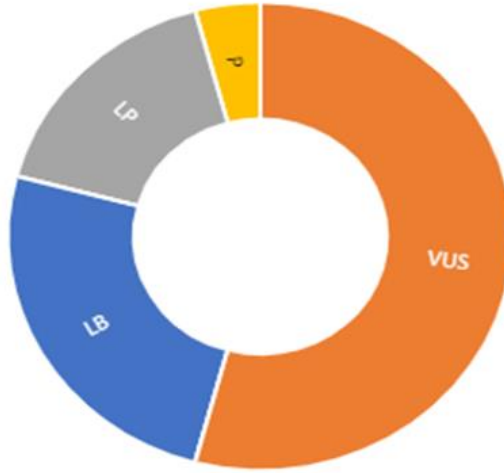
## LRBA PATOJENİTE DAĞILIMI



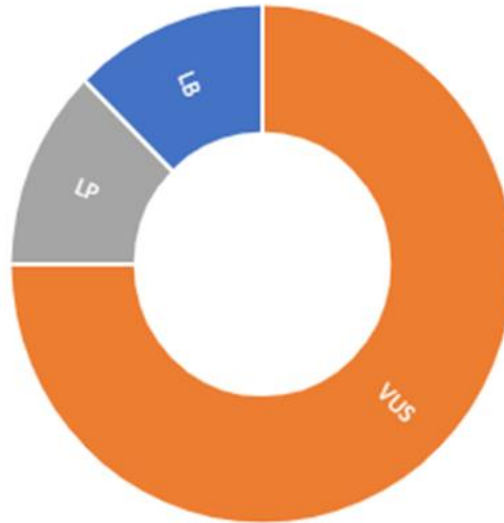
## TNFRSF13B PATOJENİTE DAĞILIMI



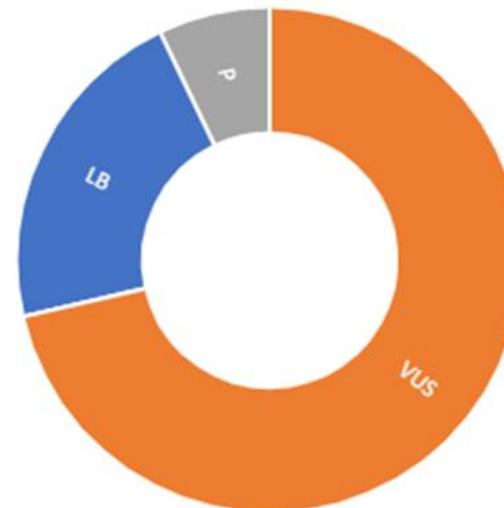
ATM PATOJENİTE DAĞILIMI

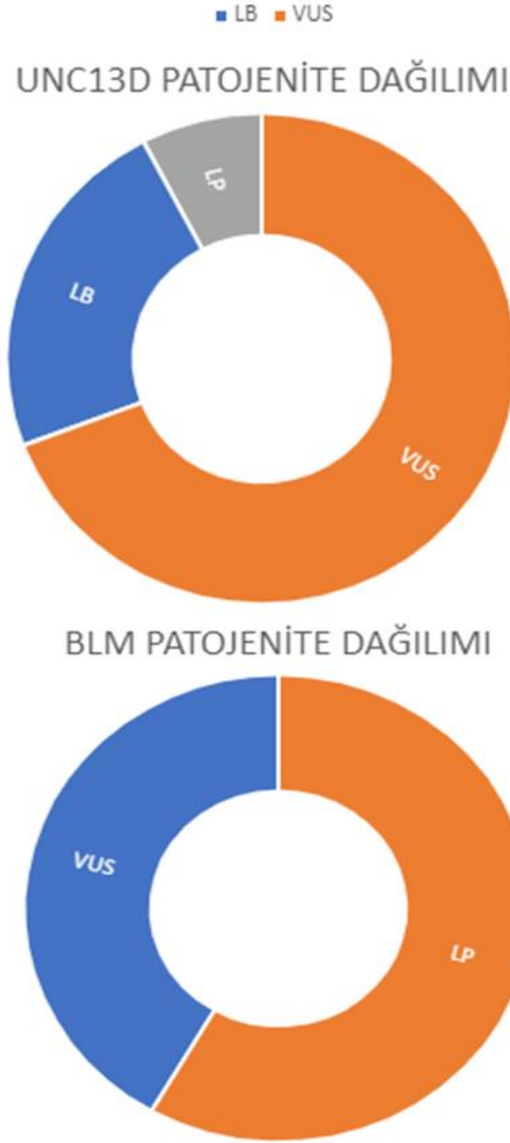


PRF1 PATOJENİTE DAĞILIMI



NOD2 PATOJENİTE DAĞILIMI





Şekil4.21: DOCK8, LRBA, TNFRSF13B, ATM, PRF1, NOD2, UNC13D, ve BLM genlerine ait (10 hastadan fazla kez varyant saptanan genler) varyant dağılımı grafikleri. Buna göre TNFRSF13B geninde en çok saptanan varyant tipi frameshift olmuştur. BLM geninde en sık saptanan varyant tipi muhtemel patojenik iken, sözkonusu genlerin kalanında en sık saptanan varyant tipi VUS olarak gerçekleşmiştir.

#### 4.2 Araştırma Grubu

Araştırma grubundaki hastalar 1-74 yaş arasında olup yaş ortalaması 14.95 idi. Hastaların %37'si (n=17) kadın, %63'ü (n=28) erkekti.

HASTA NO	GEN	YAŞ	CİNSİYET
1.	STAT1	4	E
2.	DOCK8	4	E
3.	PRF1	19	E
4.	CASP10	20	E
5.	WAS	4	E
6.	DOCK8	59	K
7.	NCF2	2	E
8.	UNC13D	1	K
9.	TNFRSF13B	3	K
10.	PRF1	7	K
11.	USB1	14	K
12.	UNC13D	2	E
13.	UNC13D	10	E
14.	ATM	23	K
15.	PGM3	2	E
16.	ATM	13	K
17.	TACI	57	E
18.	BTK	19	E
19.	DOCK8	22	K
20.	TNFRSF13B	17	E
21.	CYBA	16	E
22.	NCF2	51	E
23.	DOCK8	74	E
24.	NCF1	12	K
25.	ATM	2	E
26.	DOCK8	4	E

27.	DOCK8	10	E
28.	FAS	8	E
29.	TNFRSF13B	38	E
30.	CTLA4	6	E
31.	NCF1	3	E
32.	ELANE	2	K
33.	CASP10	8	E
34.	TNFRSF13B	10	E
35.	VPS45	3	E
36.	STAT1	16	K
37.	CASP10	22	E
38.	JAGN1	2	K
39.	DOCK8	35	E
40.	TNFRSF13B	11	K
41.	DOCK8	11	K
42.	LRBA	7	K
43.	PRF1	1	E
44.	NOD2	12	K
45.	TNFRSF13B	14	K
46.	NCF2	6	K

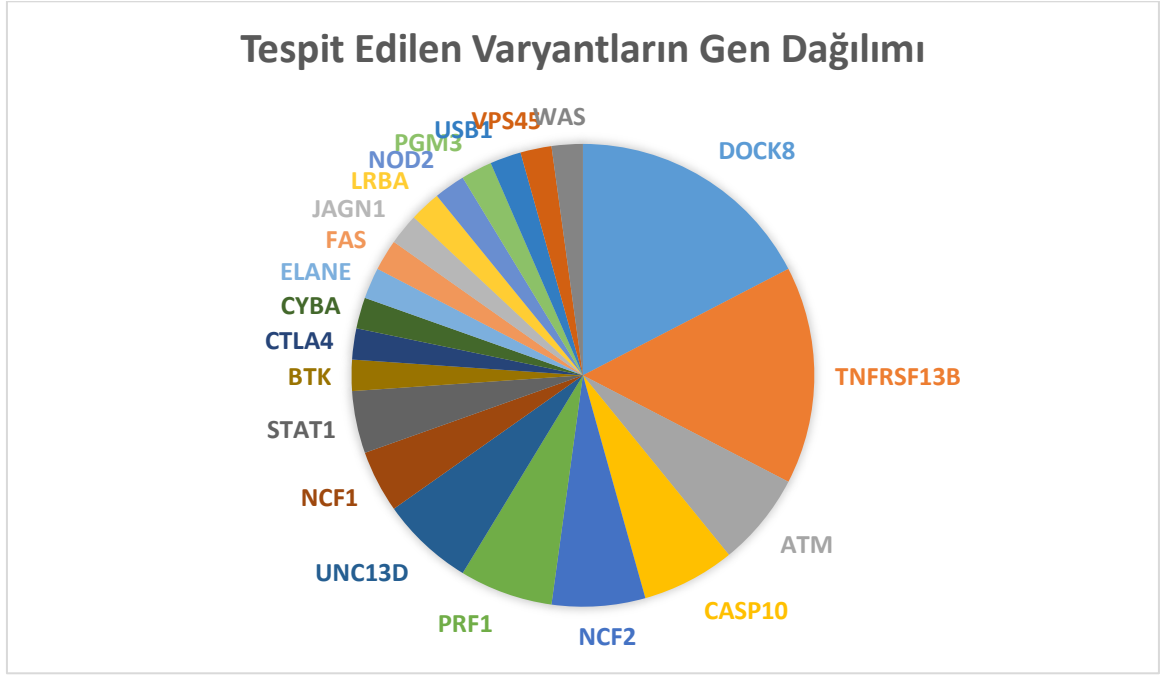
Tablo 4.18: Araştırma grubuna dahil edilen hastaların demografik özellikleri ve analiz edilen varyantların yerleştiği genler.

#### 4.2.1 Tespit Edilen Dizi Analizi Varyantları

HASTA NO	GEN	VARYANT	ALLELİK DURUM
1.	STAT1	c.1341C>A	HET
2.	DOCK8	c.2275G>A	HET
3.	PRF1	c.272C>T	HET
4.	CASP10	c.1466G>A	HET
5.	WAS	c.995T>C	HOM
6.	DOCK8	c.4241+12G>A c.4241+22T>C	HOM
7.	NCF2	c.1081A>T	HET
8.	UNC13D	c.538_541delCTCA	HOM
9.	TNFRSF13B	c.214C>T c.365G>A	HET HET
10.	PRF1	c.1304C>T	HET
11.	USB1	c.503+15C>T	HET
12.	UNC13D	c.3131T>G	HOM
13.	UNC13D	c.811C>T	HET
14.	ATM	c.1970G>C	HOM
15.	PGM3	c.10_18del	HET
16.	ATM	c.9170G>C	HET
17.	TAC1	c.515G>A c.171G>C	HET HET
18.	BTK	c.895-10G>A	HEMİZİGOT
19.	DOCK8	c.1036G>A	HET
20.	TNFRSF13B	c.214C>T	HET
21.	CYBA	c.94C>T	HET

22.	NCF2	c.737G>A	HET
23.	DOCK8	c.3022C>T	HET
24.	NCF1	c.512C>T	HET
25.	ATM	c.8615A>T	HET
26.	DOCK8	c.2007+21T>C	HET
27.	DOCK8	c.3043C>T	HET
28.	FAS	c.125C>A	HET
29.	TNFRSF13B	c.512T>G	HET
30.	CTLA4	c.23G>A	HET
31.	NCF1	c.247G>A	HET
32.	ELANE	c.225_238del	HET
33.	CASP10	c.567_568del	HET
34.	TNFRSF13B	c.310T>C	HET
35.	VPS45	c.1448A>G	HET
36.	STAT1	c.1264-20_1264-18delCTT	HET
37.	CASP10	c.890T>G	HET
38.	JAGN1	c.51T>G	HOM
39.	DOCK8	c.3058A>G c.3774T>G c.3806A>C	HET
40.	TNFRSF13B	c.593G>A	HET
41.	DOCK8	c.2275G>A c.452G>A	HET HET
42.	LRBA	c.349A>G	HET
43.	PRF1	c.74C>T	HOM
44.	NOD2	c.3019dup	HET
45.	TNFRSF13B	c.310T>C	HET
46.	NCF2	c.1193dupA	HOM

Tablo 4.19: Tespit edilen varyantlar ve allelik durumları

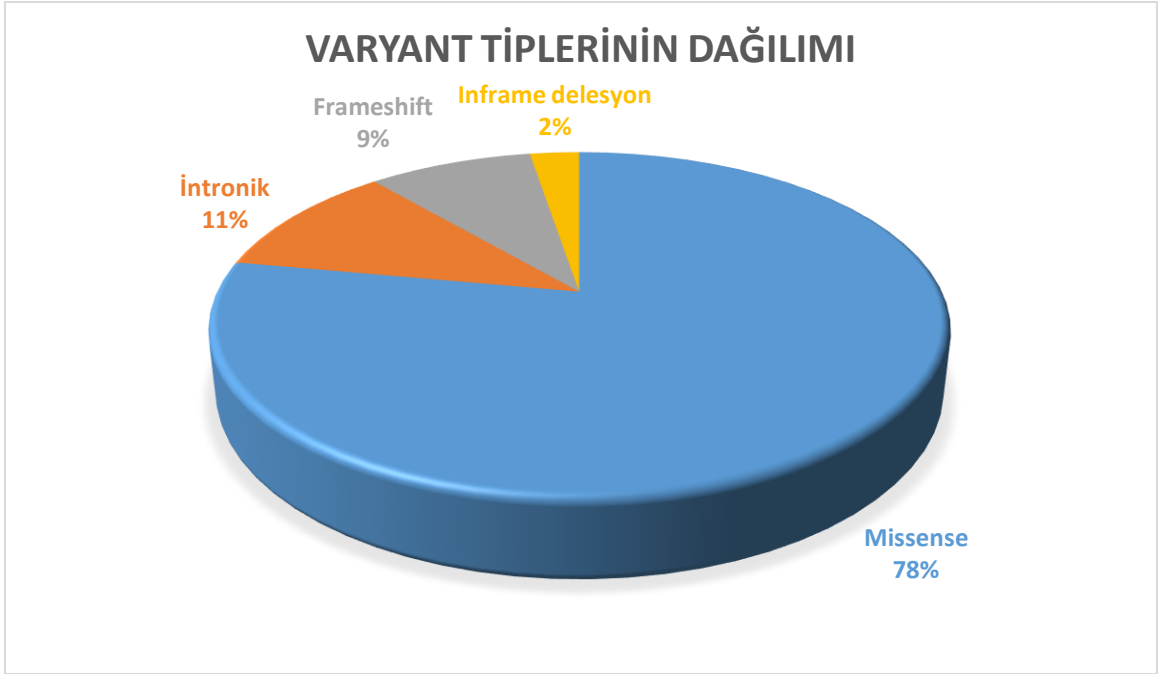


Şekil 4.22: Varyantların gen dağılımı

	GEN	SAYI
1.	DOCK8	8
2.	TNFRSF13B	7
3.	ATM	3
4.	CASP10	3
5.	NCF2	3
6.	PRF1	3

7.	UNC13D	3
8.	NCF1	2
9.	STAT1	2
10.	BTK	1
11.	CTLA4	1
12.	CYBA	1
13.	ELANE	1
14.	FAS	1
15.	JAGN1	1
16.	LRBA	1
17.	NOD2	1
18.	PGM3	1
19.	USB1	1
20.	VPS45	1
21.	WAS	1

Tablo 4.20: Varyantların gen bazında dağılımı



Şekil 4.23: Varyant tiplerinin dağılımı

## 5. TARTIŞMA

Bu çalışmada elde edilen veriler temelde; kohort grubundan elde edilen bütünsel verilerin epidemiyolojik, istatistiksel ve karşılaştırmalı yorumlanması ile, araştırma grubunda saptanan, daha önce literatürde genotip fenotip korelasyonu yapılmamış ve üzerinde konsensüs oluşacak şekilde tanımlanmamış varyantların hasta klinikleri ve genotip verileriyle birlikte kapsamlı değerlendirilmesinden doğan analitik ilişkilendirilmeler olarak 2'ye ayrılmaktadır.

Kohort grubuna bütünsel olarak bakıldığında, 224 hastadan elde edilen yaş, cinsiyet, başvuru nedeni, genotip verileri, varyant tipleri, patojeniteleri ve genlere göre spesifik istatistikler, Türk toplumundaki primer immün yetmezlik kliniğinin bilimsel olarak aydınlatılmasına yardımcı olacak niteliktedir. Sözkonusu veriler, İspanya, Norveç, İrlanda, Avusturalya, Yeni Zelanda, Fransa, İran, Fas, Hollanda, İsveç, Birleşik Krallık ve Almanya toplu ulusal kayıtları kullanılarak yayınlanan “primer immün yetmezlik kayıt verileri” yayınları ile karşılaştırılarak tartışılmıştır.

Buna göre; kohort grubundaki hastaların ortalama genetik değerlendirme yaşı 14 olarak gerçekleşirken, en sık başvuru yaşı 6 olduğu görüldü. Bu veriler daha önceki literatür verileri ile karşılaştırıldığında, literatürdeki başvuru yaşı verilerine göre daha geç olduğu izlendi (24ay, 42 ay, 64 ay, ) (Bousfiha AA ve ark 2014; Aghamohammadi A ve ark 2014; Mellouli F ve ark, 2015). Hastaların büyük bir çoğunluğunun 18 yaşın altında olması ise hem primer immün yetmezliklerin doğası, hem de geçmiş literatür verileri ile uyumluydu. Tanı yaşının gecikmesi, ülkemizde uygulanacak tarama programları ve immünyetmezlik farkındalığını artırıcı pratiklerin gereksinimini vurgulaması itibariyle ders çıkarılacak niteliktedir.

Cinsiyet dağılımı erkek cinsiyet yönünde hafif bir ağırlık olmakla birlikte birbirine yakındı (123 erkek, 101 kadın, sırasıyla 54,9% ve 45.1%). X'e bağımlı geçiş gösteren klinik tabloların sorumlu tutulabileceği bu tipte hafif bir erkek baskınlık literatürde de yaygın olarak izlenmekteydi (Norveç: 56.5%, Avustralya ve Yeni Zelanda: 53.6%, Fransa: 58.8% gibi). (Stray-Pedersen A ve ark, 2000; Kirkpatrick P, Riminton S, 2007; CEREDIH, 2010). Saptanan genler, klinik tablolar ve patojeniteler itibariyle erkek ve kadınlar arasında anlamlı bir fark izlenmedi.

Hasta profili içerisinde en sık başvuru nedeni "tekrarlayan enfeksiyon öyküsü" idi, ve patojen ajanlara karşı artmış hassasiyet primer immünyetmezliklerin en temel süreci olduğundan bu veri teori ile uyum göstermekteydi. Literatürde başvuru nedeni kimi zaman alt gruplar itibariyle tanımlanmıştı, fakat bütünsel olarak benzer nitelikteydi; örneğin İspanya ulusal bilgi bankasına göre antikor eksiklikleri ile başvuran hastaların 60%ında esas şikayet "tekrarlayan üst solunum yolu enfeksiyonları" idi. Yine Hollanda'da, tüm primer immün yetmezlikler içerisinde en sık başvuru şikayeti "tekrarlayan alt solunum yolu enfeksiyonları" (60%) olarak belirtilmişti. Sözkonusu çalışmalarda en sık ikincil başvuru nedenleri sırasıyla gastrointestinal şikayetler ve deri enfeksiyonları olurken, çalışmamızda en sık ikincil başvuru nedeni laboratuvar çalışmaları sırasında saptanan hipogamaglobülinemi olmuştu. Bu noktadaki farklılık, genel popülasyonda tıbbi şikâyetler ve bulgular anlamında yeterli bilincin olmayabileceği ve aileler veya bireyler tarafından kesin bir dille sık enfeksiyon şikâyeti belirtilmese dahi, kısa zaman içinde tekrarlı enfeksiyon geçiren bireylerde immünglobülin çalışmalarının tanıya giden yolu açabileceğini göstermesi bakımından önemli niteliktedir.

Yaptığımız çalışma, esas itibariyle primer immünyetmezliklerin genetik açıdan doğasının anlaşılması temeline kurulu olduğundan, en önemli parametre hastalarda saptanan

varyantlar ve bunların içerisinde bulunduğu genlerdir. Genel bilgiler kısmında ayrıntılı bir biçimde belirtildiği üzere, tıbbi genetik pratiğinde yalnızca tek bir yöntem bulunmaz, aksine durum bundan oldukça uzaktır. 20. Yüzyılın ortalarında DNA molekülünün yapısının anlaşılmasından itibaren genetiğin aldığı bütün bu yol süresince, genotip verilerinin farklı açılardan anlaşılmasını sağlayan birçok teknik geliştirilmiştir. Her döneme, teknoloji seviyesine ve amaçlara göre farklı avantaj ve dezavantajlara sahip bu teknikler kümesi içerisinde, günümüz itibarıyla sağladığı olanaklar, kapsamı yetkinlik ve etkinlik açısından öne çıkan moleküler teknikler özetle ikiye ayrılmaktadır. Bunlardan biri, genomun “kopya sayısının” incelenmesine olanak tanıyan, mikroarray; diğeri ise birçok genin veya tüm genlerin bir arada dizilenmesine ve genomun “nükleotit diziliminin” anlaşılmasına olanak tanıyan yeni nesil dizilemedir. Yöntem seçimi önemli olmakla birlikte, nihayetinde yapılan çalışmalar, sözkonusu dizi analizlerinin tanı başarısı (diagnostik elde) noktasında oldukça iyi olduğunu göstermektedir. Mahlaoui ve ark. tarafından 2019’da yayınlanan bir veri raporuna göre, farklı genetik yöntemlerle incelenmiş 3405 primer immün yetmezlik hastasının 2859’unda (83.9%) genetik bir değişime rastlanmıştır. Farklı genetik analizlerin kullanılması, ve ortaya çıkan varyantların analizi ile ilgili veri olmaması nedeniyle yalnızca epidemiyolojik düzeyde incelenebilecek bu çalışma, kısıtlıklarına rağmen immünyetmezlik hastalarının ne kadar önemli bir kısmında genetik değişimlerin mevcut olduğunu ortaya koyar niteliktedir (Mahlaoui N ve ark, 2019). Farklı genetik tetkiklerin kullanıldığı bir diğerk çalışmada 264 primer immün yetmezlik hastası için nihai moleküler tanı başarısı 70% olarak raporlanmıştır (Al-Herz W ve ark, 2019). Genetik tetkikler ayrı ayrı değerlendirildiğinde, hedefe yönelik panel bazlı NGS analizlerinde, dizayn edilen panelin niteliğine göre değişken başarılar elde edildiği gözlenmektedir. Örnek olarak 264 immün yetmezlik geninin dahil edildiği bir panel ile yapılan bir çalışmada, 780 hastanın 433 tanesine (diagnostik elde: 56%) tanı konulabilmiştir. Tanı konulamayan hastaların 109 tanesi WES analizi için seçilip uygulandıktan sonra 18 hastaya daha tanı konularak tanı başarısının toplamda 58%’e yükseldiği görülmüştür. Bu veriler, uygun şekilde hazırlanan gen panellerinin diagnostik elde anlamında oldukça yüksek performans gösterebileceğini ortaya koyar niteliktedir (Platt CD ve ark, 2021). Bir diğerk çalışmada, 191 genli bir PID paneliyle incelenen 20 hastanın 14 tanesine genetik tanı konulabilmiştir, böylece 70% oranında bir diagnostik başarı elde edilmiştir, fakat bu çalışmada hastaların ciddi bir eleme sürecinden sonra seçilmesi ve hasta sayısının düşük olması önemli kısıtlayıcı parametrelerdir (Yu H ve ark, 2016). 356 PID ilişkili genle oluşturulmuş bir

diğer panel 33% diagnostik eldeye ulaşırken (Erman B ve ark, 2017), 173 genin dahil edildiği bir başka panelle yapılan kohortta ise tanı başarı yüzdesi 15% olarak bulunmuştur (Stoddard JL ve ark, 2014). Bu çalışmanın 2014 yılında; günümüzdeki PID fenotiplerinin önemli bir kısmının moleküler mekanizması ve sorumlu genleri henüz belirlenmemişken yapılmış olmasına dikkat çekilmesi gerekmektedir. Daha kapsamlı genetik analizlerle yapılan (CES/WES/WGS) çalışmaların verileri de genotip-fenotip korelasyonu açısından önemlidir. 106 primer immünyetmezlik hastasına yapılan WES analizi sonucu 70%'inde muhtemel bir tanıya ulaşılmıştır (Simon AJ ve ark, 2020). 2018 yılında yapılan bir diğer WES temelli çalışmada immün yetmezlik açısından incelenen 33 ailenin 19'unda (diagnostik elde: 57%) sorumlu genetik değişimin gösterilmesi mümkün olmuştur (Yang WL ve ark, 2018). Bu yüksek oranlı tanı başarıları her çalışma ve her kohort için geçerli değildir, WES ve takiben 269 PID ilişkili genin filtrelenmesi ve bunların hedefe yönelik incelenmesi metodolojisi üzerinden yapılan bir diğer çalışmada tanı başarısı 30% düzeyinde kalmıştır (Maffucci P ve ark, 2016). Benzer bir başarı düzeyi, 176 sepsis öykülü çocukta yapılan WES analizi sonucu da elde edilmiştir, buna göre hastaların 20%'sinde PID-ilişkili bir gende patojenik varyant saptanmıştır. Benzer şekilde bir diğer WES temelli, WES ve CES analizlerini karşılaştıran bir çalışmada da ders çıkarılabilecek bazı bulgulara ulaşılmıştır; buna göre tüm genleri dizilendikten sonra, önce CES paneli içindeki genleri analiz edilen 61 PID hastasının 19 tanesine (20%) tanı konulabilirken, CES filtresi kaldırılıp tüm genler analize dahil edildiğinde 7 ekstra (11%) hasta daha tanı almıştır: bu da CES'in her koşulda tamamen yeterli kabul edilmemesi gerektiğine dair kıymetli bir veri olarak literatürdeki yerini almıştır (Rudilla F v ark, 2019). Literatürdeki tüm bu veriler ve benzer diğerleri, NGS temelli çalışmaların PID fenotiplerinin tanısında vazgeçilmez olduğunu göstermektedir. Genetik analizler sonucu elde edilen veriler, tanı oluşturma sürecindeki rolüne ek olarak, tıbbi karar verme sürecini de etkileyerek, hekimler tarafından yapılan takip şemasının oluşturulması ve süreç içerisinde atılması gereken adımların netleşmesinde kritik öneme sahiptir. 106 hastadan oluşan bir kohortta, WES analizi ile tanı konulan 39 hastanın (41%) klinik yönetiminin bu bulgulara binaen değiştirildiği raporlanmıştır. Son yıllarda gelişen hedefe yönelik genetik tedavilerle birlikte, hastadaki genetik değişimin tanımlanması belki de en önemli basamak haline gelmiştir ve genetik olarak düzenlenmiş otolog kök hücre naklinden, gen düzenlenmesine kadar değişen bir yelpazede sayısız klinik araştırma ile birlikte, tanımlı genetik varyanta sahip hastaların tedavisindeki başarıların gözle görülür bir şekilde artmaya devam

edeceği aşikârdır (Booth C ve ark, 2019). Çalışmamızda, görülme sıklığı, daha önce genotip fenotip ilişkilendirme verilerinde göze çarpan kısıtlılıklar, farklı hastalık fenotiplerini açıklayabilme kabiliyeti ve bölgesel farklılıklar göz önünde tutularak belirlenmiş, ayrıntılı özellikler genel bilgiler başlığı altında sunulmuş 64 genlik bir panel kullanılmıştır. Çalışma tüm immünyetmezlik fenotiplerini kapsama amacıyla değil, sözkonusu genlerin daha ayrıntılı analizine olanak sunma itibarıyla tasarımılanmıştır.

Buna göre, saptanan 354 varyanttan büyük çoğunluğu missense (yanlış anlamlı) varyant idi (248 varyant, 70%). Bunu intronik varyantlar (76 varyant, 21.4%), frameshift varyantlar (13 varyant, 3.6%) ve sinonim değişiklikler izledi (9 varyant, 2.5%). (Tablo 26 ve figür 9). Bu veriler literatür verileri ile paralellik göstermekteydi. Daha önce yapılan benzer çalışmalarda neredeyse her zaman en sık saptanan varyant tipinin missense olduğu, ve saptanma oranının 41%'den 74.2%'ye kadar değiştiği görüldü (Platt CD ve ark, 2021; Cifaldi C ve ark, 2019). İkinci sıklıkta intronik varyantlar saptanmıştı, bu da literatür verileri ile paralellik göstermekteydi. İtronik varyantların önemi bilinmeyen varyant ve üzeri seviyelerde bu denli raporlanabilmesi, genomun kodlanmayan bölgelerinin giderek anlaşılın önemini, immünyetmezlikler özelinde de göstermesi bakımından önemlidir. Yine, 9 adet (2.5%) sinonim varyant da, benign olarak nitelendirilmemiş ve rapora dahil edilmişti.

