

T.C
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
İMMÜNOLOJİ ANABİLİM DALI

KRONİK GRANÜLOMATÖZ HASTALIK
MOLEKÜLER TANISINDA
FRAGMENT ANALİZİNİN UYGULANMASI

Hazırlayan
Zeynep AKIDAĞI

Danışman
Prof. Dr. Mustafa Yavuz KÖKER

Yüksek Lisans Tezi

Ocak 2020
KAYSERİ

T.C
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
İMMÜNOLOJİ ANABİLİM DALI

KRONİK GRANÜLOMATÖZ HASTALIK
MOLEKÜLER TANISINDA
FRAGMENT ANALİZİNİN UYGULANMASI

(Yüksek Lisans Tezi)

Hazırlayan
Zeynep AKİDAĞI

Danışman
Prof. Dr. Mustafa Yavuz KÖKER

Bu proje, Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
tarafından TYL-2019-8936 kodlu proje ile desteklenmiştir.

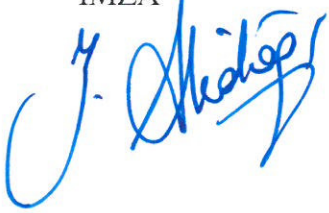
Ocak 2020
KAYSERİ

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Zeynep AKIDAĞI

İMZA

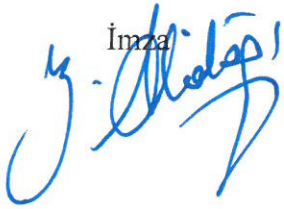


YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

“Kronik Granülatöz Hastalık Moleküler Tanısında Fragment Analizinin Uygulanması” adlı Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan

Zeynep AKIDAĞI

İmza


Danışman

Prof.Dr. Mustafa Yavuz KÖKER

İmza


ERÜ Tıp Fakültesi

İmmünoloji ABD Başkanı

Prof. Dr. Mustafa Yavuz KÖKER

İmza


KABUL VE ONAY

Prof. Dr. Mustafa Yavuz KÖKER danışmanlığında **Zeynep AKİDAĞI** tarafından hazırlanan “**Kronik Granüloamatöz Hastalık Moleküler Tanısında Fragment Analizinin Uygulanması**” konulu bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **İmmünoloji** Anabilim Dalında **Yüksek Lisans** Tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

Danışman: Prof. Dr. Mustafa Yavuz KÖKER

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi
İmmünoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi

Üye: Prof. Dr. Vesile ŞENOL

Kapadokya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Yüksekokulu
Beslenme ve Diyetetik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi

Üye: Prof Dr.İnsu YILMAZ

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi
Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı Öğretim Üyesi

Üye: Prof. Dr. Ali ÜNAL

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi
İç Hastalıkları Anabilim Dalı Öğretim Üyesi

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Hüseyin AVCILAR

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi
İmmünoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi

ONAY

Bu tezin kabulü ERÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun/...../..... tarih vesayılı kararı ile onaylanmıştır.

...../...../.....

İmza

.....
.....
.....
.....
.....

ERÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Prof. Dr. Bilal AKYÜZ
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi İmmünoloji Anabilim Dalı'nda bana her konuda yardımcı olan ve kolaylık sağlayan, öğrenim sürem boyunca desteklerini esirgemeyen kıymetli hocam ve danışmanım Prof. Dr. Mustafa Yavuz KÖKER' e, tezimin yazılışına katkılarından dolayı değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Hüseyin AVCILAR'a, bilgilerinden ve tecrübelerinden yararlandığım sevgili arkadaşlarım Dr. Nezihe KÖKER ve Uzm. Bio. Sevil ÖZSOY' a, analiz süreçlerinde yardımlarını esirgemeyen Uzm. Bio. Mustafa Akkuş'a, proje çalışmaları sürecinde 114S352 nolu Tübitak projesi ile İmmünoloji Anabilim dalında oluşan altyapıyı kullanmam nedeniyle Tübitak' a ve tüm yüksek lisans öğrenimim boyunca bana destek olan ve şevk veren canım aileme, gönülden teşekkürlerimi sunarım.

Zeynep AKIDAĞI

Ocak 2020, Kayseri

**KRONİK GRANÜLOMATÖZ HASTALIK
MOLEKÜLER TANISINDA
FRAGMENT ANALİZİNİN UYGULANMASI**

Zeynep AKIDAĞI

Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü

İmmünoloji Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi, Ocak 2020

Danışman: Prof.Dr. Mustafa Yavuz KÖKER

ÖZET

Kronik granüloamatöz hastalık (KGH), fagositlerde bulunan nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) oksidaz enziminin fonksiyon görememesi ile karakterize olan X'e bağılı ya da otozomal resesif kalıtsal geçiş gösteren primer immün yetmezlik hastalığıdır. NADPH enzimi, gp91^{phox}, p22^{phox}, p67^{phox}, p40^{phox} ve p47^{phox} protein alt birimlerinden oluşur ve bu protein alt birimlerinin herhangi birinin eksikliğinde fagositler patojen mikroorganizmaları öldürme yeteneğini kaybeder ve KGH meydana gelir.

Çalışmada, ERÜ Tıp Fakültesi İmmünoloji Anabilim Dalı immün yetmezlik laboratuvarında KGH tanısı almış 24 KGH hastası ile 41 aile bireyi (sağlıklı ve taşıyıcılar) ve sağlıklı gönüllü bireyden oluşan 20 kontrol örneği ile çalışıldı. Ayrıca daha önceden homozigot Δ GT delesyonu (Δ GT) mutasyonu bulunan 15 KGH hastası pozitif kontrol olarak çalışmaya dahil edildi. Bütün örneklerde *NCF1* geni exon 2 bölgesinde psödojen/ gen (*ΨNCF1/NCF1*) oranı araştırıldı. Bu amaçla ilgili bölgedeki Δ GT durumu fragment analizi ile hesaplanarak kontrol edildi. Çalışmamızda, fragment analizi kullanarak 24 KGH hastası (gp91, p22 ya da p67-phox protein eksikliği olan) ile 41 aile bireyinde ve 20 kontrol örneğinde heterozigot Δ GT taşıyıcılığı araştırıldı. gp91, p22 ya da p67-phox protein eksikliği olan KGH hastalarında %10 oranında heterozigot Δ GT taşıyıcılığının olabileceği gösterildi. Kontrol grubundaki sağlıklı bireylerin de

çalışmaya dahil edilmesiyle heterozigot ΔGT taşıyıcılığının, normal popülasyonda %12 olduğu gösterildi.

Bu çalışma, özellikle heterozigot ΔGT taşıyıcılığın toplumda yaygınlığının bilinmesine ışık tutmuştur. Ayrıca bu çalışma ile KGH tanısıl çalışmalarında, heterozigot ΔGT taşıyıcılığının göz önünde bulundurulması gerektiği anlaşıldı. KGH homozigot ΔGT bulunan hastalar ile heterozigot ΔGT taşıyıcısı olan bireylerin ayrımında fragment analizinin ideal bir yöntem olarak kullanılabildiği anlaşıldı.

Anahtar Kelimeler: Kronik Granülatöz Hastalık, *NCF1*, Fragment Analizi.



**APPLICATION OF FRAGMENT ANALYSIS
IN THE MOLECULAR DIAGNOSIS OF CHRONIC GRANULOMATOUS
DISEASE**

Zeynep AKIDAĞI

Erciyes University, Institute of Health Sciences

Department of Immunology

Master of Science Thesis, January 2020

Supervisor: Prof. Dr. Mustafa Yavuz KÖKER

ABSTRACT

Chronic granulomatous disease (CGD) is a primary immune deficiency disease with X-linked or autosomal recessive inheritance characterized by the failure of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase enzyme in phagocytes. NADPH oxidase consists of the gp91^{phox}, p22^{phox}, p67^{phox}, p40^{phox}, p47^{phox} protein subunits, and in the absence of any of these protein subunits, phagocytes lose the ability to kill pathogenic microorganisms and CGD occurs.

In this study, 24 patients diagnosed with CGD and 41 family members (healthy and carriers) and 20 healthy volunteer individuals were studied in the Immune Deficiency Laboratory in Erciyes University Faculty of Medicine Immunology Department. In addition, 15 CGD patients who previously had homozygous GT deletion (ΔGT) mutation included in the study as positive control.

In all samples pseudogene/gene (*ΨNCF1/ NCF1*) ratios investigated in the *NCF1* gene exon 2 region. For this purpose, the status of region was calculated and controlled by fragment analysis. Using fragment analysis, heterozygous ΔGT carrying was investigated in 24 CGD patients, (gp91, p22 or p67-phox protein deficient) 41 family members and 20 control samples. It has been shown that %10 heterozygous ΔGT carrying may be present in CGD patients with gp91, p22 or p67-phox protein deficient. The study also included healthy individuals in the control group and showed that heterozygous ΔGT carrying %12 in the normal population.

In particular, this study shed light on the prevalence of heterozygous ΔGT carrying in the society. In addition, this study showed that heterozygous ΔGT carrying should be considered in diagnostic studies of CGD. It is understood that fragment

analysis can be used as an ideal method to distinguish between patients with CGD homozygous ΔGT and individuals with heterozygous ΔGT carries

Key Words: Chronic Granulomatous Disease, *NCF1*, Fragment Analysis

İÇİNDEKİLER

KRONİK GRANÜLOMATÖZ HASTALIK MOLEKÜLER TANISINDA FRAGMENT ANALİZİNİN UYGULANMASI

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK.....	i
YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI.....	ii
KABUL VE ONAY.....	iii
ONAY.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
ÖZET.....	v
ABSTRACT.....	vii
1. GİRİŞ ve AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Kronik Granülomatöz Hastalık (KGH).....	3
2.3. Fagositik Hücreler ve Fagositoz Mekanizması.....	4
2.4. NADPH Oksidaz Enzim Kompleksi.....	7
2.4.1. NADPH Oksidaz Enziminin Yapısı.....	9
2.4.2. NADPH Oksidaz Enziminin Aktivasyonu.....	16
2.4.3. NADPH Oksidaz Ailesi ve Diğer Dokularda NADPH Oksidaz Enzimi.....	18
2.5. KGH Epidemiyolojisi ve Klinik Yaklaşım.....	19
2.5.1. KGH Tanısı.....	21
2.5.2. KGH Tanısında Taşıyıcılık ve Liyonzasyon.....	22
2.5.3. KGH Tanı Yöntemleri.....	23
2.5.3.5. Moleküler Tanı Yöntemleri.....	28
2.5.3.6. Fragment Analizi.....	29
2.5.3.7. KGH Fragment Analizinde Mikrosatellitlerin Kullanılması.....	30
2.5.4. KGH Tedavisi.....	32
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	35
3.1. Alet ve Cihazlar.....	35
3.2. Kit ve Kimyasal Maddeler.....	36

3.2.1. DNA izolasyonu için kullanılan kit ve kimyasallar	36
3.2.2. PCR işleminde mix hazırlamak için kullanılan kit ve kimyasallar	36
3.2.3. Jel Elektroforezi İşleminde Kullanılan Kimyasallar	36
3.2.4. ABI 3500 Genetik Otoanalizör için kullanılan kit ve kimyasallar	36
3.3. YÖNTEMLER.....	37
3.3.1. DNA izolasyonu	37
3.3.2. PCR İşlemi İçin Mix Hazırlama.....	38
3.3.3. NCF1 Ekzon 2 PCR Uygulaması	39
3.3.4. Jel Elektroforezi Uygulaması.....	39
3.3.5. ABI-3500 Genetik Analizörü ile Fragment Analizinin Uygulaması.....	40
3.4. İSTATİSTİK.....	43
4. BULGULAR.....	44
4.1. Uygulanan Testlerin Optimizasyonu.....	44
4.1.1. DNA Örneklerinin İzolasyonu ve Kimyasallar ile İlgili Optimizasyon	44
4.1.2. PCR ve Elektroferez Analizlerinin Optimizasyonu	44
4.1.3. Fragment Analizi ile İlgili Optimizasyon	45
4.2. Fragment Analiz Sonuçlarına Göre Çalışma Gruplarında Sağlıklı, Taşıyıcı ve Hastalarda <i>NCF1/ΨNCF1</i> oranlarının gösterilmesi.....	46
4.3. Kontrol Grubunda Fragment Analiz Sonuçları.....	47
4.4. Tüm Çalışma Grubunda Fragment Analiz Sonuçları.....	47
4.4.1. KGH Hasta Gruplarında Fragment Analiz Sonuçları.....	51
4.4.2. <i>ΨNCF1/NCF1</i> Gen Oranlarının Cinsiyetlere Göre Dağılımı.....	57
5. TARTIŞMA- SONUÇ ve ÖNERİLER.....	61
6.KAYNAKLAR.....	67
EKLER.....	80
ÖZ GEÇMİŞ.....	83

KISALTMALAR

DHR	:Dihidrorhodamin 1, 2, 3
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
DCFH	: DikloroflorosanDiasetat
FAD	: Flavinadenindinükleotid
FITC	: Fluoresceinisothiocyante
G-CSF	: GranüositKoloniStimülan Faktör
GDP	: Guanindifosfat
GTP	:Guanintrifosfat
HE	:Hidroethidine
KGH	: Kronik granüomatöz hastalık
KG	: Kronik granüomatöz
LAD	: Lökosit adezyon defekti
MPO	: Myeloperoksidaz
NADPH	: Nikotinamidadenindinükleotitfosfat
NBT	: Nitrobluetetrazolyum
NGD	: Yeni nesil dizileme
NCF1	: Neutrophilcytosolicfactor 1, nötrofilsitozolik faktör 1
NCF2	: Neutrophilcytosolicfactor 2, nötrofilsitozolik faktör 2
NCF4	: Neutrophilcytosolicfactor 4, nötrofilsitozolik faktör 4
NO	: Nitritoksit
NOX2	: Nötrofiloksidaz-2
PHOX	: Fagosit oksidaz
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
PMA	: Phorbol 12-myristate 13-acetate
PXE	: Pseudoxanthomaelasticum
P47⁰- OR-KGH	: p47 ^{phox} proteindefektibulunanotozomalkronikgranüomatöz hastalık
ROS	: Reaktif oksijen ürünleri
X- KGH	: X' e bağlı Kronik Granüomatöz Hastalık
ΔGT	: GT delesyonu

TABLOLAR LİSTESİ

		<u>Sayfa No</u>
Tablo 2.1.	Çeşitli hastalıklarda görülen psödogenler ve özellikleri	15
Tablo 2.2.	NADPH oksidaz enzimini oluşturan komponentlerin özellikleri	16
Tablo 2.3.	Kronik granümatöz hastalıkta patojen mikroorganizmaların sebep olduğu enfeksiyonlar	20
Tablo 2.4.	Fragment boyutlarına göre kullanılan boyastandartları.....	31
Tablo 2.5.	Boya standartını ve numunelerin Hi- Di Formamide ile optimizasyonu.	31
Tablo 3.1:	<i>NCF1</i> Geni Ekson 2 için PCR Uygulaması Sıcaklık ve Döngü Sayıları	39
Tablo 3.2.	<i>NCF1</i> geni ekzon spesifik PCR işlemi için kullanılan primer dizileri....	39
Tablo 4.1.	Tüm çalışma gruplarında fragment analiz sonuçları.....	48
Tablo 4.2.	KGH hastalarında <i>ΨNCF1</i> fragment boyutları varyans analiz sonuçları.	51
Tablo 4.3.	KGH hastalarında <i>NCF1</i> fragment boyutları varyans analiz sonuçları...	51
Tablo 4.4.	<i>NCF1</i> exon 2 ΔGT olmayan KGH (X- KGH) hasta ve aile bireylerinde <i>NCF1</i> exon 2 fragment analizi sonuçları.....	52
Tablo 4.5.	Pozitif kontrol grubunda <i>NCF1</i> exon 2 homozigot ΔGT olan KGH (p47 ⁰) hastaları ve aile bireylerinde <i>NCF1</i> exon 2 fragment analiz sonuçları	H
	ata! Yer işareti tanımlanmamış.	
Tablo 4.6.	<i>NCF1</i> exon 2 ΔGT olmayan KGH (p22 ⁰ , p67 ⁰ , p47 ⁰) hastaları ve aile bireylerinde <i>NCF1</i> exon 2 fragment analiz sonuçları	53
Tablo 4.7.	Hasta gruplarında <i>ΨNCF1</i> geni fragment boyutlarının istatistiksel analiz sonuçları	H
	ata! Yer işareti tanımlanmamış.	
Tablo 4.8.	Hasta gruplarında <i>NCF1</i> geni fragment boyutlarının istatistiksel analiz sonuçları	H
	ata! Yer işareti tanımlanmamış.	

Tablo 4.9.	Δ GT bulunduran ve bulundurmeyan KGH hasta, taşıyıcı ve sağlıklı bireylerin sayısı.....	58
Tablo 4.10.	KGH hasta ve aile bireylerinde <i>ΨNCF1/NCF1</i> gen oranlarının sayı ve yüzde olarak dağılımı.....	59

ŞEKİLLER LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1. Fagosit hücre zarında bulunan patojenleri tanımaya yarayan fagositik reseptörler.....	5
Şekil 2.2. Fagosit fagozomlarında oksidatif patlama.....	6
Şekil 2.3. Oksidatif patlama sonucu reaktif oksijen ürünlerinin ve reaktif azot ürününün (NO_2Cl) oluşumu	7
Şekil 2.4. NADPH Oksidaz enzim kompleksi	9
Şekil 2.5. <i>NCF1</i> geni ve pseudogenlerinin kromozom 7q11.23 bölgesinde lokasyonu	11
Şekil 2.6. <i>NCF1</i> ile <i>NCF1B</i> ve <i>NCF1C</i> psödogenlerini gösteren DNA sekansı. A. <i>NCF1</i> geni ile aynı olmayan <i>NCF1B</i> ve <i>NCF1C</i> dizileri kırmızı ile gösterilmiştir. B. <i>NCF1</i> geni ile karşılık gelen <i>NCF1B</i> ve <i>NCF1C</i> sekansları kırmızı ile gösterilmiştir.	11
Şekil 2.7. <i>NCF1</i> geni ve psödogenleri arasında gerçekleşen crossing-over olayı.....	12
Şekil 2.8. Kromozomlara göre psödogen oranları (Mb)	14
Şekil 2.9. NADPH oksidaz Aktivasyonu; İnaktif NADPH enzimi (A), Aktif NADPH enzimi (B)	17
Şekil 2.10. NADPH oksidaz enzim ailesi	19
Şekil 2. 11. KGH tanısında izlenen yol haritası	23
Şekil 2.12. X' e bağlı KGH tanısında DHR 123 testinde histogramların görünümü; ...	23
Şekil 2.13. Nötrofillerde normal NBT testi (x1000). (A) PMA ile stimüle edilmemiş nötrofiller. (B) PMA ile inkübasyondan sonra stimüle olan sağlıklı nötrofiller; sağlıklı insanlarda stimülasyon sonucu nötrofillerin %99 unda mavi-mor renk oluşurken, KGH tanısı taşıyan bireylerde bu	

rengin oluşumu (NBT pozitif granüller) ancak %1' den az nötrofillerde görülme durumu	25
Şekil 2.14. Hasta ve sağlıklı bireylerde görülen fragment analiz sonuçlarının görünümü	28
Şekil 2.15. Farklı uzunlukta bulunan farklı sayılarda tekrarlayan STR'ler	31
Şekil 3.1. ABI-3500 genetik analizör cihazı ve bileşenleri (Thermo Fisher, 2019) ...	45
Şekil 4.1. Fragment Analizinde fragment boyutlarının birbirine oranına göre belirlenen gen oranlarının, sağlıklı, taşıyıcı ve hasta bireylerde gösterimi.....	46
Şekil 4.2. Çalışma grubunda <i>ΨNCF1</i> geni fragment boyutlarının dağılımı	49
Şekil 4.3. Çalışma grubunda <i>NCF1</i> geni fragment boyutlarının dağılımı	500
Şekil 4.4. <i>ΨNCF1/NCF1</i> gen oranlarının (mavi: 0 gen oranı, siyah: 1:1 gen oranı, yeşil: 2:1 gen oranı, turuncu: 4:1 gen oranı, mor: 5:1 gen oranı, kırmızı: 1:2 gen oranı) çalışma gruplarına (0: Kontrol, 1: Sağlıklı, 2: Hasta, 3: Taşıyıcı) göre dağılımı.....	500
Şekil 4.5. Δ GT bulunduran (DelGT) ve Δ GT bulundurmeyen KGH hasta ve aile bireyleri (sağlıklı ve taşıyıcılar) arasındaki ilişki	57
Şekil 4.6. KGH hasta ve aile bireyleri ile <i>ΨNCF1/NCF1</i> gen oranları arasındaki ilişkisi.....	57
Şekil 4.7. Çalışma grubunda bulunan erkek ve kadın bireylerin yüzdelik oranları	58
Şekil 4.8. Δ GT bulunduran ve Δ GT bulundurmeyen bireylerin cinsiyete göre dağılımları	58
Şekil 4.9. <i>ΨNCF1/NCF1</i> gen oranlarının cinsiyetlere göre dağılımı	59
Şekil 4.10. Sağlıklı bireylerde ve KGH hastalarında görülebilen genotip şekilleri	60
Şekil 4.11. Çalışma grubunda gen scan analizi sonucunda X-KGH (A ve E), p470- OR- KGH (B,C ve D) ve p670-p220-OR-KGH (G) hasta ve akrabalarında bulunan gen oranlarının ve genotiplerinin gösterimi	60

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Kronik granüloamatöz hastalık (KGH), fagositlerde bulunan nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) oksidaz enziminin fonksiyon görememesi ile karakterize olan X'e bağlı ya da otozomal resesif kalıtsal geçiş gösteren primer immün yetmezlik hastalığıdır. (Köker ve ark., 2006). KGH tekrarlayan ağır bakteriyel veya fungal enfeksiyonların sebep olduğu hiper-inflamatuvar yanıtla neden olan bir hastalıktır (Roos, Holland and Kuijpers, 2014). Bu hastalığa sebep olan NADPH enzimi, *gp91^{phox}* ve *p22^{phox}*, *p47^{phox}*, *P67^{phox}* ve *p40^{phox}* proteinleri olmak üzere 5 protein alt birimden meydana gelmektedir. Bu protein alt birimleri sırasıyla *CYBB*, *CYBA*, *NCF1*, *NCF2* ve *NCF4* genleriyle kodlanmaktadır. (Köker ve ark., 2007). *gp91^{phox}* ve *p22^{phox}* proteinleri membrana bağlıdır ve *gp91^{phox}* proteini X'e bağlı kalıtılmaktadır. *p22^{phox}*, *p47^{phox}*, *P67^{phox}* ve *p40^{phox}* proteinleri ise sitozolik alt birimlerdir ve otozomal resesif (OR) genlerle kalıtılır. NADPH enzimini oluşturan bu alt birimlerin herhangi birinin eksikliğinde fagositler mikroorganizmaları öldüremezler. Dolayısıyla KGH tanısı taşıyan bireylerde sınırlı bir grup mikroorganizma ile oluşan enfeksiyonlara karşı duyarlılıkta artış gözlenir.

