

T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İmmünoloji Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

**CD19 EKSİKLİĞİNDE FOXP3 EKSPRESYONUNUN
AKAN ÖLÇERDE DEĞERLENDİRİLMESİ**

Hatice İrem KOŞ

Danışman
Prof. Dr. İsmail REİSLİ

Bu araştırma Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 201318004 proje numarası ile desteklenmiştir.

Konya-2021

TEZ ONAY SAYFASI

Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü İmmünoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Öğrencisi **Hatice İrem KOŞ**'un “**CD19 Eksikliğinde Foxp3 ekspresyonunun akan ölçerde değerlendirilmesi**” başlıklı tezi tarafımızdan incelenmiş; amaç, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

KONYA/ 18.03.2020

Tez Danışmanı Prof. Dr. İsmail Reisli
Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi
İmmünoloji Anabilim Dalı

Üye Prof. Dr. Sevgi Keleş
Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi
İmmünoloji Anabilim Dalı

Üye Prof. Dr. Hasibe Artaç
Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi
Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı

Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun tarih ve.../... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Kısmet Esra NURULLAHOĞLU ATALIK

Enstitü Müdürü

BEYANAT

Bu tezin tamamının kendi çalışmam olduğunu, planlanmasından yazımına kadar hiçbir aşamasında etik dışı davranışımın olmadığını, tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları kaynaklar listesine aldığımı, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

04.06.2021

Hatice İrem KOŞ

BENZERLİK RAPORU

Tezin Tam Adı: CD19 Eksikliğinde Foxp3 ekspresyonunun akan ölçerde değerlendirilmesi

Öğrencinin Adı Soyadı: Hatice İrem KOŞ

Dosyanın Toplam Sayfa Sayısı: 49 sayfa

CD19 EKSİKLİĞİNDE FOXP3 EKSPRESYONUNUN AKAN ÖLÇERDE DEĞERLENDİRİLMESİ			
ORJİNALLIK RAPORU			
%10	%10	%3	%2
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ
BİRİNCİL KAYNAKLAR			
1	www.alerjiklinigi.com İnternet Kaynağı	%4	
2	acikarsiv.ankara.edu.tr İnternet Kaynağı	%2	
3	erbakan.edu.tr İnternet Kaynağı	%1	
4	Submitted to Konya Necmettin Erbakan University Öğrenci Ödevi	%1	
5	www.journalagent.com İnternet Kaynağı	%1	
6	Emel Bülbül Başkan. "T hücre immunitesi", TURKDERM, 2013 Yayın	%1	

Danışman Öğretim Üyesi Adı Soyadı: Prof. Dr. İsmail REİSLİ

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Eğitim ve tez sürecim boyunca bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, bu zorlu süreçte zaman, emek ve anlayışını esirgemeyen, tez danışmanım olmasından dolayı mutluluk duyduğum değerli hocam Prof. Dr. İsmail Reisli 'ye

Yüksek lisans eğitimim süresince bilgi ve yardımlarını hiç eksik etmeyen kıymetli hocalarım Prof. Dr. Sevgi Keleş ve Doç. Dr. Şükrü Nail Güner'e

Tez çalışmalarımı yaparken büyük bir titizlikle numunelerimi çalışmamda ve elde ettiğim sonuçları değerlendirmede bana yardımcı olan başta Emine Taşçı ve Şeyma Çelikbilek Çelik olmak üzere tüm laboratuvar çalışanlarına,

İstatistik analizde ve yorumlamamda yardımları için Doç. Dr. Lütfi Saltuk Demir'e

Bugünlere gelmemde emekleri sonsuz olan ve hayatımın her döneminde beni koşulsuz destekleyen canım annem, babam ve kardeşime,

Hayattaki en büyük şansım, her koşulda sevgi ve desteğini esirgemeyen biricik eşim Yasin Koş'a

Sonsuz teşekkür ve minnetle...

Hatice İrem KOŞ

İÇİNDEKİLER

Tez kapağı ve iç kapak	i
Tez onay sayfası	ii
Beyanat.....	iii
Benzerlik raporu.....	iv
Önsöz ve teşekkür	v
İçindekiler	vi
Kısaltmalar ve simgeler listesi	viii
Şekiller listesi	ix
Tablolar listesi	x
ÖZET.....	xi
ABSTRACT	xii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
1.1. CD19 Molekülü ve Eksikliği	1
1.2. Regülatör T hücreleri	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. İmmün Sistem	3
2.2. Doğal İmmünite	3
2.3. Edinsel İmmünite	4
2.3.1. T Lenfosit Gelişimi	4
2.3.1.1. CD4+ T lenfositler	4
2.3.1.2. CD8+ T lenfositler	6
2.3.1.3. CD4+CD25+FoxP3+ T Hücreler	6
2.3.1.4. Antijen Sunumu ve İşlenmesi	8
2.3.2. B Lenfosit Gelişimi	9

2.3.2.1. B Lenfosit Aktivasyonu ve Antikor Üretimi.....	11
2.4. İmmünglobulinler.....	12
2.5. Antikor Eksikliği İle Giden Primer İmmün Yetmezlikler.....	13
2.5.1. CD19 Molekülü ve Eksikliği	16
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	17
3.1. Araştırmaya Dahil Olma ve Dışlanma Kriterleri	17
3.2. Akım Sitometrik Analiz	17
3.2.1. Kullanılan solüsyonların hazırlanması	17
3.3. İstatistiksel Analiz	22
4. BULGULAR.....	23
4.1. Çalışma Grubu Özellikleri	23
4.2. Yardımcı T lenfosit ve Regülatör T lenfosit Belirteçleri	23
5. TARTIŞMA	26
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	31
7. KAYNAKLAR	32
8. ÖZGEÇMİŞ.....	34
9. EKLER.....	36
Ek 1. Çalışmamızda elde ettiğimiz laboratuvar verileri.....	36
Ek 2. Etik kurul kararı.....	37

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

APC	: Antijen sunan hücre
BHR	: B Hücre Reseptörü
CTL	: Sitotoksik T hücreler
FOXP3	: Forkheadbox p3
IgA	: İmmünglobulin A
IgD	: İmmünglobulin D
IgE	: İmmünglobulin E
IgG	: İmmünglobulin G
IgM	: İmmünglobulin M
ITAM	: İmmünoreseptör tirozin bağımlı aktivasyon motifleri
MFI	: Mean floresan yoğunluk
NK	: Doğal öldürücü hücreler
PBMC	: Periferik kan mononükleer hücreleri
PİY	: Primer immün yetmezlik
SLE	: Sistemik Lupus Eritematozus
TCR	: T hücre reseptörü
Th	: T helper
Treg	: Regülatör T hücre
µl	: Mikro litre

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: İnsan Treg hücresi ve etkileşim mekanizması...	7
Şekil 2: B Lenfosit Gelişimi...	10
Şekil 3: CD19 kompleksi ve gen ekspresyon yolları...	11
Şekil 4: B hücreleri tarafından antijenin tanınması, farklılaşması ve çoğalması.....	12
Şekil 5: İmmünglobulinlerin yapısı	12
Şekil 6: CD19 molekülü C ve V domain yapısı.....	16
Şekil 7: Foxp3 ekspresyonunun akım sitometrik analizi...	19
Şekil 8: Foxp3 ekspresyonunun mean floresan yoğunluğu (MFI)...	20
Şekil 9: CD19 eksikliği olan bir hastanın, bir taşıyıcının ve bir sağlıklı kontrolün hücre içi Foxp3 MFI değerleri...	21

TABLÖLER LİSTESİ

Tablo 1: Primer immün yetmezlik sınıflandırılması... ..	15
Tablo 2: Akım sitometride kullanılan antikorlar ve boyaları... ..	17
Tablo 3: Olguların yaş ortalaması ve cinsiyet dağılımı.....	23
Tablo 4: Hasta, taşıyıcı ve kontrol grubunun yardımcı T lenfosit ve Treg lenfositlerin belirteçlerinin yüzdeleri... ..	24
Tablo 5: Hasta, taşıyıcı ve kontrol grubunun yardımcı T lenfosit ve Treg lenfositlerin belirteçlerinin MFI değerleri... ..	25
Tablo 6: Hasta ve kontrol grubunun yardımcı T lenfosit ve Treg lenfositlerin belirteçlerinin MFI değerlerinin karşılaştırılması.....	26
Tablo 7: Taşıyıcı ve kontrol grubunun yardımcı T lenfosit ve Treg lenfositlerin belirteçlerinin MFI değerlerinin karşılaştırılması.....	26

ÖZET

T.C.

NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

CD19 Eksikliğinde Foxp3 Ekspresyonunun Akan Ölçerde Değerlendirilmesi

Hatice İrem KOŞ

İmmunoloji Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi / Konya -2021

CD19 eksikliği, B lenfosit defekti olarak tanımlanmıştır ve CD19'un mutasyonu olan hastalarda otoimmüniteye (sistemik lupus eritematozus, IgA nefropatisi) sebep olduğu gösterilmiştir. Fakat otoimmünite ilişkili transkripsiyon faktörü Foxp3 ekspresyonu hastalarda analiz edilmemiştir. Bu çalışma ile; CD19 eksikliğinde gelişen otoimmünite durumu ile Regülatör T hücre (Treg) leri arasında bir ilişki olup olmadığının araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmaya, akan hücre ölçer ve genetik analizle CD19 eksikliği tanısı almış olan 3 hasta, bu hastalarla akrabalık ilişkisi bulunan ve genetik olarak doğrulanmış 11 taşıyıcı ve bu hastalarla akrabalığı olmayan 10 sağlıklı kontrol alınmıştır. Hasta, taşıyıcı ve kontrollerden alınan tam kan örneklerinden periferik kan mononükleer hücreler (PBMC) izole edilmiştir. İzole edilen PBMC'lerden CD3, CD4, CD25 ve CD127 ekspresyonlarını değerlendirmek amacıyla yüzey boyama işlemi, Foxp3 ekspresyonunun değerlendirilmesi için hücre içi boyama yöntemi gerçekleştirilmiştir. Boyama sonrası FACSCanto II akan hücre ölçerde yardımcı T lenfositlerin ve Treg hücrelerin yüzey belirteçlerinin ekspresyon yüzdeleri ve ortalama floresan yoğunlukları (MFI) ile ve intrasitoplazmik Foxp3'ün yüzde ve MFI değerleri belirlenmiştir.

Hasta, taşıyıcı ve kontrol grubunun CD4+ T lenfosit ve Treg hücre belirteçlerinin ekspresyon yüzdeleri ve mean floresan yoğunluğu (MFI) değerleri karşılaştırıldı. CD4+ T lenfosit yüzdeleri ve Treg hücrelerin belirteçlerinin yüzde değerleri yönünden gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0.05$). Hasta grubu, taşıyıcı grubu ve kontrol grubunun CD4+ T lenfosit MFI değeri ve Treg hücrelerin belirteçlerinin (CD4+ CD25+ CD127-, CD4+ FOXP3 ve CD4+ CD25+) MFI değerleri yönünden istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur ($p=0,001$). Kontrol grubunun CD4+ T lenfosit MFI değeri, taşıyıcı grup ($p=0,003$) ve hasta grubundan ($p=0,033$) istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksektir. Benzer şekilde kontrol grubunun Treg hücre belirteçlerinin (CD4+CD25+CD127-, CD4+ FOXP3, CD4+CD25+) MFI değerleri de taşıyıcı ve hasta gruplarından istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksektir.

Bu çalışma ile CD19 eksikliği olan hastalarda ve taşıyıcılarda yardımcı T lenfosit ve Treg lenfositlerin belirteçlerinin MFI değerlerinin kontrole kıyasla düşük olduğu gösterilmiştir. Bu bulgumuz, CD19 eksikliği olan veya taşıyıcı olan bireylerde yardımcı T lenfositlerin etkilenmiş olabileceğini ve bozulmuş baskılayıcı fonksiyon sebebiyle T hücre aracılı otoimmünitenin gelişimi ile ilişkili olabileceğini düşündürmüştür.

Anahtar Kelimeler: CD19 eksikliği, Foxp3, Regülatör T hücre

ABSTRACT

REPUBLIC OF TURKEY
NECMETTİN ERBAKAN UNIVERSITY
HEALTH SCIENCES INSTITUTE

Foxp3 Expression in CD19 Deficiency Evaluation of Flowing Meter

Hatice İrem KOŞ

Department of Immunology
Master Thesis / Konya-2021

CD19 deficiency has been described as a B lymphocyte defect. It has been shown to cause autoimmunity (systemic lupus erythematosus, IgA nephropathy) in patients with CD19 mutation. With this study, it was aimed to investigate whether there is a relationship between the status of autoimmunity developed in CD19 deficiency and regulator T cells.

The study included 3 patients who were diagnosed with CD19 deficiency by flow cell meter and genetic analysis, 11 carriers with a kinship relationship with these patients and genetically confirmed and 10 healthy controls who were not related to these patients. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from whole blood samples from patients, carriers and controls. Surface staining was performed to evaluate the expressions of CD3, CD4, CD25 and CD127 from isolated PBMCs, and intracellular staining method was used to evaluate Foxp3 expression. After staining, expression percentages and mean fluorescence intensity (MFI) of helper T lymphocytes and Treg cells on the FACSCanto II flow cytometer and the percentage and MFI values of intracytoplasmic Foxp3 were determined.

Expression percentages and mean fluorescence intensity (MFI) values of CD4+ lymphocyte and Treg cell markers of the patient, carrier and control groups were compared. There was not statistically significant difference between the groups in terms of CD4+ T lymphocyte percentages and percentage values of Treg cells ($p>0.05$). A statistically significant difference was found between the patient group, carrier group and control group in terms of CD4 + T lymphocyte MFI value and MFI values of the markers of Treg cells (CD4+ CD25+ CD127-, CD4+ FOXP3 and CD4+ CD25+) ($p=0,001$). The CD4+ T lymphocyte MFI value of the control group was statistically significantly higher than the carrier group ($p=0,003$) and the patient group ($p=0,033$). Similarly, MFI values of Treg cell markers (CD4+ CD25+ CD127-, CD4+ FOXP3, CD4+ CD25+) of the control group were statistically significantly higher than the carrier and patient groups.