Varyantların tamamına bakıldığında en sık önemi bilinmeyen varyant (62.7%) görüldüğü bunu sırasıyla olası benign (23.4%), olası patojenik (9.6%) ve patojenik varyantların takip ettiği görüldü (4.2%). Tanımlanmamış varyantların analizi dahil edilmeden direkt bakışla verilen bu oranlarda, klinikle ilişkisi olabileceği düşünülen (olası patojenik ve patojenik) varyant oranının 13.8% olduğu görülmektedir. Literatürde, yeterli hasta sayısı ve hedefe yönelik tasarlanmış gen panelleri kullanılarak yapılan çalışmalarda da benzer oranlar sözkonusu idi. 2016 yılında Al Mousa ve arkadaşlar tarafından yapılan bir çalışmada 162 genlik bir gen paneli 139 hasta üzerinde çalışılmış ve 17%sinde klinikle ilişkisi olduğu düşünülen varyant tespit edilmişti (Al Mousa ve ark, 2016). Dikkat çekilebilecek bir diğer husus olarak, çalışmaların gücü (hasta sayısı ve dahil edilen genler) artsa dahi, tanısal başarının bununla her zaman doğru orantılı olmadığı izlendi, örneğin 2020 yılında 886 primer immünyetmezlik hastasının, en kapsamlı tetkik olan WGS ile incelenmesi sonrası yapılan bir yayında, tanısal eldenin 10.6% olarak belirtildiği görüldü. Aksine, hasta sayısı ile tanısal elde ters orantılı olarak gözükmekteydi. Örneğin, 2016

yılında yayınlanan 20 hastanın yalnızca 46 genlik bir panelle incelenmesine dayanan bir yayında hastaların 14 tanesine (70%) moleküler tanı konulduğu ifade edilmişti (Yu H ve ark, 2016), yine 2018 yılında yapılan bir çalışmada 27 hastanın 46%’sında patojenik veya olası patojenik bir varyant saptanmıştı, (Rae W ve ark, 2018) bu da “seçilim biası (ascertainment bias)” kavramını akla getirdiğinden, bu tip çalışmalar değerlendirilirken dikkatli davranılmalıdır.

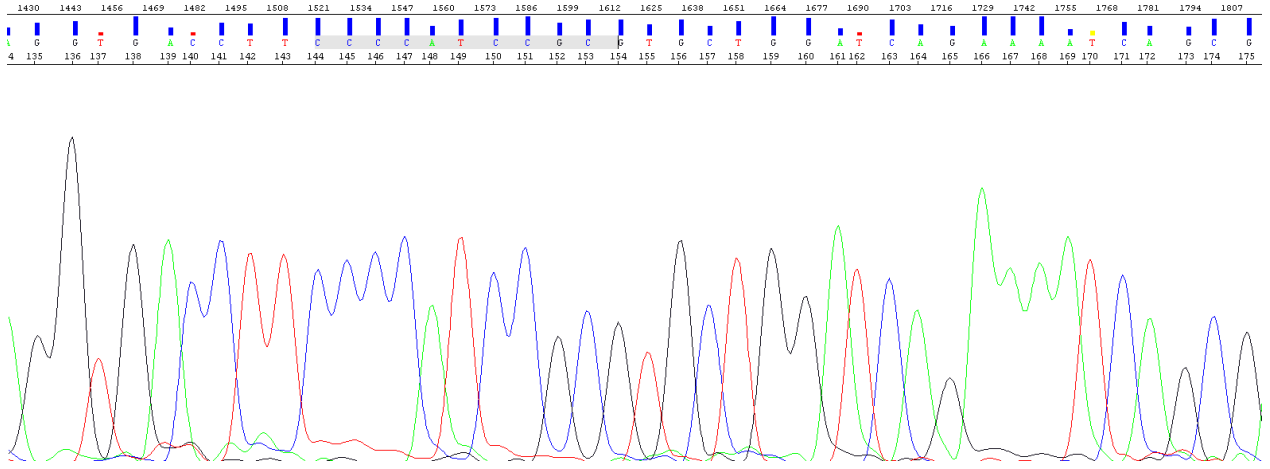
Frameshift varyantların 76%’sı, missense varyantların 13.2%’si ve intronik varyantların 5.5%’si patojenite ile ilişkilendirilmişti, bu türden bir sıralama hem teorik hem de pratik veriler ile uyum içerisindeydi. Missense varyantların büyük çoğunluğunu önemi bilinmeyen varyantlar oluşturmaktaydı (65.7%), clinvar ve uniprot gibi veritabanları incelendiğinde çalışmaya dahil edilen genlerde tespit edilen varyantların çok büyük çoğunluğunun henüz netleşmemiş bir genotip fenotip ilişkilendirilmesine sahip oluşu ile bu veri korele idi.

Bazı hastalarda birden çok gen değişimi raporlandığından, 224 hastada olası benign, önemi bilinmeyen varyant, olası patojenik ve patojenik sınıflarına dâhil olan toplam 354 varyant raporlandı. En sık raporlanan gen DOCK8 idi (36 hasta, 10,2%), bunu LRBA (25 hasta, 7.2%), ATM (24 hasta, 6.9%), TNFRSF13B (20 hasta, 5.8%) ve PRF1 (17 hasta, 4.9%) izledi. Saptanan genlerin sayısı ve yüzdelerinin tamamı tablo 25’te ve figür 8’de özetlenmiştir. Varyantların en sıklıkla izlendiği DOCK8 genindeki patojenik varyantlara bağlı olarak gelişen DOCK8 eksikliği tablosu, ağırlıklı olarak akraba evliliğinin yaygın olduğu popülasyonlarda görülen, IgE artışı ile karakterize nadir bir otozomal resesif primer immün yetmezliktir. Prevalansı tam olarak bilinmemektedir. DOCK8, yaklaşık 200 kilobaz büyüklüğünde 48 ekzondan oluşan, kromozom 9 üzerinde bulunan bir genidir. DOCK8’i varyantlarının çoğu, çoğunlukla çerçeve kayması ile sonuçlanan delesyonlardır. Böylesi delesyonların, missense varyantlara göre daha sık izlenmesi, gen çevresindeki tekrarlı dizilere ve bunların rekombinasyon süreçleri üzerindeki disregüle edici etkilerine bağlanabilir (Biggs CM ve ark, 2017). Birçok gende beklenenin aksine, missense varyantlar nadirdir. Çalışmamızda en çok DOCK8 varyantlarının izlenmesi (n=36), ve bunların içinde en yüksek oranda missense varyantların var oluşu (n=28), literatüre katkısı itibariyle önemlidir. Aynı zamanda, DOCK8 geninde hiçbir delesyon saptanmamıştır. Bölüm 5.2’de genotip fenotip korelasyonu açısından patojenite ile ilişkilendirilmiş DOCK8 missense varyantları tartışılmış ve bazı yeni tanımlanan varyantların ayrıntılı analizi sunulmuştur, buna

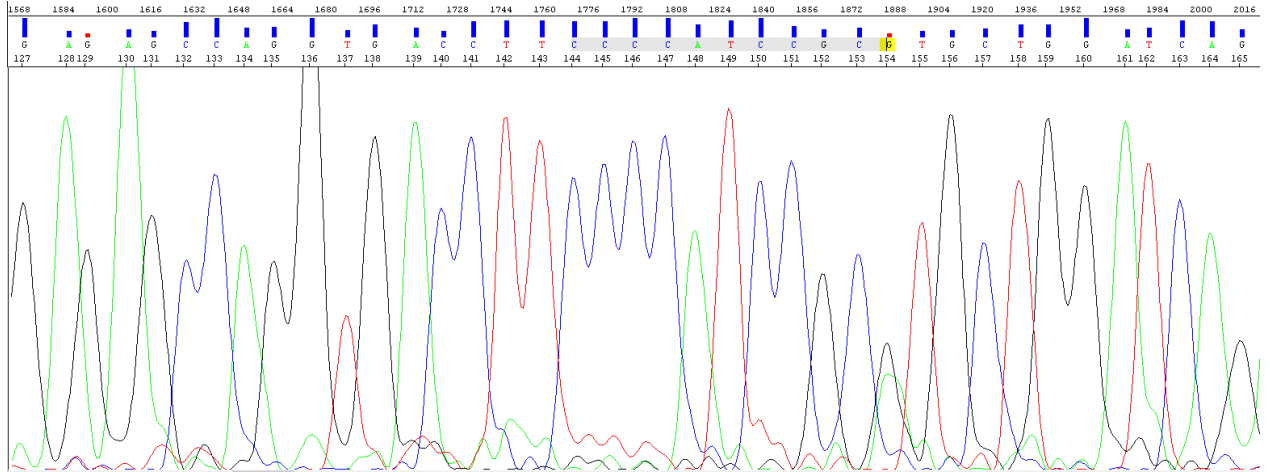
göre klinikle uyumlu olduğu için hastalarda değerlendirilen bu 8 varyanttan 7 tanesinde klinik ilişki kurulabilmiş, 1 tanesi ebeveyn çalışması neticesinde benign lehine değerlendirilmiştir.

DOCK8 geni, araştırma grubuna sıklıkla dahil edilen varyantların saptandığı bir diğer gen olmuştur. Bu genin kodladığı protein GDP-GTP dönüşümünü sağlayarak GTPase'ı aktive eden bir guanin değişim faktörüdür. İmmün sistemde intersitsiyel dendritik hücrelerin ve CD4+ T hücrelerin migrasyonlarını sağlar, aynı zamanda NK hücrelerin mikrotübül polimerizasyonu ve polarizasyonu üzerine de önemli etkileri vardır (Harada Y ve akr. 2012; Ham H ve ark. 2015; Xu X ve ark, 2017). Bu gendeki biallelik patojenik varyantlar, immün yetmezlik, tekrarlayan enfeksiyonlar, egzama, serum IgE artışı, eozinofili, bağ dokusu defektleri ve iskelet tutulumu ile karakterize nadir bir bozukluk olan Hiper IgE sendromu ile ilişkilendirilmiştir (Zhang Q ve ark, 2009). Klinik tablo, eozinofili, tekrarlayan enfeksiyonlar, kütanöz viral, mantar ve stafilokok enfeksiyonları ve şiddetli atopi/alerjik hastalıklarla karakterizedir.

Bu grupta ilk hasta 5 yaş erkek tarafımıza bacaklarda ve kollarda kaşıntılı ve kızarıklık tekrarlamaya eğilimi gösteren kabarıklıklar şikayeti ile yönlendirilen bir hastaydı (Hasta 2). Yapılan sorgusunda uzun süredir sık hastalanma nedeniyle takipli olduğu, birden çok kez akciğer enfeksiyonları nedeniyle yatış öykülerinin bulunduğu ve sık sık öksürük-balgam şikayetleri ile doktora gittiği öğrenildi. Laboratuvar parametrelerine göre IgE seviyelerinin birden çok kez üst sınırın üstünde tespit edildiği, bu seviyenin 3100 IU/mL'a kadar çıktığı görüldü. Yapılan genetik inceleme sonrası hastada DOCK8 geninde bir missense varyant monoallelilik formda tespit edildi. (chr9:377046 G->A; c.2275G>A; V759M). Bu varyant maksimal subpopülasyon frekansı 0.042% olan, ve in-siliko analizleri çelişkili olan bir varyanttı. Yapılan literatür incelemesinde daha önce HiperIgE sendromu fenotipi gösteren bir hastada tespit edildiği görüldü (Eken A ve ark, 2020). Bu verilerin ışığında klinikle uyumlu değerlendirildi. Ebeveyn çalışması sonrası bu varyant hastanın babasında da monoallelilik formda saptandı (Şekil 5.1 ve 5.2). Varyant pozisyonu itibarıyla değerlendirildiğinde de, DOCK8 geninin aktif domainlerinden herhangi birini kodlamayan bir koordinat noktasında yerleştiği izlendi. Tüm bu veriler ışığında, daha önce Hiper IgE sendromlu bir hastada izlendiğinden patojenik lehine olan literatür verilerini zenginleştirerek, benign lehine bir bakış açısı kazandırabileceğinden, bu bulgular önemli kabul edildi.



Şekil 5.1: Hasta 2 annesine ait (chr9:377046 G->A; c.2275G>A; V759M) pozisyon sanger görüntüsü. Varyant saptanmadı.



Şekil 5.2: Hasta 2'nin babasına ait (chr9:377046 G->A; c.2275G>A; V759M) pozisyonu sanger analiz görüntüsü. Varyant pozisyonu sarı ile taralı olarak gösterilmiştir. Varyant babada monoalelik olarak saptanmıştır.

Bir diğer DOCK8 hastası, 60 yaş kadın, laboratuvar parametrelerinde IgE seviyelerinin yüksek olması nedeniyle tarafımıza yönlendirilen bir vakayı (Hasta 7). IgE 'nin birden çok ölçümde yüksek olduğu ve seviyesinin 695 IU/mL' ye kadar yükseldiği izlendi. Hikâyesinde vücudunun değişik yerlerinde kaşıntılı egzema benzeri lezyonlar geçirdiği ve genel olarak alerjik bir bünyesi olduğunu ifade ettiği görüldü. Genetik inceleme sonrası DOCK8 geninde bialelik formda bir intronik varyant saptandı (chr9:422147 G->A ; c.4241+12G>A). Bu varyant maksimal subpopülasyon frekansı 0.147% olan ve in-siliko analizleri veri vermeyen bir varyanttı.

Yapılan literatür taramasına göre varyant daha önce raporlanmamıştı. Aynı zamanda, DOCK8 geni için kritik bir fonksiyonel bölge olan C-terminal bölgesi içinde yer almaktaydı. Hikâye ve IgE seviye yüksekliği kombinasyonu ile birlikte, açıklayıcı başka bir değişim de olmaması göz önünde bulundurularak bu değişim ve kliniğin ilintili olduğu sonucuna varıldı.

DOCK8 açısından tartışılan bir diğer vaka, 23 yaş, tekrarlayan enfeksiyonlar, moleküler tanı almamış kistik fibrosis şüphesi öyküsü, nefes darlıkları ve daha önce geçirilmiş aspergilloz sebebiyle aldığı primer immün yetmezlik tanısı nedeniyle tarafımıza yönlendirilen bir kadın hastaydı. Hastanın IgE seviyeleri birden çok ölçümde yüksekti (Hasta 20). Genetik inceleme sonucu hastada monoallel formda bir DOCK8 missense varyantı saptandı. (chr9:328163 G->A ; c.1036G>A ; V346I). Bu varyant maksimal subpopülasyon frekansı 0.091% olan ve in-siliko analizleri çelişkili olan bir varyant idi. Koordinat bazlı değerlendirmesine göre, varyant herhangi bir aktif domain içine yerleşik değildi. Yapılan literatür taramasında bu varyantın daha önce raporlanmadığı görüldü. Tüm bu veriler ışığında genotip-fenotip korelasyonu açısından şüpheli olarak değerlendirildi ve bu varyant hakkında bildirilecek daha fazla veriye ihtiyaç olduğu, bu verilerle birlikte sözkonusu değişimin doğasının daha iyi anlaşılacağı düşünüldü.

Bir diğer vakada, 75 yaş erkek hasta, tekrarlayan dermatit, verrüler ve akrokordon şikayetleri nedeniyle tarafımıza yönlendirildi (Hasta 24). 18 aydır immün yetmezlik tanısıyla takip edilerek IVIG kullandığı, kilo kaybı ve gece terlemeleri şikâyetleri de olduğu fakat neoplazi tanısına gidilemediği görüldü. Yapılan laboratuvar analizlerine göre hastanın birden çok ölçümde IgE seviyeleri belirgin yüksekti (712 IU/mL'ye kadar). Genetik inceleme sonucu DOCK8 geninde monoallel formda bir missense varyant tespit edildi. (chr9:396836 C->T; c.3022C>T; R1008W). Yapılan literatür sorgusunda varyantın daha önce raporlanmadığı görüldü. Aynı zamanda, bu varyantın pozisyonu herhangi bir aktif domain içerisine tekabül etmemekteydi. Bu veriler ışığında, hasta kliniği ve öyküsünü açıklamamak ile birlikte IgE yüksekliği yaratması açısından klinik olarak önemli olan, ancak literatürde gelecekte bildirilecek muhtemel diğer vakalarla birlikte netlik kazanabilecek bir değişim olarak nitelendirildi.

5 yaş erkek hasta (hasta 5) prematüre doğum, yarık-damak dudak, inguinal herni, dismorfik bulgular, prematüre retinopatisi, bronşiolit öyküsü ve tekrarlayan enfeksiyonlar hikâyeleri ile birlikte tarafımıza yönlendirildi. Sendromik yönden araştırılan hastanın bu yöndeki sorgusu devam etmekle birlikte, hastada birçok ölçümde yüksek IgE düzeyi saptanması nedeniyle

bu yüksekliği yaratabilecek bir varyantın araştırılması amacıyla genetik incelemeye alındı. Buna göre hastada DOCK8 geninde monoalelik formda bir intronik varyant tespit edildi (chr9-371587 T>C ; c.2007+21T>C). Bu varyantın maksimal subpopülasyon frekansı 0.046%, ve in-siliko analizleri belirli bir veri vermez nitelikteydi. Yapılan literatür taramasında daha önce raporlanmadığı görüldü. Koordinat düzlemi itibariyle değerlendirildiğinde, varyantın yerleştiği pozisyonun DOCK8 proteininin kritik domainlerinden biri olan DHR-1 domaini içinde yer aldığı izlendi. Daha önce, bu bölgenin DOCK8 proteinin plazma membranına migrasyonu ve yerleşmesi için gerekli olduğu ve bu bölgede meydana gelen varyantların immün sistem disfonksiyonu ile ilişkilendirildiği gösterilmişti (Sakurai T ve ark, 2021). Tüm bu verilerle, IgE yüksekliği yaratabilecek bir varyant olarak değerlendirildi.

DOCK8 araştırma grubundaki bir diğer vakada, 11 yaş erkek hasta (Hasta 28), IgE seviyesi yüksekliği, geçirilmiş plevral efüzyon sonrası şilotoraks, bronkojenik kist ve sık tekrarlayan enfeksiyonlar bulguları ile birlikte tarafımıza yönlendirildi. Laboratuvar incelemelerine göre IgE seviyesi birden çok ölçümde yüksek ve en yüksek olarak 883IU/mL olarak saptanmıştı. Genetik inceleme sonrası hastada monoalelik formda missense bir DOCK8 varyantı tespit edildi. Bu varyant, maksimal subpopülasyon frekansı 0.004% olan ve in-siliko analizleri büyük oranda patojenik lehine olan bir değişimdi. Yapılan literatür sorgusunda daha önce raporlanmadığı görüldü. Tüm bu verilerin ışığında klinikten sorumlu olabileceği düşünülerek klinik olarak değerli kabul edildi.

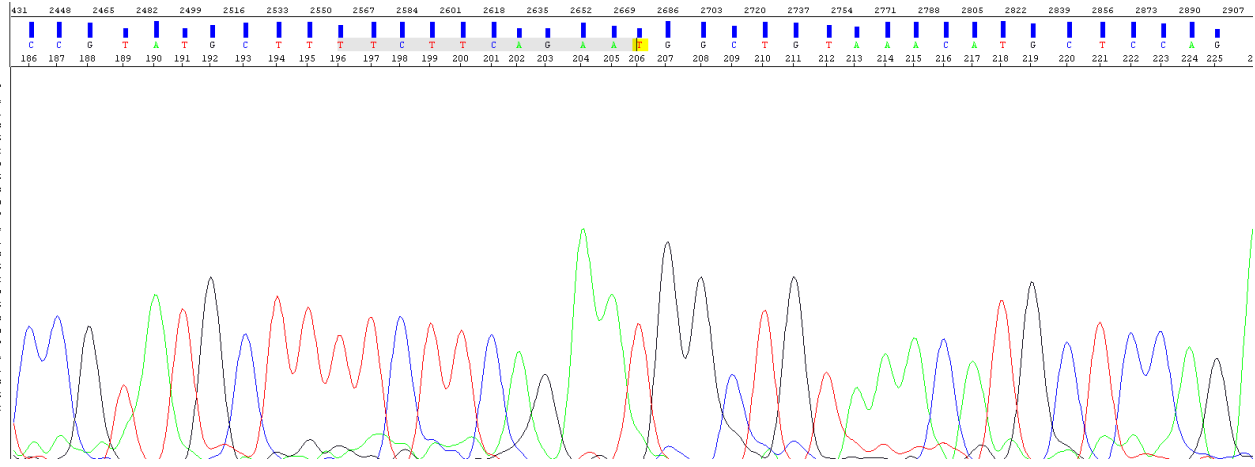
Bu gruptaki başka bir vakada, 36 yaş erkek hasta, tekrarlayan enfeksiyonlar ve IgE seviyelerinin birden çok ölçümde yüksek olması nedeniyle tarafımıza yönlendirildi (Hasta 40). Yapılan genetik analiz sonrası hastanın DOCK8 geni içerisinde yerleşik 3 adet missense monoallelik varyant tespit edildi. Bunlardan ilki (chr9-396872 A>G; c.3058A>G; I1020V). Bu varyantın maksimal subpopülasyon frekansı 0.76% ve in-siliko analizleri çelişkili sonuçlar veren bir varyanttı. Bu varyant daha önce bir kez, neonatal döküntü, pnömoni ve immün yetmezlik fenotipi olan bir hastada izlenmişti (Haskologlu S ve ark 2020). İkinci varyant (chr9-418141 T>G ; c.3774T>G ; N1258K) popülasyon veritabanlarında daha önce izlenmemiş ve in-siliko analizleri çelişkili olan bir varyanttı. Yapılan literatür taramasında bu varyantın daha önce raporlanmadığı görüldü. Üçüncü varyant ( chr9-418173 A>C; c.3806A>C ; N1269T) daha önce popülasyon veritabanlarında izlenmemiş ve in-siliko analizleri çelişkili olan bir varyanttı. Yapılan literatür

taramasında bu varyantın daha önce raporlanmadığı görüldü. Tüm bu veriler ışığında varyantların kümülatif etkilerinin hastanın klinik bulgularını açıklayıcı nitelikte olduğuna karar verildi.

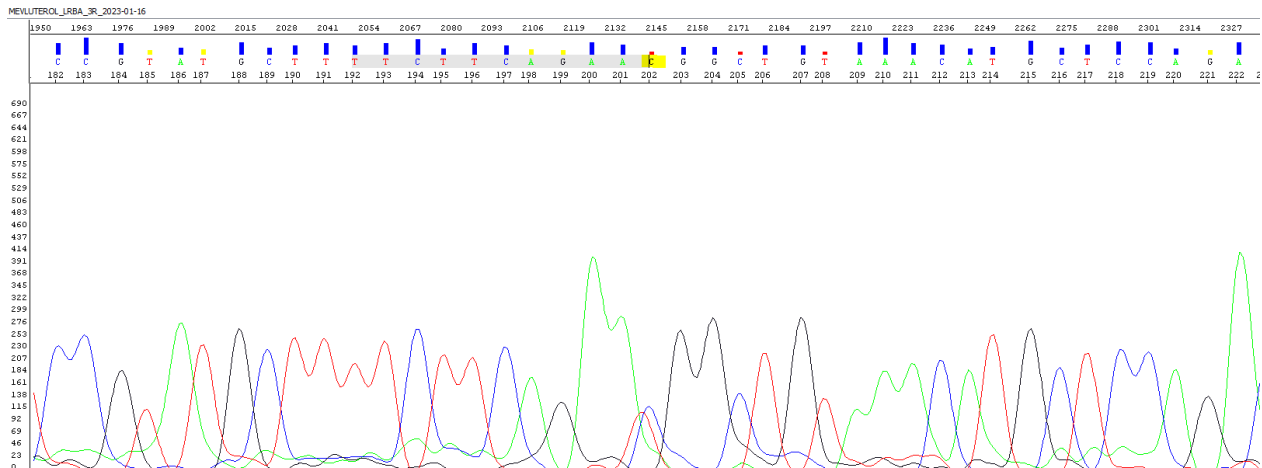
12 yaş kız hasta, tekrarlayan enfeksiyonlar, malnutrisyon ve nefes darlıkları şikâyetleri, ve primer immün yetmezlik tanısı ile tarafımıza yönlendirildi. Laboratuvar parametrelerine göre, hastanın IgE seviyesi yüksekti. Hasta özellikle HiperIgE sendromu ve immünyetmezlik açısından genetik değerlendirmeye uygun görüldü (Hasta 42). Yapılan incelemede hastada DOCK8 geninde iki missense varyant tespit edildi. Bunlardan ilki (chr9:377046 G->A; c.2275G>A; V759M), maksimal subpopülasyon frekansı 0.042% olan ve in-siliko analizleri çelişkili olan bir varyanttı. Yapılan literatür incelemesinde daha önce HiperIgE sendromu fenotipi gösteren bir hastada tespit edildiği görüldü (Eken A ve ark, 2020). Bu verilerin ışığında klinikle uyumlu değerlendirildi. İkinci varyant (chr9-304628 G>A ; c.452G>A ; R151Q), maksimal subpopülasyon frekansı 0.21% olan, ve in-siliko analizleri çelişkili sonuçlar veren bir varyanttı. Bu değişim, DOCK8'in, fonksiyonel olduğu bilinen ve evrimsel olarak iyi korunmuş bir bölgesini etkilemekteydi. Literatür taramasına göre daha önce raporlanmamıştı. IgE seviye yüksekliği, klinik bulgular ve bu 2 varyant kombine edilerek genotip fenotip korelasyonu yapıldı.

İkinci sıklıkta, LRBA varyantları ile karşılaşmıştır. LRBA geni 4. Kromozom üzerinde yer alan, 57 ekzondan oluşan ve 2851 amino asitlik bir protein kodlayan genidir. LRBA geninin homozigot veya bileşik heterozigot patojenik varyantları neticesinde LRBA'nın protein ekspresyonunun kaybı, klinik tablonun ortaya çıkış mekanizması olarak gösterilmiştir. En çok Arap (%38,1), İran (%20,6) ve Türk (%13,4) popülasyonlarında görülmektedir (Kardelen AD ve ark, 2020). Kohortumuzda izlenen 25 LRBA varyantının 19 tanesi missense, 6 tanesi intronik olarak gerçekleşmiştir, bu 25 varyanttan 19 tanesi önemi bilinmeyen varyant olarak raporlanırken 3 tanesi patojeniteyle ilişkilendirilmiştir. Patojenite ile ilk analizde ilişkilendirilen bu 3 varyant dışında 1 adet henüz tanımlanmamış varyant, hastadaki kliniği kısmen açıklaması nedeniyle araştırma grubuna dâhil edilmiş, yapılan ebeveyn çalışmasında hem probandda hem de ebeveynde monoalelik olması ve ebeveynde klinik tablo izlenmemesi neticesinde benign lehine değerlendirilmiş ve tartışılmıştır; bu vakada 7 yaş kız hasta, (Hasta 42) otoimmün bulgular, immün trombositopenik purpura, geçirilmiş tüberküloz öyküsü, tekrarlayan enfeksiyonlar ve epilepsi öyküleri ile tarafımıza yönlendirildi. Yapılan genetik inceleme sonrası hastada, otoimmünite eşlikli ağır kombine immün yetmezlik kliniği ile ilişkilendirilmiş olan LRBA

geninde monoalelik formda bir missense varyant tespit edildi (chr4-151850085 T>C ; c.349A>G ; I117V). Bu değişimin maksimal subpopulasyon frekansı 0.012%, ve in-siliko analizler çelişkili idi. Yapılan literatür incelemesinde çok nadir izlenmesine de paralel olarak daha önce bildirilmediği görüldü. Otoimmünite ve immünyetmezlik birlikteliği olan bu hastanın kliniğinin genin ilişkilendirildiği hastalıkla örtüşme göstermesi ve missense varyantların bu gende patojenik olarak tanımlanmış olması nedeniyle bu varyant klinik olarak önemli kabul edildi. Yapılan genetik analiz sonrası varyant annede saptanmadı, fakat babada da monoalelik formda saptandı (şekil 5.3 ve şekil 5.4). Benign lehine kanıt oluşturan bu veri, literatüre katkısı itibariyle değerli kabul edildi.



Şekil 5.3: Hasta 42'nin annesine ait (chr4-151850085 T>C ; c.349A>G ; I117V) pozisyonu sanger sekans görüntüsü. Varyant pozisyonu sarı renk ile taranarak gösterilmiştir. Buna göre varyant annede saptanmamıştır.

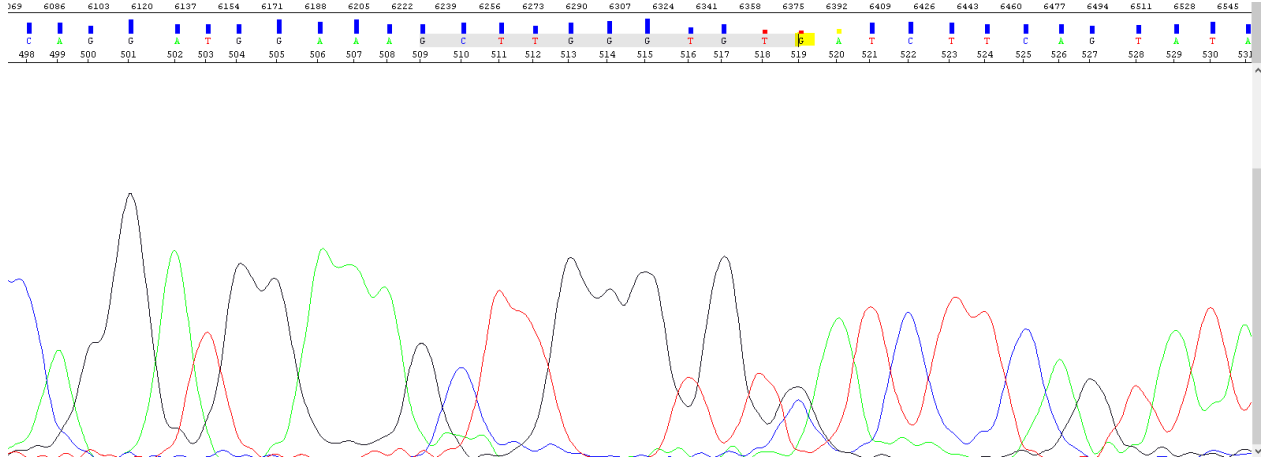


Şekil 5.4: Hasta 42'nin babasına ait (chr4-151850085 T>C ; c.349A>G ; I117V) pozisyonu sanger sekans görüntüsü. Varyant pozisyonu sarı renk ile taranarak gösterilmiştir. Buna göre varyant babada monoalelik formda saptanmıştır.