Dünyada KGH görülme oranı %70 X-KGH ve %30 otozomal resesif KGH şeklindedir. Ülkemizde ise akraba evliliklerinin %20 düzeyinde olması nedeniyle OR-KGH daha sık görülmektedir (%60 OR-KGH ve %40 X-KGH) (Köker, 2009). KGH tanısında, ilk etapta nötrofil fonksiyonu (oksidatif patlama), DHR testi ile ölçülerek tanı konulmaktadır (Roos, 2016). KGH olduğu fonksiyonel test ile kesinleşen bireylerde hastalığa sebep olan mutasyonu belirlemek için çeşitli moleküler yöntemler uygulanmaktadır (Roos ve de Boer, 2014). Geliştirilen moleküler tanı yöntemleri ile KGH tanısı konulmuş bireylerin sahip olduğu mutasyon tipleri sanger dizileme yöntemi ya da NGS yöntemi ile belirlenir.

Bu çalışmada, bazı KGH suptiplerinin molekülertanısında kullanılan beraberinde, aile bireylerinde taşıyıcılık durumunu gösterebilen fragment analiz yönteminin uygulamaya konulması amaçlanmıştır. Bu yöntem Sanger's dizi analizinden daha kolay ve ucuz yapılabilen bir uygulamadır. Bu vesile ile OR-KGH hastalarının yaklaşık %50 sini oluşturan p47-phox defekti (exon 2 GT delesyonu) olan grupta tanısal işlemlerin daha düşük maliyetli ve hızlı bir şekilde yapılması amaçlanmaktadır. Ayrıca sonuçlarımız toplumdaki heterozigot ΔGT taşıyıcılığının oranına ışık tutacaktır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kronik Granüloamatöz Hastalık

Kronik Granüloamatöz Hastalık, kişinin yaşamının ilk yıllarında ortaya çıkan, en sık olarak solunum sistemi, dermatit ve gastrointestinal sistem komplikasyonları ile karakterize enfeksiyonların görüldüğü primerimmün yetmezlik hastalığıdır (Roos, 2016). Primer immün yetmezlikler, doğumsal immün yetmezlikler olarak da tanımlanmaktadır. Bu gruptaki immün sistem bozukluklarında immün sistem, kronik ya da tekrarlayan bakteri, virüs ya da fungal enfeksiyonlara karşı yeterli baskılayıcı yanıtı oluşturamaz (Turul, 2003).

KGH, Avrupa' da 1/250.000 oranında insidansa sahip olduğu belirlenmişken bu oran akraba evliliği ve etnik köken gibi faktörlere bağlı olarak değişmektedir (Winkelstein, Marino, Johnston,ve ark., 2000). KGH' ye sebep olan doğal immün sistemin ilk basamağında yer alan ve fagosit olarak adlandırılan hücrelerde bulunan NADPH oksidaz enzimidir. Başta nötrofil olmak üzere bu hücrelerde patojen mikroorganizmaları öldürmek için kullanılan başlıca ROS (Reaktif oksijen ürünleri) mekanizması, NADPH enziminde meydana gelen yapısal ya da fonksiyonel bozuklukluktan dolayı çalışmaz. Bu mekanizmada patojenleri yok etmek için hidrojen peroksit sentezlenmektedir. Fakat NADPH enziminin yeteri kadar ya da hiç çalışmaması hidrojen persoksit üretimini engeller. Dolayısıyla özellikle katalaz pozitif olan ve hidrojen peroksit üretemeyen bakteri ve mantarlar önemli enfeksiyonlara yol açabilirler (Heyworth ve ark., 2003). Doğal immün yanıtın önemli bir basamağında yer alan nötrofil, monosit ve makrofaj gibi hücrelerde yaşanacak herhangi bir fonksiyon bozukluğu, çocukluk çağında ortaya çıkan tekrarlayan bakteri ve fungalenfeksiyonlarkarakterizeprimer bir immün yetmezlik tablosunu ortaya çıkarır (Dinauer, 2016).

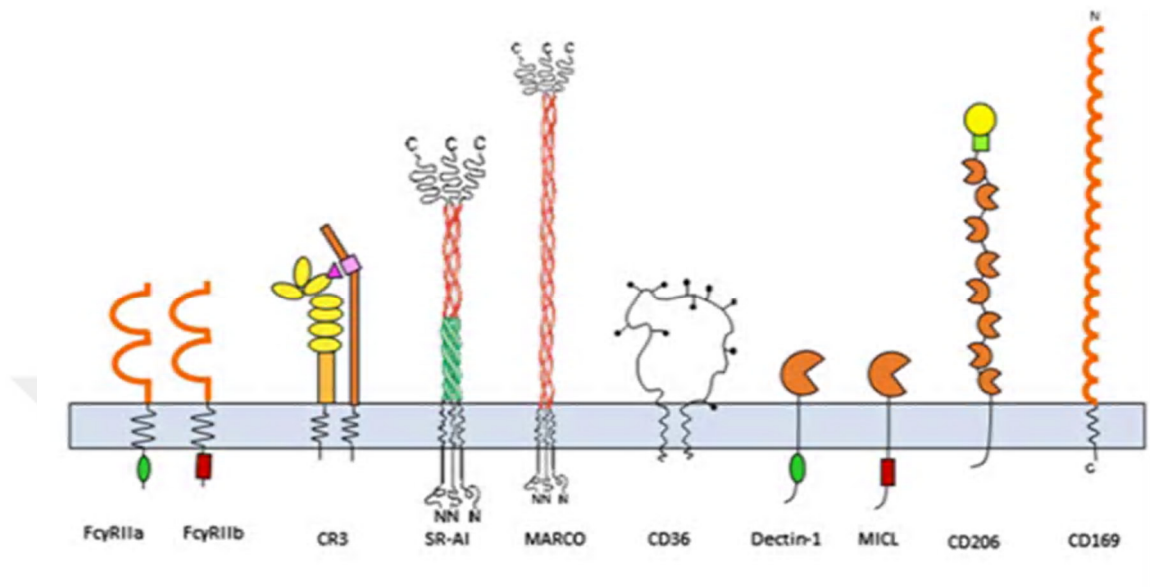
2.2. Kronik Granülamatoz Hastalık Tarihçesi

KGH, ilk olarak 1952 yılında B lenfosit eksikliği ile karakterize edilen agammaglobulinemia ile ilişkilendirilmiş fakat tanımlanamamıştır (Bruton, 1952). 1954 yılında geçmeyen veya tekrarlayan enfeksiyonların oluşumuna bağlı olarak hipergammaglobulinemia ile ilişkilendirilmiştir (Janeway ve ark., 1954). Sonraki yıllarda hastalığın ciddiyeti daha net bir şekilde anlaşılmış ve hastalık ‘‘çocukluk çağı ölümcül granülamatoz hastalığı’’ adı ile anılmaya başlamıştır. 1959 yıllarından sonra gelişen tanı ve tedavi yöntemleriyle bu ürküten isim yerine ‘‘Kronik Granülamatoz Hastalık’’ tanımı kullanılmıştır (Bridges, 1959). KGH tanımlandığı ilk yıllarda yalnızca X ‘e bağlı olduğu düşünülmüştür. Fakat bu düşünce, 1968 yılında kız çocuklarında da lökosit fonksiyon bozukluklarının görülmesine bağlı olarak hastalığın kız çocuklarında da tespit edilmesi, KGH’ nin yalnızca X’e bağlı değil otozomal olarak da geçiş gösterdiğinin anlaşılmasıyla yıkılmıştır (Azimi, 1968; Quie, 1968). Geçen 60 yıldan bu yana KGH tanı ve tedavisinde son derece önemli yollar kat edilerek hastalık artık ölümcül olmaktan çıkmış sağ kalım oranı yüksek bir hastalığa dönüşmüştür. Hastalığın ölümcül boyutunun geride bırakılmasında, erken dönemde saptanmasına ve tedavisine yönelik yeni ve etkin yaklaşımlar halen geliştirilmeye devam etmektedir (Segal, 2000).

2.3. Fagositik Hücreler ve Fagositoz Mekanizması

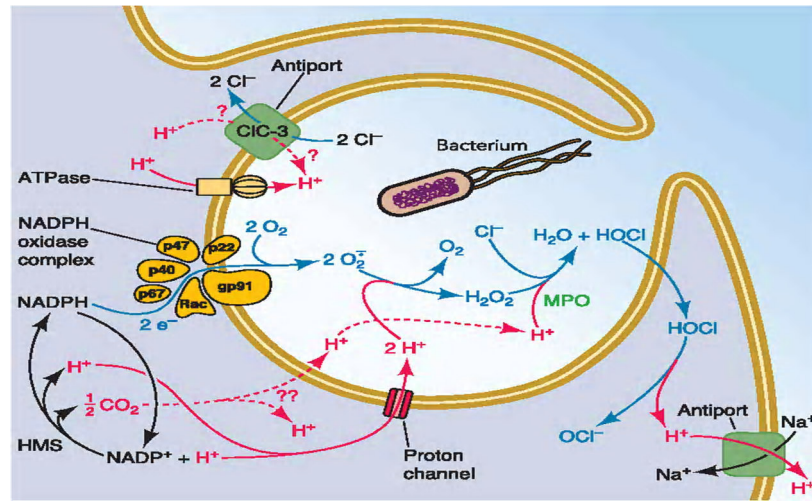
İmmün sistemimizde patojen mikroorganizmalardan korunmamızı sağlayan fagositler olarak adlandırılan nötrofil, monosit, makrofajlardan oluşan hücre grubu bulunmaktadır. (Demaurex ve Nunes, 2016). Bu hücreler arasında doğal immün sistemde mikroorganizmalara karşı ilk defansı oluşturan ve akut enfeksiyonlarda sayıları artan hücreler nötrofillerdir. KGH, nötrofillerde bulunan NADPH enzimindeki eksikliklerden kaynaklanır (Arnold ve Heimall, 2017). Nötrofiller, dolaşımdaki beyaz küreler olarak isimlendirilen, çapları 10-15 µm olan akut inflamasyonlarda olay yerine ilk göç eden hücrelerdir. Çekirdekleri 3-5 loblu olduğundan *polimorfnüveli lökositler* olarak da bilinirler. Kemik iliğinde miyoloidöncül hücrelerden granülosit stimulan faktör (G-CSF) etkisiyle gelişirler ve ömürleri en fazla 8 saattir. Dolaşımdaki nötrofiller tüm lökositlerin yaklaşık %70 i kadardır (Doan, 2014). Nötrofillerin de içinde bulunduğu fagosit denilen bu hücreler bakteri, virüs, mantar, parazit gibi patojenleri, hücre yüzeyinde taşıdıkları scavenger reseptör, mannozreseptör, Toll benzeri reseptör (TLR)

ve Mac-1 integrin gibi bazı reseptörler ile tanıyarak patojenin hücre içine fagositozunu sağlarlar (Flannagan ve ark., 2012) (**Şekil 2.1**).



Şekil 2. 1. Fagosit hücre zarında bulunan patojenleri tanıyan reseptörler(Flannagan ve ark., 2012).

Fagositler, bu reseptörleri sayesinde tanıyıp yakaladıkları patojenleri, hücre zarlarını hücre içine doğru çekerek oluşturdukları fagozom adı verilen bir kese içinde hapsederler. Bu olay fagositoz olarak tanımlanır (Gordon, 2016). Fagositler, fagositoz ile hücre içine aldıkları patojenleri süperoksit radikalleri aracılığıyla öldürürler. Bu radikaller NADPH oksidaz enziminin oksijeni süperoksit iyonuna redükteetmesiyle ortaya çıkar. Bu olay''*oksidatif patlama*'' olarak isimlendirilir (Suzuki ve ark., 2011) (**Şekil 2.2**).



Şekil 2. 2. Fagozomlarda NADPH oksidaz enzimi ve ROS (Suzuki ve ark., 2011:14).

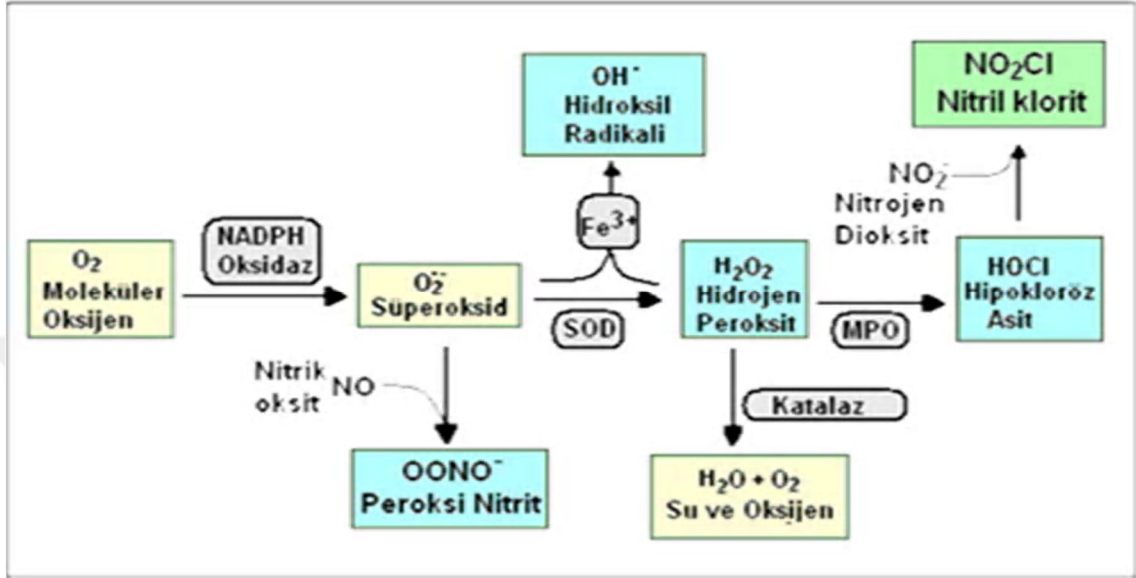
Daha sonra süperoksit iyonu dismutaz enzimi ile hidrojen peroksit'e dönüştürülür ve bu olay, doku hasarını önlemek için süperoksit radikallerinin toksik etkilerinin uzun sürmesine engel olur (Şekil 2.3).

ROS, iki şekilde biyosidal etki göstererek fagositler tarafından iki mekanizma ile kullanılır;

Myeloperoksidaz Bağımlı Öldürme Sistemi: Fagozom içinde oluşan hidrojen peroksit miktarları patojeni öldürmek için yeterli olmayabilir. Böyle durumlarda nötrofillerin azurofilik granüllerinde ve kan monositlerinde bulunan Myeloperoksidaz (MPO) enzimi ortamda Cl⁻ iyonu varlığında hidrojen peroksit'i hipokloröz asite çevirir. Bu madde bakteriler, mantarlar ve parazitler için son derece toksik bir antimikrobiyal etki gösterir. Hipokloröz asit daha sonra katalaz enziminin etkisiyle su ve oksijene dönüştürülerek yıkılır. Myeloperoksidaz enzimi içeren fagositler bu sistemi kullanarak patojenleri etkisiz hale getirirler (Weiss, 1989) .

Myeloperoksidaz Bağımsız Öldürme Sistemi: Myeloperoksidaz enzimi bulunmayan fagositlerin kullandığı mekanizmadır. Nötrofiller, MPO enzimi içerirken aktif makrofajlar içermezler. Bu hücreler MPO enziminden bağımsız olarak bakterisidal etki mekanizmaları kullanırlar fakat oksijen varlığında bu reaksiyonlar gerçekleşebilir. Bu mekanizmada makrofajlar MPO enzimleri olmadan hidrojen peroksit üretseler de açığa çıkan hidrojen peroksit yeterli miktarda olmaz. Bu sistemde oksijen varlığında hidrojen

peroksinin yanında süperoksit radikalleri ve hidroksil iyonları da oluşur. Böylece makrofajlar da nötrofiller gibi daha etkin fagositoz yapabilirler (Kavas, 1994).



Şekil 2. 3. Oksidatif patlama sonucu reaktif oksijen ürünlerinin (ROS) ve reaktif azot ürünlerinin (RNS) oluşumu (Köker, 2006: 16).

2.4. NADPH Oksidaz Enzim Kompleksi

NADPH oksidaz enzimi, nötrofil, eozinofil ve mononükleer fagositlerde bulunan, oksijen varlığında NADPH' dan süperoksit (O_2^-)² sentezini katalizleyen bir enzimdir (Babior ve ark., 2002). NADPH oksidaz enzimi ilk olarak 1933 yılında denizkestanesi fagositlerinde (Baldrige ve Gerard, 1932), bundan 10 yıl sonra ise spermatozoidlerde tanımlanmıştır (MacLeod, 1943). Fakat enzimin fagositlerdeki oksidatif patlama reaksiyonlarından sorumlu olduğu 1964 yılında anlaşılmıştır (Rossi ve Zatti, 1964). ROS reaksiyonlarında NADPH oksidaz enziminin sorumlu olduğunun bulunmasının ardından günümüze kadar bu konuda birçok çalışma yapılmış ve NADPH oksidaz aktivasyonu ile fonksiyonu hakkında birçok bilgiye ulaşılmıştır. NADPH oksidazın aktivasyonunda birçok birim görevlidir; aktivasyon sırasında hücre içinde yer alan proteaz, antimikrobiyal proteinler ve peroksidazları içeren granüller, plazma ya da fagozom zarı ile birleşir ve süperoksit oluşumunun ardından dismutaz enzimiyle patojenleri yok etmeye yarayan hidrojen peroksit (H_2O_2) meydana gelir (Horton ve ark.,

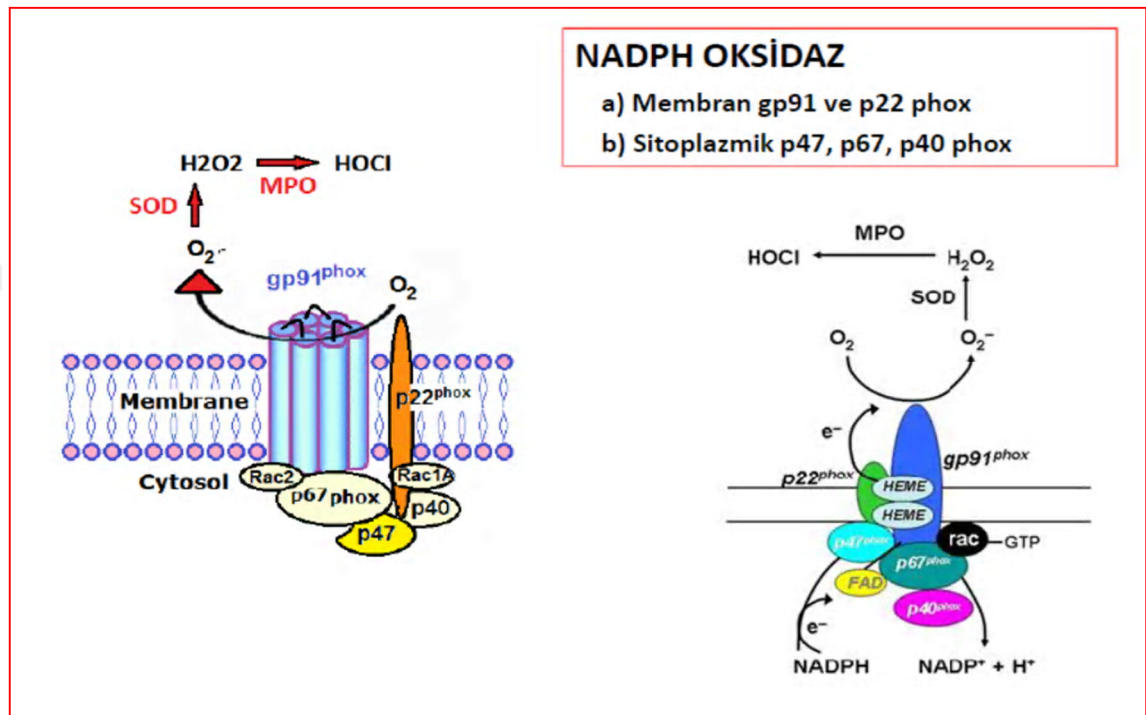
1996). NADPH oksidaz enzimi hem plazma membranında hem de sitozolde olmak üzere *gp91^{phox}* (fagosit oksidazı, *NOX2*), *p22^{phox}*, *p47^{phox}*, *p67^{phox}* ve *p40^{phox}* olarak bilinen 5 protein alt biriminden oluşur. Enzimi oluşturan protein alt birimleri sırasıyla *CYBB*, *CYBA*, *NCF1*, *NCF2*, *NCF4* genleri tarafından kodlanır.

Bu proteinler dışında *Rac2* geni ile kodlanan GTP- bağlanma proteini de yapıya katılan ve aktivasyonu başlatan bir proteindir (Köker ve ark., 2007). Dinlenme durumundaki bir fagositte bu komponentler birbirinden ayrı olarak bulunur. NADH oksidaz enziminin plazma membranına gömülü komponenti, *gp91^{phox}* (*phagocyticoxidase*, *NOX2*) ve *p22^{phox}* protein alt birimlerinden oluşan yapı flavositokrom_{b558} olarak adlandırılır (Vignais ve CMLS, 2002). Bu iki membran proteini yanında G- protein *Rap1A* olarak tanımlanan küçük bir protein daha bulunmaktadır (Sheppard ve ark., 2005). Enzim aktivasyonu flavositokromu oluşturan *gp91* ve *p22* protein alt birimlerinin birleşmesiyle başlar. Bu birleşmeyi takiben sitozolde yer alan bileşenlerin (*p47*, *p67*, *p40*) sitokrom_b ile birlikte oluşturdukları komplekse *Rac2* (GTP- bağlanma proteini) proteinin bağlanması enzimin aktivitesini artırır ve aktivasyon tamamlanır (El-Benna ve ark., 2005). Sitozolik alt birimlerin yanında *Cdc42* ve *p67* proteini ile ilişkisi olduğu düşünülen *p29* (peroksiredoksin) proteinleri de sitozolde yer alan NADPH oksidaz ile ilişkili olduğu düşünülen protein birimleridir (Leavey ve ark., 2002).