In this study, it was shown that the MFI values of T helper T lymphocyte and Treg lymphocyte markers were lower in patients with CD19 deficiency and carriers compared to the control. This finding suggests that the function of helper T lymphocytes may be affected in individuals with CD19 deficiency or carriers, and may be associated with the development of T cell mediated autoimmunity due to impaired suppressor function.

KeyWords: CD19 deficiency, Foxp3, Regulatory T cell

1. GİRİŞ VE AMAÇ

1.1. CD19 Molekülü ve Eksikliği

Primer immün yetmezlik (PİY), doğumsal olan ve immün sistem hücre gelişimini veya fonksiyonlarını etkileyen bir gendeki mutasyon sonucunda gelişen, kronik ve/veya yineleyen bakteriyel, fungal ve viral enfeksiyonlara yatkınlık ile karakterize hastalıklar grubudur. Çoğunluğu otozomal resesif kalıtım gösteren PİY tablolarının, ülkemizde olduğu gibi akraba evliliğinin sık olduğu topluluklarda daha fazla görüldüğü düşünülmektedir. Her yıl saptanan yeni mutasyonlar ile PİY spektrumu genişlemekte ve nadir hastalık olmadıkları görülmektedir.

İmmün sistem hücrelerinden B lenfositlerin yüzeyinde CD19, CD21, CD81 ve CD225 molekülleri bir kompleks (CD19 Kompleksi) oluşturur. Bu kompleks B hücre antijen reseptörü (BHR) ile birlikte görev yapmakta hem BHR-bağımlı hem de BHR-bağımsız intrinsik B lenfosit sinyal yolağını uyarmaktadır. Bugüne kadar CD19 kompleksini oluşturan CD19, CD81 ve CD21 moleküllerinin eksikliklerinin PİY tablolarına yol açtığı gösterilmiştir.

B lenfosit ko-reseptörüne ait tanımlanmış ilk hastalık örneği CD19 eksikliğidir ve ilk kez Konya’da kliniğimizce tanımlanmıştır. CD19 molekül eksikliğinde, kemik iliğinde normal B lenfosit gelişimi olmakta ancak BHR yoluyla B lenfosit uyarımı ve antijen spesifik antikor yanıtları bozulmakta, hipogammaglobulinemi meydana gelmekte ve bellek B lenfosit sayısı azalmaktadır (van Zelm MC 2006). CD19 geninde homozigot mutasyon olan hastalarda otoimmün hastalıklara (sistemik lupus eritematozus, IgA nefropatisi) yatkınlık olmaktadır. CD19 eksikliği için taşıyıcı olan bireylerde de romatizmal hastalık testlerinde pozitif bulgular saptanmıştır.

1.2. Regülatör T hücreleri

Regülatör T hücreleri (Treg) olarak bilinen düzenleyici T hücreleri, immün sistemin öz antijenlerine karşı tolerans, otoimmün hastalıklarının önlenmesi ve bağışıklık sisteminin düzenlenmesi açısından büyük önem taşımaktadır. Bağışıklık sisteminin yanıtlarının uygun şekilde kısıtlanması ve düzenlenmesi, sağlığı korumak için çok önemlidir. Treg hücrelerinin, T hücre proliferasyonunu ve sitokin üretimini inhibe edebildiği ve otoimmünitenin önlenmesinde kritik bir rol oynadığı gösterilmiştir.

Treg hücrelerinin çeşitli işlevlerine sahip farklı alt kümeleri mevcuttur. Treg'ler; CD4+ CD25+ yüzey moleküllerini ve baskılayıcı sitokinler olan IL-10 ile TGFβ1'i taşırlar ve genellikle akım sitometri ile tanımlanabilir (Savage PA 2020). Bu hücreler için en spesifik işaret, hücre içi lokalize olan Foxp3'tür. FOX protein ailesinin bir üyesi olan Foxp3, Treg hücrelerinin gelişmesinde ve işlevinde ana düzenleyici olarak işlev görür. FoxP3 proteini, gen aktivitesini kontrol etmedeki rolü nedeniyle bir transkripsiyon faktörüdür (Miyara M 2007).

Treg hücrelerinin işlevini yerine getirememesi durumunda ise immün sistem yanıtları uygun bir şekilde düzenlenemez, baskılanamaz ve doku hasarına yol açan yıkıcı bir etki oluşur. Bunun sonucunda otoimmün hastalıklar meydana gelmektedir. Ancak literatürde; B lenfosit kaynaklı CD19 eksikliğinde gelişen otoimmünite durumu ile Tregler arasında herhangi bir ilişki olup olmadığına dair bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu çalışma ile antikor eksiklikleri grubunda yer alan ve çalışma grubumuzu oluşturan CD19 eksikliği olan hastalarımızda ve taşıyıcılarda Foxp3 ekspresyonunun değerlendirilmesi ve yaşamın ileri dönemlerinde gelişebilecek otoimmün hastalıklar yönünden bir öngörü belirteci olup olamayacağının saptanmasını amaçlamaktayız.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İmmün Sistem

Bağıışıklık sistemi, vücudu patojenler veya allerjenler gibi istilacı ajanlardan koruyan savunma sistemidir. Bu sistemde yabancı ajanların tanınması ve ortadan kaldırılması için gereken farklı hücre ve moleküller bulunmaktadır. Ayrıca hücre yüzeylerinde eksprese edilen özel molekülleri tanıyarak, doku homeostazı ve doku tamirini de düzenler.

İmmün sistem hücreleri malign, ölü ya da hasarlanmış hücreleri tanır ve ortadan kaldırır. İmmün sistem içinde yer alan hücreler kemik iliğindeki hematopoetik kök hücrelerinden köken alır ve birçok prosesle işlenerek olgunlaşmaya kadar kemik iliğinde kalabilir veya vücudun farklı bölgelerine göç edip orada olgunlaşabilirler. Bu hücreler, kendilerinin veya diğer hücrelerin salgıladığı hormon benzeri çözünmüş moleküllerin etkisiyle gelişir, yanıt oluşturur veya baskılanır. Bu hücreler özelleşmiş lenfoid organlarda kompleks bir mikro yapıya dönüşüp, neredeyse her türlü dokuya yerleşirler. Mikro çevrelerinde diğer hücrelerle etkileşen karakteristik yüzey moleküllerini eksprese ederler. Bu hücre yüzey molekülleri CD (cluster of differentiations) olarak adlandırılır. Aktive olduğunda immün hücreler; immün sistem hücreleri ve diğer hücreler arasındaki etkileşimi sağlayan küçük proteinler ile sitokinler salgılar. Salgılanan peptid ya da protein yapıdaki bu moleküllere sitokin adı verilir (Abbas AK 2015).

2.2. Doğal İmmünite

İmmün sistem genel olarak doğal ve edinsel (kazanılmış) olarak ikiye ayrılır. Bu iki sistem birbirinden bağımsız olmayıp çok sıkı bir ilişki içinde çalışmaktadır. Doğal immün yanıt; yabancı maddenin vücuda girmesinin ardından o maddeyi tanıyıp yıkıma uğratmak için ilk basamağı oluşturur. Doğal immün sistem; monosit, makrofaj, dendritik hücre, doğal katil hücre (NK), eozinofil, bazofil, nötrofil ve mast hücrelerini içeren değişik tip hücreler aracılığı ile sağlanır. Özgöl olmayan korunmayı sağlar. Yanıtın hızlılığı ve erken yanıt oluşması; bu yanıtın özgüllüğünü ve uyarlanmış olmasını engellemektedir. Eğer mikroorganizmalar özgöl olmayan immün yanıtı kurtulmayı başarabilirlerse; bu durumda savunmanın ikinci aşaması olan kazanılmış yani edinsel immünite, konağın yaşamını güvence altına alır.

2.3. Edinsel İmmünite

Edinsel immün yanıt; doğal immün yanıtı takip ederek patojenle karşılaşma sonrasında patojene ait antijene spesifik olarak gelişen daha etkili yanıtlar oluşturmaktadır. Bu yanıtın özgüllük, hafıza, özelleşme, tolerans ve homeostaz sağlanması gibi önemli özellikleri vardır. Edinsel immün yanıtta T ve B lenfositler başlıca rol oynamaktadır. T hücreleri hücresel immüniteye, B hücreleri ise humoral immüniteye ait hücrelerdir. Hücresel immün yanıtın hedefi vücuda giren antijenlerin sebep olduğu enfeksiyonları, ya da tümör hücrelerini yok ederek organizmayı tehditlere karşı korumaktır. Humoral immünitenin işlevi ise yabancı maddeye karşı plazma hücrelerine dönüşerek antikor üretimi sağlamaktır. İmmünitenin bu tipi antijen ile antikor yanıtı üzerine kurulmuştur.

Edinsel bağışıklıkta yer alan T ve B lenfositlerin antijen yapısını tanınmasında farklılıklar bulunur. T lenfositler küçük peptid yapıdaki antijenleri tanırken, B lenfositler daha büyük yapıdaki protein, lipid, karbonhidrat ve nükleik asit yapısındaki antijenleri tanır.

2.3.1. T Lenfosit Gelişimi

Hücresel immünitede rol oynayan hücre grubu T lenfositlerdir. T lenfositler kemik iliğinde oluşur ve timusta olgunlaşır. T lenfositler antijen ile ilk karşılaşmadan sonra aktive olurlar (Saroj 2012). Antijen tanımaya cevap olarak ortaya çıkan T hücre proliferasyonu, IL-2 ağırlıklı otokrin mekanizmaları aracılığıyla naive T hücrelerden efektör T hücrelere farklılaşır. Sonrasında, periferik dokulara ulaşabilmek için kemokin reseptörleri ve adezyon moleküllerinin ekspresyonu gerçekleştirebilirler. Böylelikle, efektör fonksiyon kazanırlar. Efektör fonksiyonlarına göre T lenfositler kendi içinde alt gruplara ayrılırlar.

2.3.1.1. CD4+ T lenfositler

Yardımcı T lenfositler olarak da isimlendirilen CD4+ T lenfositler peptid yapıdaki antijenlere yanıt oluşturan edinsel immün sistem hücreleridir. CD4+ hücreler, fagositlerin ve diğer lenfositlerin aktivasyonunda önemli rol oynayan çok sayıda yüzey molekülü eksprese ederler ve çok sayıda sitokin salgırlar. Yardımcı T lenfositler aktive olduklarında spesifik sitokinler salgılayarak CD8+ T lenfositlerin, B lenfositlerin ve makrofajların aktivasyonuna yardımcı olurlar.

CD4+ efektör T hücrelerin farklı alt tipleri, ürettiği sitokinlerin tipine dayanılarak ayrılır. T helper 1 (Th1) adı verilen CD4+ T hücreler, çoğunlukla gecikmiş tipte aşırı duyarlılık reaksiyonları gibi hücresel immünitede görev alan IFN- γ ve TNF- α sitokinlerini üretirler. Th2 olarak adlandırılan CD4+ T hücreler ise tercihen B hücre yanıtlarını ve eozinofil aktivasyonunu düzenleyen sitokinler olan IL-4, IL-5 ve IL-13 üretirler. Th1 sitokin profili, hücre içi patojenlere karşı korunmada esastır. Makrofajlardan salgılanan IL-12, naif CD4+ T hücrelerinin CD4+ Th1 yönünde farklılaşmasını uyarır (Abbas AK 2015). IFN- γ , IL-2 ve TNF- β salgılayan Th1 hücreleri makrofaj ve NK hücrelerini aktive ederek fagositoz veya öldürme yeteneklerini arttırmaktadır (Nelson 2004). IFN- γ , Th1 hücreleri tarafından üretilen en önemli sitokinlerden biridir, makrofajları aktive eder ve B hücrelerde antikor izotiplerinin üretimini uyarak fagositozu aktifleştirir (Camcıoğlu ve Deniz 2007).

Th2 sitokinleri, B lenfositleri IgE üretimi için aktive eder. Antijen sunan hücrelerden (APC) IL-12 salgılanmazsa, T lenfositler IL-4 salgırlar ve CD4+ T hücrelerinin CD4+ Th2 yönüne doğru polarize olmasını sağlar. Th2 hücreleri IL-4 salgılayarak IgE antikorunun üretimini, IL-5 salgılayarak eozinofillerin oluşmasını ve IL-13 salgılayarak mukus sekresyonunu sağlar. Bu hücreler özellikle helmantik parazitlere karşı eozinofil aracılığıyla fagositozdan bağımsız immüniteyi aktifleştirir (Abbas 2007). IL-4, IL-5, IL-13 salgılayan Th2 hücreleri humoral immün yanıtlardan ve alerjik reaksiyonlardan sorumludur. Th2 yönünde polarizasyon Th1 oluşumunu baskılar (Nelson 2004).

T hücre çoğalması; belli bir peptid antijene yanıt veren naif T hücre sayısı yeterli değildir ve patojenle savaşmak için çoğalması gerekir. T hücre reseptörü (TCR)-MHC peptid kompleksi birleşimi ve eş-uyaran reseptörü (CD28) ile uyarım sonucunda klonal çoğalma gerçekleşir. CD28 aracılı sinyaller, başta IL-2 salgılanması olmak üzere, yanıt veren T hücreler üzerinde pek çok aktivasyon molekülünün ekspresyonu için zorunludur. T hücre reseptöründen gelen birçok sinyal birçok genin aktivasyonu ve T hücrenin hücre döngüsüne girmesine neden olur. T hücre çoğalması esnasında salgılanan IL-2'nin ortaya çıkardığı diğer sonuç ise, bu sitokinin reseptörünün (IL-2R; CD25) T hücre yüzeyinde ifade edilmeye başlamasıdır (Anderton 2002).

2.3.1.2. CD8+ T lenfositler

CD8+ hücrelerin temel efektör fonksiyonu antijen taşıyan hedef hücrelerin lizisidir. CD8+ hücreler timustan çıkışta sitotoksik T hücrelerine farklılaşmaya programlanmıştır ve sitotoksik T hücreler (CTL) olarak da adlandırılırlar.