Üçüncü sıklıkta varyant raporlanan gen ATM olmuştur (n=24). Bu genle ilişkili klinik tablo (ataksi-telenjiektazi), 150 kb genomik DNA'ya yayılan 66 ekzonlu ve 3 adet fonksiyonel domain içeren ATM genindeki fonksiyon kabı yaratıcı biallelik varyantlardan kaynaklanır. Bu gendeki 24 varyantın 5 tanesi ilk analiz sırasında literatür verileri ve hasta bilgileri korele edilerek patojenite ile ilişkilendirilmiştir (20.8%), bu oranın yüksek oluşu ATM genindeki varyantlara özellikle dikkat edilmesi gerektiği ile alakalı uyarıcı niteliktedir. Bu varyantlar arasında en sık karşılaşılan varyant tipi missense (66.6%) olmuştur. Literatür verileri incelendiğinde, 2014 yılında 12 ataksi telenjiektazi hastasında en sık çerçeve kayması varyantlarının izlendiği, bunu nonsense varyantların takip ettiği görülmüştür (sırasıyla 42% ve 33.3%) (Huang Y ve ark, 2014). Bir diğer bildirimde ise en sık varyant nonsense olarak görülmüştü (56.6%, Rawat A ve ark, 2022). İlk analizde tespit edilen bu 5 ATM varyantına ek olarak, daha önce bildirilmemiş 3 farklı ATM varyantı saptanmış, bunlar ayrıntılı olarak tartışılmıştır.

Bunlardan birinde, 23 yaş kadın hasta (Hasta 14), ataksi, telenjiektaziler ve klinik olarak ataksi telenjiektazi tanısı ile tarafımıza yönlendirilmişti. Yapılan genetik analiz sonrası ATM geninde bialelik formda bir stop-lost varyant tespit edildi (chr11-108236234 G>C ; c.9170G>C). Bu varyant, daha önce popülasyon veritabanlarında hiç izlenmeyen bir varyanttı. Hiç izlenmemesi ile paralel olarak, yapılan literatür taramasında bu varyantın daha önce bildirilmediği görüldü. Koordinat itibariyle değerlendirildiğinde varyantın, genin son ekzonunun da bittiği ve translasyon makinasının normal şartlar altında tamamen durması gereken bir yerde stop lost oluşturan bir varyant olması nedeniyle oldukça kritik olabileceği öngörüldü. Klinikle net uyumlu olan bu gende, stop kodon kaybı yaratması ve protein uzunluğunu değiştirmesi beklenen bu varyantın buna ek olarak bialelik durumda saptanmış olması nedeniyle, klinikten sorumlu olarak değerlendirildi. Hastanın ebeveyn analizi yalnızca annede mümkün oldu. Bu analize göre, varyant annede monoalelik olarak saptandı (Şekil 5.5). ATM geni, ataksi telenjiektazi ile otozomal resesif olarak ilişkili olması, varyantın stop-lost oluşu, çocukta net bir kliniğe sebebiyet

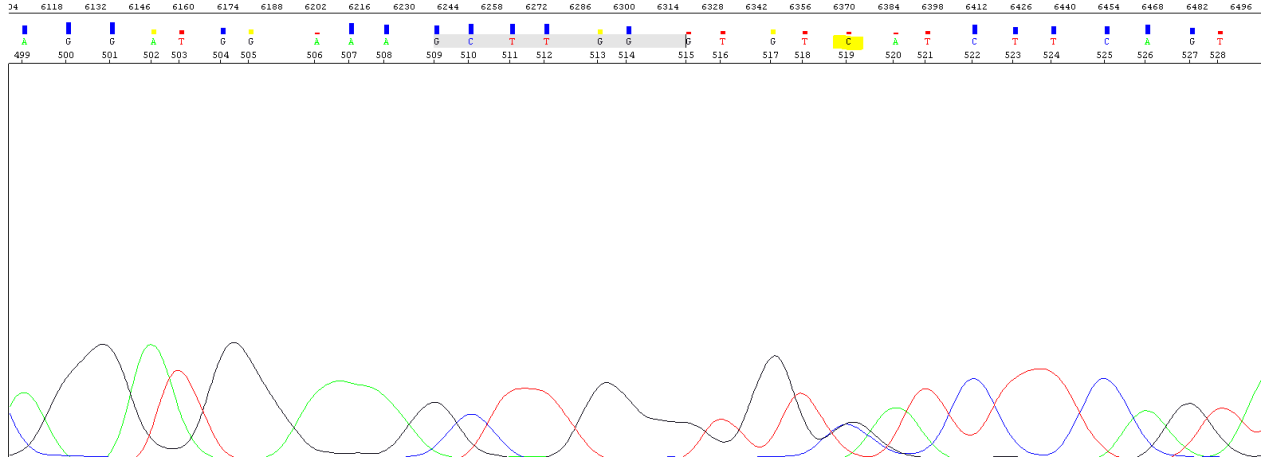
vermesi ve annede taşıyıcılığının izlenmesi verilerinin tamamı patojenik lehine olduğundan, varyant kliniği açıklayıcı olarak raporlandı.



Şekil 5.5: Hasta 14'ün annesine ait, (chr11-108236234 G>C ; c.9170G>C) pozisyonu sanger analizi görüntüsü. Varyant pozisyonu sarı renk ile taranarak işaretlenmiştir. Buna göre, varyant annede monoalelik formda izlenmiştir.

Bir diğer ATM vakasında 13 yaş kız hasta (Hasta 16) ataksi, telenjipektaziler, immün yetmezlik ve klinik ataksi telenjipektazi tanısı ile tarafımıza yönlendirildi. Buna yönelik olarak yapılan genetik inceleme sonrası ATM geninde monoalelik formda bir stop-lost varyant tespit edildi (chr11-108236234 G>C; c.9170G>C; \*3057Sext\*29). Bu varyant, patojenik olduğu literatür verilerine göre net olan monoalelik formda bir diğer varyant ile birlikte idi. Ataksi telenjipektazinin tanımlanmış kalıtım patterninin OR oluşu göz önünde bulundurularak ikinci varyant da değerlendirmeye alındı: buna göre, sözkonusu varyant daha önce popülasyon veritabanlarında hiç izlenmeyen bir varyanttı. Stop kodon kaybı oluşturması nedeniyle protein yapısını dramatik olarak etkilemesi beklenen bu varyantın, tanımlı diğer patojenik varyanta ek olarak kliniğin tam anlamıyla ortaya çıkışına zemin hazırlayan ikinci değişim olduğu düşünülerek klinikten sorumlu olduğu yönünde değerlendirme yapıldı. Hastanın ebeveyn analizi yalnızca anneden mümkün oldu. Buna göre varyant annede de monoalelik formda tespit edildi. ATM geni literatürde ataksi telenjipektazi ile biallelik olarak ilişkilendirilmişti, fakat hastada monoalelik olmakla birlikte net bir klinik izlenmekteydi. Aynı genotipteki annede kliniğin izlenmemesi (Şekil 5.6), fakat çocukta monoalelik olsa dahi kliniğin açığa çıkması, penetrans, ekpresivite, non-sense mediated decay ve dominant negatif etkileşim kalıpları itibariyle açıklanabilir. Hasta

14'te patojenik olarak değerlendirilen bu varyant, bu durumda da sözkonusu genetik kavramlar açısından değerlendirilmesi gereken bir değişim olarak göze çarpmıştır.



Şekil 5.6: Hasta 16'nın annesine ait, (chr11-108236234 G>C; c.9170G>C; \*3057Sext\*29) pozisyonu sanger analiz görüntüsü. Varyant pozisyonu sarı renk ile taranarak gösterilmiştir. Buna göre varyant, annede monoalelik formda saptanmıştır.

Hasta 25, ablasında ataksi telenjipektazi tanısı olması ve kendisinde doğumundan itibaren enfeksiyonlar izlenmesi nedeniyle 21 günlük iken tarafımıza yönlendirilmişti. Yapılan genetik inceleme sonucu ATM geninde monoalelik bir missense varyant tespit edildi (chr11-108218036 A>T ; c.8615A>T ; H2872L). Bu varyant popülasyon veritabanlarında daha önce izlenmeyen ve in-siliko analizlerinin tamamı patojenik lehine olan bir varyanttı. Yapılan literatür taramasında daha önce hiç bildirilmediği görüldü. Bu varyantın, ATM proteinin işlev görebilmesi için kritik olan katalitik domain içerisinde yer aldığı izlendi. Tüm bu veriler ışığında klinik ile uyumlu olabileceği ve ataksi telenjipektazinin tüm bulguları olmasa da bazı bulgularının ortaya çıkışına zemin hazırlayabileceği düşünülerek, hasta longitudinal olarak takibe alındı.

ATM araştırma grubunda 13 yaş kız hasta, (Hasta 47) ataksi telenjipektazi tanısı, ve sık enfeksiyon geçirme öyküleri ile birlikte tarafımıza yönlendirildi. Yapılan genetik inceleme sonucu 2 farklı varyant saptandı. Varyantlardan biri, daha önce patojenik olduğu literatür verileriyle netleşmiş bir varyant idi. Diğer varyant, (chr11-108236234 G>C; c. c.9170G>C) popülasyon frekans veritabanlarında daha önce izlenmeyen, fonksiyon kaybı ile klinik arasında ilişki kurulmuş bir gen içerisinde stop kodon kaybına sebep olan ve literatürde daha önce hiç raporlanmadığı izlenen bir varyant idi. ATM geni ataksi telenjipektazi kliniği ile otozomal resesif

olarak ilişkilendirildiğinden, ikinci varyantın patojenite ihtimali yüksekti. Yapılan sanger incelemesinde doğrulanmış varyant, aynı zamanda annede de heterozigot olarak izlendi. Babada izlenmedi. Varyantın stop lost oluşu, fonksiyon kaybı ile klinik arasında ilişki kurulmuş bir gende var olması ve başka bir patojenik varyantla birlikte kliniğin ortaya çıkışına sebep oluşu değerlendirilerek varyant raporlandı.

Bir diğer sıklıkla karşılaşılan gen TNFRSF13B olmuştur. Yaygın olarak kullanılan bir diğer adı ile TACI, 249 aminoasit uzunluğunda, 5 ekzondan oluşan, 17. Kromozom üzerinde yerleşik bir genir ve bir TNF reseptörünü kodlar. Bu genin kodladığı protein (Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 13b) diğer adıyla TACI (Transmembrane activator and caml interactor), tümör nekrosis faktör reseptör ailesinin bir üyesidir. NF-AT'nin kalsinörine bağımlı aktivasyonunun yanı sıra NF-kappa-B ve AP-1'in aktivasyonuna aracılık eder. B ve T hücre fonksiyonunun uyarılması ve humoral bağışıklığın düzenlenmesinde rol oynar. (Wu Y ve ark., 2000). Hipogamaglobulinemi, tekrarlayan bakteriyel enfeksiyonlar ve antikor yanıtı oluşturmada eksiklik ile karakterize bir primer immün yetmezlik olan yaygın değişken immünyetmezlik 2 (Castigli E ve ark., 2005) ile ilişkilendirilmiştir. Fenotip, B hücresi farklılaşmasının başarısızlığından ve immünglobulinlerin salgılanmasının bozulmasından kaynaklanır; dolaşımdaki B hücrelerinin sayısı genellikle normal aralıktadır, ancak düşük de olabilir. Aynı zamanda IgA eksikliği-2 fenotipi ile de ilişkisi mevcuttur (Castigli E ve ark., 2005). TNFRSF13B patojenik varyantları, karakteristik olarak düşük IgA ve IgG seviyeleri, tekrarlayan sinopulmoner enfeksiyonlar ve bazı aşılarla yönelik verilen antikor yanıt bozukluğuna neden olur. Buna ek olarak, otoimmünite ve lenfoproliferasyon da izlenebilir. TACI varyantları genelde sporadik olarak izlenir ve belirgin bir aile hikayesi ile birlikte başvuru nadirdir. Aynı zamanda, eksik penetrans ve değişken ekspresivite gösteren bir gen olduğundan fenotipik farklılıklar kaçınılmazdır. Aynı varyantı taşıyan kardeşler arasında bile bazen klinik farklılıklar gösterilmiştir (Salzer U, Grimbacher B, 2021). Daha önce Türkiye'deki hastalarla yürütülen bir çalışmada hastalarda klinikle ilintili olarak belirtilen 7 değişimden 6 tanesinin missense olduğu raporlanmıştır (85%). Yine Türkiye'ye yakın bir coğrafi konum olan Yunanistan'da gerçekleştirilen bir çalışmada TACI varyantı ve klinik uyum saptanan 17 hastanın tamamı missense varyantlara sahip olarak izlenmiştir. Çalışmamızda ise missense oran bu denli baskın olmaktan uzaktır, saptanan 20 varyanttan 13 tanesi missense olarak gözlenmiştir (65%). 6 varyant

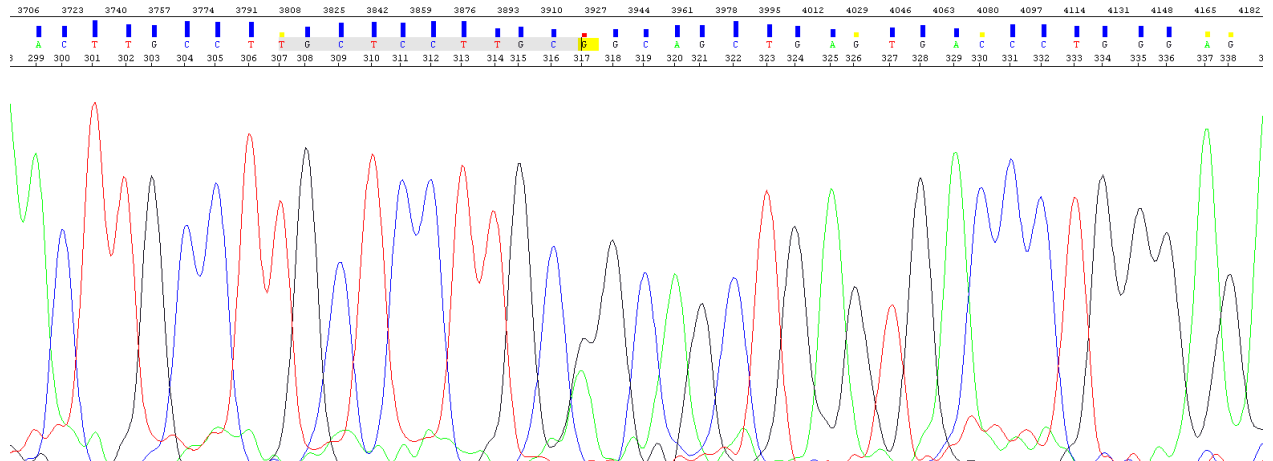
(30%) ise nonsense'tir. Nonsense varyantların bu ağırlığı ve tamamının patojenik oluşu dikkat çekicidir

TNFRSF13B varyantı saptanan hastalardan ilki, başvuru sırasındaki şikayeti tekrarlayan enfeksiyonlar olan 3 yaşında bir kız hastaydı. (Hasta 9). Hikâyesinde küçüklüğünden beri sıklıkla sinopulmoner enfeksiyonlar geçirdiği ve halsiz olduğu ifade edildi. Yapılan laboratuvar incelemelerinde anemi, lenfoproliferasyon ve IgG düşüklüğü saptandı. Bu şikâyetlerle primer immün yetmezlikler açısından genetik olarak incelenen hastada 2 adet TNFRSF13B missense varyantı saptandı. Bu varyantlardan ilki (c.214C>T, r72c, chr17:16852283 G->A), ekzon 3 içerisinde yer alan bir missense varyanttı. Bu varyantın maksimal popülasyon frekansı 0.013%'tü. In-siliko analizleri çelişkili sonuçlar veren bu varyanta dair yapılan literatür taramasında, daha önce 1 kez, hipogammaglobülinemi bulgusu ve ağır kombine immün yetmezlik kliniği izlenen bir adet hastada saptandığı izlendi. Buna bağlı olarak muhtemel patojenik olarak raporlandı (Kashimada A ve ark, 2019). Diğer missense varyant olan (chr17:16852132 C->T; c .365G>A ; p.R122Q), maksimal popülasyon frekansı 0.007% olan, in-siliko analiz verileri çelişkili olarak izlenen bir varyanttı. Bu varyant, daha önce literatürde tekrarlayan sinopulmoner enfeksiyonlar, sarılık, IgG ve IgM seviyelerinde düşüklük, ağır kombine immün yetmezlik tanısı ve erken başlangıçlı inflamatuvar bağırsak hastalığı kliniği olan 1 hastada raporlanmıştı (Fang YH ve ark, 2018). Bu veriler ışığında bu varyant da muhtemel patojenik olarak raporlandı, hem monoallel olarak hem de biallelik olarak kliniğe sebep olabileceği gösterilmiş ve fenotipik çeşitlilik gösterdiği bilinen TNFRSF13B geninde, açıklayıcı bulgular olan bir hastada, bu 2 muhtemel patojenik varyantın hastanın kliniğinden sorumlu olabileceği düşünüldü.

Bir diğer genotip fenotip ilişkilendirilmesi yapılacak TNFRSF13B varyantı, 57 yaş erkek hastada saptanmıştı, bu hasta ağır kombine immün yetmezlik tanısı ile tarafımıza yönlendirilmişti (hasta 17). Hikâyesinde, uzun süreli tinea pedis ve onikomikoz nedeniyle tedavi gördüğü, aynı zamanda sık enfeksiyon geçirdiği öğrenildi. Laboratuvar parametrelerine göre, IgA ve IgM seviyeleri düşüktü. Anemi ve lenfoproliferasyon da mevcuttu. Genetik analizde TNFRSF13B geninde 2 adet missense varyant saptandı. Bunlardan ilki (chr17:16843756 C->T ; c.515G>A ; C172Y), maksimum popülasyon frekansı 0.029% olan, ve in-siliko analizleri büyük oranda patojenik lehine bir varyanttı. Literatürde bu varyantın TNFRSF13B fonksiyonunu

bozduğunu gösteren fonksiyonel bir çalışmaya ek olarak (Fried AJ ve ark, 2011), ağır kombine immün yetmezlik ve IgA eksikliği fenotipleri görülen hastalarda da saptandığı belirlendi (Pulvirenti F ve ark, 2016). Hastada saptanan diğer varyant (chr17:16855788 C->G ; c.171G>C ; Q57H), maksimum popülasyon frekansı 0.072% olan, ve in-siliko analizleri çelişkili bir varyanttı. Literatür taramasında bu varyantın da daha önce beklenen klinik ile uyumlu bir hastada izlendiği görüldü (Almejún MB ve ark, 2012). Bu verilerin ışığında hastadaki varyantlar klinikle ilişkilendirildi.

TNFRSF13B araştırma grubunda olan bir diğer hasta, hipogamaglobülinemisi nedeniyle tarafımıza yönlendirilen 17 yaş erkek hasta idi (Hasta 20). Yapılan sorgusunda, tekrarlayan enfeksiyonlar ve 4 yıldır ayda 3-4 ile 3-4 ayda bir arasında değişen ishal atakları şikâyetleri olduğu, gaita tetkiklerinde etiyojiye yönelik bir veri tespit edilmediği öğrenildi. Aynı zamanda 1 sene önce başlangıçlı, kol ve bacakları tutan bir vitiligo tanısı mevcuttu. Laboratuvar parametrelerine göre IgA ve IgE seviyeleri düşüktü. Hastada monoalelik olarak saptanan TNFRSF13B varyantı (c.214C>T, r72c, chr17:16852283 G->A), ekzon 3 içerisinde yer alan bir missense varyanttı. Bu varyantın maksimal popülasyon frekansı 0.013%'tü. In-siliko analizleri çelişkili sonuçlar veren bu varyanta dair yapılan literatür taramasında, daha önce 1 kez, hipogammaglobülinemi bulgusu ve ağır kombine immün yetmezlik kliniği izlenen bir adet hastada saptandığı izlendi. Buna bağlı olarak muhtemel patojenik olarak raporlandı (Kashimada A ve ark, 2019), ve klinikle ilişkilendirildi. Yapılan ebeveyn çalışması sonrası varyant babada da monoalelik formda saptandı (Şekil 5.7). Daha önce bir yayında klinik ile ilişkilendirilmiş olan bu varyant, bu sonuçla birlikte benign yönünde değerlendirildi. Bu bulgular, varyantlara ait literatür verilerinin zenginleşmesi açısından önemli kabul edildi.



Şekil 5.7: Hastanın babasına ait (c.214C>T, r72c, chr17:16852283 G->A) pozisyonu sanger sekans analiz görüntüsü. Varyant pozisyonu sarı renk ile taranarak gösterilmiştir. Buna göre varyant babada monoalelik formda saptanmıştır

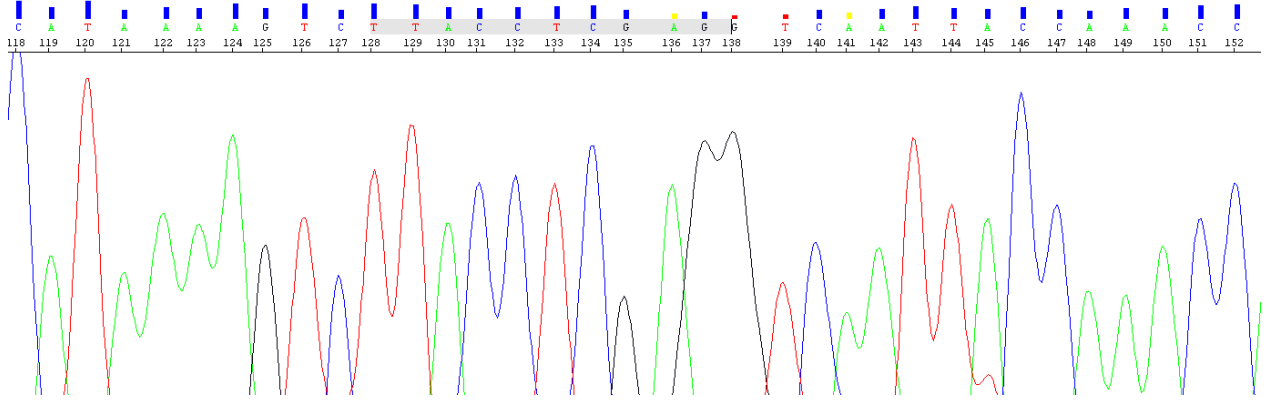
39 yaş erkek hasta, halsizlik, uyuklama, ağızda tekrarlayan yaralar, CMV enfeksiyonu, kilo kaybı ve tekrarlayan enfeksiyonlar şikâyetleriyle tarafımıza yönlendirildi (Hasta 29) Laboratuvar parametrelerine göre IgG, A, M, E düşüklüğü ve lenfopenisi vardı. Hastada missense bir TNFRSF13B varyantı saptandı (chr17:16843759 A->C ; c.512T>G ; L171R). Subpopülasyon maksimal frekansı 0.019% olan bu varyantın in-siliko analizleri büyük oranda patojenik lehine idi. Literatürde bu varyantın TNFRSF13B fonksiyonunu bozduğunu gösteren fonksiyonel bir çalışmaya ek olarak (Fried AJ ve ark, 2011), literatürdeki bir yayında, hem monoallelik hem de biallelik formda ağır kombine immünyetmezlik hastalarında saptandığı da gösterilmişti (Martínez-Pomar N ve ark, 2009). Tüm bu veriler ışığında varyant klinikten sorumlu olarak değerlendirildi.

Bu gruptaki bir diğer vaka, 11 yaş erkek hasta idi (hasta 34), ve tarafımıza bronşiolitis obliterans, ağır kombine immün yetmezlik ve hipogamaglobülinemi bulguları ile yönlendirilmişti. Laboratuvar parametrelerinde IgE seviyesi düşük saptandı. Yapılan genetik inceleme sonucu monoallelik formda bir missense TNFRSF13B varyantı saptandı (chr17:16852187 A->G; c.310T>C; C104R). Bu varyantın maksimum subpopülasyon frekansı 0.54%, ve in-siliko analizleri büyük oranda patojenik lehine idi. Literatür taramasına göre, bu varyant ağır kombine immün yetmezlik vaka grubunda kontrol grubuna göre daha sık saptanmıştır (Freiberger T ve ark., 2012). Bu veriler ışığında kliniği açıklayıcı olarak nitelendirildi. Yapılan ebeveyn analizinde, bu varyant babada da monoalelik olarak saptandı (Şekil 5.8). Daha önce vaka grubunda daha sık olduğu ifade edildiğinden patojenik lehine olan literatür verilerini, benign yönünde değiştirebileceğinden, bu bulgular önemli olarak değerlendirildi (figür 25).

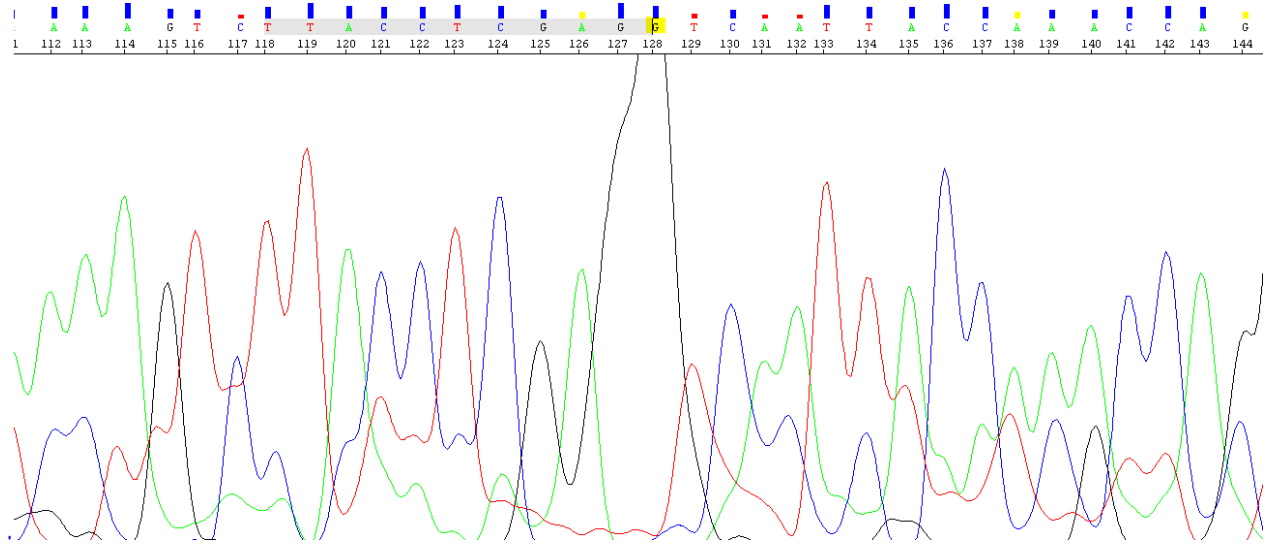


Birçok gende en sık izlenen varyant tipi missense iken, PRKCD geninde en çok karşılaşılan değişim tipi intronik olmuştur (75%). Clinvar ve uniprot gibi altın standart veritabanlarında bildirilen tanımlı varyantlar incelendiğinde, bugüne değin PRKCD geninde saptanan varyantların neredeyse tamamının fonksiyon kaybı yaratıcı varyantlar olduğu görülmektedir. İtron bölgesinde sık varyantla karşılaşılması ve literatür verisinde bu sözkonusu sapma, PRKCD geni değerlendirilirken intronik analizin önemine vurgu yapıcı niteliktedir.