NADPH oksidaz enziminin aktivasyonu için enzimi oluşturan tüm protein alt birimleri mutlaka işlevsel olması gerekmektedir. Alt üniteleri oluşturan bu beş proteininin herhangi birinin eksikliğinde fagositler etkin fagositoz yapamamakta dolayısıyla bu durum KGH oluşumuna sebep olmaktadır. KGH tanısı konmuş hastalarda yapılan çalışmalar sonucunda hastalık etkeni olarak en sık *p47*, *p67*, *gp91*, *p22* ve *Rac2* proteinlerinin defektleri görülmektedir (Köker, 2010). Bunların dışında kalan, sitozolik *p40* proteini eksikliğine yol açan mutasyonlara geçmişte rastlanmazken günümüzde yapılan çalışmalar, *p40* proteini eksikliğinde NADPH oksidaz aktivitesinin düştüğünü hatta *granüloamatözcolitis* hastalığı gibi bazı hastalıklara neden olduğunu göstermektedir (Matute ve ark., 2009a).

NADPH oksidaz enzimi, dinlenme halindeki hücrede pasif halde iken, bakteriler gibi biyolojik uyarılarla ya da phorbolmyristateacetate (PMA) ve N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLF) gibi kimyasal maddelerle uyarıldığında NADPH enziminin aktivasyonu başlamaktadır. Bu aktivasyon flavinadenindinükleotid

(FAD) bağımlı bir elektron taşıma sistemi yolağını başlatır (Knaus, 2019). Bu yolda, NADPH oksidaz, ROS sentezinin öncül molekülü olan süperoksit anyonunun ($O_2^{\square-}$) üretilmesi için gereken bir elektronu, sitozolik NADPH molekülünden O_2 ' e transfer etmekle görevlidir (Raad ve ark., 2019).



Şekil 2. 4. NADPH Oksidaz enzim kompleksi (Gardiner ve ark., 2013:4)

2.4.1. NADPH Oksidaz Enziminin Yapısı

NADPH oksidaz enzimini oluşturan beş alt birim, genel olarak transmembrankomponentler ve sitozolikkomponentler olmak üzere iki gruptan oluşmaktadır (Tablo 2.2.) (Şekil 2.4).

2.4.1.1. NADPH Oksidaz Membran Proteini Flavositokrom_{b558}

gp91^{phox}(NOX2): Flavositokrom_{b558}komponentinin β alt ünitesi olan *gp9^{phox}* diğer adıyla *NOX2* proteini 570 aminoasitten oluşan bir glikoproteindir. Bu protein, X kromozomu üzerinde Xp21.1 bölgesinde bulunan ve 13 ekzondan oluşan *CYBB* geni tarafından kodlanmaktadır. *gp91* proteininin N- terminal ucunda üç adet N-linkedglikozillenmiş bölge içeren beş tane hidrofobik domain yer almaktadır. Ayrıca

sitozolik bölgesinde *p47* ile ilişki ve hem grubu içeren C-terminal bölgesi bulunmaktadır. *Gp91* proteini, sabitlenmiş *Rac2* ve *p67* tarafından düzenlenen elektron transferinde H kanallarında yük dengesinin korunmasında ve FAD molekülünün indirgenmesinde görev almaktadır (Sheppard ve ark., 2005).

p22^{phox}: Flavositokrom *b₅₅₈* komponentinin α alt birimini oluşturan bir diğer membran proteini *p22^{phox}* proteindir. 127 kDa ağırlığında olan bu protein 16. kromozom üzerinde 16q24 bölgesinde yer almakta ve 6 ekzondan meydana gelen *CYBA* geni tarafından kodlanmaktadır. Diğer membran proteini olan *gp91 (NOX2)* ile yakından ilişkilidir; *p22* protein defekti olan KGH hastalarında NOX2 saptanamaz. Ayrıca siRNA aracılı baskılayıcı regülasyonda NOX2 ile birlikte NOX1, NOX3 ve NOX4 proteinlerinin fonksiyonlarında da azalma görülmektedir. *p22* proteini, NOX proteinlerini bağlayarak stabilizasyonunu sağlamak ve organizatör diğer proteinleri bağlamakla görevlidir (Bedard ve Krause, 2007).

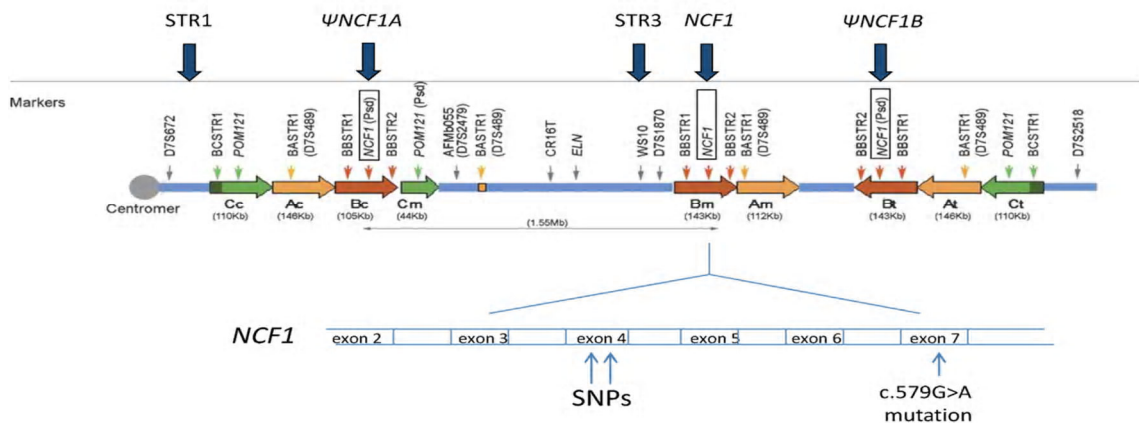
2.4.1.2. NADPH Oksidaz Sitozolik Proteinleri

p67^{phox}: 526 aminoasit zincirinden oluşan NADPH oksidaz enziminin sitoplazmada yer alan protein alt birimidir. 1q25 kromozom bölgesinde bulunan *p67^{phox}* proteini NCF2 (Nötrofilsitozolik faktör 2) geni tarafından kodlanmaktadır (O'Neill et al., 2015). *p67^{phox}* proteinin N- terminal bölgesi 4 bağlanma bölgesi, C- terminal bölgesi ise bir bağlanma bölgesi içermektedir. N-terminal bölgeleri tekrarlayan tetratrikopeptit dizilerinden oluşmaktadır. N-terminal uçtaki bağlanma bölgeleri fosforilasyon ve translokasyonun ardından *gp91^{phox}* proteine bağlanan, pralinden zengin 2 adet SH3 bağları ile *p47^{phox}* proteinine ve *Rac2* proteine bağlanan kısımları içermektedir (Sheppard ve ark., 2005).

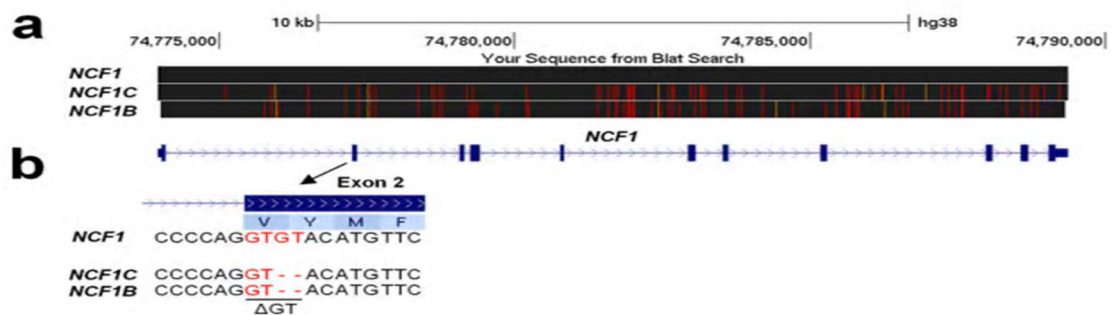
Ayrıca son zamanlarda *p67* ile ilişkilendirilen fosfolipaz ve peroksidaz aktivitesine sahip *p29* redoksiperoksin adı verilen ve oksidaz ilişkili bir protein saptanmıştır. Rekombinantsitozolik proteinlerle (*p47*, *p67*, *Rac1*) yapılan deneylerde *p29* proteinin oksidaz aktivitesini arttırdığı görülmüştür (Leavey ve ark., 2002).

p47^{phox}: 390 aminoasitten oluşan *p47* proteini, 7. kromozomun üzerinde 7q11.23 bölgesinde yer alan ve 11 ekzondan oluşan 204 baz çifti uzunluğunda *NCF1* geni tarafından kodlanmaktadır (**Şekil 2.5**). *p47* proteini, NADPH oksidaz enziminin

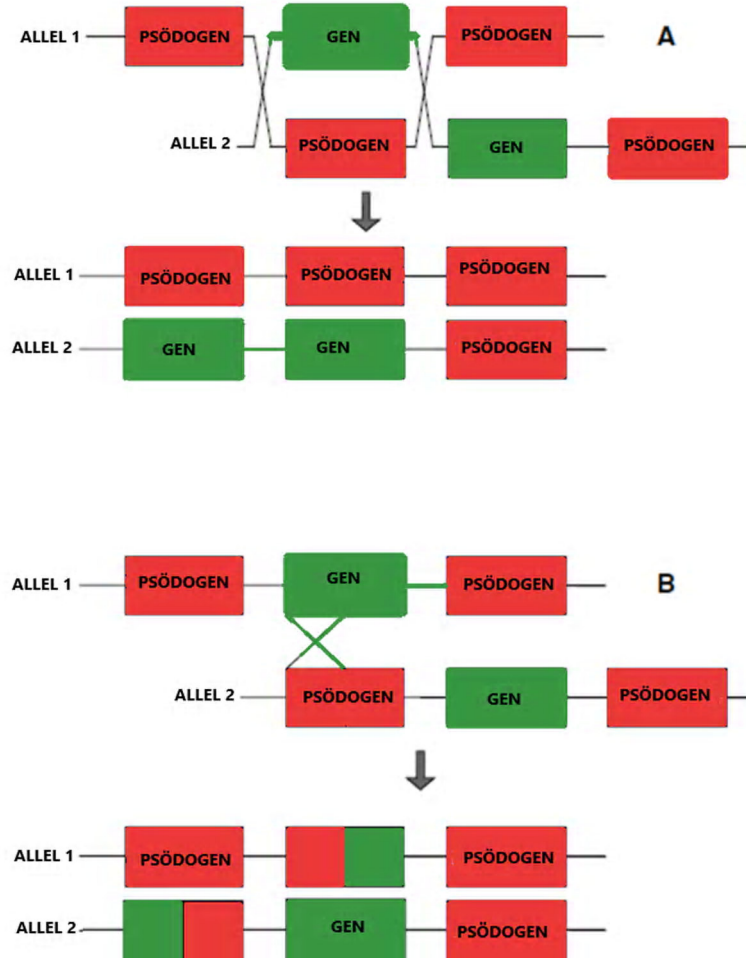
aktivatör proteini olarak işlev görmektedir (Hayrapetyan ve ark., 2013a). *P47* proteini bilinen 4 farklı domain içermektedir; bunlar, N-terminal uçta phox homolog bağlanma bölgesi, SH3 bağlarını içeren internal bağlanma bölgesi, otoinhibitör bağlanma bölgesi ve pralince zengin C-terminal bölgesini kapsamaktadır (Sheppard ve ark., 2005). KG hastalarının %25 inde *NCF1* genindeki mutasyonlar sonucu yaşanan *p47* protein eksikliği görülmektedir. *NCF1* geninde en sık rastlanan mutasyonlar 2. ekzonda meydana gelen çerçeve kayması GT delesyon (ΔGT) (3 veya daha az bazın değişimi ile meydana gelen kayma sonucu oluşur) (*c.75_76delGT*) mutasyonudur. Bu mutasyonun sebebi, *NCF1* geniyle %98 oranında homolog olan 2 adet psödogen (*ΨNCF1A* ve *ΨNCF1B*) ve *NCF1* geni arasında gerçekleşen crossing-over (parça değişimi) olayıdır (De Boer ve ark., 2015) (Şekil 2.7).



Şekil 2. 5. *NCF1* geni ve psödogenlerinin kromozom 7q11.23 bölgesinde lokasyonu (De Boer ve ark., 2015: 55)



Şekil 2. 6. *NCF1* ile *NCF1B* ve *NCF1C* psödogenlerini gösteren DNA sekansı. A. *NCF1* geni ile aynı olmayan *NCF1B* ve *NCF1C* dizileri kırmızı ile gösterilmiştir. B. *NCF1* geni ile karşılık gelen *NCF1B* ve *NCF1C* sekansları kırmızı ile gösterilmiştir (Zhoa ve ark., 2017:49).



Şekil 2.7. *NCF1* geni ve psödogenleri arasında gerçekleşen crossing-over olayı (Hayrapetyan ve ark., 2013b).

NCF1 psödogenlerinden birinin yönü *NCF1* ile aynı yönde iken diğerinin yerleşimi ters yödedir (Şekil 2.5). *NCF1* geninin 2. ekzonunun başlangıç bölgesi bir çift GTGT baz çifti içerirken psödogenlerinde bu baz çiftlerinden bir tanesi bulunmamaktadır (ΔGT). Dolayısıyla psödogeneler normal genden 2 baz çifti az baz içerdiğinden 204 baz çifti uzunluğundadırlar (Chanock ve ark., 2000). *NCF1*'in ekson 2 içindeki GTGT dizisi, bu geni bir ΔGT içeren *NCF1B* ve *NCF1C*'den ayıran iyi karakterize edilmiş bir varyanttır. Bununla birlikte, karşılıklı crossing over GTGT içeren *NCF1B* ve *NCF1C* ve ΔGT içeren *NCF1*'in varlığına neden olur (Zhao ve ark., 2017)

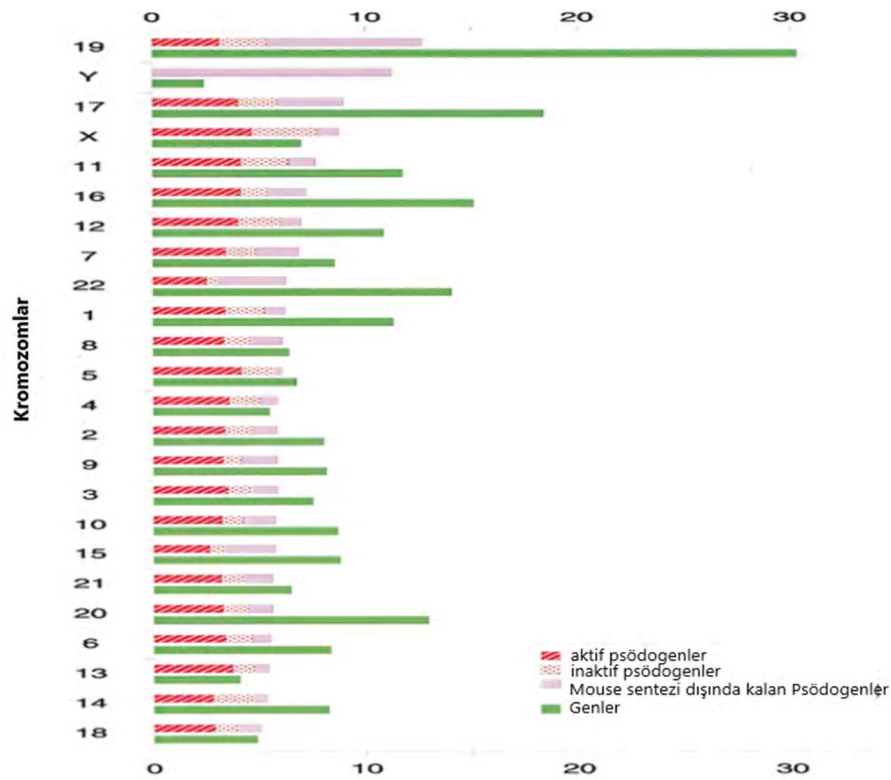
Psödogenlerin varlığı, *NCF1* geninde meydana gelen mutasyonların tespit edilmesini zorlaştırmasına rağmen ΔGT dışında oluşan mutasyonları tanımlamayı başaran çalışmalar yapılmıştır (Roos ve ark., 2006). 2. ekzonda saptanan mutasyonların

dışında KGH hastalarının bir grubunda ekzon 7 de meydana gelen mutasyonlar c.579G>A (p.Trp193Ter) p47proteinsentezinin erken sonlanmasına neden olmaktadır (Al-Zadjali ve ark., 2015). P47 proteininde bulunan mutasyonlar, NADPH oksidaz enzim aktivasyonunu tamamen bloke etmemekte kısmi bir aktivasyon yaşanmakta ve süperoksit üretimi devam etmektedir. Bu sebepten hastalığın prognozu iyi seyretmekte, tanısı ise ancak ilerleyen yaşlarda konulabilmektedir (Dekker ve ark.,2001).

2.4.1.3. Psödogenler ve Hastalıklarla İlişkisi

İnsan genomunda çeşitli tekrarlayan diziler olduğu gibi kodlanmayan bazı gen bölgeleri bulunmaktadır. Bu gen bölgelerinden bazıları fonksiyonel bir protein üretme kabiliyetini kaybetmiş, orjinal genin homoloğu durumunda olan zayıf bir gen bölgesidir. Bugenler *psödogen* olarak adlandırılmaktadır (Pink ve ark., 2011). Psödogen terimi ilk defa 1977 yılında Jacq ve arkadaşlarının, *Xenopuslaevis* 'te aktif bir gen olan 5S RNA' yı kodlayan ve aktif geni ile homolog olan gen için kullanılmıştır (Jacq ve ark., 1977).

Psödogenler genler protein kodlayamadıkları için genomda "çöplük genler" olarak anılmaktadır. Fakat bu genlerin bazılarının aktif olup hücrede enerji için ya da diğer protein kodlayan genleri düzenlemek için kullanıldıkları düşünülmektedir (Balakirev ve Ayala, 2003). Psödogenler azımsanmayacak miktarda genomda bulunmaktadır; bu oranın 10.000 ile 20.000 kadar oldukları tahmin edilmektedir (Zhang ve ark., 2004). İnsanlar kadar tek hücrelilerde sayısız olmasa da bakteriler, insektalar, bitkiler ve nematodlar gibi diğer bazı canlılarda da psödogenlerin varlığından söz edilmektedir (Lawrence ve ark., 2001). Psödogenlerin analizlerini yapmak ebeveyn genleriyle yüksek oranda benzerliklerinden dolayı çok karmaşık ve zor olmaktadır (Harper ve ark., 2003). Bir çalışmada insan genomunda 1.6 milyon gen bölgesinde yapılan tarama sonucu 19.724 gen bölgesinin tekrarlayan homolog psödogenler olduğu saptanmıştır. Bunların arasında en fazla psödogen taşıyan kromozomun 19. kromozom, en az psödogen taşıyan kromozomun ise Y kromozomu olduğu tespit edilmiştir (**Şekil 2.8**) (Torrents ve ark., 2003). Genomik DNA' nın dışında mitokondriyal DNA da (mtDNA) ise 296 adet psödogen saptanmıştır (Gaziev ve Shaikhaev, 2010).



Şekil 2. 8. Kromozomlara göre psödogen oranları (Mb) (Torrents ve ark., 2003: 13)

Psödogenlerin, uzun kodlamayan RNA'ların genomik fonksiyonlarının düzenlenmesinde kritik bir rol üstlendiği son araştırmalarla gösterilmiştir (Mattick ve Makunin, 2006). Psödogenlerin ortaya çıkışında bazı mekanizmalar rol oynamaktadır; bunlar arasında protein kodlayan genin transkripsiyonu ya da translasyonunu engelleyen spontan mutasyonlar örnek verilebilir (Zhang ve ark., 2010) Ayrıca psödogenler rastgele meydana gelen crossing-overlar olaylarıyla düzensiz çoğalmaktadırlar (Şekil 2.7) (Mighell ve ark., 2000). Bu düzensiz çoğalmalar esnasında promotor ve gen regüle edici bölgelerini kaybetmeleri, çerçeve kayması ya da erken stop kodonuna rastlama gibi mutasyonlardan dolayı protein kodlama yeteneklerini kaybederler. Ancak karakteristik intron- ekson yapılarını koruma eğilimindedirler. Buna karşılık bir mRNA transkripti ters transkripsiyona tabi tutulduğunda ve yeni bir lokasyonda genomla birleştirildiğinde intron içermeyen retrotranspoze edilmiş veya "işlenmiş" psödogenler (PP'ler) üretilmektedir. Bu genler kodlanmış genlerin sadece %10 'undan üretilmektedir. Psödogenlerin bir başka ortak özelliği ise her iki uçlarında polyA tekrarları içermeleridir (D'Errico ve ark., 2004).

Psödogenler, keşfedildiklerinden bugüne kadar araştırma konusu olmuş ve bu araştırmalar sonucunda otoimmün hastalıklar da dahil olmak üzere birçok hastalıkta bir etmen oldukları görülmüştür. Psödogenlerde yaşanan mutasyonların, Kronik granümatöz hastalığın da içinde olduğu, B hücre eksikliği, Pseudoxanthoma elasticum (PXE), otozomal dominant katarakt, Konjenital adrenal hiperplazi, Nöral tüp defekti, Tip 2 Gaucher hastalığı, Hunter Sendromu, Otozomal dominant polikistik böbrek hastalığı, Shwachman-Bodian-Diamond Sendromu, Tip 3 VonWillebrand hastalığı gibi çeşitli hastalıkların sebebi olduğu saptanmıştır (**Tablo 2.1**) (Bischof ve ark., 2006). Bu hastalıkların dışında Sistemik Lupus Eritematosus, Romatoid Artrit, Diabetes Mellitus gibi otoimmün hastalıklarda psödogenlerin etkileri görülmektedir (Hur ve ark., 2019).