CD8+ T lenfositler patojenle enfekte veya malign dönüşüme uğramış konak hücrelerini öldürür. CD8+ T hücreler, uygun MHC sınıf I/peptid kompleksi tanıyınca, hedef hücrede apoptozise neden olur. T hücre antijen temasının olduğu bölgeye toplanır; temas alanında özelleşmiş litik granüller birikir. Por oluşturuca bir protein olan perforin, litik granüllerden salınarak hedef hücre membranına saldırır. Proteazlar (granzimler) enzim kaskadlarını aktive ederek apoptotik olayı başlatmak için hedef hücre içine verilirler. CTL IFN- γ , TNF- α ve IL-2 gibi sitokinleri üretir. IFN- α/β , viral replikasyonu baskılar ve MHC sınıf I ekspresyonunu artırır (Hall ve Guyton 2007).

2.3.1.3. CD4+CD25+FoxP3+ T Hücreler

Treg hücreler CD4+ T lenfositlerinin bir alt grubudur. Treg hücreleri, CD4+ T lenfositlerinin %5-10' unu oluştururlar ve TCR yoluyla uyarılmış olan T lenfositlerinin çoğalmasını ve sitokin üretimini baskılar. Böylece öz veya yabancı antijenlere karşı oluşan T lenfositler ile ilişkili immün yanıtlar baskılanmış olur. Otoimmün hastalıkların oluşunu engelleyen Treg lenfositler, intrinsik olarak işleyen anerjiden farklı olarak, diğer hücrelerin immünolojik yanıtlarını düzenleyerek etki gösterirler. Bu mekanizma ile tüm inflamatuvar yanıtlar baskılanır.

Treg hücreler iki şekilde meydana gelir. Timusta T lenfositlerin gelişimi sırasında oluşana "doğal" Treg (nTreg) hücreleri ve inflamatuvar yanıtlar sırasında CD4+ veya CD8+ lenfositlerin uyarılmasıyla oluşana Treg hücrelere ise "indüklenmiş" Treg (iTreg) hücreler denir. nTreg ve iTreg hücreleri, CD4 ve CD25 molekülleri ile birlikte FoxP3 molekülünü de eksprese eder. Treg hücreler, immün sistemi baskılayıcı etkilerini IL-10 ve TGF- β sitokinleri ile gösterirler. Treg hücrelerinin de salgıladığı bu sitokinler, immün yanıtları baskılayıcı özelliktedir (Gallimore ve Godkin 2008).

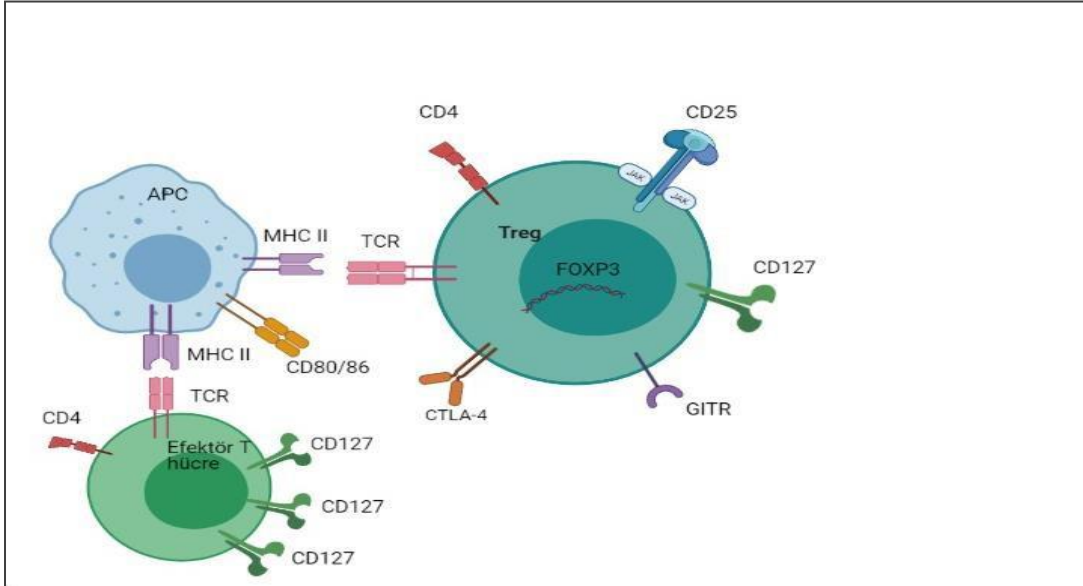
CD4⁺ T lenfositler, IL-2 (CD25) ve IL-7 (CD127) reseptörlerinin ekspresyonuna göre üç alt grup halinde sınıflandırılabilir.

-CD127⁺ CD25^{düşük} / - alt kümesi, IL-2 üreten naive ve merkezi bellek T hücrelerini içerir.

-CD127⁻ CD25⁻ alt kümesi esas olarak perforin ve IFN- γ ifade eden efektör T hücrelerini içerir.

-CD127^{düşük} CD25^{yüksek} alt küme, FoxP3 ifade eden Treg hücrelerini içerir (Richard M. Dunham 2008).

Düzenleyici T hücreleri; yüzeylerinde kendi öz antijenlerimize toleransın korunmasında ve alloantijen yanıtınlığında hayati rol oynarlar. IL-2 reseptör α (CD25) zincirinin ekspresyonu, bu hücrelerin fenotipik bir belirteci olarak kullanılmasına karşın, diğer fonksiyonel T lenfositleri üzerinde de ifade edildiğinden Treglere özgü değildir (Woo-jin Yun 2010).



Şekil 1. İnsan Treg hücresi ve etkileşim mekanizması

Foxp3 eksprese eden Treg hücre gelişimi ve fonksiyonundaki kusurlar insanlarda birçok immünolojik hastalığına yol açar. Özellikle, Foxp3 proteininin yokluğu veya düşük ekspresyonu, Foxp3'ün kendisi tarafından veya çeşitli kofaktörlerle işbirliği ile sıkı bir şekilde düzenlenen baskılayıcı işlevi değiştirir. Foxp3 molekülü, Treg hücrelerinin spesifik fenotipini ve fonksiyonel özelliklerini indüklemek ve stabilize etmek için oldukça gerekli olan çok önemli bir düzenleyici transkripsiyon faktörüdür.

Bu nedenle tanımlanmış hedef genleri etkinleştirebilen veya baskılayabilen bir Treg hücreye özgü program oluşturan birkaç transkripsiyon faktörüyle (örneğin, NFAT, Runx, GATA3 ve STAT3) işbirliği yoluyla işlevini gerçekleştirir. Bu nedenle, bozulmuş Foxp3 ekspresyonu in vitro ve in vivo bozulmuş baskılayıcı fonksiyon sebebiyle T hücre aracılı otoimmün yanıtlar ile sonuçlanır (Alessandra Colamatteo 2020).

2.3.1.4. Antijen Sunumu ve İşlenmesi

Antijen sunucu hücreler tarafından işlenen antijenler, bu hücrelerin yüzeyindeki majör histokompatibilite kompleksi (MHC) üzerinde T lenfositlere sunulur. T lenfositler MHC'ye bağlanmış olan antijeni yüzeyindeki T hücre reseptörü (TCR) ile tanır ve aktive olur. T lenfositler aktive olduğunda lenfoid organ içinde veya enfeksiyon bölgesine göç ederek etkili olmaktadır (Hall ve Guyton 2007).

T lenfositlere peptid antijeni sunan iki MHC sınıfı var olup, bunlar sınıf I ve sınıf II MHC molekülleridir. Sınıf I MHC molekülünde T hücre eş reseptörü CD8'in bağlanma bölgesi bulunmaktadır. CD8+T lenfositler, yalnızca CD8'in bağlanabileceği sınıf I MHC moleküllerinin gösterdiği peptid yapıdaki antijenlere yanıt verebilir. Sınıf II MHC moleküllerinde ise T hücre eş reseptörü CD4'e bağlanma bölgesi bulunur. CD4 sadece sınıf II MHC molekülerine bağlanabilir ve bu molekülle sunulan antijeni tanıyabilir. Sınıf I MHC molekülleri sunacağı peptid yapıdaki antijenleri sitozolik yapıdaki proteinlerden, sınıf II MHC molekülleri sunacağı peptid yapıdaki antijenleri hücre dışı proteinlerden edinir (Yeşilyurt ve Fidan 2011).

Antijen sunucu hücrenin antijen sunumu sonrası CD4+ T lenfositin aktivasyon sinyalleri başlatılır. CD4+ T lenfositlerin aktivasyonu ile hücre içinde sitokin üretimi için transkripsiyon faktörleri aktive olur. Üretilen bu sitokinler diğer yardımcı T hücrelerin çoğalmasını ve farklılaşmasını uyarır (Ross ve Pawlina 2006). Hücre içi mikroplarla oluşan enfeksiyonları yok eden CD4+ T hücreleri, fagositleri aktive ederek bu fagositlerin veziküllerinde yaşayabilen mikropların yok edilmesini de sağlar. Salgılanan sitokinler CD4+ T lenfositlerin fenotipini belirler (Alberts 2008).

2.3.2. B Lenfosit Gelişimi

B Lenfosit gelişimi antijen-bağımlı ve antijen-bağımsız olmak üzere iki evreden meydana gelir. Kemik iliğinde, antijenden bağımsız evre gerçekleşmektedir. Dalak ve lenf nodu gibi sekonder lenfoid organların germinal merkezlerindeki basamaklar ise antijen bağımlıdır.

B lenfositlerin gelişimi başlıca kemik iliğinde olur. Kemik iliğindeki pro-B hücreden immatür B hücresine kadar olan basamaklar antijenden bağımsız olarak gerçekleşmektedir (Abbas AK 2018).

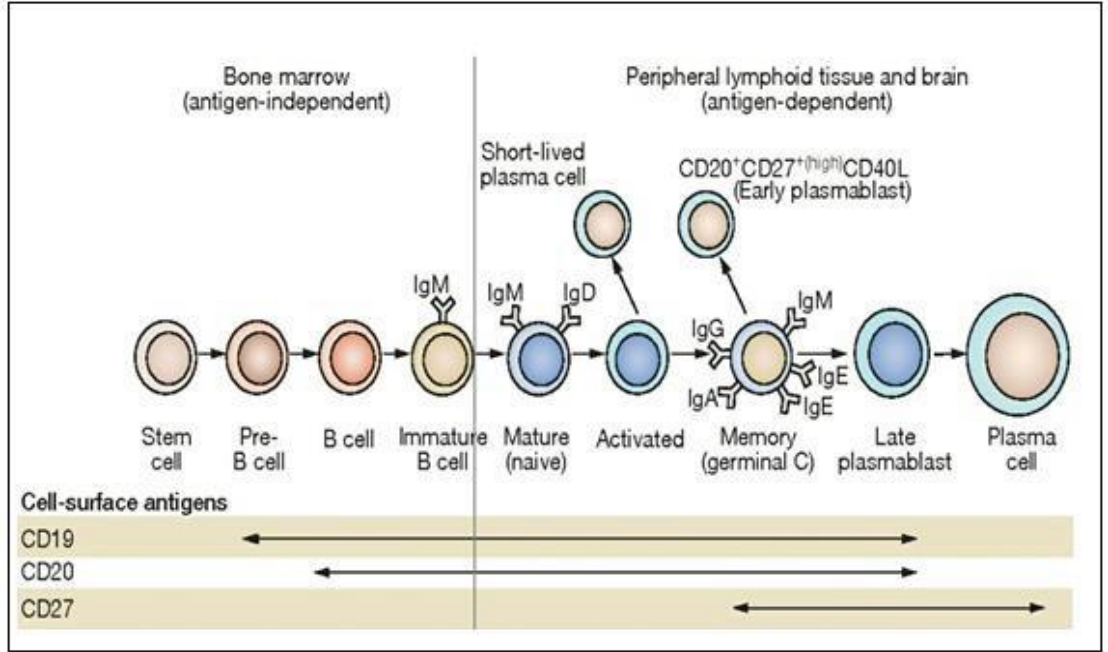
B lenfosit öncülleri, IL-7' nin etkisiyle çoğalarak pro-B hücrelerini meydana getirirler. Bu aşamada ağır zincir lokusunda Ig genleri yeniden düzenlenmeye başlar (Melchers F 2015). VDJ yeniden düzenlenmesini yapan hücreler, I μ proteinlerini sitoplazmada taşıyan pre-B hücrelerine dönüşür. İmmatür B lenfositler, yüzeyinde Ig α ve Ig β sinyal proteinlerin birleşmesi ile oluşan pre-B hücre reseptör (pre-BHR) kompleksini ve μ zincirini sergiler. Pre-BHR kompleksi, başarılı Ig ağır zincir izotipleri dönüşümü yapmış B hücrelerinin yaşamını sürdürmesi ve çoğalması için gereken sinyalleri sağlar. İmmatur B lenfositlerin sitoplazmalarında CD22 ve yüzeylerinde CD19 molekülü vardır. CD45 (CLA), CD20 antijeninden sonra belirir. Yüzeylerinde IgM eksprese ederler. B hücresinin olgunlaşması, kemik iliğinde ve kemik iliğinden çıkıp, dalağa girdiğinde sürdürülür. Son olgunlaşma basamağı, IgD'nin IgM ile birlikte ekspresyonudur (LeBien TW 2008).

B lenfosit reseptörü, yüzeyinde bulunan immunoglobulin (Ig) molekülleri ve sinyal iletili moleküllerden oluşmaktadır. BHR' nin yapısında IgM ve IgD molekülleri vardır. Yüzey IgM, B lenfosit yüzeyinde monomer şeklinde bulunur. B lenfosit membranının lipid tabakasına gömülüdür ve transmembran bölge adı verilen bir kısmı vardır. Sinyal iletili olarak çalışan Ig-alfa (CD79a) ve Ig-beta (CD79b) zincirleri mevcuttur. Ig-alfa ve Ig-beta, heterodimer oluşturmak için disülfid bağları ile birbirine bağlanmıştır. Bu zincirlerinin yarısı, hücre sitoplazması içinde bulunur ve tirozin kinaz enzimleri ile ilişkileri vardır. Bu şekilde antijenik uyarımı hücreye iletme işlevini gerçekleştirirler (Reth M 1997).