STAT1 varyantları da araştırma grubunda önemli bir kısmı oluşturdu. Bu gen 7 fonksiyonel domaine sahiptir ve her birinin işlevi ayrıntılı olarak incelenmiştir. STAT1'de yüzden fazla varyant, tüm domainlere dağılmış şekilde tanımlanmıştır. Bu gende fonksiyon kaybı, fonksiyon kazanımı ve dominant negatif etki gibi farklı mekanizmalar patojenite oluşturabildiğinden, her bir mekanizmanın getirdiği klinik farklılıklar neticesinde geniş bir klinik fenotip spektrum sahibidir (Mizoguchi Y, Okada S., 2021). Araştırma grubunda 2 farklı hasta tartışıldı. Bunlardan ilki, 5 yaş erkek hasta (Hasta 1), geçirilmiş tüberküloz ve HHV ensefaliti öyküsü, epilepsi ve hipotiroidi bulguları ile tarafımıza yönlendirildi. Primer immün yetmezlik tanısı olduğu ve hipogamaglobülinemisi nedeniyle IVIG tedavisi uygulandığı öğrenildi. Hastaya bu nedenlerle yapılan genetik inceleme sonrası TNFRSF13B ve STAT1 genlerinde missense varyantlar tespit edildi. TNFRSF13B varyantının (chr17:16852187 A->G; c.310T>C; C104R) maksimum subpopülasyon frekansı 0.54%, ve in-siliko analizleri büyük oranda patojenik lehine idi. Literatür taramasına göre, bu varyant ağır kombine immün yetmezlik vaka grubunda kontrol grubuna göre daha sık saptanmıştır (Freiberger T ve ark., 2012). Bu veriler ışığında kliniği açıdan önemli kabul edildi, fakat hasta 34'de de saptanan bu varyant, bu hastanın babasında da izlendiğinden benign lehine idi. STAT1 geninde saptanan değişim ise (chr2-191849042 G>T ; c.1341C>A ; D447E) maksimal subpopülasyon frekansı 0.033% olan ve in-siliko analizleri çelişkili veriler sunan bir varyanttı. Yapılan literatür taramasında, daha önce raporlanmadığı izlendi. Hastadaki klinik bulgular ile sözkonusu varyantlar arasında genotip fenotip korelasyonu yapıldı. STAT1 geni için yapılan ebeveyn çalışması neticesinde bu varyant anne ve babada saptanmadı (Şekil 5.9 ve şekil 5.10). Üzerinde daha önce literatür verisi olmayan, klinik ile uyum gösteren ve de novo olarak saptanan böylesi bir varyant klinik açıdan açıklayıcı kabul edildi.



Şekil 5.9: Hasta 1 annesi (chr2-191849042 G>T ; c.1341C>A ; D447E) pozisyonuna ait sanger sekans görüntüsü. Varyant saptanmadı.



Şekil 5.10: Hasta 1 babası (chr2-191849042 G>T ; c.1341C>A ; D447E) pozisyonuna ait sanger sekans görüntüsü. Varyant saptanmadı

STAT1 açısından araştırılan bir diğer vaka, 17 yaş kız hasta (hasta 36) komplike tüberküloz öyküsü nedeniyle tarafımıza yönlendirilmişti. Yapılan sorgusunda laboratuvar parametreleri ve diğer immün sistem göstergelerinde net bir tanıya varılabilecek verileri olmadığı, bu nedenle primer immünyetmezlik tanısı ile takip edildiği öğrenildi. Primer immünyetmezlik etiyolojisinin araştırılması için değerlendirilmeye alınan hastada STAT1 geninde intronik bir delesyon saptandı (chr2-191849136 AAAG>A; c.1264-20\_1264-18delCTT). Bu varyant maksimal subpopülasyon frekansı 0.033% olan bir varyanttı. Yapılan literatür taramasında daha önce bildirilmediği görüldü. STAT1 geninde yaşanacak patojenik değişimlerin

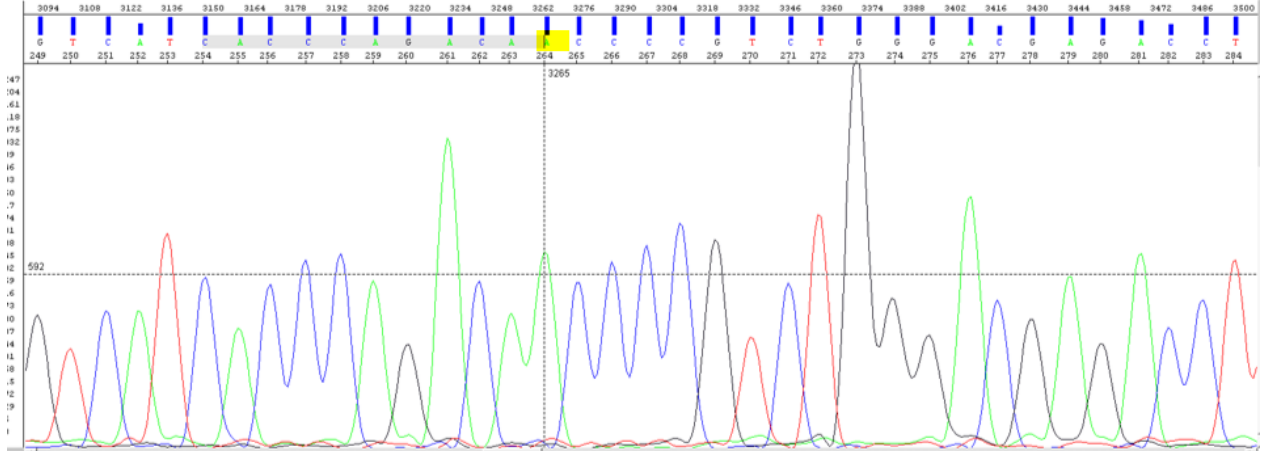
beklenen sonucu ile tam uyumlu klinik izlendiğinden klinik açısından değerli olarak değerlendirildi.

PRF1 varyantlarının büyük çoğunluğu önemi bilinmeyen varyant idi. Tanımlanmış varyantlarının büyük çoğunluğunu missense varyantlar oluşturan bir gende böyle bir sonuç beklenenle uyumlu olarak kabul edildi. Bu önemi belirsiz varyantlar arasından 2 tanesi, klinik verileri itibariyle dikkat çekici olduğundan araştırma grubuna dâhil edildi. Bunlardan biri, 7 yaş kız hasta, (hasta 10) bulantı, kusma ve ateş şikâyetleri, direkt coombs pozitifliği, otoimmün hemolitik anemi ve splenomegali bulguları ile tarafımıza yönlendirildi. Hasta bu bulguların değerlendirilmesi amacıyla araştırıldı. Yapılan genetik inceleme sonucunda PRF1 geninde monoalelik formda bir missense varyant tespit edildi (chr10-72358173 G>A; c.1304C>T; T435M). Bu varyant maksimal subpopülasyon frekansı 0.009% olan ve in-siliko analizleri patojenik lehine veriler veren bir varyanttı. Yapılan literatür taramasında bu varyantın daha önce hemofagositik lenfositosisi kliniği gösteren bir hastadasaptandığı ve bu hastada perforin ekspresyonunun olmadığı görüldü (Gadoury-Levesque V, ve ark, 2020). Tüm bu verilerin ışığında genotip fenotip korelasyonu için uygun görüldü.

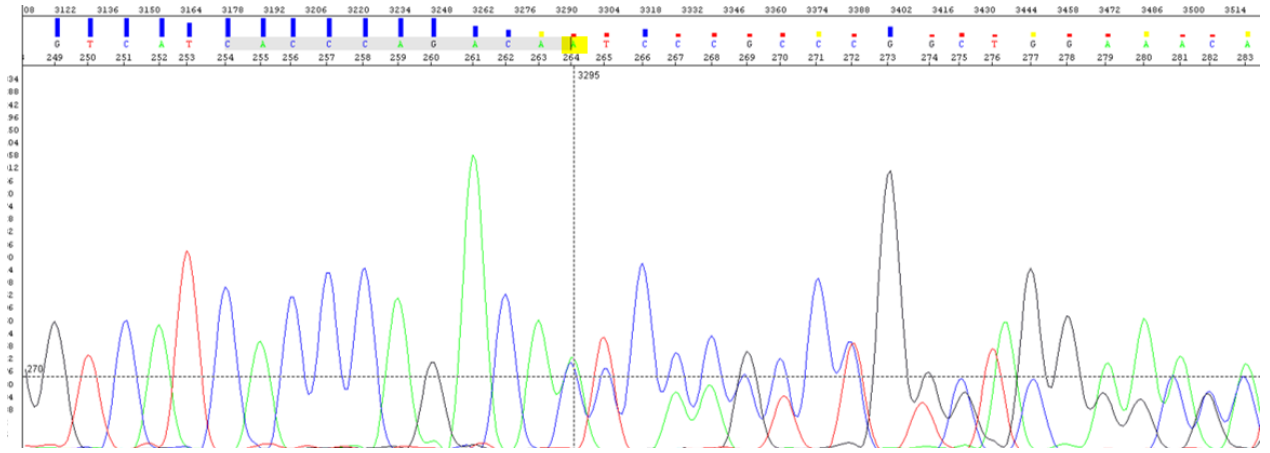
Bir diğer PRF1 varyantı saptanan hasta (hasta 43), 2 yaş erkek, net bir sebebe bağlanamayan tekrarlayan lenfadenopatiler şikâyeti ile tarafımıza yönlendirilmişti. Bu lenfadenopatilerin 3 cm boyuta kadar ulaştığı, kemik iliği incelemesinin normal sonuç verdiği ve NK hücre oranının belirgin düşük, double negatif T hücrelerin periferde saptandığı izlendi. Yapılan genetik analizde PRF1 geninde biallelik bir missense varyant saptandı (chr10-72360585 G>A ; c.74C>T ; T25I). Bu varyant daha önce popülasyon veritabanlarında izlenmemişti. In-siliko analizleri çelişkili idi. Yapılan literatür taramasında daha önce hiç bildirilmediği görüldü. Klinik ile uyumlu görüldüğünden klinik açıdan önemli olarak değerlendirildi.

UNC13D, 3 fonksiyonel domainden oluşan ve tüm baskın oranda tüm bu domainlerde dağılmış missense varyantların patojenite oluşturduğu bir gendir, araştırma grubuna bu gende saptanan, farklı varyant sınıflarına dahil 5 farklı önemi bilinmeyen varyant dahil edilmiştir, bunlar arasında literatürde az sayıda tanımlanmış frameshift varyantların da oluşu önemlidir. Bunlardan ilki, 1 yaş kız hasta (hasta 8), klinik hemofagositik lenfositosisi tanısı, hepatomegali ve pansitopeni bulguları ile tarafımıza yönlendirildi. Daha önce yapılmış kemik iliği biyopsisinde normoselüler kemik iliğinde zemininde matür granülositlerde azalma, eritroid

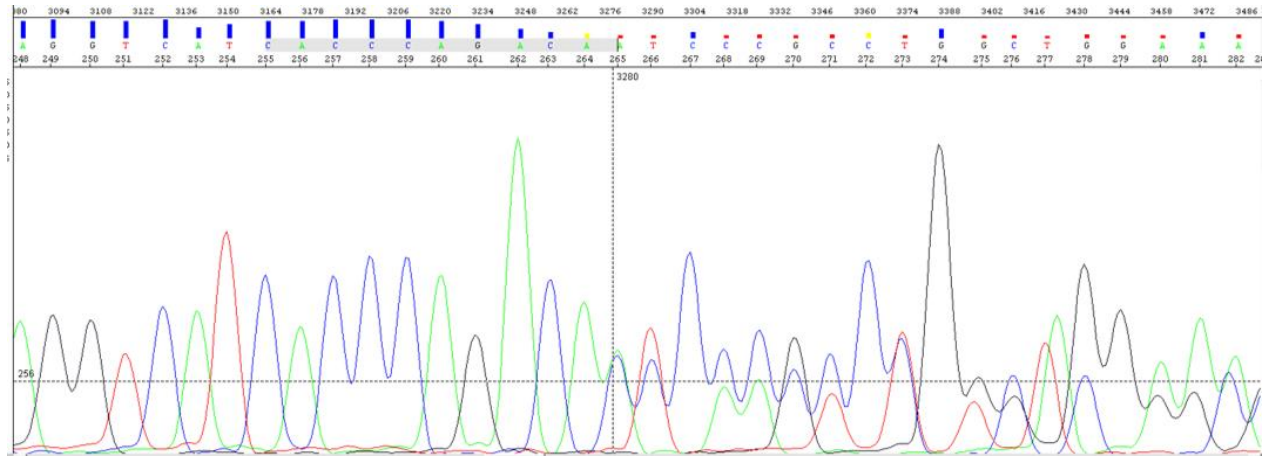
seri öncül hücrelerinde megaloblastik değişimler ve nükleer düzensizlikler görüldüğü, megakaryositlerin sayıca azaldığı ve bazılarının hipolobüle tek nüveli olduğu saptanmıştı. Buna ek olarak periferik kan yaymasında eritrositlerde anizositoz, dakrositler ve trombositopeni saptandığı, lökopeni görüldüğü, az sayıda tekli-ikili-üçlü kümeler oluşturan lenfositler izlendiği ifade edilmişti. Bunlara binaen diseritropoez ve dismegakaryopoez bulguları ile takip edildiği öğrenildi. Hastada bu bulgularını araştırılması amacıyla alındığı genetik analiz sonrası UNC13D geninde bialelik formda frameshiftte sebep olan bir delesyon varyantı saptandı (chr17-73838541 TTGAG>T ; c.538\_541delCTCA). Bu varyant, daha önce popülasyon veri tabanlarında saptanmamıştı. Yapılan literatür taramasında, bu değişimin daha önce bildirilmediği izlendi. Kliniğin bialelik olarak izlenen bu gen değişimi ile birebir uyumlu olması, fonksiyon kaybı mekanizmasının bu gende daha önce gösterilmiş olması ve frameshift yaratan bu varyantın gen fonksiyonun ileri derecede bozmasının beklenmesi gerçekleri göz önüne alınarak hastanın kliniğinden sorumlu olan genetik değişimin söz konusu varyant olduğuna kanaat getirildi. Yapılan ebeveyn çalışması sonrası, hastada bialelik olarak saptanan bu varyant anne ve babada monoalelik formda izlendi (Şekil 5.12 ve şekil 5.13). Literatürde otozomal resesif kalıtmı olduğu belirtilen UNC13D için, bu senaryo klasik bir taşıyıcılık öyküsü olarak nitelendirildi. Tüm bu verilerle birlikte varyant klinikten sorumlu olarak değerlendirildi.



Şekil 5.11: Hasta 8'in kendisine ait, (chr17-73838541 TTGAG>T ; c.538\_541delCTCA) pozisyonu sanger doğrulama görüntüsü. Varyant NGS analizini doğrular nitelikte, bialelik olarak izlenmiştir. Varyant pozisyonu sarı renk ile taranarak işaretlenmiştir.



Şekil 5.12: Hasta 8'in annesine ait (chr17-73838541 TTGAG>T ; c.538\_541delCTCA) pozisyonu sanger analiz görüntüsü. Varyant pozisyonu sarı renk ile taranarak işaretlenmiştir. Varyant annede, monoalelik olarak saptanmıştır.



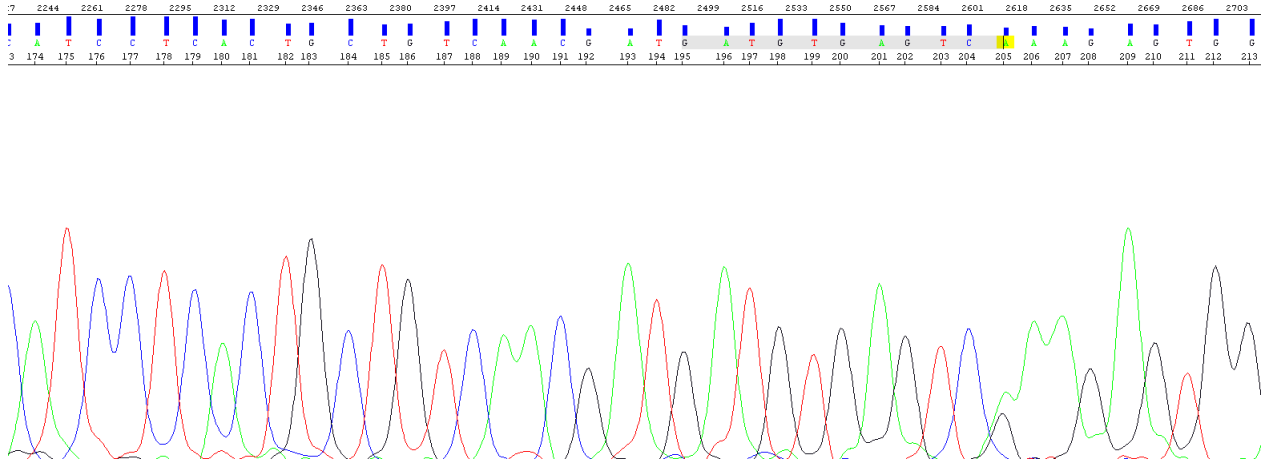
Şekil 5.13: Hasta 8'in babasına ait, (chr17-73838541 TTGAG>T ; c.538\_541delCTCA) pozisyonu sanger sekans analiz görüntüsü. Varyant pozisyonu 2 kesikli çizginin birleşim yeri itibariyle işaretlenmiştir. Varyant babada, monoalelik formda saptanmıştır.

Bir diğer UNC13D vakası (hasta 12) 2 yaş erkek hasta, ateşler, pansitopeni bulgusu ve klinik hemofagositik lenfhistiositozis tanısı ile birlikte tarafımıza yönlendirildi. Bu kliniğin etiyojisini araştırmak amacıyla yapılan genetik analiz sonrası, hastada UNC13D geninde bialelik durumda bir missense varyant saptandı (chr17-73824888 A>C ; c.3131T>G ; L1044R). Bu varyant, popülasyon veritabanlarında daha önce izlenmeyen, ve in-siliko analizlerinin tamamı patojenik lehine olan veri veren bir varyanttı. Yapılan literatür incelemesinde bu varyantın daha önce bir kez hemofagositik lenfhistiositozis kliniğine sahip bir hastada izlendiği ve raporlandığı

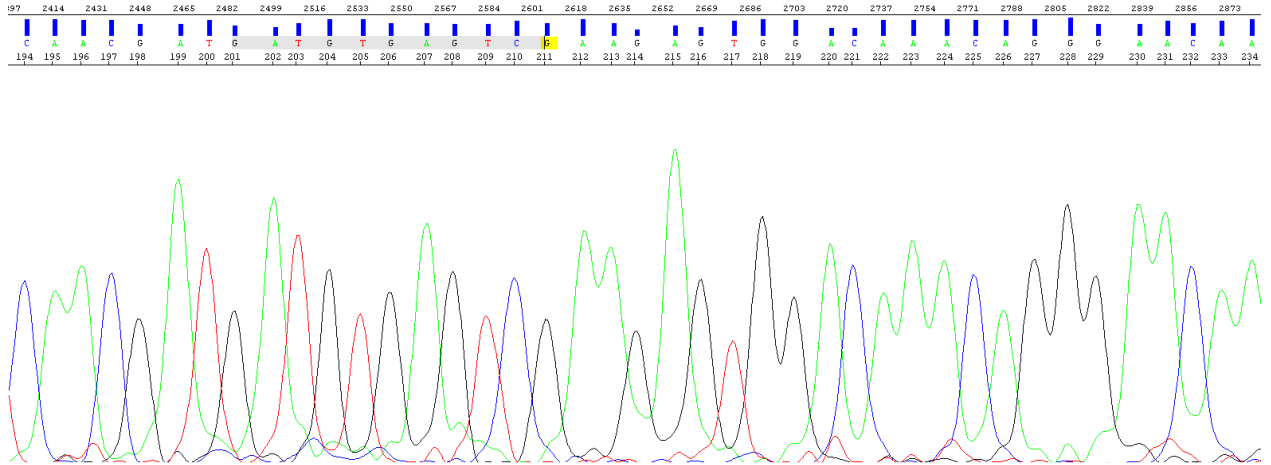
görüldü (Zur Stadt U ve ark, 2006). Tüm bu verilerin ışığında hastada bu genotiple fenotip arasında korelasyon kuruldu.

Bir başka vakada (hasta 13), 10 yaş erkek hasta, tekrarlayan yumuşak doku enfeksiyonları öyküsü, ve halihazırda devam eden inguinal bölgede lenfadenopatiler bulgularına ek olarak ateş ve tekrarlayan enfeksiyonlar şikayetleri ile tarafımıza yönlendirildi. Hastaya yapılan genetik inceleme sonrası UNC13D geninde monoalelik formda bir missense varyant saptandı (chr17-73836353 G>A ; c.811C>T ; P271S). Bu varyant popülasyon veritabanlarında maksimal subpopülasyon görülme sıklığı 0.216% olan ve in-siliko analizleri çelişkili verilere sahip bir varyant idi. Yapılan literatür taramasında bu varyantın daha önce 2 yayında bildirildiği, fakat verilerin çelişkili olduğu görüldü: Buna göre bir yayında hemofagositik lenfohistiyositoz kliniğine sahip bir hastada gösterilmişken (Müller ML ve ark, 2014), bir diğer yayında sağlıklı bir bireyde heterozigot olarak saptanmıştı (Aricò M ve ark, 2013). Literatürde üzerinde konsensüs oluşmamış böylesi bir varyantın, ateş ve tekrarlayan lenfadenopatilerle karakterize bir kliniğe sahip bir hastada görülmesi nedeniyle raporlanması uygun görüldü.

CASP10 geninde saptanan varyantlarla alakalı, araştırma grubundaki 2 hastada genotip fenotip ilişkilendirilmesi yapıldı. Bunlardan biri, 20 yaş erkek hasta (hasta 4) tekrarlayan lenfosit yükseklikleri ve primer immün yetmezlik kliniği ile tarafımıza yönlendirildi. Yapılan genetik analizi sonrası CASP10 geninde monoalelik formda bir missense varyant saptandı (chr2-202082361 G>A ; c.1466G>A ; R489Q). Bu varyantın maksimal subpopülasyon izlenme frekansı 0.013%, ve in-siliko analizleri çelişkili idi. Yapılan literatür taramasında, bu varyantın daha önce bildirilmediği görüldü. Önemi bilinmeyen varyant olarak değerlendirilen bu varyant, genotip fenotip korelasyonu açısından soru işareti olmakla birlikte lenfosit yükseklikleri verisi ile korelasyon gösterdiğinden çalışmayadâhil edilerek bu açıdan raporlandı. Yapılan ebeveyn çalışmasında aynı varyant annede de monoalelik formda saptandı (Şekil 5.14 ve şekil 5.15). Daha önce hakkında literatür verisi olmayan bu varyant hakkında benign lehine kanıt oluşturan bu durum, literatüre katkısı itibariyle değerli idi.



Şekil 5.14: Hasta 4'ün annesine ait (chr2-202082361 G>A ; c.1466G>A ; R489Q) pozisyonu sanger analiz görüntüsü. Varyant annede monoalelik olarak saptanmıştır. Varyant pozisyonu sarı renk ile taranarak işaretlenmiştir.



Şekil 5.15: Hasta 4'ün babasına ait (chr2-202082361 G>A ; c.1466G>A ; R489Q) pozisyonu sanger analiz görüntüsü. Varyant saptanmamıştır. Varyant pozisyonu sarı renk ile taranarak işaretlenmiştir.

Bir diğer CASP10 ilintili vakada, 8 yaş erkek hasta (Hasta 33) geçirilmiş hemolitik üremik sendrom, karın ağrıları, bulantı ve kusmalar, kanlı ishal, pyelonefrit, yüksek fekal kalprotektin, mezenterik lenfadenopatiler öyküleri nedeniyle tarafımıza yönlendirildi. Yapılan genetik inceleme sonrası CASP10 geninde monoalelik formda bir missense varyant saptandı (chr2-202057829 CAA>C ; c.567\_568del). Bu varyant, maksimal subpopülasyon frekansı

0.003% olan, frameshift ve fonksiyon kaybı yaratması beklenen bir varyanttı. Yapılan literatür incelemesine göre daha önce bildirilmemişti. Monoalelik olarak hastalık yaptığı gösterilmiş bir gende frameshiftte sebep olan bir varyantın hastalık yapıcı etkisi beklendiği ve klinikle uyum gösterdiğinden genotip-fenotip korelasyonu açısından uyumlu olarak değerlendirildi.

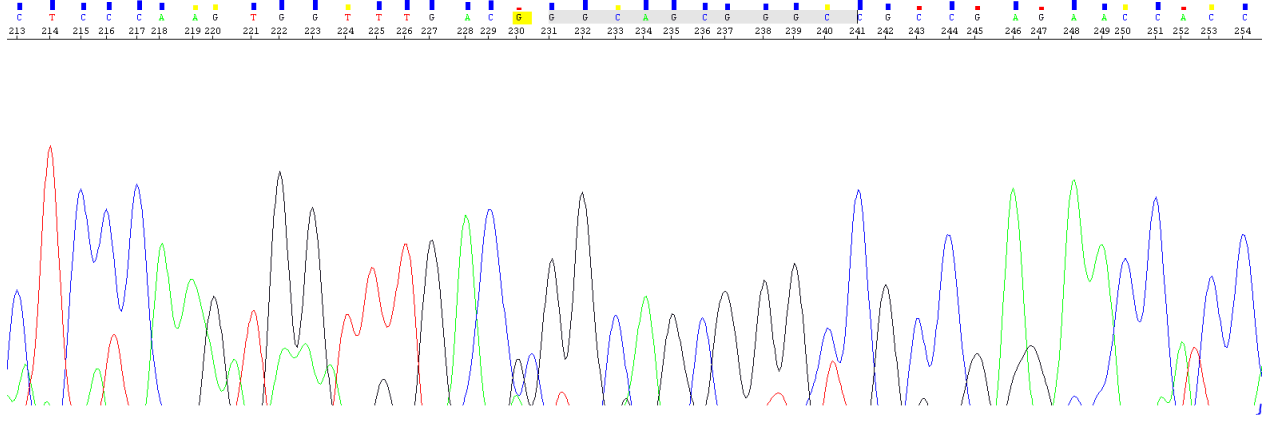
3 farklı vakada NCF2 gen varyantları tartışıldı. Bunlardan ilki, 2 yaş erkek hasta (hasta 7), damar yolu açılan yerlerde gelişen abseler ve nekrozitan enterokolit bulguları ile tarafımıza yönlendirildi. Yapılan genetik inceleme sonrası NCF2 geninde monoalelik formda bir missense varyant saptandı (chr1-183532666 T>A ; c.1081A>T ; T361S). Bu varyant maksimal subpopülasyon frekansı 0.259% olan ve in-siliko analizleri çelişkili verilen veren bir varyanttı. Yapılan literatür taramasında bu varyantın daha önce bir yayında azalmış reaktif oksijen ürün tepkisi ile ilişkilendirildiği görüldü (Denson LA, ve ark, 2018). Kalıtım patterni otozomal resesif olarak gösterilen bir gende monoalelik olarak saptanmasına rağmen kliniğin bazı parçalarını içerdiği ve fonksiyonel olarak da protein işlevini etkilediği gösterildiğinden, özellikle monoalelik durumdaki etkisinin anlaşılması için değerli bir veri olarak kabul edilerek rapora dâhil edildi.

Bir diğer NCF2 vakasında 51 yaş erkek hasta, (Hasta 22) uzun senelerdir vücudunda tekrarlayan abseler öyküsü ile tarafımıza yönlendirildi. Yapılan genetik analiz sonrası NCF2 geninde monoalelik formda bir missense varyant saptandı (chr1-183532666 T>A ; c.737G>A ; R246H). Bu varyant maksimal subpopülasyon frekansı 0.006% olan ve in-siliko analizleri büyük oranda patojenik lehine olan bir varyanttı. Yapılan literatür taramasında daha önce raporlanmadığı görüldü. Klinikle örtüşmesi nedeniyle özellikle monoallelik NCF2 varyantlarının durumunun anlaşılması açısından önemli kabul edildi.

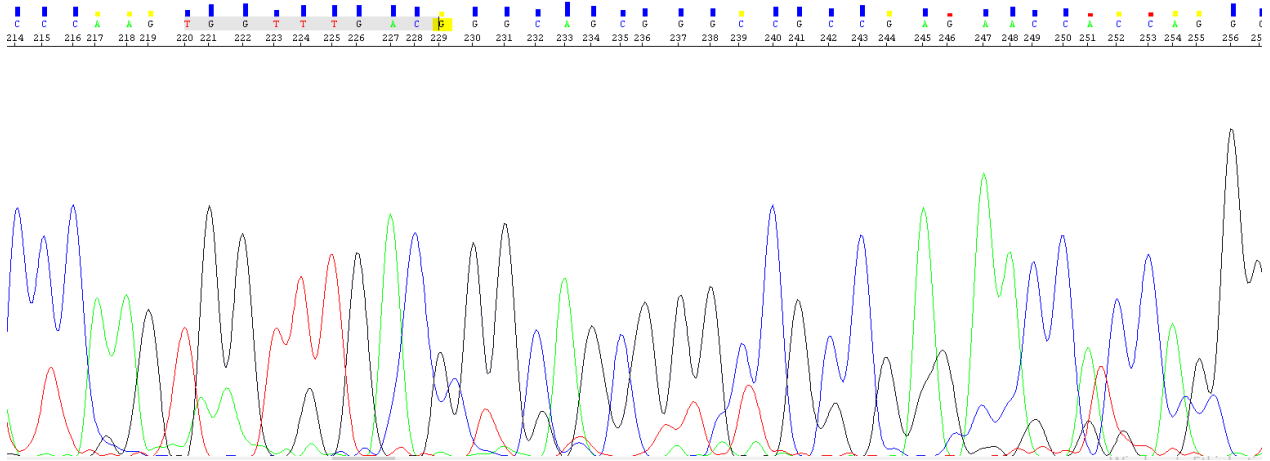
Araştırma grubundaki üçüncü ve son NCF2 vakasında ise 6 yaş kız hasta (Hasta 46), 2 aylıkken başlayan ve şimdiye değin spontan olarak 4 kez tekrar eden boyun abseleri öyküsü ve tırnak enfeksiyonları nedeniyle tarafımıza yönlendirildi. Genetik inceleme sonrası, NCF2 geninde bialelik formda bir frameshift varyant tespit edildi (chr1-183532426 G>GT; c. 1193dupA ; D398EX). Bu varyant, daha önce popülasyon veritabanlarında hiç izlenmeyen bir varyanttı. Yapılan literatür incelemesinde bu varyantın daha önce bildirilmediği izlendi. Fonksiyon kaybı mekanizmasının hastalık ile ilişkilendirildiği bir gende, bialelik olarak frameshift varyantın hastada izlenmesi nedeniyle, klinik ile uyumlu olarak değerlendirildi.