Tablo 2. 1. Çeşitli hastalıklarda görülen psödogenler ve özellikleri

Hastalık	Psödogeni olan Gen	Kromozom	Benzerlik (%)	Uzunluk (baz sayısı)	Gene Uzaklık (baz sayısı)
Kronik Granümatöz Hastalık	<i>NCF1</i>	7	99	1399	369k
B Hücre Eksikliği	<i>IGLL1</i>	22	96	576	1.8M
Pseudoxanthomaelasticum (PXE)	<i>ABCC6</i>	16	99	1198	2.3M
Otozomal dominant katarakt	<i>CRYBB2</i>	22	95	525	224k
Konjenital adrenal hiperplazi	<i>CYP21A2</i>	6	99	2006	29k
Nöral tüp defekti	<i>FOLR1</i>	11	93	714	30k
Tip 2 Gaucher hastalığı	<i>GBA</i>	1	97	2273	7k
Hunter Sendromu	<i>IDS</i>	X	99	237	20k
Otozomal dominant polikistik böbrek hastalığı	<i>PKD1</i>	16	98	6385-10155	5-10k
Shwachman-Bodian-Diamond Sendromu	<i>SBDS</i>	7	97	1578	5.8M
Tip 3 VonWillebrand hastalığı	<i>VWF</i>	12,22	98	2874	-

p40^{phox}: 339 aminoasitten meydana gelen p40 proteini, 40 kDa ağırlığındadır. 22. kromozom üzerinde 22q12.3 bölgesinde yer alan 10 ekzondan meydana gelen *NCF4* geni tarafından kodlanmaktadır (Sheppard ve ark., 2005). P47 proteini, internal SH3 domaini, N-terminal PX domaini ve p67 ile ilişkili C- terminal PC motifi olmak üzere 3 domainden oluşmaktadır (Zhan ve ark., 1996). p47^{phox} proteini, NADPH oksidaz enzim aktivitesinin regülasyonunu sağlamaktadır. Fagositoz sırasında membranfosfolipidfosfatidilinositol 3-fosfatın düzenlenmesi ve ardından p40^{phox} proteinin PX bölgesine yüksek afinite ile bağlanması NADPH oksidaz aktivitesini arttırmaktadır (Nunes ve ark.,2013). KGH sebepleri arasında p40^{phox} eksikliğine yol açan mutasyonların oranı yalnızca %5 kadardır. KGH' ta, p40^{phox} mutasyonuna ilk kez 2009 yılında *colitis* tanısı konulmuş genç bir erkek çocuğunda rastlanmıştır (Matute ve ark.,2009b). Daha sonraki çalışmalarda 8 ülkeden toplanan örneklerde 8 farklı biallelik *NCF4* mutasyonu saptanmıştır (Van De Geer ve ark., 2018).

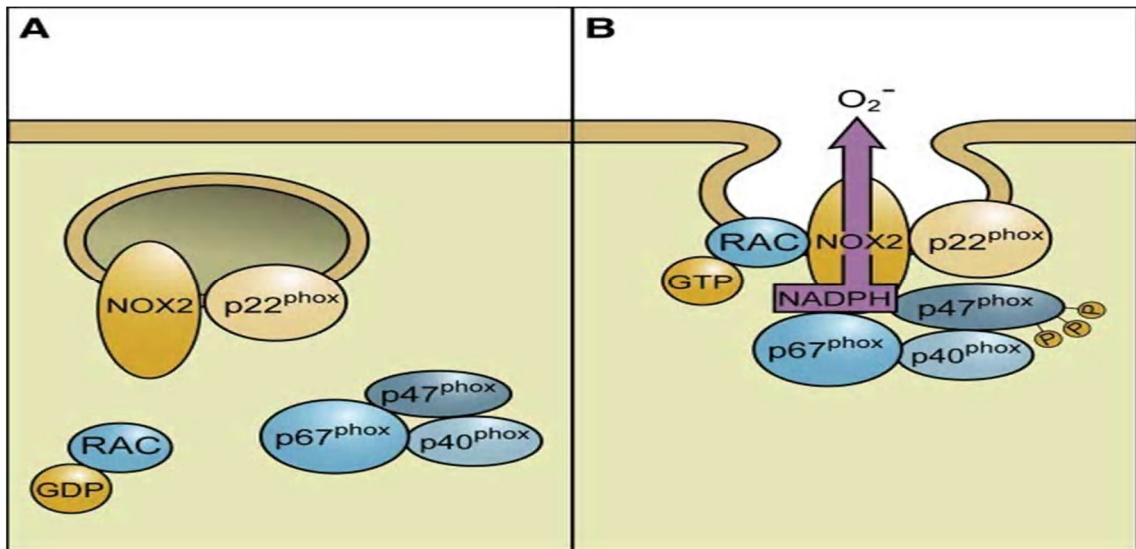
Tablo 2. 2. NADPH oksidazenziminioluşturan komponentlerinözellikleri

	gp91 ^{phox}	p22 ^{phox}	p67 ^{phox}	p47 ^{phox}	p40 ^{phox}
Kromozom	21	16	1	7	22
Lokasyonu	Xp21.1	16q24	1q25	7q11.23	22q12.3
Aminoasit	570	195	526	390	339
Kodlandığı Gen	<i>CYBB</i>	<i>CYBA</i>	<i>NCF2</i>	<i>NCF1</i>	<i>NCF4</i>
Molekül Ağırlığı	91	22	67	47	40
Hüresel Yerleşim	Membran	Membran	Sitozol	Sitozol	Sitozol
KGH görülme sıklığı	%65-70	%5	%5	%20	<%5
Ekzon sayısı	13	6	16	11	10
Baz uzunluğu	30 kb	8.5 kb	40 kb	15.3 kb	18 kb

2.4.2. NADPH Oksidaz Enziminin Aktivasyonu

NADPH oksidaz enzim aktivasyonu multi sinyalizasyon ve senkronizasyon gerektiren kompleks bir olaydır. Uyarılmış bir fagositte NADPH oksidaz enziminin aktif hale geçmesini engelleyen *Rab1A*, *P40*, *PR39* gibi baskılayıcı proteinler bulunmaktadır. Bu proteinler aşırı aktivasyonu önleyecek şekilde enzimin çalışmasını regüle eder (Condino-Neto ve ark., 1998). Fagosit hücresi, hücre zarında bulunan patojen tanıyan reseptörler (*PRR*) ve *CXCL1* and *LTB₄* gibi kemokin reseptörleri

aracılığıyla aldığı sinyaller ile uyarılmakta ve bu sinyal NADPH oksidazın aktivasyonunu başlatmaktadır. Normalde dinlenme halinde olan bir fagositte NADPH oksidazın membranında bulunan *NOX2* (gp91) ve p22 üniteleri ile sitozolik birimleri birbirinden ayrı olarak bulunmaktadır. Fakat sinyal iletiminden sonra başlayan aktivasyonla *Rac2* proteinine bağlı GDP fosforile olarak GTP' ye dönüşür. GTP' nin bağlı olduğu *Rac2* ünitesi, aktivasyonu takiben *NOX2* proteinine SH3 bağlarıyla bağlanırken eş zamanlı olarak sitozolik ünite olan p47ise fosforilasyona uğrar. p47' nin fosforilasyonu sonucu p47 proteini, konformasyonu değişen p22 proteinine bağlanır. Aktivasyon sürecinde sitozolde yer alan p67 ve p40alt üniteleri birbirlerine SH3 bağlarıyla bağlanmış şekilde membrana doğru hareket ederek membranda bulunan flavositokrom kompleksinin hidrofilik bölgesine bağlanarak aktif NADPH oksidaz enzimini oluşturur (Şekil 2.9).



Şekil 2. 9: NADPH oksidazaktivasyonu; inaktif NADPH enzimi (A), aktif NADPH enzimi (B) (Roos ve ark., 2003:5).

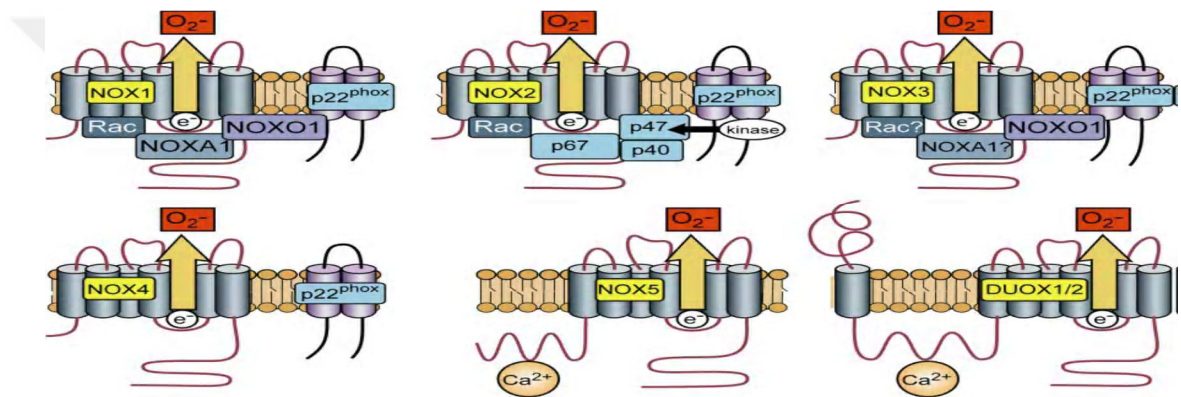
Aktive olmuş NADPH oksidaz enzimi elektronları sitoplazmik NADPH üzerinden FAD ve iki hem grubu içeren redoks merkezi aracılığıyla ekstraselüler alanda bulunan moleküler oksijene taşıyarak süperoksit radikallerinin (O₂⁻) oluşmasını sağlar. Oluşan süperoksit radikalleri fagozom içinde önce hidrojen peroksit (H₂O₂), daha toksik olarak hidroksil radikallerine ve singlet oksijene çevrilmektedir. Ayrıca fagozomda bulunan myeloperoksidaz enzimi klor varlığında hidrojen peroksiti

kullanarak dirençli mikroorganizmalara karşı son derece toksik olan hidroklorözasi meydana getirmektedir. Myeloperoksidaz enzimi sayesinde nötrofiller en dirençli patojenleri öldürme yeteneği kazanırlar. Aktivasyon sonunda katalaz enzimi ile hidrojen peroksit su ve oksijene parçalanarak yıkılır. Tüm bu reaksiyonların gerçekleştiği sırada ortamın pH' ı ilk anlarda hızlı bir artışla 8'e yükselir ve sonraki anlarda NADPH oksidaz enziminin sitozoldenfagozoma proton transfer etmesiyle ortamın pH' ı 7' ye inerek iç denge sağlanmaktadır.

2.4.3. NADPH Oksidaz Ailesi ve Diğer Dokularda NADPH Oksidaz Enzimi

NADPH Oksidaz enzimi daha çok fagositlerle birlikte anılsa da vücutta farklı doku ve organlarda da bulunmaktadır. Buralarda hücrel sinyal iletimi, apoptoz, migrasyon, hücre gelişimini ve gen ekspresyonunun düzenlenmesi gibi çeşitli fonksiyonlara sahiptir. *NOX*, *gp91* alt birimi (*NOX2*) ile homolog *NOX1*, *NOX3*, *NOX5*, *DUOX1* ve *DUOX2* olmak üzere toplam 6 adet katalitik isoformdan oluşmaktadır (Şekil 2.10). Bu isoformların hepsinde 2 adet demir bağlayan histidin kalıntıları içeren 2 bölgesi ve bir de süperoksit üretimini kolaylaştırmak için hücre içinde C-terminal kısmında NADPH bağlayıcı bölge bulunmaktadır. İsoformların hepsinde bağlanma bölgeleri homolog iken, lokalizasyon, düzenleme ve fonksiyonel açıdan isoformlar arasında farklılıklar gözlenmektedir. Örneğin *NOX1* isoformu, kolonda, damar yüzeyinde, kas hücrelerinde ve mide de bulunmaktadır (Sumimoto, 2008). *NOX1* isoformunun *NOX2* deki p47 ve p67 alt üniteleri ile homolog alt birimleri bulunmaktadır. P47 ile homolog *NOX1* alt birimi *NOXO1*, p67 ile homolog olan alt birimi ise *NOXA1* proteinleridir (Bánfi ve ark., 2003). Mikroglia dahil fagositik hücrelerin yanı sıra *NOX2*, endotelial hücrelerde, kardiomyositlerde ve nöronlarda da bulunmaktadır. *NOX3*, temel olarak böbrek ve karaciğerin fetal dokularında bulunmaktadır. *NOX4*, böbrekler, kardiyovasküler endotelial hücreler, keratinositler, fibroblastlar ve nöronlar gibi ve diğer birçok hücrede varlığı gösterilmiştir (Vallet ve ark., 2005). *NOX4*, aktivitesini modüle edebilmelerine rağmen aktivasyon için sitozolik alt birimlere ihtiyaç duymaz. Aynı zamanda süperoksit anyon asit ürün yerine hidrojen peroksit üretir. *NOX4* homologunun ayrıca adipositlerde insülin cevabının oluşmasında görevli olduğu dolayısıyla obezitede rol oynadığı görülmüştür (Porras ve ark., 2003). Dalak ve lenf düğümlerinin lenfositlerinde ve testislerde bulunan *NOX5*, çalışması için

$p22^{\text{phox}}$ 'a ihtiyaç duymaz ve kalsiyuma bağlı bir aktivasyon mekanizmasına sahiptir (Sumimoto, 2008). *NOX5* ayrıca karaciğer, akciğer, timus, prostat ve böbrek gibi organlarda da bulunmaktadır. *DUOX1* ve *DUOX2* isoformları, tiroidepitelyal hücrelerinde bulunur ve burada Ca^{+2} bağlı aktivasyonu ile H_2O_2 üretmekle görevlidirler (Björkman ve Ekholm, 1984). *DUOX1*, tiroit epitelyum hücrelerinden başka solunum yolları epitellerinde ve prostatta lokalizedir (Forteza ve ark.,2005). *DUOX2*isorformu ise prostat ve solunum yollarına ilaveten rektal mukoza, duodenum ve kolonda da bulunmaktadır (El Hassani ve ark., 2005).



Şekil 2. 10: NADPH oksidaz enzim ailesi (Bedard ve Krause, 2007:257)

2.5. KGH Epidemiyolojisi ve Klinik Yaklaşım

KGH, 200.000-250.000 canlı doğumda 1 görülen bir hastalık olmakla birlikte bu rakam etnik ve kültürel kökene göre değişmektedir. Örneğin İran ve Fas' ta bu oran daha fazla olup hastalığın insidansı her 100.000 canlı doğumda 1.5 oranındadır (Mortaz ve ark., 2019). İsveç' de 1/450.000, Amerika'da 1/200.000, İsrail Yahudilerinde 1/218.000, İsrail Araplarında ise 1/111.000 canlı doğumda rastlanmaktadır (Filiz ve ark.,2013). Ülkemizde ise görülme sıklığı akraba evliliklerine bağlı olarak değişmekte ve bu sebepten hastalığın otozomal resesif formu yaygın olarak görülmektedir (Köker ve ark., 2013).

KGH, farklı genotip ve fenotipe sahip heterojen bir özelliğe sahip olduğundan hastalığın klinik bulguları ve prognozu çok çeşitlilik göstermektedir. KGH ortak özelliği bebeklik ya da çocukluk çağında ya da erken erişkin evrede tekrarlayan bakteriyel ve fungal enfeksiyonlardır (Song ve ark., 2011). KGH tanısında en sık karşılaşılan klinik

bulgular, başta enfeksiyonlar, enflamasyonlar, granümatöz hastalıklar yer almaktadır (Holland and immunology, 2010). Bakteriyel enfeksiyonların nedeni olarak ortaya çıkan olgulardan en sık bildirilenler karaciğer apsesi, sinüzit, pnömoni, osteomyelit, kemik, akciğer, lenf nodu ve cilt enfeksiyonlarıdır (Tablo 2.3). Bu enfeksiyonların sorumlusu olarak en sık karşılaşılan bakteri *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Salmonella*, *Bacille Calmette-Guerin* (*BCG*) ve *Mycobacterium tuberculosis* gibi bakteriler gösterilirken, KGH' de görülen fungal enfeksiyon etmeni olarak *Aspergillus* türleri ve en başta *Aspergillus nidulans* mantar türüne rastlanmıştır (Winkelstein ve ark., 2000; Metan ve ark., 2017). KGH' de bakteriyel enfeksiyonlar, lökositöz ve ateş gibi bulgularla semptomatik seyrederken fungal enfeksiyonlar belirgin semptomlar vermeyip asemptomatik olarak ilerleyen evrelerde ortaya çıkmaktadır (Dorman ve ark., 2002).

Tablo 2. 3. KGH' da patojen mikroorganizmaların sebep olduğu enfeksiyonlar

Enfeksiyon Etmeni	Enfeksiyon Bölgesi	Enfeksiyon Türü
<i>S. aureus</i>	Abseler/ Granulomlar	Karaciğer/ Dalak Abseleri
<i>S. aureus</i>	Deri/ Subkutanöz dokular	Göbek İltihabı Bağ Doku İltihabı, Dermatit, Perianal Abse
<i>Staphylococcus epidermidis</i>		
<i>Aspergillus spp.</i>		
<i>S. marcescens</i>		
<i>Candida spp.</i>		
<i>Nocardia brasiliensis</i>		
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		
<i>Proteus mirabilis</i>		
<i>E. coli</i>		
<i>S. aureus</i>	Kemik	Osteomyelit
<i>Aspergillus fumigatus</i>		
<i>S. marcescens</i>		
<i>Gram-negativespp.</i>	Kan	Bakteriyel ya da fungal Sepsis
<i>Salmonella spp.</i>		
<i>Klebsiella spp.</i>		
<i>E. coli</i>		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
<i>Burkholderia cepacia</i>		
<i>Aspergillus spp.</i>		
<i>Candida spp.</i>		
<i>Candida spp.</i>	Beyin	Menenjit
<i>Nocardia spp.</i>		

Bakteriyel ve fungal enfeksiyonlar dışında KGH' da rastlanan diğer bulgular granülom ve enflamasyon oluşumudur (**Tablo 2.3**). Bunun sebebi KGH 'li hastalarda anti-enflamatuvar araçlarda azalmanın yanında proenflamatuvar araçların da artışı söz konusudur. Bu durum KGH ile birlikte otoimmün hastalıkların ve enflamasyona bağlı komplikasyonların görülme sıklığını arttırmaktadır (De Ravin ve ark., 2008).

KGH'de karşılaşılan granülomlar daha çok karaciğer, dalak, beyin, akciğer, genitoüriner sistemde görünmekle birlikte gastrointestinal sistemde karın ağrısı, kolit, fistül gibi durumlara yol açmaktadır. Özellikle X' bağlı formda %43, otozomal formda ise %11 oranlarında bulunan enflamatuvar bağırsak hastalığına rastlanmıştır (Marciano ve ark., 2004)Tüm bu enfeksiyonların dışında KGH, çocuklarda büyüme ve gelişim geriliğine neden olmaktadır (Gutte ve ark.,2011).

2.5.1. KGH Tanısı

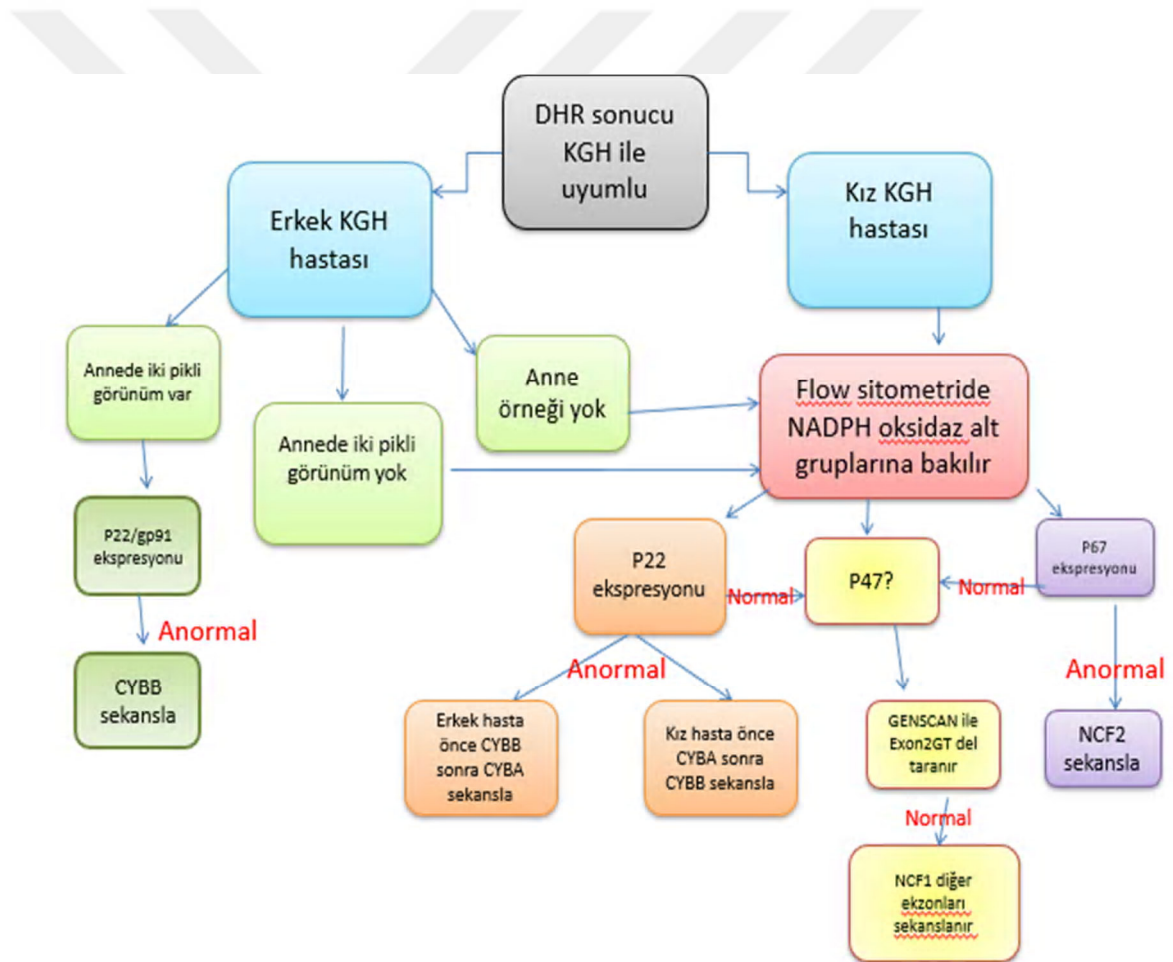
KGH tanısında özellikle klinik olarak tekrarlayan ve ciddi enfeksiyon öyküsü olan ya da ailesinde KGH tanısı konmuş olan olgular dikkatle incelenmeli ve nötrofil fonksiyon testleriyle sağlanması yapılmalıdır. Özellikle iyileşmeyen yaralar, hepatosplenomegali, ve ishal gibi şikayetleri olan bireyler atlanmamalıdır. Tipik bir laboratuvar bulgusuna sahip olmayan KGH, kişilerde tekrarlayan enfeksiyonlara bağlı gelişen hipergammaglobulinemi, kronik anemi, artmış eritrosit sedimentasyon hızı (ESR) ve CRP düzeylerinde artışa sebep olabilmektedir (Wintergest, 2008).