Naif matür B hücrelerinin BHR'ünün sitoplazmik kuyrukları kısadır. Bu kuyruk sinyal iletimini yapamaz.

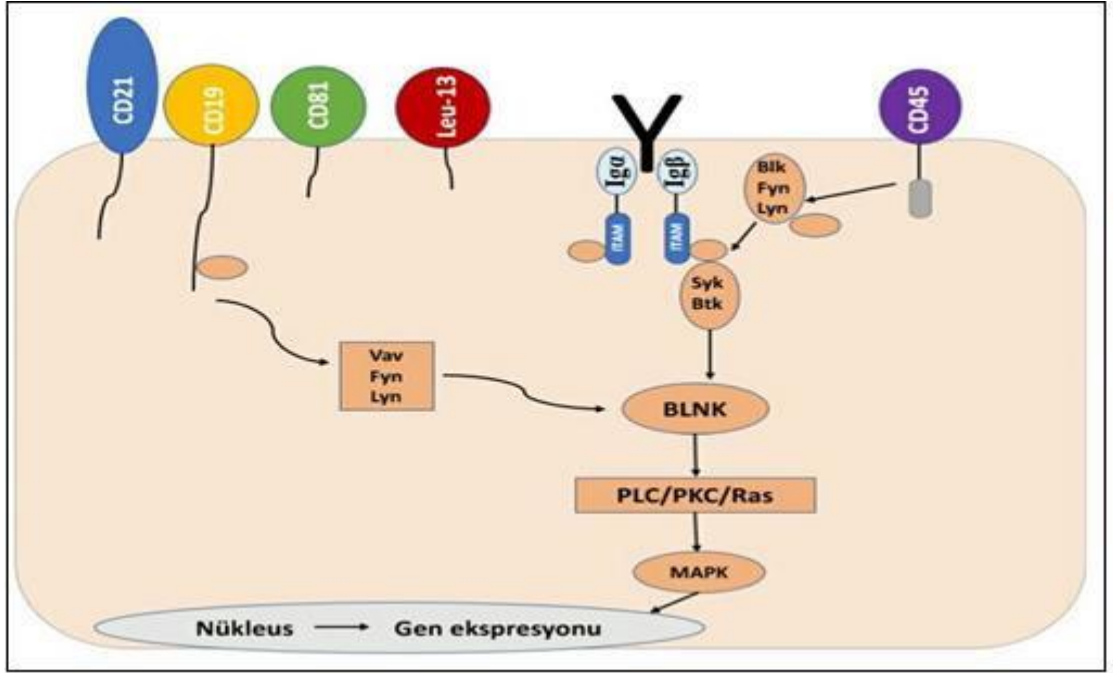
BHR ile ilişkili sinyaller Igα ve Igβ tarafından iletilir. Igα ve Igβ'nın sitoplazmik kısımları tirozinden zengin ITAM (immuno receptor tyrosine-based activation motifs) motifleri içerirler ki bu motifler sinyal transdüksiyonu için gereklidir. Sinyal iletimi için ITAM motiflerindeki tirozin aminoasitleri bazı sitoplazmik protein kinazlar tarafından fosforile edilir. Çeşitli sinyal enzimleri ve adaptör proteinlerin yardımı ile farklı sinyal yolları uyarılır (Lydyard P 2013).

Tüm bu sinyal kaskadları, gen ekspresyonunu indükleyen transkripsiyon faktörlerinin uyarılması ile sonuçlanır. Fos, Jun, NF-κB gibi transkripsiyon faktörleri, B hücre proliferasyonunu ve farklılaşmasını sağlayan genlerin ekspresyonunu başlatırlar (Abbas AK 2015).



Şekil 2. B Lenfosit Gelişimi (Nat Clin Pract Neurol 2008 Nature Publishing Group)

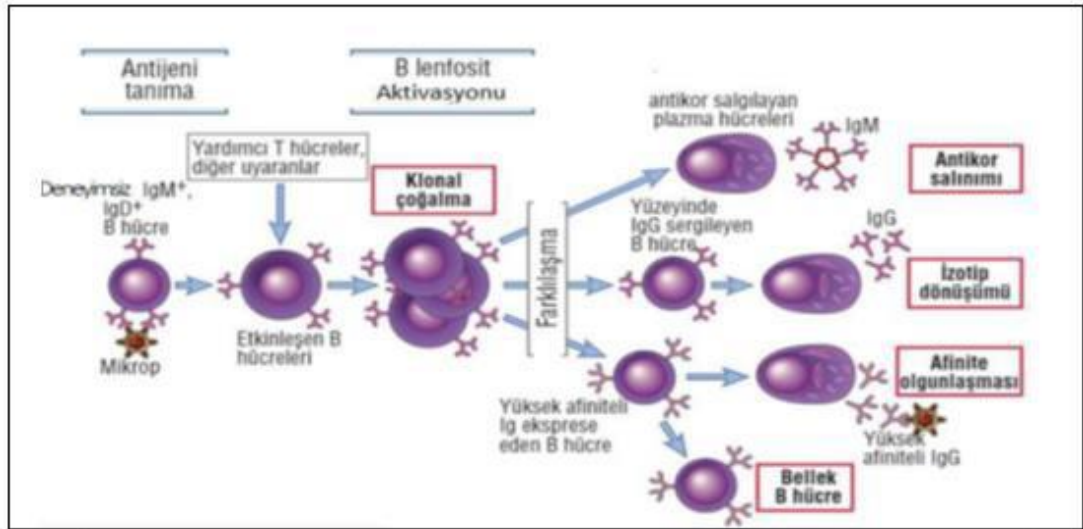
B lenfosit aktivasyonu ve genlerin ekspresyonu için, B hücre reseptör sinyali yeterli değildir, eş zamanlı B hücre ko-reseptör sinyalleri gereklidir (Carroll MC 2004). Olgun B hücrelerinin yüzeyinde CD19, CD21, CD81 ve CD225 molekülleri bir kompleks oluşturur. Bu kompleks B hücre antijen reseptörü ile birlikte görev yapmakta hem BHR-bağımlı hem de BHR-bağımsız intrinsik B lenfosit sinyal yolağını uymaktadır. BHR sinyal iletiminin başlatılması, CD19, CD21, CD81 ve CD225 gibi ko-reseptörler tarafından artırılmaktadır (Engel P 1995).



Şekil 3. CD19 kompleksi ve gen ekspresyon yolları

2.3.2.1. B Lenfosit Aktivasyonu ve Antikor Üretimi

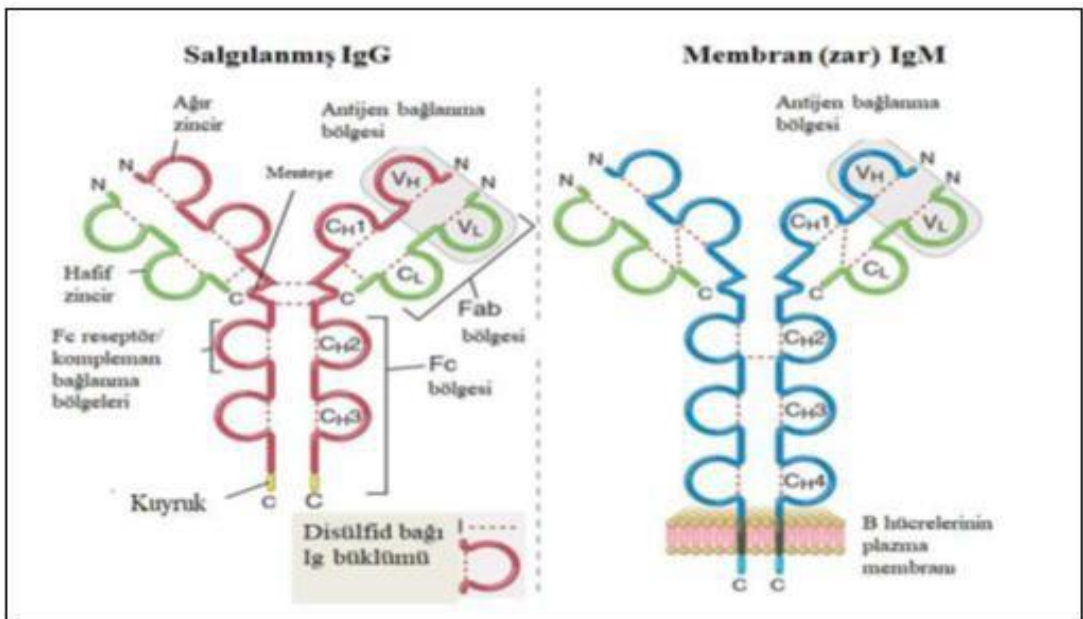
Antijenle karşılaşmamış B lenfositler antijen reseptörü görevi yapan IgM ve IgD'yi yüzeylerinde taşırlar. Bu hücreler antijeni tanır ve yardımcı T hücreleri ve diğer uyarıların etkisi ile çoğalır, klonal genişler ve antikor üreten etkin plazma hücrelerine farklılaşır. Bu farklılaşma sürecinde bazı B hücreleri mikroorganizmaya spesifik etkin görevleri olan, farklı ağır zincir izotipinde antikorlar üretmeye başlayabilir. Bu işleme ağır zincir izotip dönüşümü denir. Protein yapısındaki antijenler ile tekrarlayan karşılaşmalar sonucunda yüksek antijen afiniteli antikorlar üretilir. Bu işleme ise afinite olgunlaşması adı verilir. Böylece mikroorganizma ve onların toksinlerini etkisiz hale getiren, bağlanma kapasiteleri yüksek olan antikorların üretimi gerçekleşir (Hardy RR 2001).



Şekil 4. B hücreleri tarafından antijenin tanınması, farklılaşması ve çoğalması (Abbas AK 2018).

2.4. İmmünglobulinler

İmmünglobulinler glikoprotein yapıdadırlar. Membrana bağlı olarak B hücre yüzeylerinde veya plazma hücrelerinden salgılanarak kanda çözünebilen formda bulunabilirler. Başlıca görevleri; antijen ve toksinlerin nötralizasyonu, mikroorganizmaların opsonizasyonu ve kompleman aktivasyonudur. İmmünglobulin molekülleri birbirine eş iki ağır (H) ve iki hafif (L) zinciri olan ve her bir zinciri bir değişken (V) bir sabit (C) bölge içeren dört polipeptid zincirinden oluşur.



Şekil 5. İmmünglobulinlerin yapısı (Abbas AK 2018)

İmmünglobulinler, ağır zincirlerinin farklılıklarına IgA, IgG, IgM, IgD ve IgE adı verilen 5 izotipe ayrılır. Her bir izotip, büyüklük, elektriksel yükü, aminoasit dizilimi ve fonksiyonları açısından birbirinden farklıdır. Ayrıca IgG dört alt sınıfa (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) ve IgA iki alt sınıfa (IgA1, IgA2) ayrılır. IgM ve IgD olgun B lenfositlerin yüzeyinde yer alan glikoproteinlerdir (Abbas AK 2015). IgG serum immünglobulinlerinin %70-75'ini oluşturur ve serumda sekonder cevap sırasında üretilen başlıca immünglobulindir. IgG'nin plasentayı geçer ve yarı ömrü 21-23 gündür (Butler JE 2009). IgM ise immünglobulin havuzunun %10'unu oluşturur ve pentamer şeklinde bulunduğundan dolaşımdaki en büyük immünglobulin olarak görünmektedir. IgM molekülleri, B lenfositler üzerinde monomerik formda antijen tanıyan reseptörler olarak bulunurlar. Serum immünglobulinlerinin %15-20'si IgA'dır. Seromüköz salgılardaki (tükürük, kolostrum, süt, trakeobronşial ve genitoüriner salgılar) başlıca immünglobulindir. İnsanlardaki IgA'nın %80'i monomerik, kalan kısmı ise dimerik haldedir. Sekresyonlardaki IgA dimeriktir (van Egmond M 2000).

2.5. Antikor Eksikliği İle Giden Primer İmmün Yetmezlikler

B hücre yokluğu ve fonksiyon anormallikleri, azalmış immünoglobulin üretimi ve antikor eksikliğiyle sonuçlanır (Ballow M 2002). Bu eksiklikler tekrarlayan bakteriyel enfeksiyonlara, sinüzit ve pnömoniye neden olur. Tüm bunlar yaşamın ilk yılında anneden geçen antikorların kaybolmasıyla başlar. Enfeksiyonlar sıklıkla solunum yoluna ek olarak deri ve gastrointestinal sistemi de tutabilir (Moise A 2010).

Uluslararası İmmün Yetmezlik Dernekleri Birliği (IUIS: the International Union of Immunological Societies), 2020 yılında primer immün yetmezliklerin güncel haliyle sınıflandırılmasını yayınlamıştır. Buna göre antikor eksiklikleri Tablo 1' deki gibidir (Tangye SG 2020).

Tablo 1. Primer immün yetmezlik sınıflandırılması (Tangye SG 2020).

Tanımlar

1. Tüm Igizotiplerinde ciddi düşüklük ve beraberinde B hücrelerinin düşüklüğü ve yokluğu ile karakterize hastalıklar

- Btk Eksikliği, X'e bağlamaglobulinemi
- μ ağır zincir eksikliği
- $\lambda 5$ eksikliği
- Ig α eksikliği
- Ig β eksikliği
- BLNK eksikliği
- p110 δ eksikliği
- p85 eksikliği
- E47 transkripsiyon faktör eksikliği
- SLC39A7 (ZIP7) eksikliği
- Hoffman sendromu 7TOP2B eksikliği

2. Normal veya düşük B hücre sayıları ile birlikte en az 2 İgizotipinde düşüklük ile karakterize hastalıklar, YDIY fenotipi

- Yaygın Değişken İmmün Yetmezlik (YDIY)
 - Aktive p110 δ sendromu (APDS)
 - PTEN eksikliği
 - CD19 eksikliği
 - CD81 eksikliği
 - CD20 eksikliği
 - CD21 eksikliği
 - TACI eksikliği
 - BAFF reseptör eksikliği
 - TWEAK eksikliği
 - TRNT1 eksikliği
 - NFkB1 eksikliği
 - NFkB2 eksikliği
 - IKAROS eksikliği
-

Tablo 1. Primer immün yetmezlik sınıflandırılması (Devam).