NCF1 geni 2 hastada tartişılmıştı, bunlardan biri; 12 yaş kız hasta (hasta 24) ailesel akdeniz ateşi tanısı, kronik etiyolojisi belirlenememiş dermatit, kolon ülserleri ve tip 1 diabetes mellitus tanıları ile tarafımıza yönlendirildi. Yapılan genetik inceleme sonucu NCF1 geninde monoalelik formda bir missense varyant tespit edildi (chr7-74197342 C>T ; c.512C>T; S171L). Bu varyant maksimal subpopölasyon frekansı 0.115% olan, ve in-siliko analizleri çelişkili veriler veren bir varyanttı. Yapılan literatür taramasına göre bu varyant daha önce raporlanmamıştı. Kolon ülserleri ve dermatit tablosu NCF1 geninin patojenik varyantlarının ortaya çıkardığı tablo ile kısmi örtüşme gösterdiğinden, bilinen kalıtım kalıbı otozomal resesif olan bu gendeki monoalelik varyantların klinik ile ilişkisine ışık tutması muhtemel olduğundan bu varyant analize dâhil edildi ve klinik olarak önemli kabul edildi.

İkincisi ise (hasta 31) 3 yaş erkek hasta, 3 aylıkken başlayan ve şimdiye değin birçok kez tekrar eden anal abseler ve tüm vücuda yaygın etiyolojisi tam belirlenememiş dermatit öyküleri nedeniyle tarafımıza yönlendirildi. Genetik inceleme sonrası NCF1 geninde monoalelik formda bir missense varyant saptandı (chr7-74193620 G>A ; c.247G>A; G83R). Bu varyant maksimal subpopölasyon frekansı sınırdaki (1.355%) olan ve in-siliko analizleri çelişkili sonuçlar veren bir varyanttı. Yapılan literatür taramasında bu varyantın farklı 2 yayında saptandığı izlendi. Bunlardan ilkinde, fonksiyonel lökosit analizi çalışması sonrası kronik dermatomitozla ilişkisi görölmüştü (Constantino-Silva RN ve ark, 2020). Diğer bir yayında ise kronik granölomatoz hastalık fenotipi gösteren bir hastada bialelik durumda saptanmıştı (Kutukçuler N, ve ark, 2019). Hastanın bulguları NCF1 geninin patojenik varyantlarının ortaya çıkardığı tablo ile örtüşme gösterdiğinden, bilinen kalıtım kalıbı otozomal resesif olan bu gendeki monoalelik varyantların klinik ile ilişkisine ışık tutması muhtemel olduğundan bu varyant analize dâhil edildi ve klinik olarak önemli kabul edildi. Yapılan ebeveyn çalışması sonrası, varyant anne ve babada saptanmadı (şekil 5.16 ve şekil 5.17). Yukarıdaki verilere ek olarak de novo oluşu ile birlikte, patojenik ve kliniği açıklayıcı olarak değerlendirildi.



Şekil 5.16: Hasta 31'in annesine ait (chr7-74193620 G>A ; c.247G>A; G83R) pozisyonu sanger analizi görüntüsü. Varyanta denk gelen pozisyon sarı renk ile taranarak işaretlenmiştir. Buna göre varyant annede saptanmamıştır



Şekil 5.17: Hasta 31'in babasına ait (chr7-74193620 G>A ; c.247G>A; G83R) pozisyonu sanger sekans görüntüsü. Varyanta denk gelen pozisyon sarı renk ile taranarak gösterilmiştir. Buna göre varyant babada saptanmamıştır.

### Birer vakada görülen muhtelif diğer varyantlar

14 yaş kız hasta (hasta 11) primer immün yetmezlik tanısı ile tarafımıza yönlendirildi. Laboratuvar parametrelerine göre nötropeni olan hasta değerlendirmeye alındı. Genetik inceleme sonucu konjenital nötropeni kliniği ile ilişkilendirilmiş USB1 geninde

monoalelikformda bir varyant tespit edildi (chr16-58048245 C>T ; c.503+15C>T). Bu intronik varyant, daha önce popülasyon veritabanlarında hiç izlenmeyen, ve splice-skorları düşük bir varyant idi. Popülasyonda hiç izlenmemesine paralel olarak literatürde de daha önce bildirilmemişti. Klinik ile uyum göz önünde bulundurularak, gelecek vaka raporlarıyla muhtemel kümülasyonun varyantın genotip fenotip ilişkisine ışık tutabileceği göz önünde bulundurularak raporlandı.

2 yaş erkek hasta, kütanöz enfeksiyonlar (uyluk ve genital bölgede) ve nötropeni öyküleri ile birlikte primer immün yetmezlik tanısı ile tarafımıza yönlendirildi (Hasta 15) Yapılan genetik inceleme sonrası hastada, nötropeni ve kütanöz enfeksiyonlarla klinik ilişkisi gösterilmiş PGM3 geninde monoalelik formda bir in-frame delesyon saptandı (chr6-83900713 TAATAGCACC>T ; c.10\_18del). Bu varyant daha önce popülasyon veritabanlarında izlenmemiş bir varyant idi. Yapılan literatür taramasına göre daha önce bildirilmemişti. Bu gende daha önce hastalık yapıcı birçok farklı in-frame delesyonun bildirilmiş olması, bu in-frame delesyonun 3 aminoasitlik bir kayba yol açması ve protein fonksiyonunu etkilemesi beklenmesi ve klinik ile uyum göz önüne alınarak, bu varyant klinik açıdan değerli kabul edildi.

16 yaş erkek hasta, osteomyelit ve tekrarlayan ağır enfeksiyonlar öyküleri ile tarafımıza yönlendirildi (hasta 21). Genetik değerlendirme sonrası hastada, kronik granüloamatöz hastalık, osteomyelit ve tekrarlayan enfeksiyonlar ile ilişkilendirilmiş CYBA geninde bir missense varyant tespit edildi (chr16-88714487 G>A ; c.94C>T ; R32C). Bu varyant maksimal subpopülasyon frekansı 0.003% olan ve in-siliko analizleri büyük oranda patojenik lehine olan bir varyant idi. Yapılan literatür taramasına göre bu değişim daha önce bildirilmemişti. Hastanın kliniği ile örtüşme göstermesi nedeniyle, bilinen kalıtım kalıbı otozomal resesif olan bu gendeki monoalelik varyantların klinik ile ilişkisine ışık tutması muhtemel olduğundan bu varyant analize dâhil edildi ve klinik olarak önemli kabul edildi.

Bir diğer vakada 8 yaş erkek hasta (hasta 28) lenfadenopatiler ve Hodgkin lenfoma öyküsü ile birlikte tarafımıza yönlendirildi. Yapılan genetik analiz sonrası erken çocukluk döneminde lenfoma gelişimi, otoimmün sitopeniler ve lenfadenopatiler klinikleri ile karakterize otoimmün lenfoproliferatif sendrom kliniği ile ilişkisi gösterilmiş olan FAS geninde monoalelik

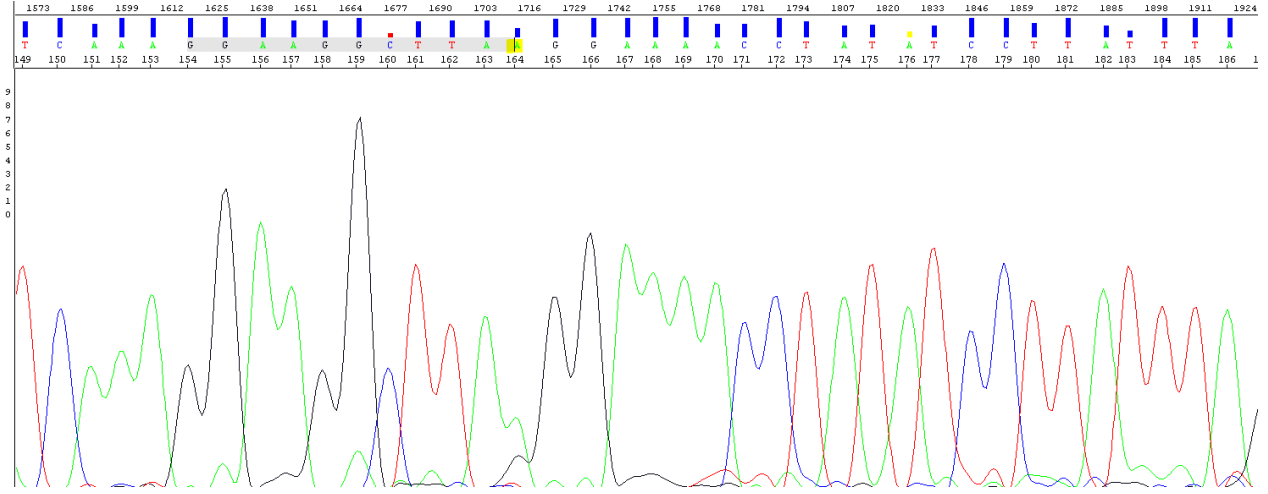
formda bir missense varyant saptandı (chr10-90762880 C>A ; c.125C>A ; T42N). Bu varyant daha önce popülasyon veritabanlarında izlenmemiş ve in-siliko analizleri çelişkili olan bir varyanttı. Literatür taramasına göre bu değişim daha önce bildirilmemişti. Klinik uyum ile birlikte, kalıtım kalıbı otozomal dominant olarak belirtilen bir gende saptanan bu varyantın klinik açıdan değerli olduğu düşünüldü.

Bir başka tartışılan varyant için, (hasta 30) 6 yaş erkek hasta ailesel akdeniz ateşi, hipogamaglobülinemi ve çoklu allerjiler ile seyreden primer immün yetmezlik tanısı ile tarafımıza yönlendirildi. Yapılan genetik inceleme sonrası hastada; tekrarlayan enfeksiyonlar, hipogamaglobülinemi, otoimmün bulgular ve lenfoproliferasyon klinikleri ile ilişkilendirilmiş olan CTLA4 geninde monoalelik formda missense varyant saptandı (chr2-204732688 G>A ; c.23G>A ; R8Q). Bu varyant maksimal subpopülasyon frekansı 0.06 olan, ve in siliko analizleri çelişkili sonuçlanan bir değişimdi. Yapılan literatür incelemesinde daha önce bildirilmediği saptandı. Klinikle kısmi uyumla birlikte hastalığın monoalelik varyantlarla ortaya çıkabildiğinin gösterilmesi göz önünde bulundurularak raporlanması anlamlı kabul edildi.

3 yaş kız hasta (hasta 32) tekrarlayan enfeksiyonlar, mukozal ülserler, abseler ve hipogamaglobülinemi bulgularıyla birlikte aldığı primer immün yetmezlik tanısı sebebiyle tarafımıza yönlendirildi. Yapılan genetik inceleme sonrası hastanın, siklik nötropeni ve ağır konjenital nötropeni klinikleri ile ilişkilendirilmiş ELANE geninde 14 nükleotidlik bir delesyonun sebep olduğu monoalelik bir frameshift varyant saptandı ( chr19-853260 AGAAACGTCCGCGCG>A ; c.225\_238del). Bu varyant popülasyon veritabanlarına göre daha önce hiç izlenmemiş bir varyanttı, bununla paralel olarak literatürde de daha önce bildirilmemişti. Hastada nötropeni saptanmamasına rağmen, fonksiyon kaybının temel patojenik mekanizma olduğu bilinen bir gende frameshift delesyon saptanması ve kliniğin de immün yetmezlikle net bir şekilde örtüşmesi nedeniyle, ELANE varyantlarının fenotipik çeşitliliğine vurgu yapması muhtemel olduğu düşünülerek raporlanmaya dâhil edildi.

Bir diğer vakada 3 yaş erkek hasta, (Hasta 35) nötropeni ve sık üst solunum yolu enfeksiyonları nedeniyle aldığı primer immün yetmezlik tanısının etiyojisinin araştırılması amacıyla tarafımıza yönlendirildi. Yapılan genetik analiz sonrası hastada ağır konjenital

nötropeni kliniği ile ilişkilendirilmiş VPS45 geninde monoalelik formda bir missense varyant saptandı (chr1-150065699 A>G ; c.1448A>G ; K483R). Bu varyant popülasyon veritabanlarına göre daha önce izlenmemiştir ve in-siliko analizleri çelişkili sonuçlar vermektedir. Yapılan literatür taraması sonrası bununla uyumlu olarak daha önce bildirilmediği görüldü. Klinikle net örtüşme göstermesi, varyantın proteinin önemli bir domain içerisinde olması ve missense değişimlerin bu hastalığın patogenezinde gösterilmiş yegâne mekanizma olması bilgileri göz önünde bulundurularak bu varyant ile klinik arasında ilişki kuruldu ve raporlandı. Yapılan ebeveyn çalışması sonrası (sadece annede mümkün olmuştur), varyant annede de monoalelik formda saptandı (şekil 5.18). Benign lehine kanıt oluşturan bu veri, literatüre katkısı itibarıyla değerli kabul edildi.



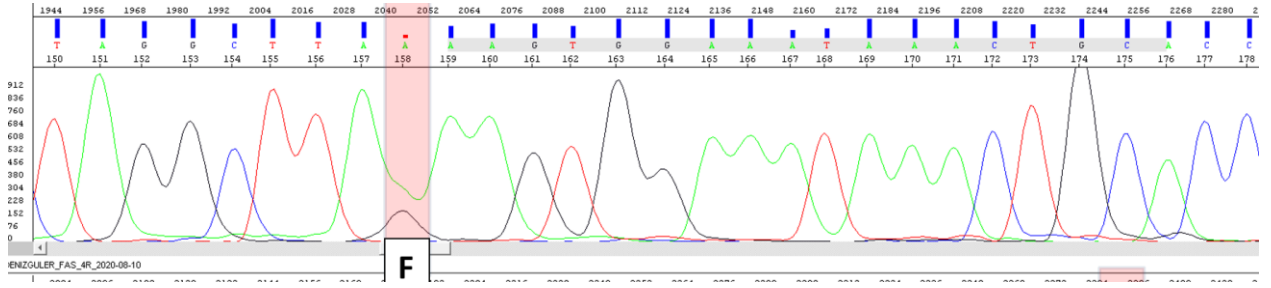
Şekil 5.18: Hasta 35'in annesine ait sanger sekans analizi görüntüsü. Varyant pozisyonu sarı renk ile taranarak işaretlenmiştir. Buna göre varyant hastanın annesine monoalelik olarak saptanmıştır.

Araştırma grubundaki bir diğer genotip fenotip ilişkilendirilmesi, (Hasta 38) 2 yaş kız hastada yapıldı, bu hasta nötropeni, tekrarlayan enfeksiyonlar, abseler, aralıklı tekrarlayan ateşler bulguları ile immünyetmezlik tanısı alması nedeniyle tarafımıza yönlendirilmişti. Yapılan genetik analizde, ağır konjenital nötropeni kliniği ile ilişkilendirilmiş olan JAGN1 geninde bialelik formda bir missense varyant tespit edildi (chr3-9932457 T>G; c.51T>G ; F17L). Bu varyant popülasyon veritabanlarında daha önce hiç izlenmemiştir, in-siliko analizleri çelişkiliydi ve popülasyonda hiç izlenmemesinden dolayı literatürde de raporlanmamıştır. Genin kalıtım kalıbının otozomal resesif olarak bildirildiği bir hastalıkta, bu değişimin hastada bialelik olarak

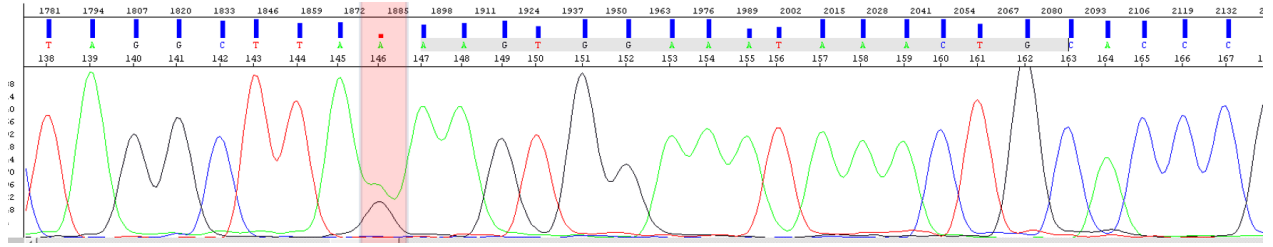
saptanması, varyantın proteinin fonksiyonel bir parçasına denk gelecek şekilde konumlanmış olması ve missense değişimlerin bu genin patogeneğinde tanımlanmış en iyi mekanizma olması gerçekleri göz önünde bulundurularak bu varyant ile klinik arasında ilişki kuruldu ve raporlandı.

12 yaş kız hasta (Hasta 44) tekrarlayan karın ağrıları ve ishaller, iştahsızlık, sinirli olma hali ve vücudunda tekrarlayan şişlikler şikâyetleri ve iktiyosis ile tarafımıza yönlendirildi. Yapılan genetik incelemesinde, Crohn hastalığına yatkınlık, Blau ve Yao sendromları ile ilişkilendirilen NOD2 geninde monoalelik bir frameshift varyant tespit edildi (chr16-50765706 C>CA ; c.3019dup). Bu varyant popülasyon veritabanlarında daha önce hiç izlenmemiş bir varyanttı. Yapılan literatür incelemesinde daha önce bir kez Crohn hastalığı fenotipi gösteren bir bireyde, bir diğer varyant ile birlikte izlendiği saptandı (Frade-Proud'Hon-Clerc S, ve ark, 2019). Crohn hastalığı ile otozomal dominant olarak, diğer sendromlar ile multifaktöriyel düzeyde ilişkisi gösterilmiş bu gende monoalelik olarak saptanan bu varyantın, hastanın bazı bulgularının açıklayıcı nitelikte olması, frameshift yaratarak fonksiyon kaybı oluşturması beklenmesi ve bu gende daha önce fonksiyon kaybı mekanizması ile klinik arasında ilişki kurulması verileri göz önünde bulundurularak bu varyant klinik olarak anlamlı kabul edildi.

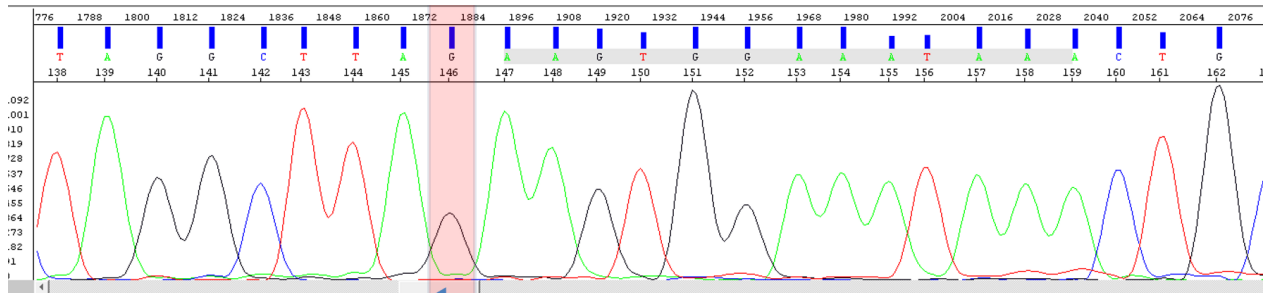
4 yaş kız hasta, (Hasta 48) kombine immün yetmezlik ve karaciğer disfonksiyonu bulguları ile birlikte genetik açıdan değerlendirme istemiyle tarafımıza yönlendirildi. Hastada FAS geninde monoalelik formda bir missense varyant saptandı (chr10-90768651 G>A; c.340G>A, E114K). Bu gende daha önce missense varyantların patojenik olabildiği gösterilmiş olması, sözkonusu varyantın insiliko analizlerinin tamamının patojenite lehine olması, maksimum subpopülasyon görülme sıklığının 0.003% olarak bildirilmesi ve daha önce literatürde genotip genotip ilişkisi olmamasına ek olarak, hastada yapılan analizde kliniği açıklayıcı başka bir varyant bulunmaması nedeniyle incelemeye alındı. Yapılan ebeveyn sanger çalışması sonrası, probandda monoallelik olarak saptanan bu varyantın probandın annesinde de monoallelik olarak bulunduğu, annenin herhangi bir şikâyetinin olmadığı izlendi (şekil 5.10). Varyantın benign oluşu lehine olan bu veriler literatüre katkı sunması açısından raporlandı. Yapılan genetik analiz sonrası varyant babada saptanmadı, fakat annede de monoalelik formda saptandı. Benign lehine kanıt oluşturan bu veri, literatüre katkısı itibariyle değerli kabul edildi.



Şekil 5.20: Hasta 48'in kendisine ait, (chr10-90768651 G>A; c.340G>A, E114K) pozisyonu sanger sekans analizi görüntüsü. Varyant NGS analizini doğrular nitelikte, monoalelik olarak saptanmıştır. Varyant pozisyonu kırmızı ile taranarak işaretlenmiştir.



Şekil 5.21: Hasta 48'in annesine ait, (chr10-90768651 G>A; c.340G>A, E114K) pozisyonu sanger sekans analizi görüntüsü. Varyant, monoalelik olarak saptanmıştır. Varyant pozisyonu kırmızı ile taranarak işaretlenmiştir.



Şekil 5.22: Hasta 48'in babasına ait, (chr10-90768651 G>A; c.340G>A, E114K) pozisyonu sanger sekans analizi görüntüsü. Varyant, saptanmamıştır. Varyanta denk gelen pozisyon kırmızı ile taranarak işaretlenmiştir.

Bu çalışmadan elde edilen bilgilerle: 1) Primer immün yetmezlikler, yalnızca çocuk yaş grubunda değil, yetişkinlerde de akılda tutulması gereken önemli bir klinik spektrumdur. 2) Her iki cinsiyette de görülmekle birlikte, tıpkı diğer toplumların verilerinde olduğu gibi ülkemizde de erkek bireylerde daha sık izlenmiştir. 3) En sık başvuru şikâyeti, beklendiği üzere tekrarlayan enfeksiyonlar olmakla birlikte, ilk bakışta primer immün yetmezlik çağrıştırmayacak tekrarlayan ateş, ishal veya egzema gibi bulgular da başvuru şikâyeti olarak azımsanmayacak derecede sık izlendiğinden, klinik pratikte bu açıdan dikkatli yaklaşılması gerektiği aşikârdır. 4) DOCK8, LRBA, ATM, TNFRSF13B ve PRF1 genleri, prevalans itibariyle en sık karşılaşılan genler olduğundan, primer immün yetmezliklerin tanısında kullanılması planlanan gen setleri içerisinde yer almaları tanı başarısı konusunda kritik önem arz edebilir. 5) Önemi bilinmeyen varyantlar, koordinat düzleminde yerleştiği yer, in-siliko analizleri ve aile segregasyon çalışmaları ile değerlendirildiğinde, sözkonusu varyantlar hakkında benign veya patojenik lehine bilgi sahibi olunabilir. 6) Genetik açıdan, çoğu gende missense varyantların baskın olduğu görüldüğünden bu varyantlara özellikle dikkat edilmelidir, bunun yanında TNFRSF13B geninde frameshift ve PRKCD genlerinde intronik varyantlara özellikle ehemmiyet verilmelidir. 7) Kapsamlı analiz ve standartlara uygun değerlendirme, eklenecek segregasyon çalışması gibi süreçlerle, önemli bir tanı başarısı sağlayabilir.

Elde edilen tüm bu istatistiksel bilgiler, karşılaştırmalı analizler, genotip fenotip eşleştirmeler ve segregasyon verileri ile birlikte primer immünyetmezliklerin moleküler doğası daha iyi anlaşılabilir. Özellikle ülkemiz özelinde şimdiye değin gerek epidemiolojik gerek etiyolojik gerekse moleküler olarak yeterli literatür birikiminin oluşmadığı böylesi önemli bir klinik spektrumda, sözkonusu veriler klinisyen hekimler için arttırılmış bir içgörü kazandırmanın yanında, gelecek çalışmalara yol gösterici olabilir.

## 6. KAYNAKLAR

Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S, Baker DL, Baker A. *Cellular and Molecular Immunology*. Ninth edition. Elsevier; 2018.

Abolhassani H, Chou J, Bainter W, et al. Clinical, immunologic and genetic spectrum of 696 patients with combined immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol*. 2018;141:1450-1458.

Aghamohammadi A, Mohammadinejad P, Abolhassani H, Mirminachi B, Movahedi M, Gharagozlou M, Parvaneh N, Zeiaee V, Mirsaeed-Ghazi B, Chavoushzadeh Z, Mahdaviani A, Mansouri M, Yousefzadegan S, Sharifi B, Zandieh F, Hedayat E, Nadjafi A, Sherkat R, Shakerian B, Sadeghi-Shabestari M, Hosseini RF, Jabbari-Azad F, Ahanchian H, Behmanesh F, Zandkarimi M, Shirkani A, Cheraghi T, Fayezi A, Mohammadzadeh I, Amin R, Aleyasin S, Moghtaderi M, Ghaffari J, Arshi S, Javahertrash N, Nabavi M, Bemanian MH, Shafiei A, Kalantari N, Ahmadiafshar A, Khazaei HA, Atarod L, Rezaei N. Primary immunodeficiency disorders in Iran: update and new insights from the third report of the national registry. *J Clin Immunol*. 2014 May;34(4):478-90. doi: 10.1007/s10875-014-0001-z. PMID: 24659230.

Aguet M, Dembić Z, Merlin G. Molecular cloning and expression of the human interferon-gamma receptor. *Cell*. 1988 Oct 21;55(2):273-80. doi: 10.1016/0092-8674(88)90050-5. PMID: 2971451.

Alderson MR, Tough TW, Davis-Smith T, Braddy S, Falk B, Schooley KA, Goodwin RG, Smith CA, Ramsdell F, Lynch DH. Fas ligand mediates activation-induced cell death in human T lymphocytes. *J Exp Med*. 1995 Jan 1;181(1):71-7. doi: 10.1084/jem.181.1.71. PMID: 7528780; PMCID: PMC2191813.

Al-Herz W, Chou J, Delmonte OM, Massaad MJ, Bainter W, Castagnoli R, Klein C, Bryceson YT, Geha RS, Notarangelo LD. Comprehensive Genetic Results for Primary Immunodeficiency Disorders in a Highly Consanguineous Population. *Front Immunol.* 2019 Jan 15;9:3146. doi: 10.3389/fimmu.2018.03146. PMID: 30697212; PMCID: PMC6340972.

Almejún MB, Sajaroff E, Galicchio M, Oleastro M, Bernasconi A, Zelazko M, Danielian S. Immunological characteristics and two novel mutations in TACI in a cohort of 28 pediatric patients with common variable immunodeficiency. *J Clin Immunol.* 2012 Feb;32(1):89-97. doi: 10.1007/s10875-011-9613-8. Epub 2011 Nov 11. PMID: 22076597.

Al-Mousa H, Abouelhoda M, Monies DM, Al-Tassan N, Al-Ghoniaim A, Al-Saud B, Al-Dhekri H, Arnaut R, Al-Muhsen S, Ades N, Elshorbagi S, Al Gazlan S, Sheikh F, Dasouki M, El-Baik L, Elamin T, Jaber A, Kheir O, El-Kalioby M, Subhani S, Al Idrissi E, Al-Zahrani M, Alhelale M, Alnader N, Al-Otaibi A, Kattan R, Al Abdelrahman K, Al Breacan MM, Bin Humaid FS, Wakil SM, Alzayer F, Al-Dusery H, Faquih T, Al-Hissi S, Meyer BF, Hawwari A. Unbiased targeted next-generation sequencing molecular approach for primary immunodeficiency diseases. *J Allergy Clin Immunol.* 2016 Jun;137(6):1780-1787. doi: 10.1016/j.jaci.2015.12.1310. Epub 2016 Feb 23. PMID: 26915675.

Alper, O.M. et al . 2004. Consanguineous marriages in the province of Antalya, Turkey. *Ann. Genet.* 47: 129–138.

Aradhya S, Woffendin H, Jakins T, Bardaro T, Esposito T, Smahi A, Shaw C, Levy M, Munnich A, D'Urso M, Lewis RA, Kenwrick S, Nelson DL. A recurrent deletion in the ubiquitously expressed NEMO (IKK-gamma) gene accounts for the vast majority of incontinentia pigmenti mutations. *Hum Mol Genet.* 2001 Sep 15;10(19):2171-9. doi: 10.1093/hmg/10.19.2171. PMID: 11590134.