KGH hastalarına, postnatal dönem ve erişkin dönemde tanı konulabildiği gibi prenatal dönemde de kordosentez ile alınan fetal kan numunesinden gerek klasik yöntemlerle gerekse daha ileri tanı için moleküler yöntemlerle tanı koymak mümkün olmaktadır. KGH, bulguları diğer bazı hastalıklarla örtüşebildiğinden kesin tanı koymada zorluklar yaşanmaktadır, keza KGH ayırıcı tanısında kistikfibroz, hiperIgE sendromu, glukoz 6-fosfat dehidrogenaz eksikliği ve Crohn hastalığı gibi hastalıklar göz önünde bulundurulmalıdır (Roos, 2007).

Prenatal Tanı: KGH tanısını prenatal evrede de yapmak mümkündür. Trimester dönemde kordosentez ile alınan kan örneklerine nötrofillerinoksidatif fonksiyonları DHR 123 yöntemi ile analiz edilir(De Boer ve ark., 2002). Ayrıca genetik bir yatkınlık düşünülüyorsa gebeliğin 6. haftasında koryonikvillus biyopsisi alınarak

DNasekanslama yöntemi ile genetik bir mutasyon varlığı araştırılarak moleküler tanı fetal dönemde konulabilir(Köker ve ark., 2009).

Ayırıcı Tanı: Fagosit fonksiyon bozukluğuna bağlı hastalıklar KGH ile karıştırılabilir. Bunlardan bazıları myeloperoksidaz enzim eksikliği, lökosit adezyon eksikliği, Chediak-Higashihastalığıve IFN-gamma reseptörünü eksikliğini sayabiliriz. Bu durumda diğer nötrofil fonksiyon bozukluklarını KGH' den ayırmada kullanılan ayırıcı tanı yöntemleri NBT, DHR 123 ve akım sitometri testleri kullanılmalıdır (Yu ve ark., 2018). KGH tanısında izlenecek yol haritasını aşağıdaki şekilde gösterilmiştir (Şekil 2.11).

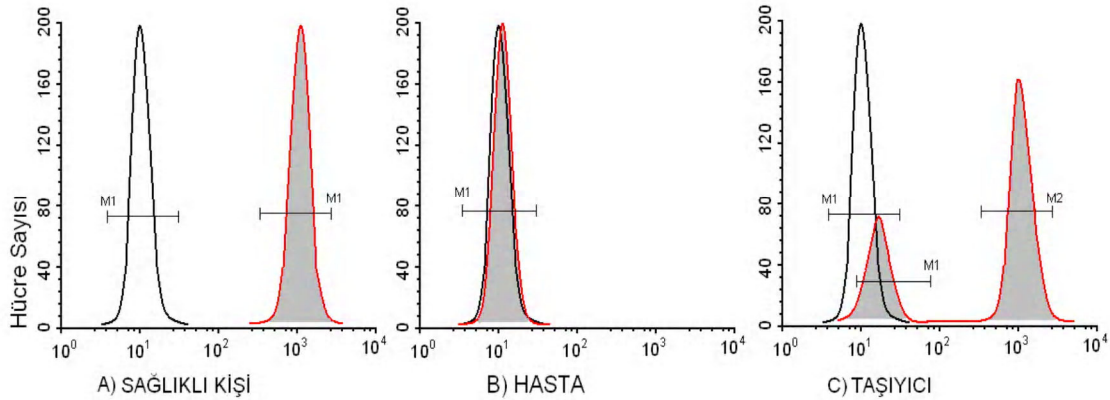


Şekil 2.11. KGH tanısının akış şeması (Kulkarni ve ark., 2018:4)

2.5.2. KGH Tanısında Taşıyıcılık

KGH' nin X' e bağlı formunda rastlanan taşıyıcı kadınlarda, X kromozomunun birinde görülen inaktivasyon sonucu periferik kan yaymalarında iki farklı nötrofil grubu

gözlenmektedir. Bu durum kadınlarda bulunan iki X kromozomundan birinin embriyonik yaşamın 16. gününde blastokist evresinde inaktif duruma geçmesinden kaynaklanmaktadır. Bu durum ilk kez 2002 yılında *Mary Frances Lyon* tarafından keşfedilmiştir ve günümüzde **Lyon hipotezi** olarak adlandırılmaktadır (Lyon, 1963). Lyon hipotezine göre, kadınlardaki her iki X kromozomundan bir tanesi embriyonik dönemde inaktive olmaktadır. Bu olaya “*liyonizasyon*” denilmektedir. İnaktif olan X kromozomu mitoz ile bir sonraki somatik hücrelere aynen geçmektedir. Bu yüzden kadınlardaki hücreler yarı yarıya maternal ve paternal olmak üzere mozaik bir yapıya sahiptir. İnaktivasyon işlemi DNA metilasyonu ile olmaktadır. Akım sitometri analizlerinde DHR 123 testinde histogramda sağda bulunan tepe sağlam X taşıyan, solda y eksenine yakın bulunan tepe ise defektif X kromozomu taşıyan nötrofilleri göstermektedir (**Şekil 2.12**) (Köker, 2006).



Şekil 2. 12. X' e bağlı KGH tanısında DHR 123 testinde histogramların görünümü;

A) Sağlıklı birey B) Hasta birey C) Taşıyıcı birey (Köker, 2006:63)

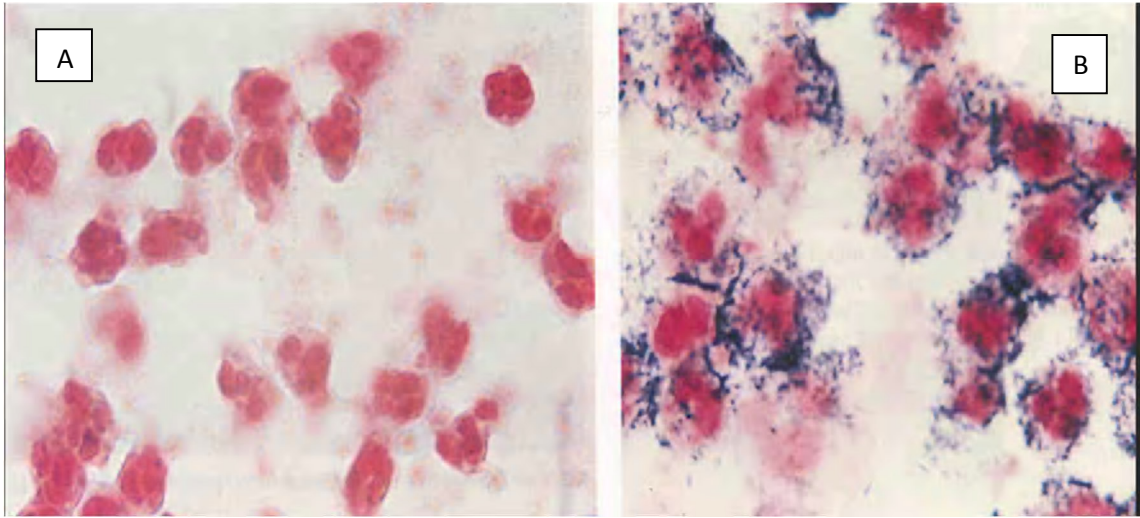
2.5.3. KGH Tanı Yöntemleri

KGH tanısında hastalığın ortaya çıkışından günümüze kadar çeşitli tanı yöntemleri geliştirilmiş ve uygulanmıştır. Bu yöntemlerle klasik tanı yöntemlerinin yanında moleküler yöntemlerin de gelişmesiyle KGH tanısını koymak daha kolay ve kesin bir şekilde yapılmaktadır.

2.5.3.1. NBT (*NitroblueTetrazolium*) Testi

NBT testi, KGH ayırıcı tanısında ilk basamakta kullanılan *in vitro* bir testtir. İlk olarak 1967 yılında Baehner ve Nathan'ın geliştirdikleri bu yöntem, semikantitatif bir yöntem olup oksijen radikallerinin varlığında nitroblue boyası ve tetrazolium tuzları indirgenmesi ve formazan denilen mavi renkte indirgenmiş bir madde oluşması prensibine dayanmaktadır. Sarıdan maviye dönüş sağlıklı ve yeterli kadar oksijen radikallerini üretebilen nötrofillerin varlığını gösterirken rengin sarıdan maviye dönmemesi ise nötrofillerin ROS ürünlerini üretmediklerinin bir göstergesi olarak kabul edilmekte ve tanıda kullanılmaktadır (**Şekil 2.13**) (Baehner ve Nathan, 1967). Uyarılmış nötrofillerde NBT değerinin %0-10 arasında bulunması genellikle KGH belirtisi olarak kabul edilmektedir (Kuhns, 2019).

NBT testinde nötrofilleri uyarmak için PMA (phorbolmiristat asetat) kullanılmaktadır. PMA, ilk olarak Lewinsky ve arkadaşları tarafından 1983 yılında yaptıkları bir çalışmada nötrofilleri uyarmak amacıyla geliştirdikleri Croton yağı aktif maddesidir (Levinsky ve ark., 1983). PMA çok güçlü bir uyarıcıdır ve aynı zamanda hücrelerin daha iyi boyanmasını sağlamaktadır. Bu yöntemde EDTA'lı kan örneği (100 mikrolitre) NBT ile inkübe edilerek oksijen radikali ile indirgenme sonucu oluşan formazan kristalleri içeren nötrofillerin yüzdesi mikroskopta sayılarak hesaplanmaktadır (Gennery, 2017). KGH taşıyıcılarında mikroskop altında, formazan birikimi gösteren uyarılmış nötrofiller ve NBT redüksiyonunu göstermeyen uyarılmış nötrofiller olmak üzere iki farklı nötrofil popülasyonu gözlemlenmektedir (Gennery, 2017). Ayrıca NBT testinde mitokondrilerden kaynaklı süperoksit hasar görmüş nötrofiller için yanlış bir pozitif sonuç nedeni olabilmektedir (Roesler, 2008). NBT testi her ne kadar KGH tanısında ayırıcı yöntem olarak kullanılsa da X'e bağlı taşıyıcıların tanımlanması ya da iki farklı nötrofil popülasyonunun mikroskop altında ayırımının tam olarak yapılamaması gibi faktörlerden dolayı günümüzde bu testle birlikte klasik tanı yöntemleri içinde akım sitometrik yöntemler kullanılmaya başlanmıştır (Emmendörffer ve ark., 1994).



Şekil 2.13. Nötrofillerde normal NBT testi (x1000). (A) PMA ile uyarılmamış nötrofiller. (B) PMA ile inkübasyondan sonra uyarılan sağlıklı nötrofiller; sağlıklı insanlarda uyarım sonucu nötrofillerin %99 unda mavi-mor renk oluşurken, KGH tanısı taşıyan bireylerde bu rengin oluşumu (NBT pozitif granüller) ancak %1' den az nötrofillerde görülmektedir (Kuhns, 2019:562).

2.5.3.2. DHR (*Dihidrorhodamin*) 123 Akım Sitometri Yöntemi

DHR 123 yöntemi, PMA ile uyarılmış ya da uyarılmamış nötrofillerin ayırımında floresan bir boya olan *Dihidrorhodamin 123*(DHR) kullanılarak 488 nm dalga boyunda hücrelerin stimülasyon analizi yapılmaktadır. DHR 123, fagositlerde mitokondriye yerleşir ve PMA ile muameleden sonra uyarılan fagositlerde ortaya çıkan süperoksit radikallerinde indirgenerek *rhodamin 123* haline gelir. Bu işlemden sonra yapılan akım sitometrik analiz sonucunda, histogramda fagositlerde sağa kayma gözlenir (Jirapongsananuruk ve ark., 2003).

DHR 123 yöntemi, yalnızca KGH tanısını koymada değil aynı zamanda alt gruplandırma işlemi de kullanılmaktadır. Özellikle KGH için otozomal ve X linked ayırımında kolaylık sağlamaktadır (El Hawary ve ark.,2016).

2.5.3.3. Özgün Antikorlar ile Akım Sitometrik Analiz Yöntemi

NADPH oksidaz enzimini oluşturan alt birimlerin nötrofil sitoplazmasında ve hücre yüzeyindeki ekspresyonlarını ölçmek için bu komponentlere özgün antikorlar kullanılarak indirekt floresans yöntemi ile akım sitometrik olarak göstermek mümkün

olmaktadır. NADPH oksidaz enzim komponentlerinden flavositokrom b_{558} gp91 proteini için 7D5, p22 proteini için 449 monoklonal antikorunu (MoAb) kullanılmaktadır. Sitolizikomponentler için ise tavşan ya da fare kaynaklı unkonjuge poliklonal antikorlar primer olarak kullanılmaktadır. Primer antikorlarla inkübasyondan sonra konjugesekonderantikor olarak önce FITC (floresan- izotiosiyonat) ve anti-rabbit Ig ya da anti- Mouse Ig antikorlarıyla işaretlenerek akım sitometride görüntülenmektedir ve bu yöntemde hücrelerin ekstra stimüle edilmesine gerek yoktur (Crockard ve ark.,1997).

2.5.3.4. Western Blot Yöntemi

Western blot tekniği, poliakrilamid jel kullanılarak proteinlerin elektrik akımının etkisiyle selüloz bir membrandan geçerek ultraviyole ışık altında jelde görüntülenmesi esasına dayanmaktadır (Mahmood ve Yang, 2012). Western blotlama, mikrobiyolojik çalışmalardan, immünolojik araştırmalara varan çeşitli alanlarda kullanılan protein analiz metotlarından biridir. KGH tanısı içinde NADPH oksidaz enzimini oluşturan protein alt birimlerinin ayırımında ve analizinde kullanılmaktadır (Ben-Farhat ve ark., 2016).

2.5.3.5. Moleküler Tanı Yöntemleri

2.5.3.5.1. DNA Dizi Analizleri

PCR yöntemi kullanarak çoğaltılmış ilgili DNA bölgelerinin nükleotid düzeyinde analizi esasına dayanan DNA dizi analizi yöntemi sayesinde bireyin genetik yapısı ve genlerin özellikleri ile var olan mutasyonların saptanması daha kolay ve hızlı bir hale gelmiştir (Heather ve Chain, 2016). 1965 yılında bir yıl süren bir çalışma sonunda 75 nükleotidlik bir tRNA molekülünü dizilemeyi başaran Robert Holley ile başlayan ve 70'den sonra ise hızla gelişmeye devam eden DNA dizileme yönteminde, iki temel teknik uygulanmaktadır. Bu yöntemler; Maxam ve Gilbert' in kimyasal degradesyona dayanan yöntemi ile Sanger' in enzimatik dideoksi yöntemi (Kchouk ve ark., 2017, Holley ve ark., 1965). Bu iki yöntemde, dizileme (sekans) analizinden önce ekzon spesifik DNA'nın hazırlanması için lineer PCR ile DNA'nın çoğaltılması ve sonrasında poliakrilamid jel elektroforezinin uygulanması gerekmektedir (Ladouceur ve ark.,2012).

Maxam- Gilbert Yöntemi: Maxam ve Gilbert tarafından geliştirilen bu yöntem, DNA' da bulunan bazların bazı kimyasallar kullanarak değiştirilip bulunduğu lokasyonda

DNA zincirini kırması temeline dayanır. Nükleotid dizisi saptanacak olan DNA öncelikle 5' ucundan P³² ya da floresan bir boya ile işaretlenir. Çeşitli kimyasallarda DNA 4 eş parçaya ayrılarak A, T, G, C bazları ortaya çıkarılır. Pürin bazları glikozit bağları dimetil sülfat ile primidin bazlarının glikozit bağları ise hidrazin adı verilen kimyasal maddeler kullanılarak parçalanır. Piperidin denilen kimyasal maddenin fosfodiester bağlarının parçalanması için kullanılmasından sonra hedef nükleotidlerden kırılmış gittikçe kısalan DNA parçaları ortaya çıkmaktadır. Son olarak bu DNA parçaları jel elektroforezi kullanılarak birbirinden ayrılmakta ve otoradyografi kullanılarak ayrılan bu parçaların görüntülenmesi yapılmaktadır (Maxam ve Gilbert, 1977).

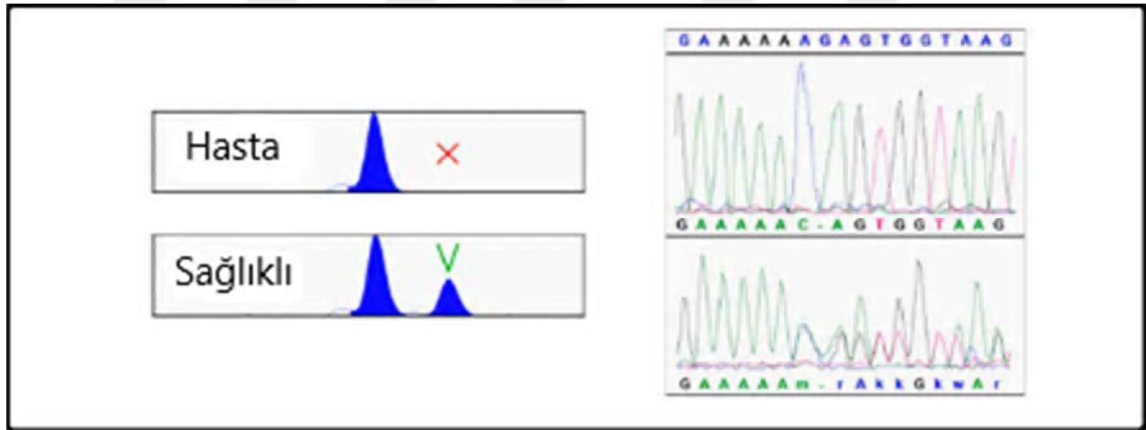
Sanger's Dizileme Yöntemi: Fred Sanger tarafından geliştirilen bu yöntem halen günümüzde de kullanılan enzimatik bir yöntemdir. Bu yöntemde, dizisi araştırılan DNA ipliği, yeni sentezlenecek olan DNA ipliği için bir kalıp görevi görmektedir. Asimetrik olarak çoğalan tek iplikli DNA, DNA polimeraz ve ddNTP ve biri S³⁵, P³³ ya da P³² atomlarıyla radyoaktif olarak ya da primerle ile işaretlenen dNTP' ler ile dizileme reaksiyonu gerçekleştirilir. DNA polimeraz etkiyle 3' ucunda hidroksil içermeyen deoksiribozların her bir nükleotidi (ddTTP, ddCTP, ddGTP, ddATP) terminatör görevi üstlenerek zincire katılır ve son olarak ddATP' nin katılmasıyla zincir uzaması sonlanır. Meydana gelen ürünlerin ayrıştırılması için poliakrilamid jel elektroforezi uygulanmaktadır (Sanger ve ark., 1977).

Fred Sanger ile Maxam ve Gilbert dizileme alanında yaptıkları çalışmalarla genetik bilimine ve dolaylı olarak diğer bilimsel alanlara sağladıkları katkılardan ötürü 1960 yılında Nobel Kimya ödülünü almaya hak kazanmışlardır.

2.5.3.6. Fragment Analizi

Bu analiz yöntemi DNA belirli bir nükleotid parçasını belirlemek ya da DNA dizisi uzunluğunda herhangi bir değişikliğin olup olmadığını saptamak için uygulanan bir DNA sekans yöntemidir. Termal cyclus üzerinde polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) kullanılarak etiketlenmiş fragmentlerin amplifiye edilmesi esasına dayanır. Kılcal elektroforez kullanılarak fragmentler boyutlarına göre ayrılır. Fragment analizinde, tüm DNA dizilimi analiz edilmeksizin, belirteç olarak daha küçük nükleotid dizileri kullanılarak, gendeki mutasyonlarla birlikte gene ait bir allelin varlığını ya da

yokluğunu saptayabilmek mümkün olmaktadır. Genetik belirteç görevi gören yapılar mikrosatelitler ya da *RFLP*'lerden oluşan genin yakınında veya allelin herhangi bir yerinde bulunan polimorfik dizilerden oluşmaktadır (Wrona ve ark., 2019). Fragment analizinde ilk olarak, KGH tanısı olan hastalardan elde edilen DNA örnekleri alınarak spesifik polimorfik bölgeler floresan boyalar kullanılarak PCR ile çoğaltılır ve pürüfikasyon gerekmesizin fragment analizi için bu PCR ampliconları kullanılmaktadır. Floresan işaretli bir primer ile ampliconları birleştirilerek çoğalan fragmentler, cihazdaki kapiller elektroforezde yürütülerek analiz işlemi tamamlanmaktadır. Fragment analizinde floresan boya olarak en çok *ROX*, *FAM*, *HEX*, ve *NED* boya kullanılmaktadır. Bir örnekte birden fazla farklı renkli floresan boya tespit edilebilir. Boya renklerinden biri, her numunede bulunan etiketli bir boyut standardı için kullanılır. Boyut standardı, örnek ürün piklerinin taban çifti boyutlarını tahmin etmek için kullanılır. Analiz sonunda elde edilen veriler standartlarla karşılaştırılarak boyutlandırılmaktadır (Şekil 2.14) (Thermo Fisher, 2019).