-
- IRF2BP2 eksikliği
 - ATP6AP1 eksikliği
 - ARHGEF1 eksikliği
 - SEC61A1 eksikliği
 - RAC2 eksikliği
 - Mannozi-oligosakkarid glukosidaz eksikliği
-

3. IgG ve IgA düzeylerinde ciddi düşüklük ile birlikte normal veya artmış IgM düzeyleri ve normal B hücre sayısı ile karakterize hastalıklar,

- Hiper IgM sendromu
 - AID eksikliği
 - UNG eksikliği
 - INO80 eksikliği
 - MSH6 eksikliği
-

4. İzotip veya hafif zincir eksiklikleri ve normal B hücre sayıları ile karakterize hastalıklar

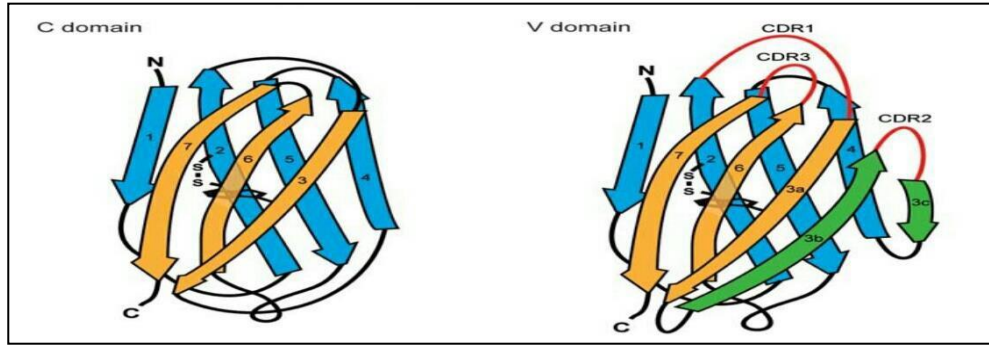
- Ig ağır zincir mutasyon ve delesyonları
- κ zincir eksikliği
- İzole IgG alt grup eksiklikleri
- IgA ve IgG alt grup eksiklikleri

Aseptomatik seyir gösterebilenler

- Selektif IgA eksikliği
 - Normal Ig düzeyi ve B hücre sayıları ile birlikte spesifik antikor eksiklikleri
 - Süt çocuğunun geçici hipogamaglobulinemisi
 - CARD11 GOF
 - Selektif IgM eksikliği
-

2.5.1. CD19 Molekülü ve Eksikliği

CD19, Ig süper ailesinin 95-kD'lik bir transmembran proteinidir. 16.kromozom p11.2 bölgesinde yer alan, 7.41 kb uzunluğunda ve 15 ekzondan oluşan CD19 geni tarafından kodlanmaktadır. Antikor oluşturan plazma hücreleri hariç, kemik iliğindeki erken progenitörlerden bellek hücrelerine kadar B lenfositler yüzeyinde spesifik olarak eksprese edilir. CD19, hücre dışında iki adet Ig yapısı ve fosforilasyon bölgesi olarak da dokuz tirozin tekrarı olan 243-amino asit uzunluğunda bir sitoplazmik kuyruktan oluşur. Bu yapısal özellikler bilinen sinyal yeteneğine katkıda bulunur. Olgun B lenfositlerinde CD19, tetramerik bir kompleks oluşturmak için üç farklı molekülle in vitro ve in vivo olarak birleşir. Bunlar; CD21 (CR2), CD81 (Antiproliferatif antikor 1'in hedefi) ve CD225 (Leu-13)'tir. CD19, doğrudan B lenfosit reseptörüyle ilişkilidir ve B lenfosit seçimi, aktivasyonu, farklılaşmasını düzenleyen hücre yüzeyi reseptörleri için sinyal eşiklerini tanımladığı gösterilmiştir (Cherukuri A 2001).



Şekil 6. CD19 molekülü C ve V domain yapısı

CD19 eksikliği, esas olarak tekrarlayan bakteriyel enfeksiyonlarla karakterize bir antikor eksikliği sendromuna neden olur. CD19 eksikliği olgularının klinik ve laboratuvar bulguları benzerdir. Otozomal resesif bir geçiş söz konusudur. Tüm hastalar yaşamın ilk on yılında klinik olarak antikor eksikliği semptomları gösterir. Hastaların serum Ig seviyelerinde azalma görülmektedir. Tüm hastalar aşılardan sonra bozulmuş bir antikor yanıtı göstermektedir. Periferik kan B lenfosit sayısı normal bulunsa bile, hepsinde bellek B hücrelerinde belirgin azalma vardır. CD19 sinyal yolundaki mutasyonların fareleri ve insanları otoantikor üretimine, sistemik otoimmüniteye yatkın hale getirdiği gösterilmiştir. İlk tanımlanan CD19 eksikliği olgusu Konya' dan olup, hastanın uzun süreli izleminde sistemik lupus eritematozus ve nefropati ortaya çıkmıştır (van Zelm MC 2006).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun 18/03/2020 tarih ve 07/12 sayılı kararı ile onaylanmıştır. Necmettin Erbakan Üniversitesi İlaç ve Tıbbi Cihaz Dışı Araştırmalar Etik Kurulu 2020/2383 karar sayısı ile onaylanıp Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 201318004 proje numarası ile desteklenmiştir. Necmettin Erbakan Üniversitesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı bünyesindeki İmmünoloji Araştırma Laboratuvarında ve FACSCanto II akım sitometri cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.1. Araştırmaya Dahil Olma ve Dışlanma Kriterleri

Çocuk İmmünoloji Polikliniğine başvuran hastalardan akım sitometri analizi ile CD19 eksikliği tanısı almış olan 3 hasta, bu hastalarla akrabalık ilişkisi bulunan 11 taşıyıcı ve bu hastalarla akrabalığı olmayan 10 sağlıklı kontrol ile yapılmıştır. Kontrol grubu için çalışmaya dahil edilme kriterleri, bilinen bir kronik ve immünolojik hastalığı olmamak ve akan hücre ölçerde CD19 molekül eksikliği bulgusuna sahip olmamaktır. CD19 eksikliği dışında, diğer primer veya sekonder immün yetmezlik tanısı almış olan hastalar çalışma dışında tutulmuştur.

3.2. Akım Sitometrik Analiz

Tablo 2. Akım sitometride kullanılan antikorlar ve boyaları.

CD25 PE CY7	(BD Biosciences, 335824)
CD127 ALEXA FLOUR 647	(BD Biosciences, 558598)
CD4 FITC	(BD Biosciences, 345768)
FOXP3 PE	(Thermofisher, 12-4777-42)
FOXP3 Transkripsiyon faktörü buffer set	(Thermofisher, 00-5523-00)

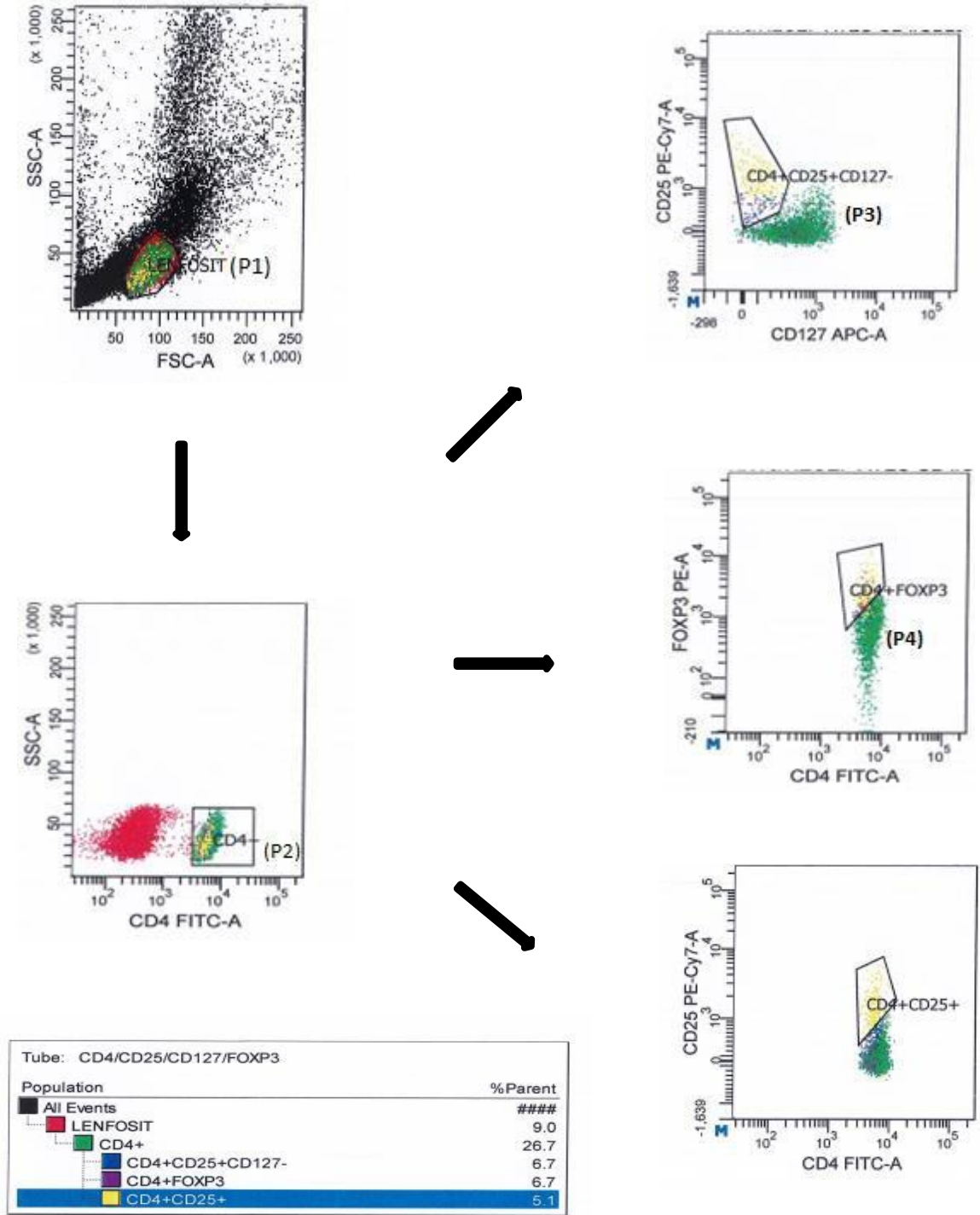
Akım Sitometrik analizde kullanılan antikor ve boyalar Tablo 2’ de gösterilmiştir.

3.2.1. Kullanılan solüsyonların hazırlanması

Perm solüsyonu: Perm solüsyonu akım sitometride hücre içine giriş için gereklidir ve 250 µl perm ile 750 µl fixation solüsyonu karıştırılarak hazırlanır. Örnekler üzerine 500 µl olacak şekilde paylaşılır.