Aricò M, Boggio E, Cetica V, Melensi M, Orilieri E, Clemente N, Cappellano G, Buttini S, Soluri MF, Comi C, Dufour C, Pende D, Dianzani I, Ellis SR, Pagliano S, Marcenaro S, Ramenghi U, Chiocchetti A, Dianzani U. Variations of the UNC13D gene in patients with autoimmune lymphoproliferative syndrome. *PLoS One.* 2013 Jul 1;8(7):e68045. doi: 10.1371/journal.pone.0068045. PMID: 23840885; PMCID: PMC3698121.

Arredondo-Vega FX, Santisteban I, Kelly S, Schlossman CM, Umetsu DT, Hershfield MS. Correct splicing despite mutation of the invariant first nucleotide of a 5' splice site: a possible basis for disparate clinical phenotypes in siblings with adenosine deaminase deficiency. *Am J Hum Genet.* 1994 May;54(5):820-30. PMID: 8178821; PMCID: PMC1918276.

Aulak KS, Davis AE 3rd, Donaldson VH, Harrison RA. Chymotrypsin inhibitory activity of normal C1-inhibitor and a P1 Arg to His mutant: evidence for the presence of overlapping reactive centers. *Protein Sci.* 1993 May;2(5):727-32. doi: 10.1002/pro.5560020504. PMID: 8495195; PMCID: PMC2142501.

Banka S, Newman WG, Ozgöl RK, Dursun A. Mutations in the G6PC3 gene cause Dursun syndrome. *Am J Med Genet A.* 2010 Oct;152A(10):2609-11. doi: 10.1002/ajmg.a.33615. PMID: 20799326.

Behjati S, Tarpey PS. What is next generation sequencing? *Arch Dis Child Educ Pract Ed.* 2013 Dec;98(6):236-8. doi: 10.1136/archdischild-2013-304340. Epub 2013 Aug 28. PMID: 23986538; PMCID: PMC3841808.

Belaouaj A, Kim KS, Shapiro SD. Degradation of outer membrane protein A in *Escherichia coli* killing by neutrophil elastase. *Science.* 2000 Aug 18;289(5482):1185-8. doi: 10.1126/science.289.5482.1185. PMID: 10947984.

Ben-Chetrit E, Gattorno M, Gul A, Kastner DL, Lachmann HJ, Touitou I, Ruperto N; Paediatric Rheumatology International Trials Organisation (PRINTO) and the AIDs Delphi study participants. Consensus proposal for taxonomy and definition of the autoinflammatory diseases (AIDs): a Delphi study. *Ann Rheum Dis.* 2018 Nov;77(11):1558-15. doi: 10.1136/annrheumdis-2017-212515. Epub 2018 Aug 12. PMID: 30100561.

Bettelli E, Dastrange M, Oukka M. Foxp3 interacts with nuclear factor of activated T cells and NF-kappa B to repress cytokine gene expression and effector functions of T helper cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Apr 5;102(14):5138-43. doi: 10.1073/pnas.0501675102. Epub 2005 Mar 24. PMID: 15790681; PMCID: PMC555574.

Béziat V, Li J, Lin JX, Ma CS, Li P, Bousfiha A, Pellier I, Zoghi S, Baris S, Keles S, Gray P, Du N, Wang Y, Zerbib Y, Lévy R, Leclercq T, About F, Lim AI, Rao G, Payne K, Pelham SJ, Avery DT, Deenick EK, Pillay B, Chou J, Guery R, Belkadi A, Guérin A, Migaud M,

Rattina V, Ailal F, Benhsaien I, Bouaziz M, Habib T, Chaussabel D, Marr N, El-Benna J, Grimbacher B, Wargon O, Bustamante J, Boisson B, Müller-Fleckenstein I, Fleckenstein B, Chandesris MO, Titeux M, Fraitag S, Alyanakian MA, Leruez-Ville M, Picard C, Meyts I, Di Santo JP, Hovnanian A, Somer A, Ozen A, Rezaei N, Chatila TA, Abel L, Leonard WJ, Tangye SG, Puel A, Casanova JL. A recessive form of hyper-IgE syndrome by disruption of ZNF341-dependent STAT3 transcription and activity. *Sci Immunol*. 2018 Jun 15;3(24):eaat4956. doi: 10.1126/sciimmunol.aat4956. PMID: 29907691; PMCID: PMC6141026.

Biggs CM, Keles S, Chatila TA. DOCK8 deficiency: Insights into pathophysiology, clinical features and management. *Clin Immunol*. 2017 Aug;181:75-82. doi: 10.1016/j.clim.2017.06.003. Epub 2017 Jun 15. PMID: 28625885; PMCID: PMC5555255.

Bogunovic D, Byun M, Durfee LA, Abhyankar A, Sanal O, Mansouri D, Salem S, Radovanovic I, Grant AV, Adimi P, Mansouri N, Okada S, Bryant VL, Kong XF, Kreins A, Velez MM, Boisson B, Khalilzadeh S, Ozcelik U, Darazam IA, Schoggins JW, Rice CM, Al-Muhsen S, Behr M, Vogt G, Puel A, Bustamante J, Gros P, Huibregtse JM, Abel L, Boisson-Dupuis S, Casanova JL. Mycobacterial disease and impaired IFN- $\gamma$  immunity in humans with inherited ISG15 deficiency. *Science*. 2012 Sep 28;337(6102):1684-8. doi: 10.1126/science.1224026. Epub 2012 Aug 2. PMID: 22859821; PMCID: PMC3507439.

Booth C, Romano R, Roncarolo MG, Thrasher AJ. Gene therapy for primary immunodeficiency. *Hum Mol Genet*. 2019 Oct 1;28(R1):R15-R23. doi: 10.1093/hmg/ddz170. PMID: 31297531.

Bousfiha AA, Jeddane L, El Hafidi N, Benajiba N, Rada N, El Bakkouri J, Kili A, Benmiloud S, Benhsaien I, Faiz I, Maataoui O, Aadam Z, Aglaguel A, Baba LA, Jouhadi Z, Abilkassem R, Bouskraoui M, Hida M, Najib J, Alj HS, Ailal F; Moroccan Society for Primary Immunodeficiencies (MSPID). First report on the Moroccan registry of primary immunodeficiencies: 15 years of experience (1998-2012). *J Clin Immunol*. 2014 May;34(4):459-68. doi: 10.1007/s10875-014-0005-8. Epub 2014 Mar 12. PMID: 24619622.

Boztug K, Järvinen PM, Salzer E, Racek T, Mönch S, Garncarz W, Gertz EM, Schäffer AA, Antonopoulos A, Haslam SM, Schieck L, Puchałka J, Diestelhorst J, Appaswamy G, Lescoeur B, Giambruno R, Bigenzahn JW, Elling U, Pfeifer D, Conde CD, Albert MH, Welte K,

Brandes G, Sherkat R, van der Werff Ten Bosch J, Rezaei N, Etzioni A, Bellanné-Chantelot C, Superti-Furga G, Penninger JM, Bennett KL, von Blume J, Dell A, Donadieu J, Klein C. JAGN1 deficiency causes aberrant myeloid cell homeostasis and congenital neutropenia. *Nat Genet.* 2014 Sep;46(9):1021-7. doi: 10.1038/ng.3069. Epub 2014 Aug 17. PMID: 25129144; PMCID: PMC4829076.,

Calzoni E, Platt CD, Keles S, Kuehn HS, Beaussant-Cohen S, Zhang Y, Pazmandi J, Lanzi G, Pala F, Tahiat A, Artac H, Heredia RJ, Dmytrus J, Reisli I, Uygun V, Uygun D, Bingol A, Basaran E, Djenouhat K, Benhalla N, Bendahmane C, Emiroglu M, Kirchhausen T, Pasham M, Jones J, Wallace JG, Zheng L, Boisson B, Porta F, Rosenzweig SD, Su H, Giliani S, Lenardo M, Geha RS, Boztug K, Chou J, Notarangelo LD. F-BAR domain only protein 1 (FCHO1) deficiency is a novel cause of combined immune deficiency in human subjects. *J Allergy Clin Immunol.* 2019 Jun;143(6):2317-2321.e12. doi: 10.1016/j.jaci.2019.02.014. Epub 2019 Feb 26. PMID: 30822429; PMCID: PMC6701838.

Campbell GR, To RK, Hanna J, Spector SA. SARS-CoV-2, SARS-CoV-1, and HIV-1 derived ssRNA sequences activate the NLRP3 inflammasome in human macrophages through a non-classical pathway. *iScience.* 2021 Apr 23;24(4):102295. doi: 10.1016/j.isci.2021.102295. Epub 2021 Mar 9. PMID: 33718825; PMCID: PMC7939994.

Carney, J. P., Maser, R. S., Olivares, H., Davis, E. M., Le Beau, M., Yates, J. R., III, Hays, L., Morgan, W. F., Petrini, J. H. J. The hMre11/hRad50 protein complex and Nijmegen breakage syndrome: linkage of double-strand break repair to the cellular DNA damage response. *Cell* 93: 477-486, 1998.

Casanova JL. Severe infectious diseases of childhood as monogenic inborn errors of immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015 Dec 22;112(51):E7128-37. doi: 10.1073/pnas.1521651112. Epub 2015 Nov 30. PMID: 26621750; PMCID: PMC4697435.

Cascino I, Fiucci G, Papoff G, Ruberti G. Three functional soluble forms of the human apoptosis-inducing Fas molecule are produced by alternative splicing. *J Immunol.* 1995 Mar 15;154(6):2706-13. PMID: 7533181.

Castigli E, Wilson SA, Garibyan L, Rachid R, Bonilla F, Schneider L, Geha RS. TACI is mutant in common variable immunodeficiency and IgA deficiency. *Nat Genet.* 2005 Aug;37(8):829-34. doi: 10.1038/ng1601. Epub 2005 Jul 10. PMID: 16007086.

Cepika AM, Sato Y, Liu JM, Uyeda MJ, Bacchetta R, Roncarolo MG. Tregopathies: Monogenic diseases resulting in regulatory T-cell deficiency. *J Allergy Clin Immunol.* 2018 Dec;142(6):1679-1695. doi: 10.1016/j.jaci.2018.10.026. PMID: 30527062.

CEREDIH: The French PID study group. The French national registry of primary immunodeficiency diseases. *Clin Immunol.* 2010 May;135(2):264-72. doi: 10.1016/j.clim.2010.02.021. PMID: 20399414.

Chan AY, Torgerson TR. Primary immune regulatory disorders: a growing universe of immune dysregulation. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2020 Dec;20(6):582-590. doi: 10.1097/ACI.0000000000000689. PMID: 32941318; PMCID: PMC7769114.

Chandrakasan S, Chandra S, Davila Saldana BJ, Torgerson TR, Buchbinder D. Primary immune regulatory disorders for the pediatric hematologist and oncologist: A case-based review. *Pediatr Blood Cancer.* 2019 May;66(5):e27619. doi: 10.1002/pbc.27619. Epub 2019 Jan 29. PMID: 30697957.

Cheng HC, Skehan BM, Campellone KG, Leong JM, Rosen MK. Structural mechanism of WASP activation by the enterohaemorrhagic *E. coli* effector EspF(U). *Nature.* 2008 Aug 21;454(7207):1009-13. doi: 10.1038/nature07160. Epub 2008 Jul 23. PMID: 18650809; PMCID: PMC2719906.,

Chieffo C, Garvey N, Gong W, Roe B, Zhang G, Silver L, Emanuel BS, Budarf ML. Isolation and characterization of a gene from the DiGeorge chromosomal region homologous to the mouse *Tbx1* gene. *Genomics.* 1997 Aug 1;43(3):267-77. doi: 10.1006/geno.1997.4829. PMID: 9268629.

Cifaldi C, Brigida I, Barzaghi F, Zoccolillo M, Ferradini V, Petricone D, Cicalese MP, Lazarevic D, Cittaro D, Omrani M, Attardi E, Conti F, Scarselli A, Chiriaco M, Di Cesare S, Licciardi F, Davide M, Ferrua F, Canessa C, Pignata C, Giliani S, Ferrari S, Fousteri G, Barera G, Merli P, Palma P, Cesaro S, Gattorno M, Trizzino A, Moschese V, Chini L, Villa A, Azzari C, Finocchi A, Locatelli F, Rossi P, Sangiuolo F, Aiuti A, Cancrini C, Di Matteo G. Targeted NGS

Platforms for Genetic Screening and Gene Discovery in Primary Immunodeficiencies. *Front Immunol.* 2019 Apr 11;10:316. doi: 10.3389/fimmu.2019.00316. Erratum in: *Front Immunol.* 2019 May 31;10:1184. PMID: 31031743; PMCID: PMC6470723.

Constantino-Silva RN, Perazzio SF, Weidebach NA, Grumach AS. Functional Defect of Neutrophils Causing Dermatophytosis: Case Report. *J Fungi (Basel).* 2020 Oct 22;6(4):238. doi: 10.3390/jof6040238. PMID: 33105551; PMCID: PMC7712173.

Cooke GS, Campbell SJ, Sillah J, Gustafson P, Bah B, Sirugo G, Bennett S, McAdam KP, Sow O, Lienhardt C, Hill AV. Polymorphism within the interferon-gamma/receptor complex is associated with pulmonary tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006 Aug 1;174(3):339-43. doi: 10.1164/rccm.200601-088OC. Epub 2006 May 11. PMID: 16690980.

Cool DE, MacGillivray RT. Characterization of the human blood coagulation factor XII gene. Intron/exon gene organization and analysis of the 5'-flanking region. *J Biol Chem.* 1987 Oct 5;262(28):13662-73. PMID: 2888762.

Corneo, B., Moshous, D., Gungor, T., Wulffraat, N., Philippet, P., Le Deist, F., Fischer, A., de Villartay, J.-P. Identical mutations in RAG1 or RAG2 genes leading to defective V(D)J recombinase activity can cause either T-B-severe combined immune deficiency or Omenn syndrome. *Blood* 97: 2772-2776, 2001.

Dale DC, Boxer L, Liles WC. The phagocytes: neutrophils and monocytes. *Blood.* 2008 Aug 15;112(4):935-45. doi: 10.1182/blood-2007-12-077917. PMID: 18684880.

Dale DC, Person RE, Bolyard AA, Aprikyan AG, Bos C, Bonilla MA, Boxer LA, Kannourakis G, Zeidler C, Welte K, Benson KF, Horwitz M. Mutations in the gene encoding neutrophil elastase in congenital and cyclic neutropenia. *Blood.* 2000 Oct 1;96(7):2317-22. PMID: 11001877.

Davis AE 3rd, Bissler JJ, Cicardi M. Mutations in the C1 inhibitor gene that result in hereditary angioneurotic edema. *Behring Inst Mitt.* 1993 Dec;(93):313-20. PMID: 8172583.

de Boer M, Hilarius-Stokman PM, Hossle JP, Verhoeven AJ, Graf N, Kenney RT, Seger R, Roos D. Autosomal recessive chronic granulomatous disease with absence of the 67-kD

cytosolic NADPH oxidase component: identification of mutation and detection of carriers. *Blood*. 1994 Jan 15;83(2):531-6. PMID: 8286749.

De Ravin, S. S., Cowen, E. W., Zarembek, K. A., Whiting-Theobald, N. L., Kuhns, D. B., Sandler, N. G., Douek, D. C., Pittaluga, S., Poliani, P. L., Lee, Y. N., Notarangelo, L. D., Wang, L., Alt, F. W., Kang, E. M., Milner, J. D., Niemela, J. E., Fontana-Penn, M., Sinal, S. H., Malech, H. L. Hypomorphic Rag mutations can cause destructive midline granulomatous disease. *Blood* 116: 1263-1271, 2010.

de Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med*. 1991 Nov 1;174(5):1209-20. doi: 10.1084/jem.174.5.1209. PMID: 1940799; PMCID: PMC2119001.

Del-Rey MJ, Manzanares J, Bosque A, Aguiló JI, Gómez-Rial J, Roldan E, Serrano A, Anel A, Paz-Artal E, Allende LM. Autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS) in a patient with a new germline Fas gene mutation. *Immunobiology*. 2007;212(2):73-83. doi: 10.1016/j.imbio.2006.12.003. Epub 2007 Jan 19. PMID: 17336828.

Denson LA, Jurickova I, Karns R, Shaw KA, Cutler DJ, Okou DT, Dodd A, Quinn K, Mondal K, Aronow BJ, Haberman Y, Linn A, Price A, Bezold R, Lake K, Jackson K, Walters TD, Griffiths A, Baldassano RN, Noe JD, Hyams JS, Crandall WV, Kirschner BS, Heyman MB, Snapper S, Guthery SL, Dubinsky MC, Leleiko NS, Otley AR, Xavier RJ, Stevens C, Daly MJ, Zwick ME, Kugathasan S. Clinical and Genomic Correlates of Neutrophil Reactive Oxygen Species Production in Pediatric Patients With Crohn's Disease. *Gastroenterology*. 2018 Jun;154(8):2097-2110. doi: 10.1053/j.gastro.2018.02.016. Epub 2018 Feb 15. PMID: 29454792; PMCID: PMC5985211.

Devriendt K, Kim AS, Mathijs G, Frints SG, Schwartz M, Van Den Oord JJ, Verhoef GE, Boogaerts MA, Fryns JP, You D, Rosen MK, Vandenberghe P. Constitutively activating mutation in WASP causes X-linked severe congenital neutropenia. *Nat Genet*. 2001 Mar;27(3):313-7. doi: 10.1038/85886. PMID: 11242115.

Dewald G, Bork K. Missense mutations in the coagulation factor XII (Hageman factor) gene in hereditary angioedema with normal C1 inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006 May 19;343(4):1286-9. doi: 10.1016/j.bbrc.2006.03.092. PMID: 16638441.

Dietrich J, Hou X, Wegener AM, Geisler C. CD3 gamma contains a phosphoserine-dependent di-leucine motif involved in down-regulation of the T cell receptor. *EMBO J*. 1994 May 1;13(9):2156-66. doi: 10.1002/j.1460-2075.1994.tb06492.x. PMID: 8187769; PMCID: PMC395069.

Dinauer MC, Pierce EA, Bruns GA, Curnutte JT, Orkin SH. Human neutrophil cytochrome b light chain (p22-phox). Gene structure, chromosomal location, and mutations in cytochrome-negative autosomal recessive chronic granulomatous disease. *J Clin Invest*. 1990 Nov;86(5):1729-37. doi: 10.1172/JCI114898. PMID: 2243141; PMCID: PMC296926.

Dong F, Hoefsloot LH, Schelen AM, Broeders CA, Meijer Y, Veerman AJ, Touw IP, Löwenberg B. Identification of a nonsense mutation in the granulocyte-colony-stimulating factor receptor in severe congenital neutropenia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 May 10;91(10):4480-4. doi: 10.1073/pnas.91.10.4480. PMID: 7514305; PMCID: PMC43809.

Dorman SE, Holland SM. Mutation in the signal-transducing chain of the interferon-gamma receptor and susceptibility to mycobacterial infection. *J Clin Invest*. 1998 Jun 1;101(11):2364-9. doi: 10.1172/JCI2901. PMID: 9616207; PMCID: PMC508825.

Duan Z, Li FQ, Wechsler J, Meade-White K, Williams K, Benson KF, Horwitz M. A novel notch protein, N2N, targeted by neutrophil elastase and implicated in hereditary neutropenia. *Mol Cell Biol*. 2004 Jan;24(1):58-70. doi: 10.1128/mcb.24.1.58-70.2004. PMID: 14673143; PMCID: PMC303357.

Dunne A, Carpenter S, Brikos C, Gray P, Strelow A, Wesche H, Morrice N, O'Neill LA. IRAK1 and IRAK4 promote phosphorylation, ubiquitination, and degradation of MyD88 adaptor-like (Mal). *J Biol Chem*. 2010 Jun 11;285(24):18276-82. doi: 10.1074/jbc.M109.098137. Epub 2010 Apr 16. Erratum in: *J Biol Chem*. 2016 Nov 18;291(47):24802. PMID: 20400509; PMCID: PMC2881752.

Dupuis S, Dargemont C, Fieschi C, Thomassin N, Rosenzweig S, Harris J, Holland SM, Schreiber RD, Casanova JL. Impairment of mycobacterial but not viral immunity by a germline

human STAT1 mutation. *Science*. 2001 Jul 13;293(5528):300-3. doi: 10.1126/science.1061154. PMID: 11452125.

Dupuis S, Jouanguy E, Al-Hajjar S, Fieschi C, Al-Mohsen IZ, Al-Jumaah S, Yang K, Chapgier A, Eidenschenk C, Eid P, Al Ghonaium A, Tufenkeji H, Frayha H, Al-Gazlan S, Al-Rayes H, Schreiber RD, Gresser I, Casanova JL. Impaired response to interferon-alpha/beta and lethal viral disease in human STAT1 deficiency. *Nat Genet*. 2003 Mar;33(3):388-91. doi: 10.1038/ng1097. Epub 2003 Feb 18. PMID: 12590259.

Eken A, Cansever M, Okus FZ, Erdem S, Nain E, Azizoglu ZB, Haliloglu Y, Karakukcu M, Ozcan A, Devecioglu O, Aksu G, Arikan Ayyildiz Z, Topal E, Karakoc Aydiner E, Kiykim A, Metin A, Cipe F, Kaya A, Artac H, Reisli I, Guner SN, Uygun V, Karasu G, Dönmez Altuntas H, Canatan H, Oukka M, Ozen A, Chatila TA, Keles S, Baris S, Unal E, Patiroglu T. ILC3 deficiency and generalized ILC abnormalities in DOCK8-deficient patients. *Allergy*. 2020 Apr;75(4):921-932. doi: 10.1111/all.14081. Epub 2019 Oct 31. PMID: 31596517; PMCID: PMC7141948.

Ellis NA, Groden J, Ye TZ, Straughen J, Lennon DJ, Ciocci S, Proytcheva M, German J. The Bloom's syndrome gene product is homologous to RecQ helicases. *Cell*. 1995 Nov 17;83(4):655-66. doi: 10.1016/0092-8674(95)90105-1. PMID: 7585968.

Erman B, Bilic I, Hirschmugl T, Salzer E, Boztug H, Sanal Ö, Çağdaş Ayvaz D, Tezcan I, Boztug K. Investigation of Genetic Defects in Severe Combined Immunodeficiency Patients from Turkey by Targeted Sequencing. *Scand J Immunol*. 2017 Mar;85(3):227-234. doi: 10.1111/sji.12523. PMID: 28109013.

Fang YH, Luo YY, Yu JD, Lou JG, Chen J. Phenotypic and genotypic characterization of inflammatory bowel disease in children under six years of age in China. *World J Gastroenterol*. 2018 Mar 7;24(9):1035-1045. doi: 10.3748/wjg.v24.i9.1035. PMID: 29531467; PMCID: PMC5840468.

Feldmann J, Callebaut I, Raposo G, Certain S, Bacq D, Dumont C, Lambert N, Ouachée-Chardin M, Chedeville G, Tamary H, Minard-Colin V, Vilmer E, Blanche S, Le Deist F, Fischer A, de Saint Basile G. Munc13-4 is essential for cytolytic granules fusion and is mutated in a form

of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis (FHL3). *Cell*. 2003 Nov 14;115(4):461-73. doi: 10.1016/s0092-8674(03)00855-9. PMID: 14622600.

Fischer A, Notarangelo LD, Neven B, Cavazzana M, Puck JM. Severe combined immunodeficiencies and related disorders. *Nat Rev Dis Primers*. 2015 Oct 29;1:15061. doi: 10.1038/nrdp.2015.61. PMID: 27189259.

Fischer A, Rausell A. Primary immunodeficiencies suggest redundancy within the human immune system. *Sci Immunol*. 2016;1(6). <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aah5861>.

Flanagan, S. E., Haapaniemi, E., Russell, M. A., Caswell, R., Allen, H. L., De Franco, E., McDonald, T. J., Rajala, H., Ramelius, A., Barton, J., Heiskanen, K., Heiskanen-Kosma, T., and 11 others. Activating germline mutations in STAT3 cause early-onset multi-organ autoimmune disease. *Nature Genet*. 46: 812-814, 2014.

Frade-Proud'Hon-Clerc S, Smol T, Frenois F, Sand O, Vaillant E, Dhennin V, Bonnefond A, Froguel P, Fumery M, Guillon-Dellac N, Gower-Rousseau C, Vasseur F. A Novel Rare Missense Variation of the NOD2 Gene: Evidences of Implication in Crohn's Disease. *Int J Mol Sci*. 2019 Feb 15;20(4):835. doi: 10.3390/ijms20040835. PMID: 30769939; PMCID: PMC6412783.

Frei K, Lins H, Schwerdel C, Fontana A. Antigen presentation in the central nervous system. The inhibitory effect of IL-10 on MHC class II expression and production of cytokines depends on the inducing signals and the type of cell analyzed. *J Immunol*. 1994 Mar 15;152(6):2720-8. PMID: 8144879.

Freiberger T, Ravčuková B, Grodecká L, Pikulová Z, Stikarovská D, Pešák S, Kuklínek P, Jarkovský J, Salzer U, Litzman J. Sequence variants of the TNFRSF13B gene in Czech CVID and IgAD patients in the context of other populations. *Hum Immunol*. 2012 Nov;73(11):1147-54. doi: 10.1016/j.humimm.2012.07.342. Epub 2012 Aug 9. PMID: 22884984.

Frey-Jakobs S, Hartberger JM, Fliegau M, Bossen C, Wehmeyer ML, Neubauer JC, Bulashevskaya A, Proietti M, Fröbel P, Nöltner C, Yang L, Rojas-Restrepo J, Langer N, Winzer S, Engelhardt KR, Glocker C, Pfeifer D, Klein A, Schäffer AA, Lagovsky I, Lachover-Roth I, Béziat V, Puel A, Casanova JL, Fleckenstein B, Weidinger S, Kilic SS, Garty BZ, Etzioni A, Grimbacher B. ZNF341 controls STAT3 expression and thereby immunocompetence. *Sci*

Immunol. 2018 Jun 15;3(24):eaat4941. doi: 10.1126/sciimmunol.aat4941. PMID: 29907690; PMCID: PMC6173313.

Fried AJ, Rauter I, Dillon SR, Jabara HH, Geha RS. Functional analysis of transmembrane activator and calcium-modulating cyclophilin ligand interactor (TACI) mutations associated with common variable immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol.* 2011 Jul;128(1):226-228.e1. doi: 10.1016/j.jaci.2011.01.048. Epub 2011 Mar 21. PMID: 21419480; PMCID: PMC3121922.

Gadoury-Levesque V, Dong L, Su R, Chen J, Zhang K, Risma KA, Marsh RA, Sun M. Frequency and spectrum of disease-causing variants in 1892 patients with suspected genetic HLH disorders. *Blood Adv.* 2020 Jun 23;4(12):2578-2594. doi: 10.1182/bloodadvances.2020001605. PMID: 32542393; PMCID: PMC7322966.

Gao J, Wang Q, Dong C, Chen S, Qi Y, Liu Y. Whole Exome Sequencing Identified MCM2 as a Novel Causative Gene for Autosomal Dominant Nonsyndromic Deafness in a Chinese Family. *PLoS One.* 2015 Jul 21;10(7):e0133522. doi: 10.1371/journal.pone.0133522. PMID: 26196677; PMCID: PMC4510057.

Garrido-Cardenas JA, Garcia-Maroto F, Alvarez-Bermejo JA, Manzano-Agugliaro F. DNA Sequencing Sensors: An Overview. *Sensors (Basel).* 2017 Mar 14;17(3):588. doi: 10.3390/s17030588. PMID: 28335417; PMCID: PMC5375874.

Germeshausen M, Grudzien M, Zeidler C, Abdollahpour H, Yetgin S, Rezaei N, Ballmaier M, Grimbacher B, Welte K, Klein C. Novel HAX1 mutations in patients with severe congenital neutropenia reveal isoform-dependent genotype-phenotype associations. *Blood.* 2008 May 15;111(10):4954-7. doi: 10.1182/blood-2007-11-120667. Epub 2008 Mar 12. PMID: 18337561.

Ginés S, Mariño M, Mallol J, Canela EI, Morimoto C, Callebaut C, Hovanessian A, Casadó V, Lluís C, Franco R. Regulation of epithelial and lymphocyte cell adhesion by adenosine deaminase-CD26 interaction. *Biochem J.* 2002 Jan 15;361(Pt 2):203-9. doi: 10.1042/0264-6021:3610203. PMID: 11772392; PMCID: PMC1222300.

Glocker EO, Kotlarz D, Boztug K, Gertz EM, Schäffer AA, Noyan F, Perro M, Diestelhorst J, Allroth A, Murugan D, Hätscher N, Pfeifer D, Sykora KW, Sauer M, Kreipe H,

Lacher M, Nustede R, Woellner C, Baumann U, Salzer U, Koletzko S, Shah N, Segal AW, Sauerbrey A, Buderus S, Snapper SB, Grimbacher B, Klein C. Inflammatory bowel disease and mutations affecting the interleukin-10 receptor. *N Engl J Med*. 2009 Nov 19;361(21):2033-45. doi: 10.1056/NEJMoa0907206. Epub 2009 Nov 4. PMID: 19890111; PMCID: PMC2787406.