Şekil 2. 14. Hasta ve sağlıklı bireylerde görülen fragment analiz sonuçlarının görünümü (Thermo Fisher, 2019: 108).

Lokasyonu bilinen bir genin dizilimi bilinmiyor ise direkt olarak dizilim karşılaştırması mümkün olmamaktadır. Gendeki mutasyonlar, markır olarak kullanılan mikrosatelitlerin gen lokusuna yakın olması durumunda saptanabilmektedir ve bu işlem tüm DNA dizi analizinden çok daha hızlı ve kolay bir metot olarak uygulanmaktadır. Fragment analizi, KGH moleküler tanısında çalışmamızda kullandığımız gibi tek bir

mutasyonun arandığı durumlarda, dizi düzenleme çalışmalarında, kanser araştırmalarında, yeni bir genom araştırılmasında, botanikle ilgili çalışmalarda, daha birçok alanda yaygın olarak kullanılan moleküler bir yöntemdir (ThermoFisher, 2019).

Fragment Analizinde Boyut Standartının Belirlenmesi ve Optimizasyonu

Fragment analizinde sonucu ortaya çıkan fragment boyutları oluşturulan standartta göre belirlenir. Bilinmeyen her numune elektroforezden önce boyut standardıyla işlevi yerine getirir;

1. Her rnek için bir boyut eğrisi oluşturulur. Standart piklerinin boyutları (bp cinsinden) bilindiği için, numune piklerinin boyutları, elektroforez sırasında geçiş hızlarının standart pik boyutlarıyla nispi karşılaştırmasıyla belirlenir. Standart pik boyutlarının eşit aralığı, numune fragmentlerinin boyutlandırma aralığı boyunca hassas bir boyutlandırma sağlar.

2. Optimum performans için, standart boyuttaki piklerin sinyal yoğunluğu, numune piklerinin sinyal yoğunluğundan daha düşük veya buna eşit olmalıdır.

Bilinmeyen rnek fragmentlerinden daha küçük ve daha büyük fragmentleri olan ve primerleri etiketlemek için kullanılan boyalarla uyumlu bir boya ile bir boyut standardı yapılmalıdır (Tablo 2.4).

Tablo 2.4. Fragment boyutlarına göre kullanılan boya standartları

Beklenen Marker uzunluğu	LIZ Boyası ile Yapılan Boyut Standartı				ROX Boyası ile Yapılan Boyut Standartı			
	GS120 LIZ ^{®†}	GS500 LIZ ^{®‡}	GS600 LIZ ^{®‡}	GS1200 LIZ ^{®‡}	GS350 ROX [™]	GS400HD ROX [™]	GS500 ROX ^{™‡}	GS1000 ROX [™]
≤120 bp	✓	–	–	–	✓	–	–	–
≤400 bp	–	✓	✓	–	✓	✓	✓	–
≤500 bp	–	✓	✓	–	–	–	✓	✓
≤600 bp	–	–	✓	–	–	–	–	–
≤1000 bp	–	–	–	–	–	–	–	✓
≤1200 bp	–	–	–	✓	–	–	–	–

Boya standartları oluşturulduktan sonra numune ve boyut standartı Hi-Di formamide eklenmesiyle optimize edilmelidir (Tablo 2.5).

Tablo 2.5. Boyut standartının ve numunelerin Hi- Di Formamide ile optimizasyonu

BİLEŞENLER	3500, 373 ve 3130 serisi Cihazlar için	310 serisi için
Numune	0.5 µL	0.5 µL
Boyut Standartı	0.5 µL	0.5 µL
Hi-Di™ Formamide	9.0 µL	11.0 µL

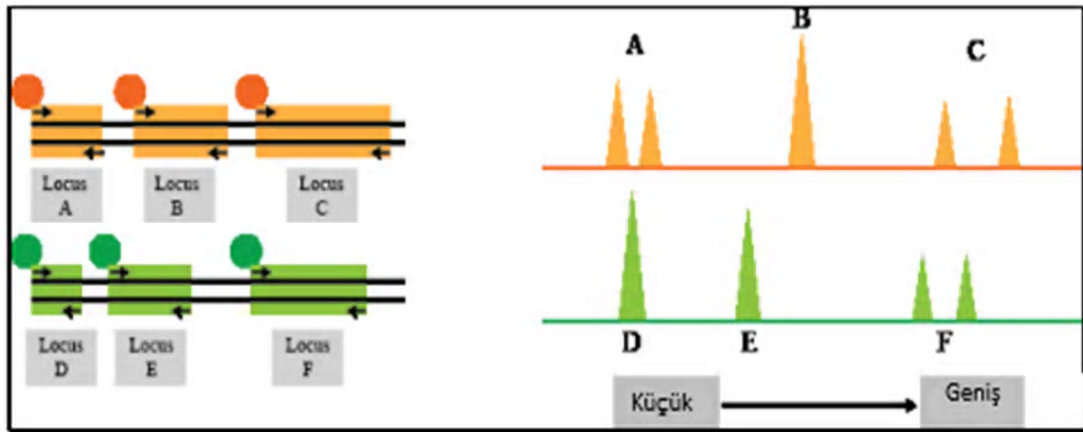
2.5.3.7. KGH Fragment Analizinde Mikrosatellit Markırlarının Kullanımı

Kısa tekrarlanan diziler (STR) olarak da adlandırılan mikrosatellit markırları, tekrarlanan bir nükleotid sekansı içeren polimorfik DNA lokuslarıdır. Genom boyunca nispeten eşit aralıklarla yerleştirilmişlerdir ve genellikle fiziksel olarak genlerin yakınında veya içinde bulunmaktadır. Mikrosatellit olmayan lokuslara göre değişken fakat göreceli olarak yüksek mutasyon göstermektedirler. Alelleri belirli popülasyonlara özgü olabilir. Her bir tekrar biriminin uzunluğu 2 ila 7 nükleotid olabilir ve aleller tekrar sayısına göre değişmektedir. Tekrar birimi başına nükleotidlerin sayısı, bir mikrosatellit lokusu içindeki tekrarların çoğu için aynıdır (Ellegren, 2004). Mikrosatellitler aynı zamanda basit dizi tekrarları (SSR), değişken sayı dizi tekrarları (VNTRs) olarak da adlandırılmaktadır. Mikrosatellit analizi, forward ve revers primerler kullanılarak floresan etiketli fragmentlerin ayrılması ve fragmentlerin nispi boyutunun belirlenmesi prensibine dayanmaktadır. *ROX500* floresan boyası ile etiketlenmiş forward ve revers primerler DNA şablonunda kendi tamamlayıcı zinciri ile hibritleşir ve ilgili bölgeyi çevreler. Bir mikrosatellit lokusunda tekrar ünitelerin sayısı farklı olabilir, bunun sebebi her lokustaki alellerin farklı uzunlukta olmasıdır. Yapılan PCR işleminde ilgili DNA bölgenin yakınındaki primerler kullanıldığında dinükleotid tekrarının uzunluğuna bağlı olarak farklı uzunluklarda PCR fragmentleri üretilmektedir. Dolayısıyla farklı tekrarlar, farklı uzunluklarda fragmentleri ortaya çıkarmaktadır (Thermo Fisher, 2019) (**Şekil 2.15**).

Fragment Analizinin Uygulandığı Alanlar

Kısa nükleotid tekrarları olarak bilinen mikrosatellit markırları tekrarlanan bir nükleotit sekansından oluşan polimorfik DNA lokuslarıdır. Tipik bir mikrosatellit analizinde, mikrosatellit lokusları floresan etiketli ileri primerler ve etiketlenmemiş ters primerler kullanılarak PCR ile çoğaltılır. PCR amplikonları elektroforez kullanılarak boyuta göre ayrılır. Uygulamalar şunları içerir (Thermo Fisher, 2019):

1. Genomda bağlantı kurma
2. Hayvan, bitki ve insanda genomik tiplendirme
3. Patojen subtipleme
4. Genetik çeşitlilik
5. Heterozigotluk kaybı (LOH)
6. Basit dizi tekrarları (ISSR)
7. Multilokus varyant analizi (MLVA)
8. Hastalıklarda mutasyon tarama
9. Genotiplendirme



Şekil 2.15. Farklı uzunlukta bulunan farklı sayılarda tekrarlayan STR'ler (Thermo Fisher, 2019:108).

2.5.3.8. NGS (Yeni Nesil Sekanslama) Yöntemi

2004 yılında insan genom projesinin tamamlanmasıyla postgenomik çalışmalar hız kazanmış ve bu alanda gün geçtikçe yeni yaklaşımlar ortaya çıkarılmıştır. Popülasyonlar arasındaki varyasyonların belirlenmesinde, kişiye özgü tedavi

yöntemlerinin geliştirilmesinde ve hastalıklardan sorumlu mutasyonların nükleotid düzeyinde belirlenmesinde son 30 yıldır altın standart olarak kullanılan Sanger's dizileme yöntemi, günümüzde ‘yeni nesil dizilme yönteminin (*Next Generation Sequencing*)’ geliştirilmesine olanak sağlamıştır. Yeni nesil dizileme (NGS) yöntemi 2005 yılından itibaren kullanılmakta olup 2007 yılında Nature Method tarafından yılın yöntemi olarak seçilmiştir (Topaloğlu ve ark., 2016).

KGH tanısında moleküler yöntem olarak iki strateji izlenmektedir. Bunlardan ilki Sanger's dizileme yöntemi ikincisi ise NGS yöntemidir. Sanger's dizileme araştırılan mutasyonun bulunduğu ilgili gen dizisi bilindiğinde tercih edilmelidir. Gen dizisi bilinmediğinde bu yöntem zaman alan ve maliyeti yüksek bir metod haline gelmektedir (Mousallem ve ark., 2015). KGH tanısında, NGS yönteminin kullanımı, hem uzman teknik personel gerektirdiğinden hem de X'e bağlı formda taşıyıcı annelerin mozaik bir durum göstermesi, gen kopyaları, ekzon ya da gen kayıpları, intronik varyasyonlarda ve *NCF1* geninin iki adet psödogen içermesi gibi bazı özel durumlarda daha karmaşık bir yöntem haline geldiğinden böyle durumlarda tercih edilmemektedir (Richardson ve ark., 2018).

2.5.4. KGH Tedavisi

KGH, ortaya çıktığı 1950'li yıllardan bu yana uygulanan klasik yöntemlerin yanında geliştirilen modern yöntemler ile ölümcül bir hastalık olmaktan çıkmış tedavi edilebilir ve sağ kalım oranı yüksek bir hastalık formuna dönüşmüştür (Segal ve ark., 2000). KGH tedavisinde ilk amaç enfeksiyonların önlenmesidir. Bunun için patojenden kaçınmak, aşılama ve parenteral antibiyotikler ile enfeksiyonların önüne geçmek mümkün olmaktadır.

İlaç Tedavisi: KGH'da, en önemli husus yaşam boyu antibiyotik ve antifungalproflaksidir. Retrospektif çalışmalar *co-trimoxazolun* uzun vadede kullanılmasını desteklerken *itraconazolun* ise rutinde kullanılmasının bir sakıncası olmayacağı bazı çalışmalarla ortaya konmuştur (Gallin ve ark., 2003). X-KGH hastalarının küçük bir grubunun interferon gamma uyarımına cevap verdiği yapılan çalışmalarda görülmüş ve yalnızca seçilmiş bir grup KGH hastasında, interferon proflaksisi uygulanmıştır (Condino-Neto ve Newburger, 2000). Fakat fungal enfeksiyonların başında gelen *Aspergilloz* için klinik olarak etkili bir ilaç söz konusu

olmasa da fungal enfeksiyonlar üzerinde etkili yeni ilaçlar geliştirilmektedir (Martire ve ark., 2008). Antifungal ilaçlar ve antibiyotiklerin yanı sıra KGH tedavisinde etkin olarak kullanılan *IFN-gamma* tedavisidir. IFN-gamma kullanımı ile süperoksit radikallerinin sentezini arttırılarak KGH hastalarının çoğunun tedavisinde efektif sonuçlar elde edilmiştir (Ezekowitz ve ark., 1987).

Cerrahi Tedavi: Antibiyotik tedavisinin yanında bazı vakalarda cerrahi girişimler ile enfeksiyonlar giderilmeye çalışılmaktadır. KGH' da cerrahi uygulamalar genel olarak absenin drenajı, karaciğerde ya da akciğerde bulunan fokal enfeksiyonun eksizyonu ve tıkanmaların giderilmesi ile gerçekleştirilmektedir (Lublin ve ark., 2002).

Hematopoetik Kök Hücre Transplantasyonu: KGH tedavisinde allojenik hematopoetik kök hücre nakilleri yapılmaktadır. Fakat son zamanlarda etkin antifungal ilaçların artması ile lökosit tranfüzyonunu azalmıştır (Seger, 2010). Bununla birlikte kök hücre nakli, birçok hasta için tedavi edici bir yöntem olmakla beraber yüksek risk taşıyan ölümcül sonuçları olan bir tedavi biçimidir. Özellikle nakilden sonra en sık rastlanan *Graft-versus-host-* hastalığının (GVHD) meydana gelme riski çok fazladır. Ayrıca çeşitli enfeksiyonların vuku bulması tedavisi zor komplikasyonları beraberinde getirmektedir. Tabii ki bu riskler hastanın HLA uyumuna, yaşına ve genel klinik durumuna göre değişebilmektedir (Connelly ve ark., 2018).

Gen Tedavisi: Gen tedavisi, öncül kök hücrelerin fonksiyonlarını geri döndürerek normal ve işlevsel düzeyde fagosit üretecek hücreler sağlamak için viral bir vektör kullanılarak, işlevsel olmayan bir protein eklenmesiyle yapılan bir tedavi yöntemidir. Bu yöntem daha çok KGH hastalarının üçte ikisini oluşturan X' e bağlı formundan sorumlu *CYBB* geni üzerinde uygulanmaktadır (Keller ve ark., 2018). Yapılan bir çalışmada *CYBB* geninden başka *NCF1* genindeki mutasyona bağlı $p47^{phox}$ defekti olan 5 hastada otolog $CD34^+$ periferik kök hücrelere in vitro olarak retroviral vektörler ile $p47^{phox}$ cDNAsı transfer edilerek bu geni düzeltilmiş kök hücreler hastaya verilmiş ve nakilden 5 hafta sonra oksidaz pozitif hücreler tespit edilmiştir (Malech ve ark., 2004). Şimdilerde ise gammaretroviral terapilerde bazı toksisite problemlerinin ortaya çıkmasından dolayı gen tedavi çalışmaları lentiviral vektörlerle yürütülmektedir.

Lentivirüsler, gamma retrovirüslerden farklı olarak transkripsiyonel aktif genlere giremezler ve bölünemeyen hücreleri de uyarma özelliğine sahiptirler (Mukherjee ve Thrasher, 2013). Önümüzdeki yıllarda çinko-parmak nükleazlar (ZFN'ler) ve

kümelenmiş düzenli aralıklarla kesişen kısa palindromik tekrarlar (CRISPR) / Cas9 sistemi gibi yöntemlerin rutinde kullanılmasıyla gen düzenleme teknolojisi daha gelişerek KGH dahil birçok hastalığın tedavisini mümkün kılabilecektir. Örneğin Mallech ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ZNF'leri kullanarak AAVS1 lokusunda genin normal bir kopyasını KGH' nin 5 formundan olan her bir hasta bireyin pluripotent kök hücrelerine yerleştirerek, gen nakledilmiş fagositler güçlü oksidaz aktivitesi göstererek mikrosidal öldürmeyi başarmışlardır (Merling ve ark., 2015). Aynı yöntemle yapılan çalışmalar p47^{phox} protein defekti olan hastalar için uygulanmaya başlanmıştır (Wrona ve ark., 2017). Her ne kadar gen tedavisinin bazı zorlukları olsa da KGH hastaları için kesin tedavi yöntemi olarak geliştirilmektedir. KGH için gen terapi çalışmaları şimdilik X' bağlı formunda daha çok yoğunlaşsa da ilerleyen dönemlerde KGH hastalığının diğer otozomal formlarında uygulanması beklenmektedir (De Ravin ve ark., 2016).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmada, ERÜ Tıp Fakültesi İmmünoloji Anabilim Dalı immün yetmezlik laboratuvarında KGH tanısı almış 24 KGH hastası ile 41 aile bireyi (sağlıklı ve taşıyıcılar) ve sağlıklı gönüllü bireyden oluşan 20 kontrol örneği ile çalışıldı. Ayrıca daha önceden homozigot GT delesyonu (Δ GT) mutasyonu bulunan 15 KGH hastası pozitif kontrol olarak çalışmaya dahil edildi. Bütün örneklerde *NCF1* geni exon 2 bölgesinde psödogen/ gen (*YNCF1/ NCF1*) oranı araştırıldı. Bu amaçla ilgili bölgedeki Δ GT durumu fragment analizi ile hesaplanarak kontrol edildi. Bu çalışma, TYL-2019-8936 numaralı proje olarak Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Birimi tarafından desteklenmiş ve Erciyes Üniversitesi Etik Kurulundan onay alınmıştır.

3.1. Alet ve Cihazlar

Çalışmada kullanılan alet ve cihazlar:

1. Nüve NF48 model santrifüj cihazı,
2. Stratagene marka Robocyclergradient 40 model inkübatör,
3. UVP marka BioDoc-it system, transilluminatör jel görüntüleyici,
4. Vorteks cihazı (MRC SI-100),
5. Biorad marka DNA Engine Thermal Cycler PCR cihazı
6. Gilson pipet 1-10 μ L, Socorex acura pipet 825 10-100 μ L ve 100-1000 μ L otomatik mikropipetler,
7. Derin dondurucu (-20°Beko)
8. CIEAVER scientific CS-300 Jel elektroforez cihazı
9. ABI 3500 genetik otoanalizör
10. Gen-mapper programının bulunduğu bilgisayar

3.2. Kit ve Kimyasal Maddeler

3.2.1. DNA izolasyonu için kullanılan kit ve kimyasallar

Çalışmada kullanılan DNA izolasyon kiti içeriğinde bulunan RBC Lysisbuffer, WBC Lysis buffer, Proteinaz K, BB buffer, BW buffer, Elisyon buffer, DNA pürifikasyon kolonları ve izolasyon tüpleri (2ml)Genaxxon Bioscience, Almanya'dan temin edildi.

3.2.2. PCR işleminde mix hazırlamak için kullanılan kit ve kimyasallar

PCR işlemi için kullanılan Blue Master mix kiti içeriğinde bulunan MgCl₂, dNTP ve DNA polimerazGenaxxon Bioscience, Almanya'dan temin edildi. PCR işleminde ilgili gen bölgesini çoğaltmak için kullandığımız *NCF1* ekzon 2 forward primer ve *NCF1* ekzon 2 reversprimer SenteBioLab, Ankara'dan temin edildi.

3.2.3. Jel Elektroforezi İşleminde Kullanılan Kimyasallar

Agaroz jel elektroforezi işleminde kullanılan Agaroz, TAE (10X), Jel Red boyasıve Loading Dye Biorad, ABD' dan temin edildi.

3.2.4. ABI 3500 Genetik Otoanalizör için kullanılan kit ve kimyasallar

Fragment analizi için kullandığımız ABI 3500 Genetik Otoanalizörü için gerekli kit ve kimyasallar arasında yer alan Hi- Di Formamide, ROX500, Anot Buffer, Katot Buffer ve POP-7™ Polimer jel, Thermo Fısher Scientific, ABD' den temin edildi.

3.3. YÖNTEMLER

3.3.1. DNA izolasyonu

KGH tanısı taşıyan hasta ve aile bireylerinden temin edilen EDTA'lı tamkan örneklerinden aşağıdaki protokol uygulanarak DNA örnekleri elde edilmiştir.

DNA İzolasyonu İşlem Basamakları (Genoxxan Kiti)

- 5 ml' likependorf tüp içine 400 µl kan ve eşit hacimde RBC lizisbuffer eklendi. (Not: 200 µl den daha az hacimdeki kan örneği için eldeki hacim kadar Elüsyonbuffer ya da PBS (Fosfat buffersaline) ile tamamlanıp ve üzerine eşit hacimde RBC buffer eklendi.
- Berrak kırmızı renkli solüsyon oluşuncaya kadar iyice karıştırıldı.
- 8600xg' de 4 dakika santrifüj edildi.
- Beyaz kan hücre pelleti üzerindeki süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldı.
- Pellet, 200 µl WBC buffer ile yeniden süspanse edildi.
- 3 µl Proteinaz K ilave edilir ve vortekslenerek karıştırıldı.
- 65⁰C' de 5 dakika inkübe edilir. (pellet lizis buffer içinde tamamen süspanse olmadıysa, eritrositler tamamen lizis olana kadar her 1-2 dakikada bir vortekslendi.
- 400 µl BB buffer eklenip ve iyice karıştırıldı.
- 70⁰C' de 5 dakika inkübasyon yapıldı.
- İnkübasyon sonrası 15-20 saniye hızlı bir şekilde vortekslendi.
- İçerisinde toplama tüpü bulunan mini kolonlu tüp içerisine elde edilen karışım aktarılıp, 13000 xg' de 1 dakika santrifüj edildi.
- Alt kısımda bulunan 2 ml' lik toplama tüpü değiştirildi.
- 600 µl BW buffer eklenip 13000xg'de 30 saniye santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası sıvı halde bulunan içerik dökülüp aynı toplama tüpü kullanılmaya devam edildi.
- 400 µl BW buffer eklenip 13000xg' de 30 saniye santrifüj edildi.
- İçerik dökülüp aynı toplama tüpü kullanılmaya devam edildi.
- 18000xg' de 2 dakika santrifüj edildi.
- Pürifikasyon kolonu, 1,5 ml' likependorf tüp içine yerleştirildi. Toplama tüpü atıldı.