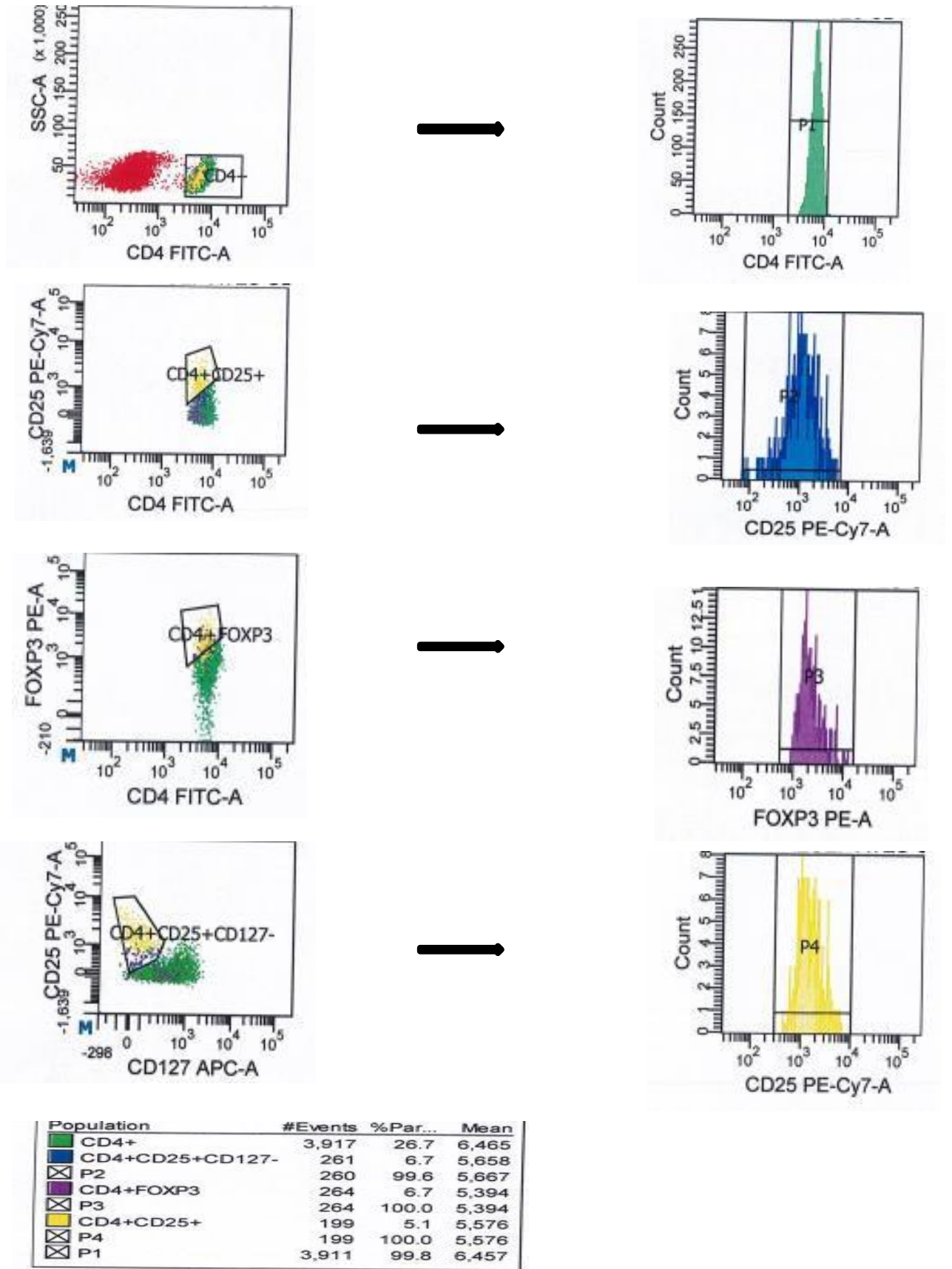
3.2.2. Çalışma Yöntemi

- Çalışmaya dahil olan hasta (n:3), taşıyıcı (n:10) ve kontrollerden (n:10), EDTA'lı tüplere 2 ml kan örneği aldım.
- Alınan tam kan örneklerinden periferik kan mononükleer hücreleri (PBMC) izole etmek için tüpe 1000 µl histopaque koyup üzerine oldukça yavaş bir şekilde 1000 µl kan ekledim.
- Ardından tüplerimi oda sıcaklığında 2500 rpm'de 30 dakika santrifüj ettim.
- Santrifüjden sonra hücreler gradient farkına göre ayrıldı. Histopaque ile plazma arasındaki ara fazda yer alan ince bir tabaka halindeki PBMC'leri pipetaj yaparak temiz bir tüpe aktardım.
- PBMC'leri oda sıcaklığında 1800 rpm'de 10 dakika RPMI solüsyonu ile santrifüj edip, yıkadım.
- Yüzey boyama işlemi için; CD4 FITC 20 µl, CD25 PE CY7 5 µl, CD127 ALEXA FLOUR 647 10 µl olacak şekilde antikorları test tüplerine ekledim.
- Üzerine ayırmış olduğum PBMC'leri ilave edip vorteks ile karıştırdım ve 30 dakika inkübasyona bıraktım.
- Inkübasyon sonunda 1 ml cell-wash solüsyonu ile oda sıcaklığında 1800 rpm'de 5 dakika santrifüj ettim. Yıkama işlemini tekrarladım.
- Süpernatantları döküp pelletleri önceden hazırlamış olduğum perm solüsyonu ile 45 dakika inkübe edip Foxp3 boyası için hücrelerimi geçirgen hale getirdim.
- Ardından Foxp3 transkripsiyon faktörü boyama seti içinde bulunan yıkama solüsyonu ile iki defa oda sıcaklığında 5 dakika 1800 rpm'de yıkama işlemi yaptım.
- Yıkama işleminden sonra; 5 µl Foxp3 PE antikorunu tüplerime ekledim.
- 40 dakikalık intrasitoplazmik boyama işlemi sonrası hücreleri son kez 5 dakika yıkayarak FACS Canto II akım sitometri sisteminde hücre sayımı ve analizi yaptım.
- Veriler "dot plot" ve "histogram plot" ile analiz edildi. Sonuçlar rölatif oran ve mean floresan yoğunluk değeri (MFI) olarak ifade edildi.



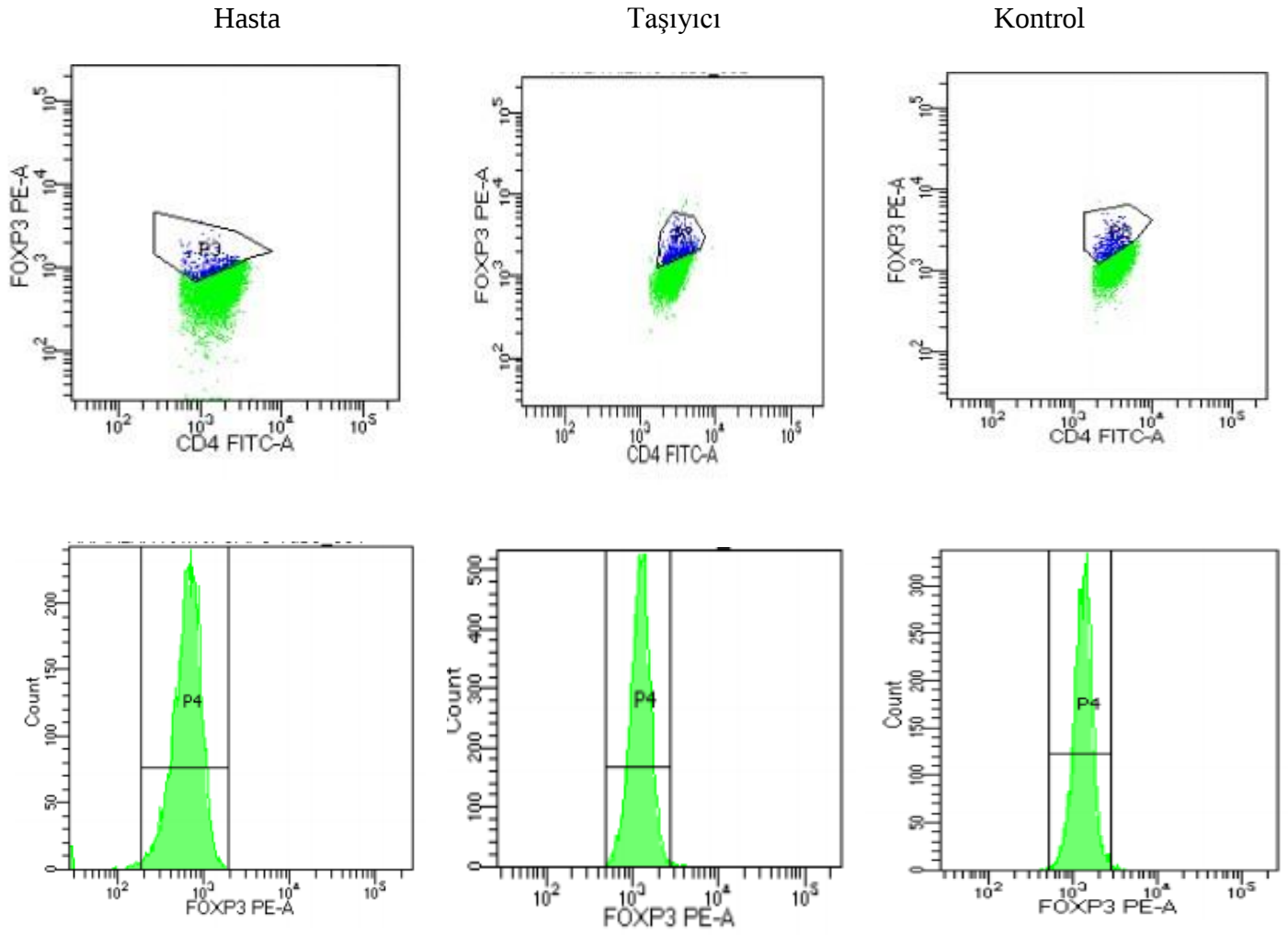
Şekil 7. Foxp3 ekspresyonunun akım sitometrik analizi (dot-plot görüntüsü)

Lenfositler öncelikli olarak kapılır (P1 kapısı). Lenfositler içinden CD4+ hücreler ayrılır (P2 kapısı). Foxp3 yüksek ekspresyonu içeren düzenleyici T lenfositlerin taraması için kullanılan CD4+CD25+ CD127- hücreler ayrılır (P3 kapısı). Foxp3 intrasitoplazmik yüzey boyama ile boyadığımız hücreler ayrılır (P4 kapısı). P3 ve P4 değerleri Foxp3 ekspresyonunu ifade eder ve bu yüzden birbirine yakın değerler olması beklenir.



Şekil 8. Foxp3 ekspresyonunun mean floresan yoğunluğu (MFI)

Önceden kapıladığımız (Şekil 6) CD4+, CD4+ CD25+ CD127- , CD4+ FOXP3 ve CD4+ CD25+ hücreler histogramlara göre mean floresan yoğunluğu (MFI) değerlendirildi.



Hasta MFI Değeri: 1,589

Taşıyıcı MFI değeri: 2,591

Kontrol MFI değeri: 3,178

Şekil 9. CD19 eksikliği olan bir hastanın, bir taşıyıcının ve bir sağlıklı kontrolün hücre içi Foxp3 MFI değerleri

3.3. İstatistiksel Analiz

Verilerin istatistiksel analizi SPSS programı (SPSS for windows, USA) kullanılarak yapıldı. İstatistik veri analizinde Kruskal-Wallis Test, parametrelerin gruplar arasında karşılaştırılması için varyant test analizi Post-hoc Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney u Testi kullanıldı. $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Çalışma Grubu Özellikleri

Çalışmaya, akan hücre ölçer ve genetik analizle CD19 eksikliği tanısı almış olan 3 hasta, bu hastalarla akrabalık ilişkisi bulunan ve genetik olarak doğrulanmış 11 taşıyıcı ve bu hastalarla akrabalığı olmayan 10 sağlıklı kontrol alınmıştır. Hasta grubunda 2 kız 1 erkek olup, yaşları 10-29 (ortalama $21,6 \pm 10,2$) yıl ve Taşıyıcı grubunda 6 erkek 5 kız olup, yaşları 1-77 (ortalama $33,2 \pm 27,5$) yıl arasındaydı. Kontrol grubunda ise 5 erkek 5 kız olup, yaşları 32-43 (ortalama $36,9 \pm 4,0$) yıldır. Gruplar arasında yaş ve cinsiyet yönünden anlamlı fark bulunmadı (Tablo 3).

Tablo 3. Olguların yaş ortalaması ve cinsiyet dağılımı.

	Hasta grubu (n=3)	Taşıyıcı grubu (n=11)	Kontrol grubu (n=10)	P değeri
Yaş(yıl) (ortalama$\pm$SD) (min-max)	$21,6 \pm 10,2$ 10-29	$33,2 \pm 27,5$ 1-77	$36,9 \pm 4,0$ 32-43	0,27
Cinsiyet (erkek/kız)	1/2	6/5	5/5	0,175

4.2. Yardımcı T lenfosit ve Treg Belirteçleri

Hasta, taşıyıcı ve kontrol grubunun CD4+ T lenfosit ve Treg hücre belirteçlerinin (CD4+ CD25+ CD127- , CD4+ FOXP3 ve CD4+ CD25+) ekspresyon yüzdeleri ve mean floresan yoğunluğu (MFI) değerleri karşılaştırıldı.

1-Belirteçlerin yüzde değerlerinin karşılaştırılması

CD4+ T lenfosit yüzdeleri ve Treg hücrelerin belirteçlerinin yüzde değerleri yönünden gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0.05$) (Tablo 4).

CD4+ T lenfosit yüzdesi (hasta grubunda $33,7\pm16,01$; taşıyıcı grubunda $31,3\pm11,7$; kontrol grubunda $29,6\pm9,3$), CD4+ CD25+ CD127- hücre yüzdesi sırasıyla ($5,9\pm2,2$; $5,6\pm1,5$; $6,6\pm1,7$), CD4+ FOXP3 hücre yüzdesi ($6,6\pm1,1$; $4,6\pm1,6$; $5,8\pm2,1$), CD4+ CD25+ hücre yüzdesi ($7,8\pm2,1$; $6,8\pm2,4$; $6,5\pm2,1$) olarak hesaplanmış olup hücrelerin ekspresyon yüzde değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç bulunamamıştır ($p>0,05$).

Tablo 4. Hasta, taşıyıcı ve kontrol grubunun yardımcı T lenfosit ve Treg lenfositlerin belirteçlerinin yüzdeleri.

T Lenfosit Ekspresyon Değerleri (%)*	Hasta grubu (n=3)	Taşıyıcı grubu (n=11)	Kontrol grubu (n=10)	P değeri
CD4+	$33,7\pm16,0$ 22,5-52,1	$31,3\pm11,7$ 15,5-60,7	$29,6\pm9,3$ 12,0-46,7	$p>0,05$
CD4+CD25+CD127-	$5,9\pm2,2$ 3,3-7,5	$5,6\pm1,5$ 2,2-8,0	$6,6\pm1,7$ 3,7-9,4	$p>0,05$
CD4+ FOXP3	$6,6\pm1,1$ 5,5-7,8	$4,6\pm1,6$ 2,3-7,7	$5,8\pm2,1$ 2,7-9,4	$p>0,05$
CD4+ CD25+	$7,8\pm2,1$ 6,5-10,3	$6,8\pm2,4$ 3,6-12,2	$6,5\pm2,1$ 4,0-10,8	$p>0,05$

*Bütün değerler ortalama±standart sapma, min-max olarak gösterilmiştir.

2-Belirteçlerin mean floresan yoğunluk (MFI) değerlerinin karşılaştırılması

Hasta grubu, taşıyıcı grubu ve kontrol grubunun CD4+ T lenfosit MFI değeri ve Treg hücrelerin belirteçlerinin (CD4+ CD25+ CD127- , CD4+ FOXP3 ve CD4+ CD25+) MFI değerleri yönünden istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur. (p=0,001) (Tablo 5).

Kontrol grubunun CD4+ T lenfosit MFI değeri, taşıyıcı grup (p=0,003) ve hasta grubundan (p=0,033) istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksektir. Benzer şekilde kontrol grubunun Treg hücre belirteçleri (CD4+CD25+CD127-, CD4+ FOXP3, CD4+CD25+) de taşıyıcı ve hasta gruplarından istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksektir (Tablo 5).

Tablo 5. Hasta, taşıyıcı ve kontrol grubunun yardımcı T lenfosit ve Treg lenfositlerin belirteçlerinin MFI değerleri.