Goodwin RG, Friend D, Ziegler SF, Jerzy R, Falk BA, Gimpel S, Cosman D, Dower SK, March CJ, Namen AE, et al. Cloning of the human and murine interleukin-7 receptors: demonstration of a soluble form and homology to a new receptor superfamily. *Cell*. 1990 Mar 23;60(6):941-51. doi: 10.1016/0092-8674(90)90342-c. PMID: 2317865.

Goodwin RG, Lupton S, Schmierer A, Hjerrild KJ, Jerzy R, Clevenger W, Gillis S, Cosman D, Namen AE. Human interleukin 7: molecular cloning and growth factor activity on human and murine B-lineage cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Jan;86(1):302-6. doi: 10.1073/pnas.86.1.302. PMID: 2643102; PMCID: PMC286452.

Green MR, Camilleri E, Gandhi MK, Peake J, Griffiths LR. A novel immunodeficiency disorder characterized by genetic amplification of interleukin 25. *Genes Immun*. 2011 Dec;12(8):663-6. doi: 10.1038/gene.2011.50. Epub 2011 Jul 21. PMID: 21776014.

Gubler U, Chua AO, Schoenhaut DS, Dwyer CM, McComas W, Motyka R, Nabavi N, Wolitzky AG, Quinn PM, Familletti PC, et al. Coexpression of two distinct genes is required to generate secreted bioactive cytotoxic lymphocyte maturation factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 May 15;88(10):4143-7. doi: 10.1073/pnas.88.10.4143. PMID: 1674604; PMCID: PMC51614.

Ham H, Huynh W, Schoon RA, Vale RD, Billadeau DD. HkRP3 is a microtubule-binding protein regulating lytic granule clustering and NK cell killing. *J Immunol*. 2015 Apr 15;194(8):3984-96. doi: 10.4049/jimmunol.1402897. Epub 2015 Mar 11. PMID: 25762780; PMCID: PMC4390494.

Harada Y, Tanaka Y, Terasawa M, Pieczyk M, Habiro K, Katakai T, Hanawa-Suetsugu K, Kukimoto-Niino M, Nishizaki T, Shirouzu M, Duan X, Uruno T, Nishikimi A, Sanematsu F, Yokoyama S, Stein JV, Kinashi T, Fukui Y. DOCK8 is a Cdc42 activator critical for interstitial dendritic cell migration during immune responses. *Blood*. 2012 May 10;119(19):4451-61. doi: 10.1182/blood-2012-01-407098. Epub 2012 Mar 28. PMID: 22461490; PMCID: PMC3418773.

Haskologlu S, Kostel Bal S, Islamoglu C, Aytakin C, Guner S, Sevinc S, Keles S, Kendirli T, Ceylaner S, Dogu F, Ikinciogullari A. Clinical, immunological features and follow up of 20 patients with dedicator of cytokinesis 8 (DOCK8) deficiency. *Pediatr Allergy Immunol*. 2020 Jul;31(5):515-527. doi: 10.1111/pai.13236. Epub 2020 Mar 11. PMID: 32108967; PMCID: PMC7228270.

Ho M, Chelly J, Carter N, Danek A, Crocker P, Monaco AP. Isolation of the gene for McLeod syndrome that encodes a novel membrane transport protein. *Cell*. 1994 Jun 17;77(6):869-80. doi: 10.1016/0092-8674(94)90136-8. PMID: 8004674.

Horev L, Unger S, Molho-Pessach V, Meir T, Maly A, Stepensky P, Zamir M, Keller B, Babay S, Warnatz K, Ramot Y, Zlotogorski A. Generalized verrucosis and HPV-3 susceptibility associated with CD4 T-cell lymphopenia caused by inherited human interleukin-7 deficiency. *J Am Acad Dermatol*. 2015 Jun;72(6):1082-4. doi: 10.1016/j.jaad.2015.02.1118. PMID: 25981006.

Hsu LC, Ali SR, McGillivray S, Tseng PH, Mariathasan S, Humke EW, Eckmann L, Powell JJ, Nizet V, Dixit VM, Karin M. A NOD2-NALP1 complex mediates caspase-1-dependent IL-1beta secretion in response to *Bacillus anthracis* infection and muramyl dipeptide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Jun 3;105(22):7803-8. doi: 10.1073/pnas.0802726105. Epub 2008 May 29. PMID: 18511561; PMCID: PMC2409384.

Huang Y, Yang L, Wang J, Yang F, Xiao Y, Xia R, Yuan X, Yan M. Twelve novel Atm mutations identified in Chinese ataxia telangiectasia patients. *Neuromolecular Med*. 2013 Sep;15(3):536-40. doi: 10.1007/s12017-013-8240-3. Epub 2013 Jun 27. Erratum in: *Neuromolecular Med*. 2014 Mar;16(1):216. PMID: 23807571; PMCID: PMC3732755.

Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cézard JP, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O'Morain CA, Gassull M, Binder V, Finkel Y, Cortot A, Modigliani R, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Macry J, Colombel JF, Sahbatou M, Thomas G. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*. 2001 May 31;411(6837):599-603. doi: 10.1038/35079107. PMID: 11385576.

Jensen LE, Whitehead AS. IRAK1b, a novel alternative splice variant of interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK), mediates interleukin-1 signaling and has prolonged stability.

J Biol Chem. 2001 Aug 3;276(31):29037-44. doi: 10.1074/jbc.M103815200. Epub 2001 Jun 7. PMID: 11397809.

Jones AM, Clark PA, Katz F, Genet S, McMahon C, Alterman L, Cant A, Kinnon C. B-cell-negative severe combined immunodeficiency associated with a common gamma chain mutation. Hum Genet. 1997 May;99(5):677-80. doi: 10.1007/s004390050428. PMID: 9150740.

Jouanguy E, Lamhamedi-Cherradi S, Lammas D, Dorman SE, Fondanèche MC, Dupuis S, Döffinger R, Altare F, Girdlestone J, Emile JF, Ducoulombier H, Edgar D, Clarke J, Oxelius VA, Brai M, Novelli V, Heyne K, Fischer A, Holland SM, Kumararatne DS, Schreiber RD, Casanova JL. A human IFNGR1 small deletion hotspot associated with dominant susceptibility to mycobacterial infection. Nat Genet. 1999 Apr;21(4):370-8. doi: 10.1038/7701. PMID: 10192386.

Jyonouchi S, Jr Graham JM, Ming JE. Genetic syndromes with evidence of Immune deficiency. In: Sullivan KE, Stiehm ER. Stiehm's Immune Deficiencies Inborn Errors of Immunity. 2nd ed. Cambridge: Academic Publisher; 2020. p. 61-97.

Kang S, Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. Targeting Interleukin-6 Signaling in Clinic. Immunity. 2019 Apr 16;50(4):1007-1023. doi: 10.1016/j.immuni.2019.03.026. PMID: 30995492.

Karaca NE, Severcan EU, Guven B, Azarsiz E, Aksu G, Kutukculer N. TNFRSF13B/TACI Alterations in Turkish Patients with Common Variable Immunodeficiency and IgA Deficiency. Avicenna J Med Biotechnol. 2018 Jul-Sep;10(3):192-195. PMID: 30090215; PMCID: PMC6064010.

Kashimada A, Hasegawa S, Nomura T, Shiraku H, Moriyama K, Suzuki T, Nakajima K, Mizuno T, Imai K, Sugawara Y, Morio T, Kumada S, Takagi M. Genetic analysis of undiagnosed ataxia-telangiectasia-like disorders. Brain Dev. 2019 Feb;41(2):150-157. doi: 10.1016/j.braindev.2018.09.007. Epub 2018 Oct 6. PMID: 30301590.

Kilic SS, Ozel M, Hafizoglu D, Karaca NE, Aksu G, Kutukculer N. The prevalences [correction] and patient characteristics of primary immunodeficiency diseases in Turkey--two centers study. J Clin Immunol 2013; 33(1):74-83.

Kim YM, Choi BS. Structure and function of the regulatory HRDC domain from human Bloom syndrome protein. *Nucleic Acids Res.* 2010 Nov;38(21):7764-77. doi: 10.1093/nar/gkq586. Epub 2010 Jul 17. PMID: 20639533; PMCID: PMC2995041.

Kirkpatrick P, Riminton S. Primary immunodeficiency diseases in Australia and New Zealand. *J Clin Immunol.* 2007 Sep;27(5):517-24. doi: 10.1007/s10875-007-9105-z. Epub 2007 Jun 22. PMID: 17588141.

Kobayashi I, Shiari R, Yamada M, Kawamura N, Okano M, Yara A, Iguchi A, Ishikawa N, Ariga T, Sakiyama Y, Ochs HD, Kobayashi K. Novel mutations of FOXP3 in two Japanese patients with immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X linked syndrome (IPEX). *J Med Genet.* 2001 Dec;38(12):874-6. doi: 10.1136/jmg.38.12.874. PMID: 11768393; PMCID: PMC1734795.

Kristiansen OP, Nolsøe RL, Larsen L, Gjesing AM, Johannesen J, Larsen ZM, Lykkesfeldt AE, Karlsen AE, Pociot F, Mandrup-Poulsen T; DIEGG; DSGD. Association of a functional 17beta-estradiol sensitive IL6-174G/C promoter polymorphism with early-onset type 1 diabetes in females. *Hum Mol Genet.* 2003 May 15;12(10):1101-10. doi: 10.1093/hmg/ddg132. PMID: 12719374.

Kutukculer N, Aykut A, Karaca NE, Durmaz A, Aksu G, Genel F, Pariltay E, Cogulu Ö, Azarsız E. Chronic granulomatous disease: Two decades of experience from a paediatric immunology unit in a country with high rate of consanguineous marriages. *Scand J Immunol.* 2019 Feb;89(2):e12737. doi: 10.1111/sji.12737. Epub 2019 Jan 23. PMID: 30506560.

Kwan SP, Hagemann TL, Radtke BE, Blaese RM, Rosen FS. Identification of mutations in the Wiskott-Aldrich syndrome gene and characterization of a polymorphic dinucleotide repeat at DXS694% adjacent to the disease gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 May 9;92(10):4706-10. doi: 10.1073/pnas.92.10.4706. PMID: 7753869; PMCID: PMC42013.

Lai L, Goldschneider I. Cutting edge: Identification of a hybrid cytokine consisting of IL-7 and the beta-chain of the hepatocyte growth factor/scatter factor. *J Immunol.* 2001 Oct 1;167(7):3550-4. doi: 10.4049/jimmunol.167.7.3550. PMID: 11564764.

Langland G, Elliott J, Li Y, Creaney J, Dixon K, Groden J. The BLM helicase is necessary for normal DNA double-strand break repair. *Cancer Res.* 2002 May 15;62(10):2766-70. PMID: 12019152.

Lard LR, van Gaalen FA, Schonkeren JJ, Pieterman EJ, Stoeken G, Vos K, Nelissen RG, Westendorp RG, Hoeben RC, Breedveld FC, Toes RE, Huizinga TW. Association of the -2849 interleukin-10 promoter polymorphism with autoantibody production and joint destruction in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2003 Jul;48(7):1841-8. doi: 10.1002/art.11160. PMID: 12847677.

Levin M, Newport MJ, D'Souza S, Kalabalikis P, Brown IN, Lenicker HM, Agius PV, Davies EG, Thrasher A, Klein N, et al. Familial disseminated atypical mycobacterial infection in childhood: a human mycobacterial susceptibility gene? *Lancet.* 1995 Jan 14;345(8942):79-83. doi: 10.1016/s0140-6736(95)90059-4. PMID: 7815885.

Li B, Samanta A, Song X, Iacono KT, Bembas K, Tao R, Basu S, Riley JL, Hancock WW, Shen Y, Saouaf SJ, Greene MI. FOXP3 interactions with histone acetyltransferase and class II histone deacetylases are required for repression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Mar 13;104(11):4571-6. doi: 10.1073/pnas.0700298104. Epub 2007 Mar 7. PMID: 17360565; PMCID: PMC1838642.

Li S, Strelow A, Fontana EJ, Wesche H. IRAK-4: a novel member of the IRAK family with the properties of an IRAK-kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Apr 16;99(8):5567-72. doi: 10.1073/pnas.082100399. PMID: 11960013; PMCID: PMC122810.

Lindley ER, Pisoni RL. Demonstration of adenosine deaminase activity in human fibroblast lysosomes. *Biochem J.* 1993 Mar 1;290 ( Pt 2)(Pt 2):457-62. doi: 10.1042/bj2900457. PMID: 8452534; PMCID: PMC1132295.

Lowenthal JW, Zubler RH, Nabholz M, MacDonald HR. Similarities between interleukin-2 receptor number and affinity on activated B and T lymphocytes. *Nature.* 1985 Jun 20-26;315(6021):669-72. doi: 10.1038/315669a0. PMID: 3925347.

Łyszkiewicz M, Ziętara N, Frey L, Pannicke U, Stern M, Liu Y, Fan Y, Puchałka J, Hollizeck S, Somekh I, Rohlf s M, Yilmaz T, Ünal E, Karakukcu M, Patiroğlu T, Kellerer C, Karasu E, Sykora KW, Lev A, Simon A, Somech R, Roesler J, Hoenig M, Keppler OT, Schwarz

K, Klein C. Human FCHO1 deficiency reveals role for clathrin-mediated endocytosis in development and function of T cells. *Nat Commun.* 2020 Feb 25;11(1):1031. doi: 10.1038/s41467-020-14809-9. Erratum in: *Nat Commun.* 2020 Apr 20;11(1):1963. PMID: 32098969; PMCID: PMC7042371.

Ma Y, Pannicke U, Schwarz K, Lieber MR. Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/DNA-dependent protein kinase complex in nonhomologous end joining and V(D)J recombination. *Cell.* 2002 Mar 22;108(6):781-94. doi: 10.1016/s0092-8674(02)00671-2. PMID: 11955432.

Maffucci P, Filion CA, Boisson B, Itan Y, Shang L, Casanova JL, Cunningham-Rundles C. Genetic Diagnosis Using Whole Exome Sequencing in Common Variable Immunodeficiency. *Front Immunol.* 2016 Jun 13;7:220. doi: 10.3389/fimmu.2016.00220. PMID: 27379089; PMCID: PMC4903998.

Mahlaoui N, Picard C, Bach P, Costes L, Courteille V, Ranohavimparany A, Alcaïs A, Jais JP, Fischer A; CEREDIH French PID study group. Genetic diagnosis of primary immunodeficiencies: A survey of the French national registry. *J Allergy Clin Immunol.* 2019 Apr;143(4):1646-1649.e10. doi: 10.1016/j.jaci.2018.12.994. Epub 2019 Jan 9. PMID: 30639347.

Marsh, W. L. Chronic granulomatous disease, the McLeod syndrome, and the Kell blood groups. *Birth Defects Orig. Art. Ser.* XIV(6A): 9-25, 1978.,

Martin CC, Oeser JK, Svitek CA, Hunter SI, Hutton JC, O'Brien RM. Identification and characterization of a human cDNA and gene encoding a ubiquitously expressed glucose-6-phosphatase catalytic subunit-related protein. *J Mol Endocrinol.* 2002 Oct;29(2):205-22. doi: 10.1677/jme.0.0290205. PMID: 12370122.

Martínez-Pomar N, Detková D, Arostegui JI, Alvarez A, Soler-Palacín P, Vidaller A, Espanol T, Sampalo A, de Gracia J, Hernandez M, Yagüe J, Matamoros N. Role of TNFRSF13B variants in patients with common variable immunodeficiency. *Blood.* 2009 Sep 24;114(13):2846-8. doi: 10.1182/blood-2009-05-213025. PMID: 19779048.

Matute JD, Arias AA, Wright NA, Wrobel I, Waterhouse CC, Li XJ, Marchal CC, Stull ND, Lewis DB, Steele M, Kellner JD, Yu W, Meroueh SO, Nauseef WM, Dinauer MC. A new genetic subgroup of chronic granulomatous disease with autosomal recessive mutations in p40

phox and selective defects in neutrophil NADPH oxidase activity. *Blood*. 2009 Oct 8;114(15):3309-15. doi: 10.1182/blood-2009-07-231498. Epub 2009 Aug 19. PMID: 19692703; PMCID: PMC2759653.

Mayilyan KR. Complement genetics, deficiencies, and disease associations. *Protein Cell*. 2012 Jul;3(7):487-96. doi: 10.1007/s13238-012-2924-6. Epub 2012 Jul 10. PMID: 22773339; PMCID: PMC4875391.

McMurphy AN, Gillies J, Gizzi MC, Riba M, Garcia-Manteiga JM, Cittaro D, Lazarevic D, Di Nunzio S, Piras IS, Bulfone A, Roncarolo MG, Stupka E, Bacchetta R, Levings MK. A novel function for FOXP3 in humans: intrinsic regulation of conventional T cells. *Blood*. 2013 Feb 21;121(8):1265-75. doi: 10.1182/blood-2012-05-431023. Epub 2012 Nov 20. PMID: 23169781.

Medvedev AE, Lentschat A, Kuhns DB, Blanco JC, Salkowski C, Zhang S, Arditi M, Gallin JI, Vogel SN. Distinct mutations in IRAK-4 confer hyporesponsiveness to lipopolysaccharide and interleukin-1 in a patient with recurrent bacterial infections. *J Exp Med*. 2003 Aug 18;198(4):521-31. doi: 10.1084/jem.20030701. PMID: 12925671; PMCID: PMC2194174.

Mellouli F, Mustapha IB, Khaled MB, Besbes H, Ouederni M, Mekki N, Ali MB, Larguèche B, Hachicha M, Sfar T, Gueddiche N, Barsaoui S, Sammoud A, Boussetta K, Becher SB, Meherzi A, Guandoura N, Boughammoura L, Harbi A, Amri F, Bayouhdh F, Jaballah NB, Tebib N, Bouaziz A, Mahfoudh A, Aloulou H, Mansour LB, Chabchoub I, Boussoffara R, Chemli J, Bouguila J, Hassayoun S, Hammami S, Habboul Z, Hamzaoui A, Ammar J, Barbouche MR, Bejaoui M. Report of the Tunisian Registry of Primary Immunodeficiencies: 25-Years of Experience (1988-2012). *J Clin Immunol*. 2015 Nov;35(8):745-53. doi: 10.1007/s10875-015-0206-9. Epub 2015 Oct 13. PMID: 26464197.

Miller LH, Mason SJ, Clyde DF, McGinniss MH. The resistance factor to *Plasmodium vivax* in blacks. The Duffy-blood-group genotype, FyFy. *N Engl J Med*. 1976 Aug 5;295(6):302-4. doi: 10.1056/NEJM197608052950602. PMID: 778616.

Milner JD, Vogel TP, Forbes L, Ma CA, Stray-Pedersen A, Niemela JE, Lyons JJ, Engelhardt KR, Zhang Y, Topcagic N, Roberson ED, Matthews H, Verbsky JW, Dasu T, Vargas-

Hernandez A, Varghese N, McClain KL, Karam LB, Nahmod K, Makedonas G, Mace EM, Sorte HS, Perminow G, Rao VK, O'Connell MP, Price S, Su HC, Butrick M, McElwee J, Hughes JD, Willet J, Swan D, Xu Y, Santibanez-Koref M, Slowik V, Dinwiddie DL, Ciaccio CE, Saunders CJ, Septer S, Kingsmore SF, White AJ, Cant AJ, Hambleton S, Cooper MA. Early-onset lymphoproliferation and autoimmunity caused by germline STAT3 gain-of-function mutations. *Blood*. 2015 Jan 22;125(4):591-9. doi: 10.1182/blood-2014-09-602763. Epub 2014 Oct 30. PMID: 25359994; PMCID: PMC4304103.

Mincheva A, Todorov I, Werner D, Fink TM, Lichter P. The human gene for nuclear protein BM28 (CDCL1), a new member of the early S-phase family of proteins, maps to chromosome band 3q21. *Cytogenet Cell Genet*. 1994;65(4):276-7. doi: 10.1159/000133647. PMID: 8258304.

Minegishi Y, Saito M, Tsuchiya S, Tsuge I, Takada H, Hara T, Kawamura N, Ariga T, Pasic S, Stojkovic O, Metin A, Karasuyama H. Dominant-negative mutations in the DNA-binding domain of STAT3 cause hyper-IgE syndrome. *Nature*. 2007 Aug 30;448(7157):1058-62. doi: 10.1038/nature06096. Epub 2007 Aug 5. PMID: 17676033.

Miyazaki T, Kawahara A, Fujii H, Nakagawa Y, Minami Y, Liu ZJ, Oishi I, Silvennoinen O, Witthuhn BA, Ihle JN, et al. Functional activation of Jak1 and Jak3 by selective association with IL-2 receptor subunits. *Science*. 1994 Nov 11;266(5187):1045-7. doi: 10.1126/science.7973659. PMID: 7973659.

Mizoguchi Y, Okada S. Inborn errors of STAT1 immunity. *Curr Opin Immunol*. 2021 Oct;72:59-64. doi: 10.1016/j.coi.2021.02.009. Epub 2021 Apr 8. PMID: 33839590.

Modell V, Quinn J, Orange J, Notarangelo LD, Modell F. Primary immunodeficiencies worldwide: an updated overview from the Jeffrey Modell Centers Global Network. *Immunol Res*. 2016;64:736-753.

Möhlig M, Boeing H, Spranger J, Osterhoff M, Kroke A, Fisher E, Bergmann MM, Ristow M, Hoffmann K, Pfeiffer AF. Body mass index and C-174G interleukin-6 promoter polymorphism interact in predicting type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004 Apr;89(4):1885-90. doi: 10.1210/jc.2003-031101. PMID: 15070960.

Moshous D, Callebaut I, de Chasseval R, Corneo B, Cavazzana-Calvo M, Le Deist F, Tezcan I, Sanal O, Bertrand Y, Philippe N, Fischer A, de Villartay JP. Artemis, a novel DNA double-strand break repair/V(D)J recombination protein, is mutated in human severe combined immune deficiency. *Cell*. 2001 Apr 20;105(2):177-86. doi: 10.1016/s0092-8674(01)00309-9. PMID: 11336668.

Mroczek S, Krwawicz J, Kutner J, Lazniewski M, Kuciński I, Ginalski K, Dziembowski A. C16orf57, a gene mutated in poikiloderma with neutropenia, encodes a putative phosphodiesterase responsible for the U6 snRNA 3' end modification. *Genes Dev*. 2012 Sep 1;26(17):1911-25. doi: 10.1101/gad.193169.112. Epub 2012 Aug 16. PMID: 22899009; PMCID: PMC3435495.

Müller ML, Chiang SC, Meeths M, Tesi B, Entesarian M, Nilsson D, Wood SM, Nordenskjöld M, Henter JI, Naqvi A, Bryceson YT. An N-Terminal Missense Mutation in STX11 Causative of FHL4 Abrogates Syntaxin-11 Binding to Munc18-2. *Front Immunol*. 2014 Jan 14;4:515. doi: 10.3389/fimmu.2013.00515. PMID: 24459464; PMCID: PMC3890652.

Müller ML, Chiang SC, Meeths M, Tesi B, Entesarian M, Nilsson D, Wood SM, Nordenskjöld M, Henter JI, Naqvi A, Bryceson YT. An N-Terminal Missense Mutation in STX11 Causative of FHL4 Abrogates Syntaxin-11 Binding to Munc18-2. *Front Immunol*. 2014 Jan 14;4:515. doi: 10.3389/fimmu.2013.00515. PMID: 24459464; PMCID: PMC3890652.

Mullikin JC, McMurray AA. Techview: DNA sequencing. Sequencing the genome, fast. *Science*. 1999 Mar 19;283(5409):1867-9. doi: 10.1126/science.283.5409.1867. Erratum in: *Science* 1999 Jun 11;284(5421):1776. PMID: 10206892.

Neeft M, Wieffer M, de Jong AS, Negroiu G, Metz CH, van Loon A, Griffith J, Krijgsveld J, Wulffraat N, Koch H, Heck AJ, Brose N, Kleijmeer M, van der Sluijs P. Munc13-4 is an effector of rab27a and controls secretion of lysosomes in hematopoietic cells. *Mol Biol Cell*. 2005 Feb;16(2):731-41. doi: 10.1091/mbc.e04-10-0923. Epub 2004 Nov 17. PMID: 15548590; PMCID: PMC545907.

Newman JA, Savitsky P, Allerston CK, Bizard AH, Özer Ö, Sarlós K, Liu Y, Pardon E, Steyaert J, Hickson ID, Gileadi O. Crystal structure of the Bloom's syndrome helicase indicates a role for the HRDC domain in conformational changes. *Nucleic Acids Res*. 2015 May

26;43(10):5221-35. doi: 10.1093/nar/gkv373. Epub 2015 Apr 21. PMID: 25901030; PMCID: PMC4446433.

Noack D, Rae J, Cross AR, Ellis BA, Newburger PE, Curnutte JT, Heyworth PG. Autosomal recessive chronic granulomatous disease caused by defects in NCF-1, the gene encoding the phagocyte p47-phox: mutations not arising in the NCF-1 pseudogenes. *Blood*. 2001 Jan 1;97(1):305-11. doi: 10.1182/blood.v97.1.305. PMID: 11133775.

Oppmann B, Lesley R, Blom B, Timans JC, Xu Y, Hunte B, Vega F, Yu N, Wang J, Singh K, Zonin F, Vaisberg E, Churakova T, Liu M, Gorman D, Wagner J, Zurawski S, Liu Y, Abrams JS, Moore KW, Rennick D, de Waal-Malefyt R, Hannum C, Bazan JF, Kastelein RA. Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity*. 2000 Nov;13(5):715-25. doi: 10.1016/s1074-7613(00)00070-4. PMID: 11114383.

Orange JS, Jain A, Ballas ZK, Schneider LC, Geha RS, Bonilla FA. The presentation and natural history of immunodeficiency caused by nuclear factor kappaB essential modulator mutation. *J Allergy Clin Immunol*. 2004 Apr;113(4):725-33. doi: 10.1016/j.jaci.2004.01.762. PMID: 15100680.

Person RE, Li FQ, Duan Z, Benson KF, Wechsler J, Papadaki HA, Eliopoulos G, Kaufman C, Bertolone SJ, Nakamoto B, Papayannopoulou T, Grimes HL, Horwitz M. Mutations in proto-oncogene GFI1 cause human neutropenia and target ELA2. *Nat Genet*. 2003 Jul;34(3):308-12. doi: 10.1038/ng1170. PMID: 12778173; PMCID: PMC2832179.

Picard C, Fieschi C, Altare F, Al-Jumaah S, Al-Hajjar S, Feinberg J, Dupuis S, Soudais C, Al-Mohsen IZ, Génin E, Lammas D, Kumararatne DS, Leclerc T, Rafii A, Frayha H, Murugasu B, Wah LB, Sinniah R, Loubser M, Okamoto E, Al-Ghonaium A, Tufenkeji H, Abel L, Casanova JL. Inherited interleukin-12 deficiency: IL12B genotype and clinical phenotype of 13 patients from six kindreds. *Am J Hum Genet*. 2002 Feb;70(2):336-48. doi: 10.1086/338625. Epub 2001 Dec 17. PMID: 11753820; PMCID: PMC384913.

Platt CD, Zaman F, Bainter W, Stafstrom K, Almutairi A, Reigle M, Weeks S, Geha RS, Chou J; International Consortium for Immunodeficiencies. Efficacy and economics of targeted panel versus whole-exome sequencing in 878 patients with suspected primary immunodeficiency.

J Allergy Clin Immunol. 2021 Feb;147(2):723-726. doi: 10.1016/j.jaci.2020.08.022. Epub 2020 Sep 2. PMID: 32888943; PMCID: PMC7870529.

Pulvirenti F, Zuntini R, Milito C, Specchia F, Spadaro G, Danieli MG, Pession A, Quinti I, Ferrari S. Clinical Associations of Biallelic and Monoallelic TNFRSF13B Variants in Italian Primary Antibody Deficiency Syndromes. J Immunol Res. 2016;2016:8390356. doi: 10.1155/2016/8390356. Epub 2016 Mar 30. PMID: 27123465; PMCID: PMC4829724.

Rae W, Ward D, Mattocks C, Pengelly RJ, Eren E, Patel SV, Faust SN, Hunt D, Williams AP. Clinical efficacy of a next-generation sequencing gene panel for primary immunodeficiency diagnostics. Clin Genet. 2018 Mar;93(3):647-655. doi: 10.1111/cge.13163. Epub 2018 Feb 2. PMID: 29077208.

Rae W, Ward D, Mattocks C, Pengelly RJ, Eren E, Patel SV, Faust SN, Hunt D, Williams AP. Clinical efficacy of a next-generation sequencing gene panel for primary immunodeficiency diagnostics. Clin Genet. 2018 Mar;93(3):647-655. doi: 10.1111/cge.13163. Epub 2018 Feb 2. PMID: 29077208.

Raje N, Soden S, Swanson D, Ciaccio CE, Kingsmore SF, Dinwiddie DL. Utility of next generation sequencing in clinical primary immunodeficiencies. Curr Allergy Asthma Rep. 2014 Oct;14(10):468. doi: 10.1007/s11882-014-0468-y. PMID: 25149170; PMCID: PMC4582650.