- Önceden 70⁰C'ye ısıtılmış olan Elüsyonbufferdan 50 µl, pürifikasyon kolon membranının merkezine pipet ucu değdirilmeden yerleştirildi.Oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edildi.
- 13000xg'de 1 dakika santrifüj edildi.
- Mini kolon uzaklaştırıldıktan sonra elde edilen DNA kullanılmak üzere hazır hale getirildi.

DNA kısa süreliğine +2⁰C - +8⁰C arasında, uzun süreliğine ise -20⁰C 'de saklanabilir.

3.3.2. PCR İşlemi İçin Mix Hazırlama

KGH hasta ve ailelerinden elde edilen DNA örnekleri ile PCR uygulanmasında önce PCR miksi hazırlandı.

PCR Miksi Hazırlanışı İşlem Basamakları (*NCF1* Ekzon 2)

- Örnek sayısı kadar PCR tüpü kullanıldı ve örnek numaraları ile etiketlendi.
- Miks için 2 ml' likependorf tüp kullanıldı.
- Örnek sayısından bir fazla olacak şekilde miks tüpüne örnek başı 10 µl ddH₂O eklendi.
- Blue Master Mix dondurucudan çıkarılıp çözdürüldü.
- Blue Master Mix' ten örnek başına 7 µl miks tüpüne ilave edildi.
- *NCF1* geninin 2. ekzonuna ait forward ve reversprimerler dondurucudan çıkarıldı ve örnek başına her bir primerden 0,5 µl miks tüpüne eklendi. İş biten primerler dışarıda fazla bekletilmeden hemen dondurucuya kaldırıldı.
- Miks tüpü buzun üstüne alınıp pipetaj yapılarak karıştırıldı.
- Önceden örnek numaralarına göre ayrılmış ve etiketlenmiş örnek tüplerinin her birine hazırlanan miksten 18 µl ilave edildi.
- Hasta ve yakınlarının DNA larından 2'şer µl eklenerek pipetaj yapıldı.
- Blue Master Mix dondurucuya kaldırıldı.
- Örnek PCR cihazına yüklendi.

3.3.3. PCR Uygulaması (*NCF1* Ekzon 2)

KGH hasta ve aile bireyleri ile kontrollerden oluşan örneklerin *NCF1* geninde p47^{phox} protein ifadesini ve psödogenlerin etkinliğini gözlemlemek için *NCF1* geninin 2. ekzonu spesifik primerler (Tablo 3.2) kullanılarak thermalcycler PCR' da çoğaltıldı. DNA örneği eklenmiş numune tüplerinden toplamda 20 µl alınarak PCR tüplerine aktarıldı. Çalışmada pozitif ve negatif kontrol olarak DNA örnekleri kullanıldı. *NCF1* geninin 2. ekzonuna uygun olarak reaksiyon sıcaklıkları ve döngü sayıları cihazda ayarlandı. 2,5 saat süren denatürasyon (DNA ipliğinin ayrılması), annealing (primerlerin eklenmesi), extension (dNTP' lerin eklenmesi) ve elongation (zincirin uzaması) reaksiyonları sonucunda PCR işlemi tamamlandı. *NCF1* ekzon 2 PCR işlemi için aşağıdaki optimum koşullar ayarlandı;

Tablo 3. 2: *NCF1* geni ekson 2 için PCR uygulaması sıcaklık ve döngü sayıları

Basamak	Süre	Sıcaklık
Denatürasyon (DNA zincirinin açılması)	3 dakika	94 ⁰ C
Denatürasyon (DNA zincirinin açılması)	30 saniye	94 ⁰ C
Annealing (Primerlerin Bağlanması)	30 saniye	62 ⁰ C
Extension (Zincirin uzaması)	30 saniye	72 ⁰ C
Elongation (DNA molekülünün uzaması)	7 dakika	72 ⁰ C

} 2 kez 40 döngü

Tablo 3. 3: *NCF1* geni ekzon spesifik PCR işlemi için kullanılan primer dizileri

ForwardPrimer	5'-Fam- TGC ACA CAG CAA AGC CTC TT-3'
ReversPrimer	5'-GTG TCC TTC CCA AAG GGT GGA GCT-3'

3.3.4. Jel Elektroforezi Uygulaması

NCF1 geni ekzon 2 PCR işleminin ardından DNA örneklerinin yeteri kadar çoğaldığından emin olmak adına PCR ampikonlarını jelde gözlemek için jel elektroforezi uygulandı. Bunun için öncelikle 1 gram agaroz ile hazırlanan TAE (1X)

çözeltisi kullanıldı. PCR ürünleri 30 dakika 80A akımda jelde yürütüldükten sonra UV görüntüleme cihazında bantlar görüntülendi.

Jel Elektroforez işlem basamakları

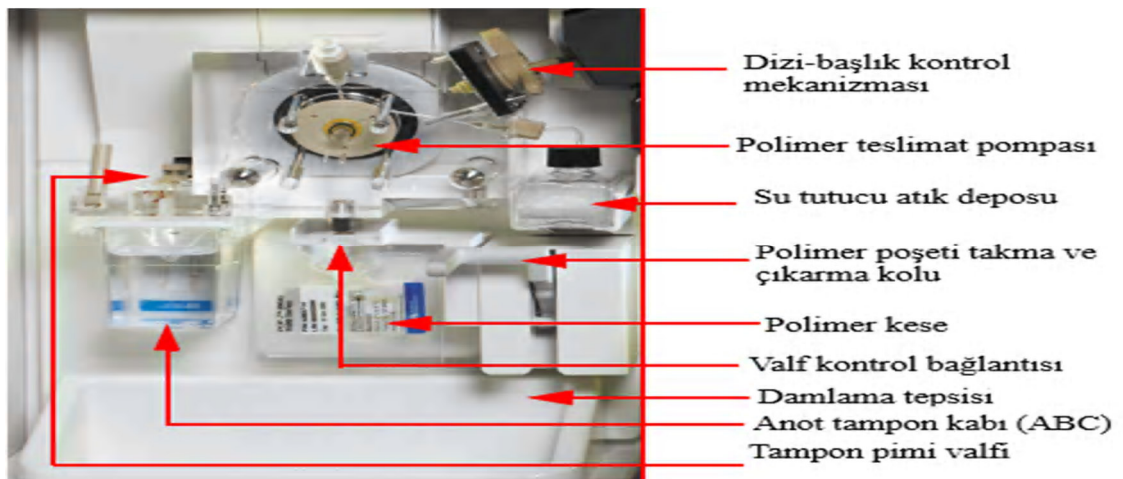
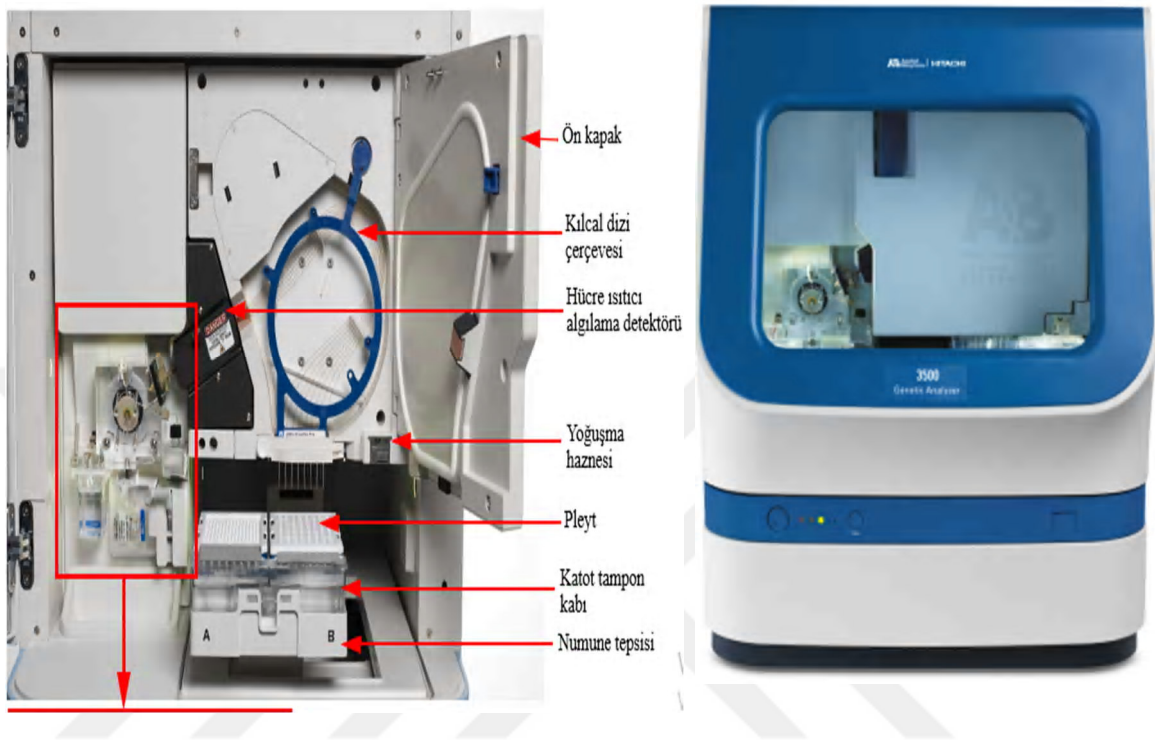
- 250 ml'lik bir erlen içine 1 gr olarak tartılan agaroz 25 ml TAE (1X) ile çözünerek çözelti hazırlandı.
- Bu çözelti mikrodalga fırında 1 dakika ısıtıldı.
- Isıtılan çözelti koruyucu eldiven kullanılarak karıştırıldı.
- 45 saniye kadar tekrar mikrodalg fırında ısıtıldı.
- Fırından çıkarılan agaroz üzerine 25 ml daha TAE (1X) eklendi ve iyi karıştırıldı.
- Üzerine 5 µl Jel Red boyasından eklendi ve baloncuk olmaması için iyi karıştırıldı.
- Hazırlanan jel elektroforez tankına dikkatlice ve eşit yayılacak şekilde döküldü.
- Elektroforez tankının tarafları yerleştirildi.
- Jel +4 °C' de buzdolabında 15-20 dakika bekletildi.
- Bu arada tank içine 400 ml hacminde TAE (1X) eklendi.
- Donan jelden dikkatlice taraflar kaldırılarak jel tanka yerleştirildi.
- Jelin tampon çözelti içine tamamen batmasına dikkat edildi.
- Boş bir pleyt alınarak yüklenecek örnek kadar kuyucuklara 0,5 µl Jel Red boyası eklendi.
- Boyanın üzerine 2,5 µl PCR ürünü eklenerek pipetaj yapıldı.
- PCR ürünleri jeldeki kuyucuklara yüklendi,
- 80A akım altında 30 dakika elektroforez işlemi uygulandı.
- UV ışık altında bant görülen örnekler PCR ürünü olarak değerlendirildi.

3.3.5. ABI-3500 Genetik Analizörü ile Fragment Analizinin Uygulaması

DNA sekansı ve fragment analizi yapabilen Gen- Scans yöntemini kullanan ABI 3500 genetik analizörü, 8 adet kapillerelektroforez yöntemi temeline dayanan bir analizördür (**Şekil 3.1**). Cihaz, kapillerelektroforez uygulaması için anot ve katot tampon çözeltileri, ayırma matrisi olarak POP-7™ polimer jel, Hi- DiFormamide ve bir de floresan boya olarak ROX500 varlığında analiz yapmaktadır. Numune analiz için

hazır hale geldiğinde analize başlamadan ABI 3500 genetik analizöründe birtakım kontroller yapıldı; cihazın ön kapağı açılarak anot ve katot tampon kaplarının doluluk seviyeleri kontrol edildi. Kılcal elektroforez için gerekli olan ve yine cihazın ön tarafında bulunan polimerjel, polimer takma bölmesine yerleştirildi. Son olarak atık kutusu ve elektriksel valf sisteminin kontrolü yapıldıktan sonra numuneler, numune tepsisi üzerinde bulunan pleyte yerleştirilip üzerleri plastik pleyt koruyucusuyla kapatılarak analiz gerçekleştirildi (Şekil 3.1). Bu çalışmada *NCF1* ekzon 2 PCR uygulaması ve elektroforez işleminden sonra ABI 3500 GeneticAnalizör cihazında fragment analizi uygulanarak, KGH hastası olan bireylerin hepsinde aynı gen bölgesinin nasıl çalıştığı ve psödogenlerin etkisi ve ΔG araştırıldı.

Bu işlem öncesinde PCR ürünleri dilüe edilerek analiz optimizasyonu için Hi-Di Formamide ve fragment boya standardizasyonu için ROX500 ilavesiyle fragment analizine hazır hale getirildi. 2 saat süren reaksiyon sonucunda, sonuçlar Gen- Mapper yazılımı kullanılarak analiz edildi.



Şekil 3. 1. ABI-3500 genetik analizör cihazı ve bileşenleri (Thermo Fisher, 2019)

3.3.5.1. Fragment Analizi

Fragment analizi için gerekli reaktifler

- PCR ürünü
- ddH₂O
- ROX500
- Hi- Di Formamide
- POP-7™ polimer jel

Fragment Analizi İşlem Basamakları

- 1µl PCR ürünü 100 µl ddH₂O ile pipetaj yapılarak karıştırılarak dilüe edildi.
- Karışımdan 0,5 µl dilüe PCR ürünü örneği alındı.
- 0,2 veya 0,5 ml' lik PCR tüpüne, bir örnek fazladan olacak şekilde örnek başına 0,2 µl ROX500 ve 9 µl Hi-Di formamide eklenerek pipetaj yapıp miks oluşturuldu.
- ABI 3500 sisteminde kullanılan pleyte her bir dilüe PCR ürününün üzerine 9,5 µl miks eklenerek 10 µl son hacim elde edildi.
- 10 µl' lik son karışım 95⁰C' de 5 dakika inkübe edildi.
- 5 dakika sonunda örnekler buza gömülüp üzerlerine basınç uygulanarak 3 dakika soğuması sağlandı.
- ABI 3500 cihazında kimyasalların ve sistemsel kontroller yapıldı. Cihaz analize hazır hale getirildi.
- Pleyt içindeki örnekler 1-2 dakika santrifüj edildikten sonra ABI 3500 cihazına yüklendi.
- GeneMapper Software 5 programı kullanılarak fragment analizi yapıldı.

3.4. İSTATİSTİK

Verilerin analizleri Turcosa Analitik yazılımı ile değerlendirildi. Verilerin normallik analizleri q-q grafikleri ve histogram kullanılarak Shapiro-Wilk testi ile, verilerin dağılımı, kutu grafikleri kullanılarak varyans analizi ile gruplar arası karşılaştırmalar ise nitel değişkenler için ki-kare analizleri ile değerlendirildi. p<0.05 düzeyi anlamlı kabul edildi

4. BULGULAR

4.1. Uygulanan Testlerin Optimizasyonu

4.1.1. DNA Örneklerinin İzolasyonu ve Optimizasyon

Çalışmada kontrol, hasta ve aile bireylerinden temin edilen EDTA' lı tam kan numunelerinden, DNA izolasyon kiti kullanılarak periferik kandan DNA materyalleri izole edildi. İzolasyon için 200 mikrolitrenin altındaki hacimlerde olan tam kan örneklerinden yapılan izolasyonda yeterli miktarda DNA konsantrasyonu elde edilemedi. Bu durumda ikinci bir kan numunesi olan çalışma grubunda 200 mikrolitrenin üzerinde tam kan kullanılarak optimum konsantrasyonlarda DNA materyalleri elde edildi. Fakat ikinci bir tam kan örneği bulunmayan bireylerde ise 200 mikrolitrenin altında çekilen tam kan örneğinin üzerine izolasyon kiti içerisinde yer alan elüsyonbufferdan eldeki hacim kadar ilave edilip oluşan hacim kadar RBC buffer eklenerek 200 mikrolitreye tamamlandı. Bu şekilde optimum konsantrasyonlarda DNA örnekleri elde edilebildi. Hiç tam kan numunesi bulunmayan ve çalışma grubu içerisinde yer alan bireylerin ise önceden elde edilen optimum konsantrasyonlardaki stok DNA örnekleri kullanıldı.

DNA izolasyonu, PCR, elektroforez ve fragment analizi sırasında kullanılan kit ve kimyasalların stabilitelerini korumak amacıyla istenilen prosedürler uygulanarak analizler gerçekleştirildi.

4.1.2. PCR ve Elektroforez Optimizasyonu

DNA izolasyon işlemlerinden sonra ekzon spesifik PCR işlemimin optimum şartlarda gerçekleşebilmesi için miks hazırlama işlemi sırasında kullanılan Master Mix kiti ve primerlerin uygun sıcaklık ve hacimlerde kullanılmalarına dikkat edildi. PCR

miksi hazırlama aşamasında Fam boyalı olan *NCF1* geni ekzon 2 forward primeri ışık görmeyecek şekilde, Blue Master Mix kiti ise buz üzerinde olacak şekilde çalışıldı. Optimum koşullarda hazırlanan PCR miksi ile hazırlanan PCR örneklerinin amplifikasyonu başarı ile tamamlanırken bazı örneklerin ise yeteri kadar amplike olmadığı görüldü. Bu durumun yetersiz DNA örneğinden kaynaklandığı düşüncesiyle, DNA izolasyon ve PCR miksi hazırlama aşamaları dikkatli bir şekilde tekrar edilerek optimize edilmiş PCR koşullarında (Tablo 3.1) PCR ürünleri elde edildi.

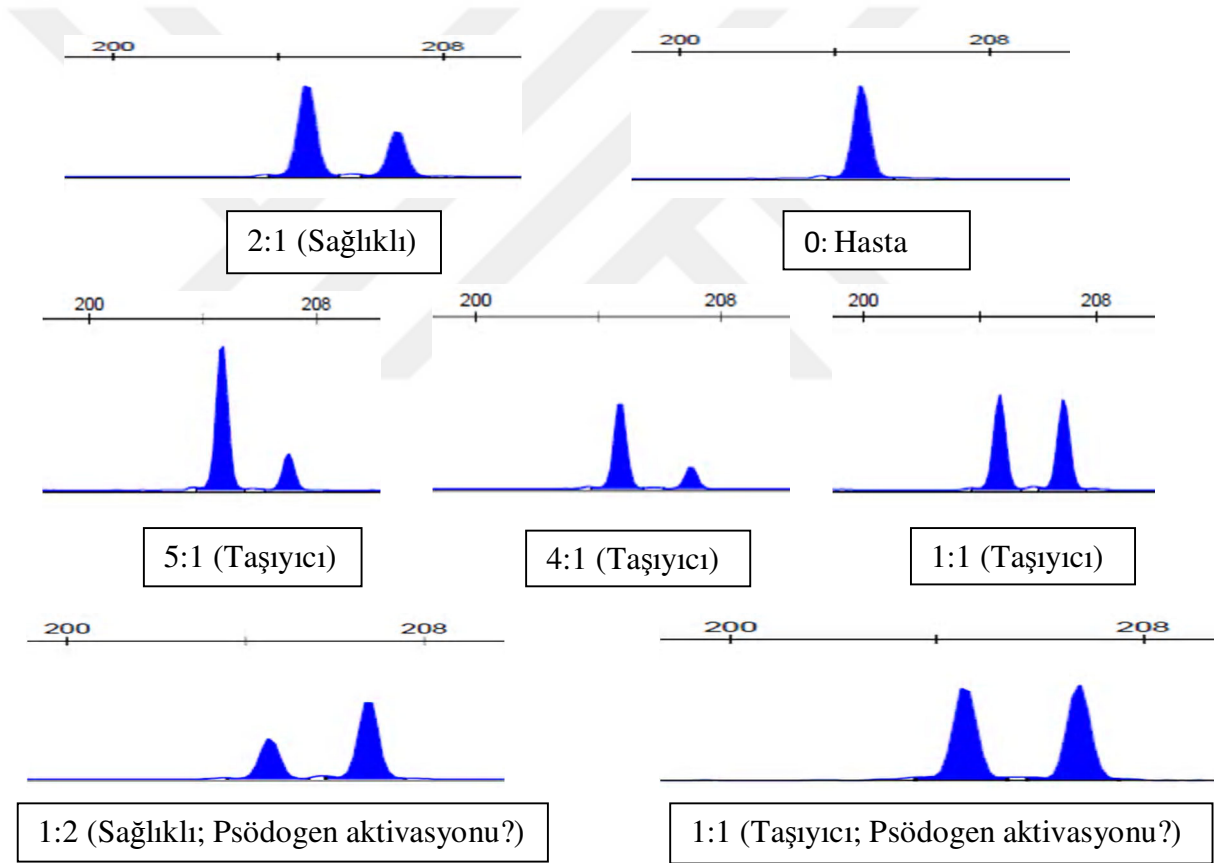
Optimum standartlarda elde edilen PCR ürünlerinin jelde görüntülenmesi yapıldı. PCR ürünlerinin görüntülenmesi için yapılan elektroforez uygulanmasında %1 lik agaroz çözeltilisinin, farklı yüzdelerde hazırlanan agaroz jel çözeltileri ile kıyaslandığında optimum bantlaşma görüntüsü veren konsantrasyon olduğuna karar verildi. %1' lik agaroz çözeltilisi kullanılarak hazırlanan jelde amplike olmuş PCR ürünlerinin görüntülenmesi yapıldı.

4.1.3. Fragment Analizi ile İlgili Optimizasyon

Fragment analizi için analiz yapılacak örneklerin listesi yapıp analiz protokolü hazırlandı (Bkz. 3.3.5.1). Analiz için 50 cm uzunluğunda kapillerelektroforez uygulaması yapan fragment analizi yöntemi seçildi. Elde edilen PCR ürünleri %1 oranında dilüe edilerek hazırlandı, analiz için optimum konsantrasyona ulaşıldı. ABI 3500 genetik analizörde yapılan fragment analizi için *NCF1* geninde 2. ekzonun içerdiği baz çifti sayısına uygun standartlarda boya seçildi. Boyu 400 trinükleotit ya da tetranükleotitler için kullanılan ROX500 boyası ile optimizasyon sağlandı. 9µl Hi-DiFormamide kullanarak örneklerin boyut standartizasyonu optimize edildi. Analiz öncesi örnekler 95⁰C de 5 dakika ısıtıldı hemen ardından ise buza alınarak şok etkisiyle soğutuldu. Bu işlemin yapılmadığı örneklerin çalışmadığı gözlemlendi. Analiz için optimum ısınma sıcaklığının 95⁰C, buzda beklediği optimum sürenin ise 3 dakika olduğu anlaşıldı. Sağlanan optimum koşullar altında analizler gerçekleştirildi. Bazı örneklerde tüm optimizasyona rağmen analizin sonuçlanmadığı görüldü. Bunun sebebinin pipetaj işlemi sırasında eksik örnek çekmekten kaynaklanabileceği düşünüldü. Böyle numuneler için işlemler daha dikkatli şekilde tekrarlanarak analizler tamamlandı.