Mean Floresan Yoğunluk değerleri (MFI)*	Hasta grubu (n=3)	Taşıyıcı grubu (n=11)	Kontrol grubu (n=10)	P değeri
CD4+	2697±721 1871-3204	2798±1060 2491-3106	5100±1118 3538-6465	P=0,001
CD4+CD25+CD127-	2280±683 1508-2807	2493±122 2283-2654	4370±947 3061-5685	P=0,001
CD4+ FOXP3	2565±846 1589-3103	2728±231 2481-3183	4458±837 3122-5394	P=0,001
CD4+ CD25+	2508±725 1725-3156	2614±169 2411-2938	4526±969 3226-5617	P=0,001

*Bütün değerler ortalama±standart sapma, min-max olarak gösterilmiştir.

Tablo 6. Hasta ve kontrol grubunun yardımcı T lenfosit ve Treg lenfositlerin belirteçlerinin MFI değerlerinin karşılaştırılması

Mean Floresan Yoğunluk değerleri (MFI)*	CD4+	CD4+CD25+ CD127-	CD4+ FOXP3	CD4+ CD25+
Hasta grubu (n=3)	2697±721 1871-3204	2280±683 1508-2807	2565±846 1589-3103	2508±725 1725-3156
Kontrol grubu (n=11)	5100±1118 3538-6465	4370±947 3061-5685	4458±837 3122-5394	4526±969 3226-5617
P değeri	0,033	0,033	0,033	0,033

Tablo 7. Taşıyıcı ve kontrol grubunun yardımcı T lenfosit ve Treg lenfositlerin belirteçlerinin MFI değerlerinin karşılaştırılması

Mean Floresan Yoğunluk değerleri (MFI)*	CD4+	CD4+CD25+ CD127-	CD4+ FOXP3	CD4+ CD25+
Taşıyıcı grubu (n=3)	2798±1060 2491-3106	2493±122 2283-2654	2728±231 2481-3183	2614±169 2411-2938
Kontrol grubu (n=11)	5100±1118 3538-6465	4370±947 3061-5685	4458±837 3122-5394	4526±969 3226-5617
P değeri	0,003	0,003	0,003	0,003

5. TARTIŞMA

Treg hücreler; kendi öz antijenlerimize toleransın korunmasında ve alloantijen yanıtsızlığında hayati rol oynar. Foxp3 molekülü, Treg hücrelerinin spesifik fenotipini ve fonksiyonel özelliklerini indüklemek ve stabilize etmek için oldukça gerekli olan çok önemli bir düzenleyici transkripsiyon faktörüdür. Foxp3 eksprese eden Treg hücre gelişimi ve fonksiyonundaki kusurlar insanlarda birçok immünolojik hastalığına yol açar (Miyara M 2007).

CD19 eksikliği, tekrarlayan bakteriyel enfeksiyonlarla karakterize antikor eksikliği sendromuna neden olur. Otozomal resesif geçiş gösteren CD19 eksikliği olgularının klinik ve laboratuvar bulguları benzerdir. Hastaların serum immünglobulin seviyelerinde azalma görülmektedir. Tüm hastalar yaşamın ilk on yılında klinik olarak antikor eksikliği semptomları gösterir. CD19 eksikliği olan hastaların bir kısmında bazı otoimmün hastalıklar (Sistemik lupus eritematozus, IgA nefropatisi) yatkınlık olmaktadır (van Zelm MC 2006).

Hastalar olası enfeksiyonlar, lenfoproliferasyon, kanser ve otoimmün hastalıklar yönünden takip edilir. Sık enfeksiyon geçirme durumunda antibiyotik profilaksisi de uygulanabilir. Eşlik eden organ hasarlarına (bronşiektazi, malnütrisyon) yönelik ek tedavi yaklaşımları planlanır. Klinik izlemde ortaya çıkabilecek olan otoimmün ve malign hastalıklar yönünden yakın takip edilirler.

B hücre yanıtlarının düzenlenmesinde rol oynayan bu ko-reseptörlere ait ilk CD19 eksikliği olgusu Konya’da kliniğimizde tanı almış ve ardından bu indeks olgu ile akrabalık ilişkisi olan iki farklı hastada daha CD19 eksikliğine yol açan genetik mutasyon tanımlanmıştır. Çalışmamızı önceden CD19 eksikliği tanısı almış olan hastalarımız (3 hasta) ve onlarla akrabalıkları bulunan taşıyıcılar (11 taşıyıcı), CD19 eksikliği olmayan sağlıklı kontrol grubu (10) ile gerçekleştirdik.

Çalışmadaki amacımız antikor eksiklikleri grubunda yer alan ve çalışma grubumuzu oluşturan CD19 eksikliği olan hastalarımızda ve taşıyıcılarda Foxp3 ekspresyonunun değerlendirilmesi ve yaşamın ileri dönemlerinde gelişebilecek otoimmün hastalıklar yönünden bir öngörü belirteci olup olamayacağının saptanmasıdır.

Yaptığımız çalışmanın sonunda; hasta, taşıyıcı ve kontrol grubunun yardımcı T lenfosit ve Treg lenfositlerin belirteçlerinin yüzdesel oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0,05$). Fakat yardımcı T lenfositlerin yüzeyinde bulunan CD4 molekülünün mean floresan yoğunluk (MFI) değeri hasta ve taşıyıcılarda kontrollerden anlamlı derecede daha düşük bulunmuştur ($p<0,05$). Hasta grubunun CD4 MFI değeri, taşıyıcı grubunun MFI değerinden düşük olmakla birlikte, istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. Mean floresan yoğunluk (MFI) değeri ilgili molekülün hücre yüzeyi veya içindeki yoğunluğu ifade etmektedir. MFI değeri, akan hücre ölçerde hücre popülasyonları arasında ilgili hedefin ifadesini karşılaştırmak için sıklıkla kullanılır ve hücrenin fonksiyonu ile doğrudan ilişkili olabilir. Bu bulgumuz, CD19 eksikliği olan veya taşıyıcı olan bireylerde yardımcı T lenfositlerin fonksiyonunun etkilenmiş olabileceğini, T lenfosit aktivasyonu sonrası bozulmuş yanıtlar gelişebileceğini düşündürmüştür. T hücre aracılı immün tolerans bozulabilir ve bozulmuş T lenfosit immün toleransı sonrası, B lenfositlerin antikor yapımları da etkilenebilir ve bu da kendi öz antijenlerimize antikor yanıtları ile sonuçlanabilir. Sonuç olarak hem T lenfosit aracılı immün toleransın bozulması ve hem de B lenfosit aracılı otoantikorların yapımı söz konusu olursa otoimmün hastalıklar meydana gelebilir. CD19 eksikliği olan hastalarımızda ve taşıyıcılarda saptadığımız T lenfosit yüzey belirteçlerinin MFI değerinin düşüklüğü, bu hastalarda ileride gelişebilecek bir T hücre aracılı immün tolerans bozulması ve bozulmuş B lenfosit antikor yapımı ile ilişkili olabilir.

Benzer şekilde kontrol grubunun Treg hücre belirteçlerinin MFI değerleri (CD4+CD25+CD127-, CD4+FOXP3, CD4+CD25+), taşıyıcı ve hasta gruplarından istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). Regülatör T hücrelerinin hem hücre yüzey belirteçleri (CD4, CD25 ve CD127) hem de hücre içi belirtecinin (Foxp3), taşıyıcı ve hasta grubunda düşük bulunması bize ilerleyen dönemde bozulmuş baskılayıcı fonksiyon sebebiyle T hücre aracılı otoimmünitenin ortaya çıkabileceğini düşündürmüştür. CD19 eksikliği hastalarının bir kısmında bildirilen sistemik lupus eritematoz hastalığı ve buna bağlı böbrek yetmezliği ile CD19 eksikliği olan hastalarda bildirilen romatoid artrit benzeri eklem iltihapları bu bozulmuş Treg hücre fonksiyonu ile ilişkili olabilir ve bu düşüklük ile açıklanabilir. Çünkü Treg hücreler, öz antijenlere immün yanıtları baskılayarak otoimmün hastalık gelişimini engeller. Treg transkripsiyon faktörü olan Foxp3 MFI değerinin azalması,

fonksiyonel olarak azalmış immün toleransı ve ardından gelişebilecek olan otoimmün hastalıkların habercisi olabilir. Bu konuda planlanacak olan uzun süreli hasta izlemlerinde Foxp3'ün MFI değerlerinin takip edilmesinin, bu konuda bir belirteç olarak kullanılıp kullanılamayacağını bizlere gösterebileceği kanaatindeyiz.

CD19 eksikliği olan hastalarda tanımlanmış olan bir diğer önemli immünolojik bulgu, TLR yanıtlarında bazı farklılıkların olmasıdır. TLR7 ve TLR9 aracılı yanıtların CD19 eksikliğinde etkilendiği gösterilmiştir (Morbach H. 2016). CD19 taşıyan B lenfositleri aynı zamanda antijen sunan hücrelerdir ve T lenfosit fonksiyonlarını etkileyebilirler. Belki de CD4+ T lenfositlerde ve Treg hücrelerde saptadığımız MFI değerlerindeki düşüklük, etkilenen TLR uyarıları sonucu değişen T lenfosit yanıtları ile ilişkili de olabilir. Bu konuyu aydınlatmak için daha ileri fonksiyonel çalışmalara ihtiyaç olduğu kanaatindeyiz.

Hücre içi Foxp3 ekspresyonu ile belirlenen Treg lenfositlerinin miktarı, CD4⁺ CD25⁺ CD127⁻ alt popülasyonu olarak hücre dışı boyama ile belirlenen Treg hücre sayısı ile ilişkilidir. Bu, CD25 molekülünün yüksek ekspresyonunu ve CD127 molekülünün düşük ekspresyonunu aynı anda sergileme ile hücre içi faktör Foxp3 ekspresyonu arasındaki korelasyonu doğrular (Cai 2012 ; Crispin 2003). Biz de çalışmamızda Treg hücreleri tanımlamada kullanılan yüzey belirteçlerinin ve hücre içi Foxp3 belirtecinin, tüm kan örneklerimizde (hasta, taşıyıcı, kontrol) birbiri ile uyumlu olduğunu gördük. Böylece akan hücre ölçer çalışmamızın kendi için güvenilirliğinin tam olduğu düşüncesindeyiz.

Yapılan çalışmalar göstermiştir ki; CD4⁺ CD25⁺ T lenfositleri, immün homeostazın sürdürülmesinde ve otoimmünitenin önlenmesinde önemli bir rol oynar. Bu nedenle, Treg gelişimi veya fonksiyonundaki kusurlar, nükleer bileşenlere tolerans kaybı ile karakterize edilen ve kadınlarda daha sık görülen sistemik bir otoimmün hastalık olan Sistemik lupus eritematozus (SLE) dahil olmak üzere birçok otoimmün hastalık ile ilişkilidir. SLE hastalarında Treg hücrelerinin (FoxP3⁺ CD4⁺ CD25⁺) spesifik olarak azaldığı gösterilmiştir. Ender olarak immün aracılı diyabet ve multipl sklerozlu hastalarda da CD4⁺ CD25⁺ T hücrelerinin sayısının azalması veya fonksiyonel bozukluğu bildirilmiştir. CD4⁺ CD25⁺ Treg hücrelerinin gelişimlerini ve işlevlerini kontrol eden transkripsiyon faktörü Foxp3'dür.

Foxp3'teki fonksiyonel bozuklukların, Treg hücre üretimini bozduğu ve bu durumun İmmünodisregülasyon, Poliendokrinopati ve Enteropati, X'e bağlı Sendroma (IPEX) yol açtığı kanıtlanmıştır. Lenfopeni, enfeksiyon ve otoimmün reaktiviteye yanıt olarak immün hücre sayılarının ve efektör fonksiyonlarının kontrolü de Treg'in sıkı kontrolü altındadır (Marta Barreto 2009). Biz de hastalarımızda Treg hücre yüzey ve hücre içi belirteçlerinin MFI değerlerini, kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulduk. Bu bulgularımız otoimmün hastalıklarda Treg hücrelerini düşük olduğunu bildiren yukarıdaki çalışmalarla benzerlik göstermektedir.

Germline Foxp3 mutasyonlarının, insanlarda birden fazla organı etkileyen ciddi otoimmün hastalıklara neden olduğu bilinmektedir. Aynı zamanda, epitel hücrelerindeki somatik Foxp3 mutasyonlarının fare modellerinde malign tümörlere yol açtığı bildirilmiştir. Bu nedenle Foxp3, hem otoimmün hastalıkların hem de kanserin moleküler mekanizmalarının anahtarını elinde tutar. FoxP3'ün hem Treg hücrelerinde hem de epitel hücrelerinde hedef genleri için bir transkripsiyonel aktivatör / baskılayıcı olarak önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Ancak, FoxP3 aracılı gen düzenlemesinin moleküler mekanizması tam olarak karakterize edilmemiştir (Hiroto Katoh 2013). Bizim çalışmamızda Treg hücrelerinin yüzey ve hücre içi belirteçlerinin analizine dayanan bir çalışma olup, CD19 eksikliği saptanan hasta ve taşıyıcılarda bir durum değer değerlendirmesi özelliğini taşımaktadır ve ileride yapacağımız diğer çalışmalara ışık tutacak nitelikte sonuçlar elde edilmiştir. Bu yönü ile de literatüre katkı sağlayacağı kanaatindeyiz.

Bu çalışmanın eksik yönü CD19 eksikliği saptanan hastaların ve hastalık taşıyıcılarının yardımcı T lenfosit ve Treg lenfositlerinin yalnızca yüzey ve intrasitoplazmik belirteçlerinin değerlendirilmiş olması ve fonksiyonel bir çalışma yapılmamış olmasıdır. Planlanacak ileri fonksiyonel çalışmalar ile saptanan MFI değerlerindeki düşüklüklerin açıklanması ve yorumlanması daha doğru bir şekilde yapılabilir. Yine de bu çalışmanın verileri, CD19 eksikliği olan hastalarda ve hastalık taşıyıcılarında Treg lenfosit fonksiyonlarının etkilenmiş olabileceğinin işareti yönünde bir bulgu olarak değerlendirilebilir.