Ramesh N, Antón IM, Hartwig JH, Geha RS. WIP, a protein associated with wiskott-aldrich syndrome protein, induces actin polymerization and redistribution in lymphoid cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997 Dec 23;94(26):14671-6. doi: 10.1073/pnas.94.26.14671. PMID: 9405671; PMCID: PMC25088.

Rawat A, Tyagi R, Chaudhary H, Pandiarajan V, Jindal AK, Suri D, Gupta A, Sharma M, Arora K, Bal A, Madaan P, Saini L, Sahu JK, Ogura Y, Kato T, Imai K, Nonoyama S, Singh S. Unusual clinical manifestations and predominant stopgain ATM gene variants in a single centre cohort of ataxia telangiectasia from North India. Sci Rep. 2022 Mar 8;12(1):4036. doi: 10.1038/s41598-022-08019-0. PMID: 35260754; PMCID: PMC8904522.

Rooney M, David J, Symons J, Di Giovine F, Varsani H, Woo P. Inflammatory cytokine responses in juvenile chronic arthritis. Br J Rheumatol. 1995 May;34(5):454-60. doi: 10.1093/rheumatology/34.5.454. PMID: 7788176.

Rosenzweig SD, Holland SM. Defects in the interferon-gamma and interleukin-12 pathways. *Immunol Rev.* 2005 Feb;203:38-47. doi: 10.1111/j.0105-2896.2005.00227.x. PMID: 15661020.

Rudilla F, Franco-Jarava C, Martínez-Gallo M, Garcia-Prat M, Martín-Nalda A, Rivière J, Aguiló-Cucurull A, Mongay L, Vidal F, Solanich X, Irastorza I, Santos-Pérez JL, Tercedor Sánchez J, Cuscó I, Serra C, Baz-Redón N, Fernández-Cancio M, Carreras C, Vagace JM, Garcia-Patos V, Pujol-Borrell R, Soler-Palacín P, Colobran R. Expanding the Clinical and Genetic Spectra of Primary Immunodeficiency-Related Disorders With Clinical Exome Sequencing: Expected and Unexpected Findings. *Front Immunol.* 2019 Oct 1;10:2325. doi: 10.3389/fimmu.2019.02325. PMID: 31681265; PMCID: PMC6797824.

Sabbah A, Chang TH, Harnack R, Frohlich V, Tominaga K, Dube PH, Xiang Y, Bose S. Activation of innate immune antiviral responses by Nod2. *Nat Immunol.* 2009 Oct;10(10):1073-80. doi: 10.1038/ni.1782. Epub 2009 Aug 23. Erratum in: *Nat Immunol.* 2010 Oct;11(10):969. PMID: 19701189; PMCID: PMC2752345.

Sakurai T, Kukimoto-Niino M, Kunimura K, Yamane N, Sakata D, Aihara R, Yasuda T, Yokoyama S, Shirouzu M, Fukui Y, Uruno T. A conserved PI(4,5)P<sub>2</sub>-binding domain is critical for immune regulatory function of DOCK8. *Life Sci Alliance.* 2021 Feb 11;4(4):e202000873. doi: 10.26508/lsa.202000873. PMID: 33574036; PMCID: PMC7893821.

Salzer U, Grimbacher B. TACI deficiency - a complex system out of balance. *Curr Opin Immunol.* 2021 Aug;71:81-88. doi: 10.1016/j.coi.2021.06.004. Epub 2021 Jul 8. PMID: 34247095.

Sawczenko A, Azooz O, Paraszczuk J, Idestrom M, Croft NM, Savage MO, Ballinger AB, Sanderson IR. Intestinal inflammation-induced growth retardation acts through IL-6 in rats and depends on the -174 IL-6 G/C polymorphism in children. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Sep 13;102(37):13260-5. doi: 10.1073/pnas.0503589102. Epub 2005 Sep 6. PMID: 16150725; PMCID: PMC1198995.

Schatz DG, Oettinger MA, Baltimore D. The V(D)J recombination activating gene, RAG-1. *Cell.* 1989 Dec 22;59(6):1035-48. doi: 10.1016/0092-8674(89)90760-5. PMID: 2598259.

Schubert D, Bode C, Kenefeck R, Hou TZ, Wing JB, Kennedy A, Bulashevskaya A, Petersen BS, Schäffer AA, Grüning BA, Unger S, Frede N, Baumann U, Witte T, Schmidt RE, 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 LSK, Sansom DM, Grimbacher B. Autosomal dominant immune dysregulation syndrome in humans with CTLA4 mutations. *Nat Med.* 2014 Dec;20(12):1410-1416. doi: 10.1038/nm.3746. Epub 2014 Oct 20. PMID: 25329329; PMCID: PMC4668597.

Sharif-Askari E, Vassen L, Kosan C, Khandanpour C, Gaudreau MC, Heyd F, Okayama T, Jin J, Rojas ME, Grimes HL, Zeng H, Möröy T. Zinc finger protein Gfi1 controls the endotoxin-mediated Toll-like receptor inflammatory response by antagonizing NF-kappaB p65. *Mol Cell Biol.* 2010 Aug;30(16):3929-42. doi: 10.1128/MCB.00087-10. Epub 2010 Jun 14. PMID: 20547752; PMCID: PMC2916436.

Shimada H, Shimizu K, Mimaki S, Sakiyama T, Mori T, Shimasaki N, Yokota J, Nakachi K, Ohta T, Ohki M. First case of aplastic anemia in a Japanese child with a homozygous missense mutation in the NBS1 gene (I171V) associated with genomic instability. *Hum Genet.* 2004 Oct;115(5):372-6. doi: 10.1007/s00439-004-1155-1. Epub 2004 Aug 24. PMID: 15338273.

Shin HD, Winkler C, Stephens JC, Bream J, Young H, Goedert JJ, O'Brien TR, Vlahov D, Buchbinder S, Giorgi J, Rinaldo C, Donfield S, Willoughby A, O'Brien SJ, Smith MW. Genetic restriction of HIV-1 pathogenesis to AIDS by promoter alleles of IL10. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Dec 19;97(26):14467-72. doi: 10.1073/pnas.97.26.14467. PMID: 11121048; PMCID: PMC18942.

Simon AJ, Golan AC, Lev A, Stauber T, Barel O, Somekh I, Klein C, AbuZaitun O, Eyal E, Kol N, Unal E, Amariglio N, Rechavi G, Somech R. Whole exome sequencing (WES) approach for diagnosing primary immunodeficiencies (PIDs) in a highly consanguineous community. *Clin Immunol.* 2020 May;214:108376. doi: 10.1016/j.clim.2020.108376. Epub 2020 Mar 3. PMID: 32135276.

Smith KA. Interleukin-2: inception, impact, and implications. *Science.* 1988 May 27;240(4856):1169-76. doi: 10.1126/science.3131876. PMID: 3131876.

Smith T, Cunningham-Rundles C. Primary B-cell immunodeficiencies. *Hum Immunol*. 2019 Jun;80(6):351–62.

Sonnenberg GF, Artis D. Innate lymphoid cells in the initiation, regulation and resolution of inflammation. *Nat Med*. 2015 Jul;21(7):698-708. doi: 10.1038/nm.3892. Epub 2015 Jun 29. PMID: 26121198; PMCID: PMC4869856.

Spoor J, Farajifard H, Rezaei N. Congenital neutropenia and primary immunodeficiency diseases. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2019 Jan;133:149-162. doi: 10.1016/j.critrevonc.2018.10.003. Epub 2018 Oct 13. PMID: 30661651.

Stepp SE, Dufourcq-Lagelouse R, Le Deist F, Bhawan S, Certain S, Mathew PA, Henter JI, Bennett M, Fischer A, de Saint Basile G, Kumar V. Perforin gene defects in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Science*. 1999 Dec 3;286(5446):1957-9. doi: 10.1126/science.286.5446.1957. PMID: 10583959.

Stoddard JL, Niemela JE, Fleisher TA, Rosenzweig SD. Targeted NGS: A Cost-Effective Approach to Molecular Diagnosis of PIDs. *Front Immunol*. 2014 Nov 3;5:531. doi: 10.3389/fimmu.2014.00531. PMID: 25404929; PMCID: PMC4217515.

Stray-Pedersen A, Abrahamsen TG, Frøland SS. Primary immunodeficiency diseases in Norway. *J Clin Immunol*. 2000 Nov;20(6):477-85. doi: 10.1023/a:1026416017763. PMID: 11202238.

Stray-Pedersen A, Backe PH, Sorte HS, Mørkrid L, Chokshi NY, Erichsen HC, Gambin T, Elgstøen KB, Bjørås M, Wlodarski MW, Krüger M, Jhangiani SN, Muzny DM, Patel A, Raymond KM, Sasa GS, Krance RA, Martinez CA, Abraham SM, Speckmann C, Ehl S, Hall P, Forbes LR, Merckoll E, Westvik J, Nishimura G, Rustad CF, Abrahamsen TG, Rønnestad A, Osnes LT, Egeland T, Rødningen OK, Beck CR; Baylor-Johns Hopkins Center for Mendelian Genomics, Boerwinkle EA, Gibbs RA, Lupski JR, Orange JS, Lausch E, Hanson IC. PGM3 mutations cause a congenital disorder of glycosylation with severe immunodeficiency and skeletal dysplasia. *Am J Hum Genet*. 2014 Jul 3;95(1):96-107. doi: 10.1016/j.ajhg.2014.05.007. Epub 2014 Jun 12. PMID: 24931394; PMCID: PMC4085583.

Suzuki Y, Demoliere C, Kitamura D, Takeshita H, Deuschle U, Watanabe T. HAX-1, a novel intracellular protein, localized on mitochondria, directly associates with HS1, a substrate of Src family tyrosine kinases. *J Immunol.* 1997 Mar 15;158(6):2736-44. PMID: 9058808.

Symons M, Derry JM, Karlak B, Jiang S, Lemahieu V, McCormick F, Francke U, Abo A. Wiskott-Aldrich syndrome protein, a novel effector for the GTPase CDC42Hs, is implicated in actin polymerization. *Cell.* 1996 Mar 8;84(5):723-34. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81050-8. PMID: 8625410.

Tangye SG, Al-Herz W, Bousfiha A, Chatila T, Cunningham-Rundles C, Etzioni A, Franco JL, Holland SM, Klein C, Morio T, Ochs HD, Oksenhendler E, Picard C, Puck J, Torgerson TR, Casanova JL, Sullivan KE. Human Inborn Errors of Immunity: 2019 Update on the Classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee. *J Clin Immunol.* 2020 Jan;40(1):24-64. doi: 10.1007/s10875-019-00737-x. Epub 2020 Jan 17. Erratum in: *J Clin Immunol.* 2020 Feb 22;; PMID: 31953710; PMCID: PMC7082301.

Tangye SG, Al-Herz W, Bousfiha A, Cunningham-Rundles C, Franco JL, Holland SM, Klein C, Morio T, Oksenhendler E, Picard C, Puel A, Puck J, Seppänen MRJ, Somech R, Su HC, Sullivan KE, Torgerson TR, Meyts I. Human Inborn Errors of Immunity: 2022 Update on the Classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee. *J Clin Immunol.* 2022 Jun 24:1–35. doi: 10.1007/s10875-022-01289-3. Epub ahead of print. PMID: 35748970; PMCID: PMC9244088.

Teft WA, Kirchhof MG, Madrenas J. A molecular perspective of CTLA-4 function. *Annu Rev Immunol.* 2006;24:65-97. doi: 10.1146/annurev.immunol.24.021605.090535. PMID: 16551244.

Thaventhiran JED, Lango Allen H, Burren OS, Rae W, Greene D, Staples E, Zhang Z, Farmery JHR, Simeoni I, Rivers E, Maimaris J, Penkett CJ, Stephens J, Deevi SVV, Sanchis-Juan A, Gleadall NS, Thomas MJ, Sargur RB, Gordins P, Baxendale HE, Brown M, Tuijnenburg P, Worth A, Hanson S, Linger RJ, Buckland MS, Rayner-Matthews PJ, Gilmour KC, Samarghitean C, Seneviratne SL, Sansom DM, Lynch AG, Megy K, Ellinghaus E, Ellinghaus D, Jorgensen SF, Karlsen TH, Stirrups KE, Cutler AJ, Kumararatne DS, Chandra A, Edgar JDM, Herwadkar A, Cooper N, Grigoriadou S, Huissoon AP, Goddard S, Jolles S, Schuetz C,

Boschann F; Primary Immunodeficiency Consortium for the NIHR Bioresource; Lyons PA, Hurles ME, Savic S, Burns SO, Kuijpers TW, Turro E, Ouwehand WH, Thrasher AJ, Smith KGC. Whole-genome sequencing of a sporadic primary immunodeficiency cohort. *Nature*. 2020 Jul;583(7814):90-95. doi: 10.1038/s41586-020-2265-1. Epub 2020 May 6. Erratum in: *Nature*. 2020 Aug;584(7819):E2. PMID: 32499645; PMCID: PMC7334047.

Thye T, Burchard GD, Nilius M, Müller-Myhsok B, Horstmann RD. Genomewide linkage analysis identifies polymorphism in the human interferon-gamma receptor affecting *Helicobacter pylori* infection. *Am J Hum Genet*. 2003 Feb;72(2):448-53. doi: 10.1086/367714. Epub 2003 Jan 6. PMID: 12516030; PMCID: PMC379236.

Todorov IT, Pepperkok R, Philipova RN, Kearsley SE, Ansorge W, Werner D. A human nuclear protein with sequence homology to a family of early S phase proteins is required for entry into S phase and for cell division. *J Cell Sci*. 1994 Jan;107 ( Pt 1):253-65. doi: 10.1242/jcs.107.1.253. PMID: 8175912.

Triot A, Järvinen PM, Arostegui JI, Murugan D, Kohistani N, Dapena Díaz JL, Racek T, Puchalka J, Gertz EM, Schäffer AA, Kotlarz D, Pfeifer D, Díaz de Heredia Rubio C, Ozdemir MA, Patiroglu T, Karakukcu M, Sánchez de Toledo Codina J, Yagüe J, Touw IP, Unal E, Klein C. Inherited biallelic CSF3R mutations in severe congenital neutropenia. *Blood*. 2014 Jun 12;123(24):3811-7. doi: 10.1182/blood-2013-11-535419. Epub 2014 Apr 21. PMID: 24753537; PMCID: PMC4055927.

Ueno N, Takeya R, Miyano K, Kikuchi H, Sumimoto H. The NADPH oxidase Nox3 constitutively produces superoxide in a p22phox-dependent manner: its regulation by oxidase organizers and activators. *J Biol Chem*. 2005 Jun 17;280(24):23328-39. doi: 10.1074/jbc.M414548200. Epub 2005 Apr 11. PMID: 15824103.

Usacheva A, Kotenko S, Witte MM, Colamonici OR. Two distinct domains within the N-terminal region of Janus kinase 1 interact with cytokine receptors. *J Immunol*. 2002 Aug 1;169(3):1302-8. doi: 10.4049/jimmunol.169.3.1302. PMID: 12133952.

van de Veerdonk FL, Plantinga TS, Hoischen A, Smeekens SP, Joosten LA, Gilissen C, Arts P, Rosentul DC, Carmichael AJ, Smits-van der Graaf CA, Kullberg BJ, van der Meer JW, Lilic D, Veltman JA, Netea MG. STAT1 mutations in autosomal dominant chronic

mucocutaneous candidiasis. *N Engl J Med.* 2011 Jul 7;365(1):54-61. doi: 10.1056/NEJMoa1100102. Epub 2011 Jun 29. PMID: 21714643.

Varon R, Reis A, Henze G, von Einsiedel HG, Sperling K, Seeger K. Mutations in the Nijmegen Breakage Syndrome gene (NBS1) in childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Cancer Res.* 2001 May 1;61(9):3570-2. PMID: 11325820.

Varon R, Vissinga C, Platzer M, Cersaletti KM, Chrzanowska KH, Saar K, Beckmann G, Seemanová E, Cooper PR, Nowak NJ, Stumm M, Weemaes CM, Gatti RA, Wilson RK, Digweed M, Rosenthal A, Sperling K, Concannon P, Reis A. Nibrin, a novel DNA double-strand break repair protein, is mutated in Nijmegen breakage syndrome. *Cell.* 1998 May 1;93(3):467-76. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81174-5. PMID: 9590180.

Vergelli M, Hemmer B, Muraro PA, Tranquill L, Biddison WE, Sarin A, McFarland HF, Martin R. Human autoreactive CD4+ T cell clones use perforin- or Fas/Fas ligand-mediated pathways for target cell lysis. *J Immunol.* 1997 Mar 15;158(6):2756-61. PMID: 9058810.

Vetrie D, Vorechovský I, Sideras P, Holland J, Davies A, Flinter F, Hammarström L, Kinnon C, Levinsky R, Bobrow M, et al. The gene involved in X-linked agammaglobulinaemia is a member of the src family of protein-tyrosine kinases. *Nature.* 1993 Jan 21;361(6409):226-33. doi: 10.1038/361226a0. Erratum in: *Nature* 1993 Jul 22;364(6435):362. PMID: 8380905.

Vilboux T, Lev A, Malicdan MC, Simon AJ, Järvinen P, Racek T, Puchalka J, Sood R, Carrington B, Bishop K, Mullikin J, Huizing M, Garty BZ, Eyal E, Wolach B, Gavrieli R, Toren A, Soudack M, Atawneh OM, Babushkin T, Schiby G, Cullinane A, Avivi C, Polak-Charcon S, Barshack I, Amariglio N, Rechavi G, van der Werff ten Bosch J, Anikster Y, Klein C, Gahl WA, Somech R. A congenital neutrophil defect syndrome associated with mutations in VPS45. *N Engl J Med.* 2013 Jul 4;369(1):54-65. doi: 10.1056/NEJMoa1301296. Epub 2013 Jun 5. PMID: 23738510; PMCID: PMC3787600.

Volpi L, Roversi G, Colombo EA, Leijsten N, Concolino D, Calabria A, Mencarelli MA, Fimiani M, Macciardi F, Pfundt R, Schoenmakers EF, Larizza L. Targeted next-generation sequencing appoints c16orf57 as clericuzio-type poikiloderma with neutropenia gene. *Am J Hum Genet.* 2010 Jan;86(1):72-6. doi: 10.1016/j.ajhg.2009.11.014. Epub 2009 Dec 10. Erratum in: *Am J Hum Genet.* 2010 Sep 10;87(3):445. PMID: 20004881; PMCID: PMC2801743.

Volpp BD, Nauseef WM, Donelson JE, Moser DR, Clark RA. Cloning of the cDNA and functional expression of the 47-kilodalton cytosolic component of human neutrophil respiratory burst oxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Sep;86(18):7195-9. doi: 10.1073/pnas.86.18.7195. Erratum in: *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989 Dec;86(23):9563. PMID: 2550933; PMCID: PMC298023.

von Bernuth H, Picard C, Jin Z, Pankla R, Xiao H, Ku CL, Chrabieh M, Mustapha IB, Ghandil P, Camcioglu Y, Vasconcelos J, Sirvent N, Guedes M, Vitor AB, Herrero-Mata MJ, Aróstegui JI, Rodrigo C, Alsina L, Ruiz-Ortiz E, Juan M, Fortuny C, Yagüe J, Antón J, Pascal M, Chang HH, Janniere L, Rose Y, Garty BZ, Chapel H, Issekutz A, Maródi L, Rodriguez-Gallego C, Banchereau J, Abel L, Li X, Chaussabel D, Puel A, Casanova JL. Pyogenic bacterial infections in humans with MyD88 deficiency. *Science*. 2008 Aug 1;321(5889):691-6. doi: 10.1126/science.1158298. PMID: 18669862; PMCID: PMC2688396.

Wang H, Wang P, Sun X, Luo Y, Wang X, Ma D, Wu J. Cloning and characterization of a novel caspase-10 isoform that activates NF-kappa B activity. *Biochim Biophys Acta*. 2007 Nov;1770(11):1528-37. doi: 10.1016/j.bbagen.2007.07.010. Epub 2007 Aug 8. PMID: 17822854.

Wang J, Chun HJ, Wong W, Spencer DM, Lenardo MJ. Caspase-10 is an initiator caspase in death receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Nov 20;98(24):13884-8. doi: 10.1073/pnas.241358198. PMID: 11717445; PMCID: PMC61136.

Wang J, Zheng L, Lobito A, Chan FK, Dale J, Sneller M, Yao X, Puck JM, Straus SE, Lenardo MJ. Inherited human Caspase 10 mutations underlie defective lymphocyte and dendritic cell apoptosis in autoimmune lymphoproliferative syndrome type II. *Cell*. 1999 Jul 9;98(1):47-58. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80605-4. PMID: 10412980.

Wang JW, Howson J, Haller E, Kerr WG. Identification of a novel lipopolysaccharide-inducible gene with key features of both A kinase anchor proteins and chs1/beige proteins. *J Immunol*. 2001 Apr 1;166(7):4586-95. doi: 10.4049/jimmunol.166.7.4586. PMID: 11254716.

Wientjes FB, Hsuan JJ, Totty NF, Segal AW. p40phox, a third cytosolic component of the activation complex of the NADPH oxidase to contain src homology 3 domains. *Biochem J*. 1993 Dec 15;296 ( Pt 3)(Pt 3):557-61. doi: 10.1042/bj2960557. PMID: 8280052; PMCID: PMC1137734.

Wu J, Wilson J, He J, Xiang L, Schur PH, Mountz JD. Fas ligand mutation in a patient with systemic lupus erythematosus and lymphoproliferative disease. *J Clin Invest.* 1996 Sep 1;98(5):1107-13. doi: 10.1172/JCI118892. PMID: 8787672; PMCID: PMC507531.

Wu Y, Bressette D, Carrell JA, Kaufman T, Feng P, Taylor K, Gan Y, Cho YH, Garcia AD, Gollatz E, Dimke D, LaFleur D, Migone TS, Nardelli B, Wei P, Ruben SM, Ullrich SJ, Olsen HS, Kanakaraj P, Moore PA, Baker KP. Tumor necrosis factor (TNF) receptor superfamily member TACI is a high affinity receptor for TNF family members APRIL and BLyS. *J Biol Chem.* 2000 Nov 10;275(45):35478-85. doi: 10.1074/jbc.M005224200. PMID: 10956646.

Xu X, Han L, Zhao G, Xue S, Gao Y, Xiao J, Zhang S, Chen P, Wu ZY, Ding J, Hu R, Wei B, Wang H. LRCH1 interferes with DOCK8-Cdc42-induced T cell migration and ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med.* 2017 Jan;214(1):209-226. doi: 10.1084/jem.20160068. PMID: 28028151; PMCID: PMC5206493.

Yang WL, Lau YL, Lee PP, Chung BH, Yang J. Molecular diagnosis of severe combined immunodeficiency using whole-exome sequencing. *Hong Kong Med J.* 2018 Jun;24 Suppl 3(3):15-17. PMID: 29937439.

Yao Q, Zhou L, Cusumano P, Bose N, Piliang M, Jayakar B, Su LC, Shen B. A new category of autoinflammatory disease associated with NOD2 gene mutations. *Arthritis Res Ther.* 2011;13(5):R148. doi: 10.1186/ar3462. Epub 2011 Sep 14. PMID: 21914217; PMCID: PMC3308076.

Yoshida L, Nishida S, Shimoyama T, Kawahara T, Rokutan K, Tsunawaki S. Expression of a p67(phox) homolog in Caco-2 cells giving O(2)(-)-reconstituting ability to cytochrome b(558) together with recombinant p47(phox). *Biochem Biophys Res Commun.* 2002 Sep 6;296(5):1322-8. doi: 10.1016/s0006-291x(02)02059-4. Erratum in: *Biochem Biophys Res Commun.* 2003 Jan 31;301(1):258. PMID: 12207919.

Yu H, Zhang VW, Stray-Pedersen A, Hanson IC, Forbes LR, de la Morena MT, Chinn IK, Gorman E, Mendelsohn NJ, Pozos T, Wiszniewski W, Nicholas SK, Yates AB, Moore LE, Berge KE, Sorte H, Bayer DK, ALZahrani D, Geha RS, Feng Y, Wang G, Orange JS, Lupski JR, Wang J, Wong LJ. Rapid molecular diagnostics of severe primary immunodeficiency determined by using targeted next-generation sequencing. *J Allergy Clin Immunol.* 2016 Oct;138(4):1142-

1151.e2. doi: 10.1016/j.jaci.2016.05.035. Epub 2016 Jul 12. Erratum in: *J Allergy Clin Immunol*. 2017 Jan;139(1):378. PMID: 27484032.

Yu H, Zhang VW, Stray-Pedersen A, Hanson IC, Forbes LR, de la Morena MT, Chinn IK, Gorman E, Mendelsohn NJ, Pozos T, Wiszniewski W, Nicholas SK, Yates AB, Moore LE, Berge KE, Sorte H, Bayer DK, ALZahrani D, Geha RS, Feng Y, Wang G, Orange JS, Lupski JR, Wang J, Wong LJ. Rapid molecular diagnostics of severe primary immunodeficiency determined by using targeted next-generation sequencing. *J Allergy Clin Immunol*. 2016 Oct;138(4):1142-1151.e2. doi: 10.1016/j.jaci.2016.05.035. Epub 2016 Jul 12. Erratum in: *J Allergy Clin Immunol*. 2017 Jan;139(1):378. PMID: 27484032.

Zeng W, Xu M, Liu S, Sun L, Chen ZJ. Key role of Ubc5 and lysine-63 polyubiquitination in viral activation of IRF3. *Mol Cell*. 2009 Oct 23;36(2):315-25. doi: 10.1016/j.molcel.2009.09.037. PMID: 19854139; PMCID: PMC2779157.

Zhang Q, Davis JC, Lamborn IT, Freeman AF, Jing H, Favreau AJ, Matthews HF, Davis J, Turner ML, Uzel G, Holland SM, Su HC. Combined immunodeficiency associated with DOCK8 mutations. *N Engl J Med*. 2009 Nov 19;361(21):2046-55. doi: 10.1056/NEJMoa0905506. Epub 2009 Sep 23. PMID: 19776401; PMCID: PMC2965730.

Zhang Q, Frange P, Blanche S, Casanova JL. Pathogenesis of infections in HIV-infected individuals: insights from primary immunodeficiencies. *Curr Opin Immunol*. 2017;48:122–33. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2017.09.002>.

Zhao C, Denison C, Huibregtse JM, Gygi S, Krug RM. Human ISG15 conjugation targets both IFN-induced and constitutively expressed proteins functioning in diverse cellular pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Jul 19;102(29):10200-5. doi: 10.1073/pnas.0504754102. Epub 2005 Jul 11. PMID: 16009940; PMCID: PMC1177427.

Zhou H, Wertz I, O'Rourke K, Ultsch M, Seshagiri S, Eby M, Xiao W, Dixit VM. Bcl10 activates the NF-kappaB pathway through ubiquitination of NEMO. *Nature*. 2004 Jan 8;427(6970):167-71. doi: 10.1038/nature02273. Epub 2003 Dec 24. PMID: 14695475.

Zonana J, Elder ME, Schneider LC, Orlow SJ, Moss C, Golabi M, Shapira SK, Farndon PA, Wara DW, Emmal SA, Ferguson BM. A novel X-linked disorder of immune deficiency and hypohidrotic ectodermal dysplasia is allelic to incontinentia pigmenti and due to mutations in

IKK-gamma (NEMO). *Am J Hum Genet.* 2000 Dec;67(6):1555-62. doi: 10.1086/316914. Epub 2000 Oct 24. PMID: 11047757; PMCID: PMC1287930.

Zur Stadt U, Beutel K, Kolberg S, Schneppenheim R, Kabisch H, Janka G, Hennies HC. Mutation spectrum in children with primary hemophagocytic lymphohistiocytosis: molecular and functional analyses of PRF1, UNC13D, STX11, and RAB27A. *Hum Mutat.* 2006 Jan;27(1):62-8. doi: 10.1002/humu.20274. PMID: 16278825.

zur Stadt U, Rohr J, Seifert W, Koch F, Grieve S, Pagel J, Strauss J, Kasper B, Nürnberg G, Becker C, Maul-Pavicic A, Beutel K, Janka G, Griffiths G, Ehl S, Hennies HC. Familial hemophagocytic lymphohistiocytosis type 5 (FHL-5) is caused by mutations in Munc18-2 and impaired binding to syntaxin 11. *Am J Hum Genet.* 2009 Oct;85(4):482-92. doi: 10.1016/j.ajhg.2009.09.005. PMID: 19804848; PMCID: PMC2756548.

zur Stadt U, Schmidt S, Kasper B, Beutel K, Diler AS, Henter JI, Kabisch H, Schneppenheim R, Nürnberg P, Janka G, Hennies HC. Linkage of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis (FHL) type-4 to chromosome 6q24 and identification of mutations in syntaxin 11. *Hum Mol Genet.* 2005 Mar 15;14(6):827-34. doi: 10.1093/hmg/ddi076. Epub 2005 Feb 9. PMID: 15703195.

Zweidler-Mckay PA, Grimes HL, Flubacher MM, Tschlis PN. Gfi-1 encodes a nuclear zinc finger protein that binds DNA and functions as a transcriptional repressor. *Mol Cell Biol.* 1996 Aug;16(8):4024-34. doi: 10.1128/mcb.16.8.4024. PMID: 8754800; PMCID: PMC231398.