Sonuç olarak bu çalışma ile CD19 eksikliği olan hastalarda ve hastalık taşıyıcılarında CD4+T lenfositlerin ve Treg lenfositlerin yüzey ve hücre içi belirteçlerinin MFI değerlerinde, kontrol grubunun değerleri ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı düşüklük olduğu gösterilmiştir. Bu bulgularımızı genel olarak değerlendirdiğimizde, B lenfositlerin yüzeyinde CD19 molekülünde hastalık yapıcı veya taşıyıcılığa neden olan gen bozukluklarına eşlik edebilecek otoimmünite durumu ile Treg hücrelerin fonksiyonları arasında bir ilişki olabileceğini düşünmekteyiz.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Bu çalışma ile B lenfosit yüzeyinde CD19 molekül eksikliğinde gelişebilecek olan otoimmünite durumu ile Treg hücreler arasındaki ilişki ortaya konmaya çalışılmıştır.

2. Yardımcı T lenfositlerin CD4 mean floresan yoğunluk (MFI) değeri hasta ve taşıyıcılarda kontrollerden anlamlı derecede daha düşük bulunmuştur ($p<0,05$). Hasta grubunun CD4 MFI değeri, taşıyıcı grubunun MFI değerinden düşük olmakla birlikte, istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır.

3. Kontrol grubunun Treg hücre belirteçlerinin MFI değeri de (CD4+CD25+CD127-, CD4+FOXP3, CD4+CD25+), taşıyıcı ve hasta gruplarından istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0,05$).

4. Yaptığımız çalışma sonucunda; hasta, taşıyıcı ve kontrol grubunun yardımcı T lenfosit ve Treg lenfositlerin belirteçlerinin yüzdeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç bulunamamıştır ($p>0,05$).

5. Çalışmaya alınan gruplar arasında yaş ve cinsiyet yönünden anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0,05$).

6. Treg hücrelerinin hem hücre yüzey belirteçleri, hem de hücre içi belirtecinin CD19 eksikliği taşıyıcılarında ve CD19 eksikliği olan hastalarda düşük bulunması ilerleyen dönemde bozulmuş baskılayıcı fonksiyon sebebiyle T hücre aracılı otoimmünitenin ortaya çıkabileceğini düşündürmektedir.

7. Bu çalışmada; Treg hücrelerinin sadece yüzey belirteçleri ve yine hücre içi Foxp3 değerlendirilmiş olup herhangi bir fonksiyon çalışması yapılmamıştır. Bu durum ilerleyen dönemlerde fonksiyon çalışmalarının yapılması gerekliliğini düşündürmektedir.

7.KAYNAKLAR

- Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Hümmoral immün yanıtlar. Philadelphia, USA, Elsevier Saunders, 2015:277-560-62
- Abbas AK, Lichtman AH. Basic immunology: functions and disorders of the immune system. 2nd ed. Philadelphia, PA: W.B Saunders Co, Updated edition 2006-007
- Colamatteo A, Carbone F. Molecular mechanisms controlling Foxp3 expression in health and autoimmunity: from epigenetic to post-translational regulation. *Front. Immunol.* 2020; 10:3136.
- Anderton SM, Wraith DC. Selection and fine tuning of the autoimmune T cell repertoire. *Nat Rev Immunol.* 2002; 2:487-98.
- Ballow M. Primary immuno deficiency disorders: antibody deficiency. *J Allergy Clin Immunol.* 2002; 109 (4):581-91.
- Butler JE, Zhao Y, Sinkora M, Wertz N, Kacskovics I. Immunoglobulins, antibody repertoire and B cell development. *Dev Comp Immunol.* 2009; 33(3):321-23.
- Cai XY, Luo M, Lin XJ. Expression and significance of Th17 and Treg cells in peripheral blood of patients with systemic lupus erythematosus. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 2012; 92:460–63.
- Camcıoğlu Y ve Deniz G. Temel immünoloji immün sistemin işlev ve bozuklukları. İstanbul, İstanbul Medikal Yayıncılık. 2007; 1: 1-21, 41-60, 83-1037.
- Carroll MC. The complement system in regulation of adaptive immunity. *Nat Immunol.* 2004; 5(10):981-86.
- Cherukuri A, Cheng PC, Pierce SK. The role of the CD19/CD21 complex in the B cell processing and presentation of complement-tagged antigens. *The J Immunol.* 2001; 167: 163-72.
- Crispin JC, Martinez A, Alcocer-Varela J. Quantification of regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *J Autoimmun.* 2003; 21:273–76.
- Engel P, Zhou LJ, Ord DC, Sato S, Koller B, et al. Abnormal B lymphocyte development, activation, and differentiation in mice that lack or over express the CD19 signal transduction molecule. *Immunity.* 1995; 3(1):39-5.
- Gallimore A, Godkin A. Regulatory T cells and tumour immunity-observations in mice and men. *Immunology.* 2008; 123:157–63
- Hall JE, Guyton AC. Tıbbi Fizyoloji. 11. Basım. Nobel Tıp Kitabevleri. 2007; 419-39.
- Hardy RR, Hayakawa K. B cell development pathways. *Annu Rev Immunol.* 2001; 19:595-621.
- Hiroto Katoh, Pan Zheng, Yang Liu et al. FOXP3: genetic and epigenetic implications for autoimmunity. *J Autoimmun.* 2013 Mar; 41:72-8. doi: 10.1016.
- LeBien TW, Tedder TF. B lymphocytes: how they develop and function. *Blood.* 2008; 112 (5):1570-580.
- Lydyard P, Whelan A. İmmünoloji. Üçüncü baskı. Ankara, Nobel kitabevi, 2013, 105-14.

- Marta Barreto, Ricardo C Ferreira, Lara Lourenço, Maria F Moraes-Fontes, et al. Low frequency of CD4+CD25+ Treg in SLE patients: a heritable trait associated with CTLA4 and TGF beta gene variants. *BMC Immunol.* 2009; 10:5. doi: 10.1186/1471-2172-10-5.
- Melchers F. Check points that control B cell development. *J Clin Invest.* 2015; 125 (6):2203-210.
- Miyara M, Sakaguchi S. Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression. *Trends Mol Med.* 2007; 13: 108-16.
- Moise A, Nedelcu FD, Toader MA. Primary immune deficiencies of the B lymphocyte. *J Med Life.* 2010; 3 (1):60-3.
- Morbach H., Schickel JN, Cunningham C, Conley ME, Reisli I, et al. CD19 controls TLR9 responses in human B cells. *J Allergy Clin Immunol.* 2016 Mar; 137(3):889-98
- Natvig JB, Kunkel HG. Human immunoglobulins: classes, subclasses, genetic variants, and idiotypes. *Adv Immunol.* 1973; 16:1-59.
- Nelson BH. IL-2, regulatory T cells, and tolerance. *J. Immunol.* 2004; 172 (7): 3983- 988.
- Savage PA, Klawon DEJ, Miller CH. Regulatory T cell development. *University of Chicago Annual Review of Immunology.* 2020; 100219-020937.
- Reth M , Wienands J. Initiation and processing of signals from the B cell antigen receptor. *Annu Rev Immunol.* 1997; 15: 453-79.
- Richard M Dunham, Barbara Cervasi, Jason M Brenchley. CD127 and CD25 expression defines CD4+ T cell subsets that are differentially depleted during HIV infection. *J Immunol.* 2008;180(8):5582-592.
- Ross MH, Pawlina W. *Histology. A Text and Atlas. With correlated cell and molecular biology.* 2006; 848-854, 441-53.
- Saroj P, Verma M, Jha KK, Pal M. An overview on immunomodulation. *J Adv Scient Res.* 2012; 3(1): 07-12.
- Tangye SG, Al-Herz W, Bousfiha A. Human inborn errors of immunity: 2019 update on the classification from the international union of immunological societies expert committee. *J Clin Immunol.* 2020; 40 (1):24-64.
- Tsitsikov EN, Gutierrez-Ramos JC, Geha RS. Impaired CD19 expression and signaling, enhanced antibody response to type 2T independent antigen and reduction of B-1 cells in CD81 deficient mice. *Proc Natl Acad Sci* 1997; 94: 10844-0849.
- Woo-Jin Yun, Deok-Woo Lee. Role of CD4CD25FOXP3 regulatory T cells in psoriasis. *Ann Dermatol.* 2010 Nov; 22(4):397-99.
- van Egmond M, van Garderen E, van Spriel AB, Damen CA. FcαRI-positive liver kupffer cells: reappraisal of the function of immunoglobulin A in immunity. *Nat Med.* 2000; 6 (6):680-85.
- van Zelm MC, Reisli I, van der Burg M, Castano D, van Noesel CJ, et al. An antibody deficiency syndrome due to mutations in the CD19 gene. *N Eng J Med.* 2006; 354: 1901-912.

8. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Hatice İrem	Soyadı	KOŞ
Doğum Yeri	İstanbul	Doğum Tarihi	1996
Uyruğu	T.C.		

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Lisans	Necmettin Erbakan Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik	2018
Yüksek Lisans	Necmettin Erbakan Üniversitesi İmmünoloji	

Yabancı Dil	İngilizce
--------------------	-----------

Yayınları/Tebliğleri/Sertifikaları/Ödülleri

5.Klinik İmmünoloji Kongresi Poster Sunumu-RFLP yönteminin CD19 eksikliği tanısında kullanımı (2019)

İyi Laboratuvar Uygulamaları (GLP) Temel Eğitim Sertifikası-2015

22. Ulusal Biyoloji Kongresi /Ankara Üniversitesi-2015

Laboratuvar Kalite Güvence (TS EN ISO/IEC17025& TS EN ISO 15189)
28 Saat Eğitim-2016/2017

1.Konya Biyoteknoloji Günleri /Necmettin Erbakan Üniversitesi-2017

2.Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Öğrenci Kongresi
Necmettin Erbakan Üniversitesi-2018

1.Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji İş Fikri Çalıştayı
Necmettin Erbakan Üniversitesi-2018

Özel İlgi Alanları: Çeşitli el sanatları, kitap okumak, resim yapmak

9. EKLER

Ek 1: Çalışmamızda elde ettiğimiz laboratuvar verileri

	CİNSİYET	YAŞ	% CD4	% CD4+ CD25+ CD127-	% CD4+Foxp3+	%CD4+ CD25+	CD4 + MFI	CD4+ CD25+ CD127- MFI	CD4+ Foxp3+ MFI	CD4+ CD25+ MFI
1	4	29	52,1	7,5	7,8	6,5	3,018	2,525	3,004	2,644
1	4	10	22,5	7	6,5	10,3	3,204	2,807	3,103	3,156
1	5	26	26,7	3,3	5,5	6,7	1,871	1,508	1,589	1,725
2	5	1	60,7	5,3	4,3	7,2	2,781	2,418	2,542	2,513
2	4	55	35,9	2,2	2,6	3,6	2,784	2,283	2,481	2,411
2	4	26	22	6,5	4,9	7,5	2,807	2,498	2,894	2,519
2	4	41	28,7	4,9	3,4	6,2	2,922	2,525	2,862	2,696
2	5	6	26,2	6,9	6,6	9,7	2,842	2,654	2,878	2,938
2	5	8	15,5	7,2	7,7	12,2	2,693	2,545	2,561	2,801
2	5	67	31,7	8	6	6,7	2,633	2,466	2,585	2,507
2	5	77	21,8	5,4	4,4	7,1	2,491	2,391	2,499	2,468
2	4	24	33	4,8	2,3	4,6	2,815	2,367	2,591	2,472
2	5	57	34	5,1	4	4,1	3,106	2,631	2,939	2,657
2	4	4	35,1	5,5	5,3	6,9	2,912	2,649	3,183	2,778
3	4	33	34	9,4	9,4	10,8	3,538	3,061	3,122	3,226
3	4	35	46,7	7	6,1	7,3	3,691	3,077	3,178	3,229
3	4	40	26,8	7,8	7,1	5,7	6,133	4,991	4,813	5,064
3	5	43	22,9	6,8	6,2	4,8	6,093	5,258	5,298	5,428
3	5	32	12	5,4	2,7	6,3	3,917	3,507	3,671	3,518
3	5	34	26,7	6,7	6,7	5,1	6,465	5,685	5,394	5,576
3	5	39	38	3,7	3,2	4	5,319	4,735	5,046	4,858
3	5	42	25,4	4,3	3,6	5,6	5,947	4,913	4,805	5,617
3	4	38	30,5	7,8	7,4	9,9	5,547	4,777	4,763	4,883
3	4	33	33,8	7,7	6,5	6,3	4,357	3,696	4,497	3,868
	1:HASTA									
	2:TAŞIYICI									
	3:KONTROL									
	4:KADIN									
	5:ERKEK									

Ek 2: Etik kurul kararı

T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
İLAÇ VE TIBBİ CİHAZ DIŞI ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

Toplantı Sayısı: 136

Toplantı Tarihi: 30 Temmuz 2021

Karar Sayısı: 2021/3353: (6516) N.E.Ü. Meram Tıp Fakültesi Dahili Tıp Bilimleri Bölümü Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. İsmail REİSLİ'nin "**CD19 eksikliğinde Foxp3 ekspresyonunun değerlendirilmesi**" başlıklı yüksek lisans tez çalışması ile ilgili 02.07.2021 tarihli çalışma başlığı değişimi hakkında dilekçesi ve ekleri görüşüldü, Hatice İrem EFE'nin yüksek lisans tez çalışma başlığının "**CD19 eksikliğinde Foxp3 ekspresyonunun akan ölçerde değerlendirilmesi**" olarak değiştirilmesinin uygun olduğuna oybirliği ile karar verilmiştir.

Not: Çalışma ile ilgili gerekli izinlerin alınması ve yasal sorumluluk araştırmacılara aittir.

Sorumlu Araştırmacı: Prof. Dr. İsmail REİSLİ

Yardımcı Araştırmacılar: Hatice İrem EFE, Prof. Dr. Sevgi KELEŞ, Emine TAŞÇI