4.2. Fragment Analiz Sonuçlarına Göre Çalışma Gruplarında Sağlıklı, Taşıyıcı ve Hastalarda $\Psi NCF1/NCF1$ oranlarının gösterilmesi

Fragment analiz sonuçlarına göre gerek kontrol gerekse diğer çalışma grubunda yer alan bireylerin farklı fragment boyutlarına sahip oldukları görüldü. Her iki gende görülen bu farklı fragment boyutlarının birbirlerine oranına bağlı olarak denekler, GT delesyonuna (ΔGT) bağlı $p47^{phox}$ defektine sahip olup olmamalarına göre sağlıklı, taşıyıcı ve hasta olarak değerlendirildi (Şekil 4.1).



Şekil 4. 1. Fragment analizinde fragment boyutlarının birbirine oranına göre belirlenen gen oranlarının ($\Psi NCF1/NCF1$), sağlıklı, taşıyıcı ve hasta bireylerde gösterimi.

4.3. Kontrol Grubunda Fragment Analiz Sonuçları

Sağlıklı kontrol grubu, KGH tanısı olmayan yaşları 3 ile 50 arasında değişen 20 sağlıklı bireyden, pozitif kontrol grubu ise homozigot ΔGT mutasyonu bulunan KGH hastalarından oluşturuldu. Yapılan fragment analizinde kontrol grubunda *NCF1* ve *ΨNCF1* genine ait fragment boyutları ile bu fragmentlerin birbirlerine olan oranları ($\Psi NCF1/NCF1$) ölçüldü (Tablo 4.1). İstatistiksel olarak varyans analizi sonucunda *NCF1* ve *ΨNCF1* genlerini fragment boyutlarının median değerleri ile ortalama, standart sapmaları ve p değerleri belirlendi (Tablo 4.2 ve Tablo 4.3). Kontrol grubunda *NCF1* ve *ΨNCF1* genlerinin 2. ekzonlarına ait fragment analizi sonucunda elde edilen veriler Tablo 4.1’ de verildi.

KGH tanısı olmayan rastgele seçilen sağlıklı kontrol grubundaki bireylerin fragment analiz sonuçlarında 3 bireyde *NCF1* ve *ΨNCF1* genlerinin fragment boyutları oranları arasında bir fark olmadığı tespit edildi. Her iki gen arasındaki $\Psi NCF1/NCF1$ gen oranı 1:1 olarak bulundu. Bu orana sahip sağlıklı olarak seçilen bireylerin, ΔGT bağlı $p47^{phox}$ protein defekti taşıyıcılığını gösteren 1:1 oranına sahip oldukları bulundu. Negatif kontrol grubunda yer alan diğer bireylerin ise analiz sonucuna göre sağlıklı oldukları tespit edildi ($\Psi NCF1/NCF1= 2:1$). Sağlıklı, taşıyıcı ve hasta bireylerin gen oranlarını gösteren analiz görüntüleri Şekil 4.1’ verildi.

4.4. Tüm Çalışma Grubunda Fragment Analizi Sonuçları

Kontrol grupları dışında kalan çalışma grubu; KGH tanısı kesinleşmiş ΔGT ve $p47^{phox}$ protein defekti bulunan hastaların 6 aile bireyinden, ΔGT bulunmayan fakat $p47^{phox}$ protein defekti bulunan 4 hasta ile 8 aile bireyinden ve ΔGT ile $p47^{phox}$ protein defekti bulunmayan 16 hasta ile 27 aile bireyden oluşturuldu. 35 kontrol grubu dahil 65 KGH hastası ve aile bireyinden oluşan çalışma grubunda, *NCF1* geni ve *ΨNCF1* arasında bulunan gen oranları ve fragment boyutları karşılaştırıldı. Çalışma grubunda uygulanan fragment analiz sonuçları Tablo 4.4, Tablo 4.5 ve Tablo 4.6’ da verildi. KGH hastalarında fragment analizi sonucu bulunan *ΨNCF1* ve *NCF1* genleri fragment boyutlarındaki ilişki Şekil 4.2 ve Şekil 4.3’ de gösterildi.

Tablo 4. 1. Sağlıklı kontrol gruplarında fragment analiz sonuçları

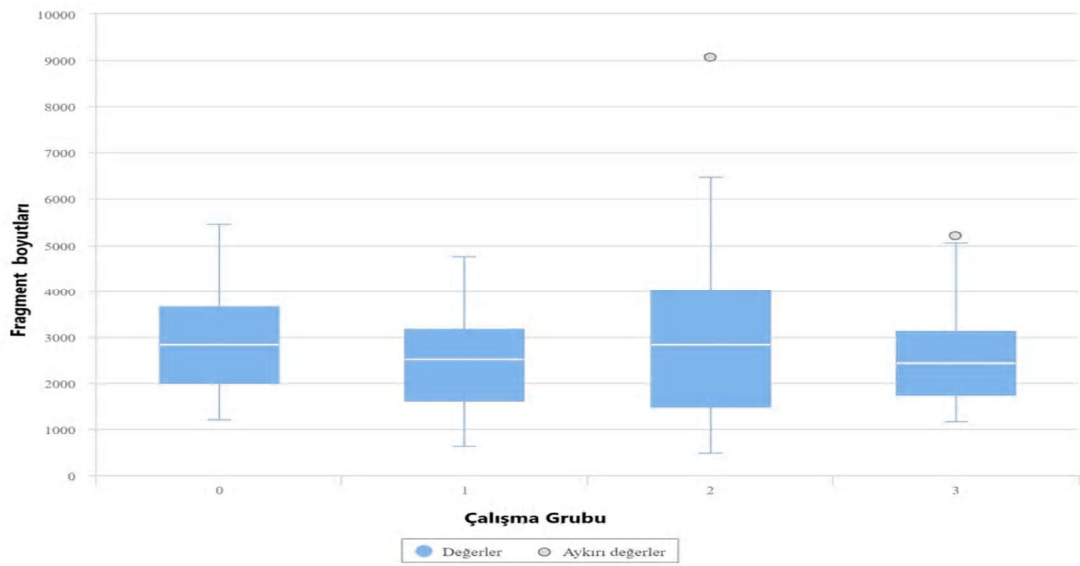
Örnek No	Grup	Ψ NCF1 Fragment Boyutları (Bp)	NCF1 Fragmen t Boyutları (Bp)	Ψ NCF1/ NCF1	Fenotip
1	Sağlıklı Kontrol	1972	1799	1:1	Taşıyıcı
2		2596	1341	2:1	Sağlıklı
3		4967	2298	2:1	Sağlıklı
4		3356	1684	2:1	Sağlıklı
5		4287	1970	2:1	Sağlıklı
6		1245	639	2:1	Sağlıklı
7		2676	1244	2:1	Sağlıklı
8		3370	1788	2:1	Sağlıklı
9		5456	2689	2:1	Sağlıklı
10		1654	850	2:1	Sağlıklı
11		3880	1934	2:1	Sağlıklı
12		2322	1240	2:1	Sağlıklı
13		4502	4504	1:1	Taşıyıcı
14		1854	976	2:1	Sağlıklı
15		3566	1750	2:1	Sağlıklı
16		3069	3031	1:1	Taşıyıcı
17		2213	1178	2:1	Sağlıklı
18		1208	644	2:1	Sağlıklı
19		1998	1020	2:1	Sağlıklı
20		2970	1532	2:1	Sağlıklı

Tablo 4.2. Sağlıklı kontrol grubunda *ΨNCF1* fragment boyutları varyans analiz sonuçları

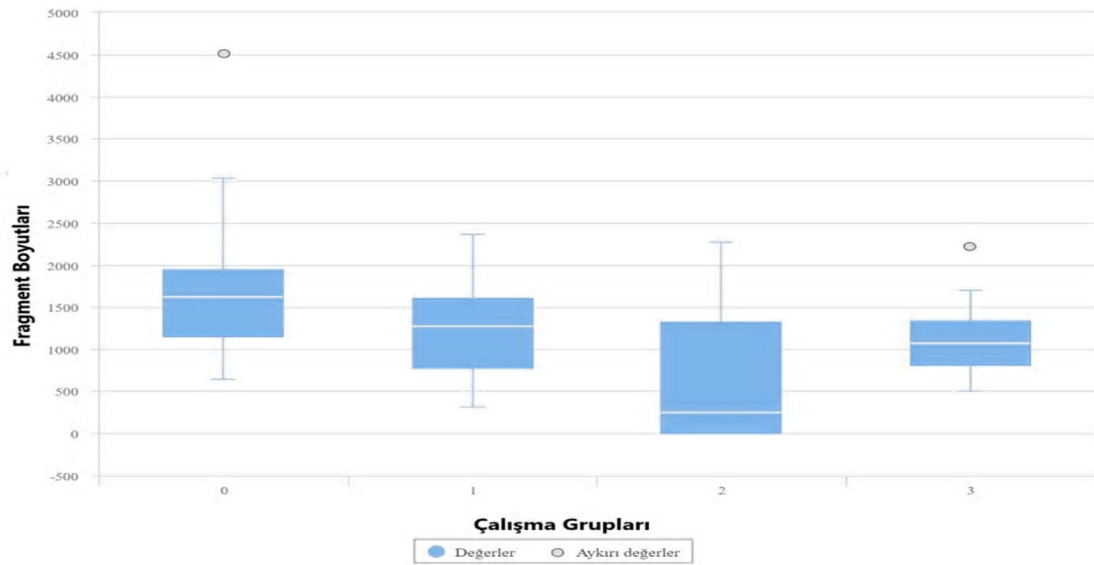
<i>ΨNCF1</i>	Denek sayısı	Median Değeri	Ortalama ± Standart Sapma	p değeri
Sağlıklı Kontrol	n = 20	2823	2958 ± 1213	0.327

Tablo 4.3. Sağlıklı kontrol grubunda *NCF1* fragment boyutları varyans analiz sonuçları

<i>NCF1</i>	Denek sayısı	Median Değeri	Ortalama ± Standart Sapma	p değeri
Sağlıklı Kontrol	n = 20	1608	1705 ± 915	<0.001

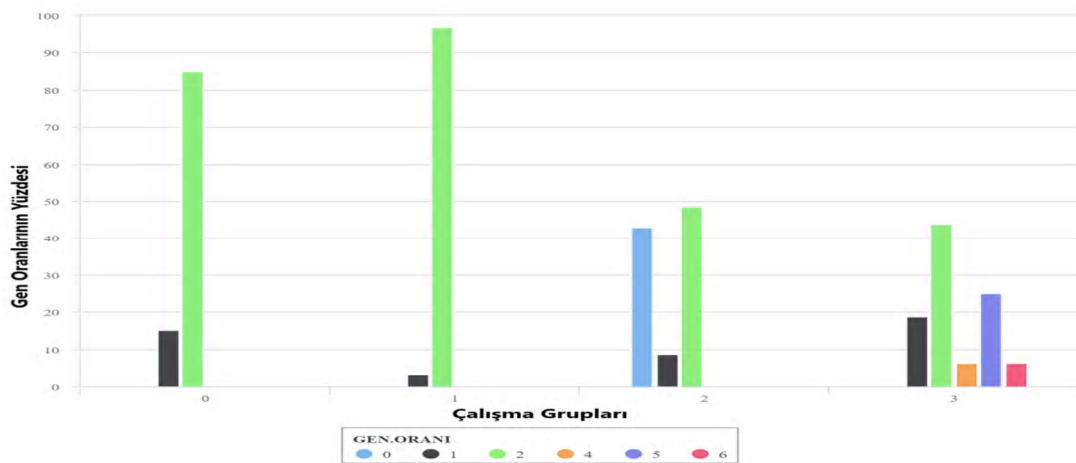


Şekil 4. 2. KGH hastalarında *ΨNCF1* geni fragment boyutlarının dağılımı (0: Sağlıklı grup, 1: X-KGH hastaları, 2: ΔGT - p47⁰-OR-KGH hastaları ve 3: p67⁰,p22⁰-OR- KGH hastaları)



Şekil 4.3. KGH hastalarında *NCF1* geni fragment boyutlarının dağılımı (0: Sağlıklı grup, 1: X-KGH hastaları, 2: ΔGT - p47⁰ -OR-KGH hastaları ve 3: p67⁰,p22⁰ -OR- KGH hastaları)

Çalışma grubunda yer alan kontrol grubu ile KGH, hasta ve aile bireyleri (sağlıklı ve taşıyıcılar) ile ΔGT taşıyıcılığının araştırılması için yapılan fragment analiz sonuçlarına göre, $\Psi NCF1/NCF1$ oranı ile çalışma grubunu oluşturan kontrol, sağlıklı, hasta ve taşıyıcılar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulundu. İstatistiksel olarak yapılan Pearson Ki-Kare analizi sonucuna göre $SD=15$, $p<0.001$ olarak bulundu. Çalışma grubunda $\Psi NCF1/NCF1$ gen oranlarının dağılımı Şekil 4.4’de verildi.



Şekil 4.4. $\Psi NCF1/NCF1$ gen oranlarının (mavi: 0 gen oranı, siyah: 1:1 gen oranı, yeşil: 2:1 gen oranı, turuncu: 4:1 gen oranı, mor: 5:1 gen oranı, kırmızı: 1:2 gen oranı) çalışma gruplarına (0: Kontrol, 1: Sağlıklı, 2: Hasta, 3: Taşıyıcı) göre dağılımı

4.4.1. KGH Hasta Gruplarında Fragment Analizi Sonuçları

Çalışma grubunda yer alan KGH hasta ve aile bireylerinden oluşan toplam 80 bireye fragment analizi yapıldı. *NCF1* exon 2 ΔGT ve $p47^{phox}$ protein defekti bulunan ve pozitif kontrol olarak gruplandırdığımız 15 hasta ile 6 aile bireyden, *NCF1* exon 2 ΔGT bulunmayan fakat $p47^{phox}$ protein defekti bulunan 4 hasta ile 8 aile bireyinden ve *NCF1* exon 2 ΔGT ve $p47^{phox}$ defekti bulunmayan 16 hasta ile 27 aile bireyden oluşan toplam 80 bireyin $\Psi NCF1/NCF1$ gen oranları fragment analiz yöntemi ile analiz edildi. Yapılan bu analizde KGH hasta ve aile bireylerinin $\Psi NCF1/NCF1$ gen oranları karşılaştırıldı. Hasta gruplarında yapılan fragment analiz sonuçları Tablo 4.5, Tablo 4.6 ve Tablo 4.7' de verildi.

Tablo 4. 4. *NCF1* exon 2 ΔGT olmayan KGH (X- KGH) hasta ve aile bireylerinde *NCF1* exon 2 fragment analizi sonuçları

Aile No	Yakınlık	Cinsiyet	Fenotip	$\Psi NCF1$ Fragment Boyutları (Bp)	<i>NCF1</i> Fragment Boyutları (Bp)	$\Psi NCF1/NCF1$
1	Hasta	E	Hasta	3984	2038	2:1
	Anne	K	Aile bireyi	1222	626	2:1
	Baba	E	Aile bireyi	3214	1567	2:1
2	Hasta	E	Hasta	2561	1275	2:1
	Anne	K	Aile bireyi	1811	903	2:1
	Kardeş	E	Hasta	2814	1312	2:1
	Kardeş	E	Hasta	1912	911	2:1
	Kardeş	E	Hasta	2760	1339	2:1
3	Hasta	E	Hasta	630	290	2:1
	Anne	K	Aile bireyi	2094	1053	2:1
	Kardeş	E	Hasta	1239	577	2:1
	Kardeş	K	Aile bireyi	2281	1010	2:1
4	Hasta	E	Hasta	2474	2274	1:1
	Anne	K	Aile bireyi	1471	1325	1:1
5	Hasta	E	Hasta	2466	1234	2:1
	Anne	K	Aile bireyi	2571	1322	2:1
6	Hasta	E	Hasta	4425	2012	2:1
	Anne	K	Hasta	3203	1466	2:1
	Kardeş	K	Aile bireyi	2550	1134	2:1
7	Hasta	E	Hasta	1275	1317	1:1
	Anne	K	Aile bireyi	1165	2218	1:2
	Baba	E	Aile bireyi	1908	989	2:1

Tablo 4. 5. Pozitif kontrol grubunda *NCF1* exon 2 homozigot ΔGT olan KGH (p47⁰) hastaları ve aile bireylerinde *NCF1* exon 2 fragment analiz sonuçları

Aile No	Yakınlık	Cinsiyet	Fenotip	$\Psi NCF1$ Fragment Boyutları (Bp)	<i>NCF1</i> Fragment Boyutları (Bp)	$\Psi NCF1/ NCF1$
1	Hasta	E	Hasta	573	0	0
	Kardeş	E	Hasta	1105	0	0
2	Hasta	E	Hasta	2932	0	0
3	Hasta	K	Hasta	3818	0	0
	Kardeş	E	Hasta	2983	0	0
4	Hasta	E	Hasta	5961	0	0
5	Hasta	K	Hasta	2206	0	0
	Anne	K	Aile bireyi	2514	1282	2:1
6	Hasta	K	Hasta	9066	0	0
	Kardeş	K	Hasta	6076	0	0
7	Hasta	K	Hasta	6472	0	0
	Kardeş	K	Hasta	6227	0	0
8	Hasta	E	Hasta	6286	0	0
12	Hasta	E	Hasta	3462	0	0
	Anne	K	Aile bireyi	5212	1078	5:1
	Baba	E	Aile bireyi	4112	851	5:1
	Kardeş	K	Aile bireyi	2431	1212	2:1
	Kardeş	E	Aile bireyi	3025	678	5:1
13	Hasta	E	Hasta	6312	0	0
	Anne	K	Aile bireyi	2817	1315	2:1
14	Hasta	E	Hasta	4015	0	0

Tablo 4. 6. *NCF1* exon 2 ΔGT olmayan KGH (p22⁰, p67⁰, p47⁰) hastaları ve aile bireylerinde *NCF1* exon 2 fragment analiz sonuçları

Aile No	Yakınlık	Cinsiyet	Fenotip	$\Psi NCF1$ Fragment Boyutları (Bp)	<i>NCF1</i> Fragment Boyutları (Bp)	$\Psi NCF1 / NCF1$
1	Hasta	E	Hasta	473	233	2:1
	Anne	K	Aile bireyi	662	327	2:1
	Baba	E	Aile bireyi	616	315	2:1
2	Hasta	K	Hasta	1316	938	2:1
	Anne	K	Aile bireyi	2973	1353	2:1
	Baba	E	Aile bireyi	1719	1664	1:1
3	Hasta	E	Hasta	540	243	2:1
	Anne	K	Aile bireyi	2814	1342	2:1
	Baba	E	Aile bireyi	1275	572	2:1
4	Hasta	K	Hasta	496	253	2:1
	Anne	K	Aile bireyi	1345	645	2:1
	Kardeş	E	Aile bireyi	1560	714	2:1
5	Hasta	K	Hasta	3384	1656	2:1
	Anne	K	Sağlıklı	3678	1734	2:1
6	Hasta	E	Hasta	2684	1325	2:1
	Anne	K	Aile bireyi	2243	1128	2:1
	Baba	E	Aile bireyi	2900	1358	2:1
	Kardeş	E	Aile bireyi	3200	1598	2:1
7	Hasta	E	Hasta	3024	1492	2:1
	Anne	K	Aile bireyi	1211	608	2:1
	Kardeş	E	Aile bireyi	3619	1734	2:1
8	Hasta	E	Hasta	3342	1688	2:1
	Anne	K	Aile bireyi	1744	897	2:1
9	Hasta	E	Hasta	1634	798	2:1
	Anne	K	Aile bireyi	3940	2034	2:1
10	Hasta	E	Hasta	3030	644	5:1
	Anne	K	Aile bireyi	2514	1224	2:1
11	Hasta	K	Hasta	3003	1330	2:1
	Anne	K	Aile bireyi	2491	1253	2:1
	Baba	E	Aile bireyi	4742	2368	2:1
12	Hasta	K	Hasta	1473	731	2:1
	Anne	K	Aile bireyi	1514	1414	1:1
	Baba	E	Aile bireyi	4511	2018	2:1
	Kardeş	E	Aile bireyi	3914	1912	2:1
13	Hasta	E	Hasta	1958	499	1:1
	Anne	K	Aile bireyi	2015	1038	2:1
	Kardeş	E	Aile bireyi	5041	1286	4:1

Toplam 80 bireyden oluşan hasta grupları (hastalar ve aile bireyleri) ile yapılan fragment analiz sonuçlarına göre $\Psi NCF1$ ve $NCF1$ genleri fragment boyutları ile KGH herhangi 3 formundan birinin tanısını taşıyan hastalar ve aile bireyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulundu. Bu anlamlılığın $NCF1$ exon 2 homozigot ΔGT bulunan $p47^{phox}$ proteini defektine sahip otozomal KGH hastaları ve aile bireylerinin oluşturduğu grup ile $NCF1$ exon 2 homozigot ΔGT bulundurmeyen X'e bağlı formundan ve $p67^{phox}$ ve $p22^{phox}$ protein defekti bulunan otozomal formundan olan hasta ve aile bireyleri arasındaki gen oranlarının farklılığından kaynaklandığı görüldü. KGH hasta gruplarının $\Psi NCF1$ ve $NCF1$ genleri fragment boyutlarına ait istatistiksel sonuçlar Tablo 4.7 ve Tablo 4.8' de verildi.

Fragment analiz sonucuna göre ΔGT bulunan KGH hastası ve aile bireyleri ile ΔGT bulunmayan KGH hasta ve aile bireylerinde ortaya çıkan $\Psi NCF1/ NCF1$ gen oranları Pearson Ki- Kare testi ile istatistiksel olarak karşılaştırıldı. ΔGT içeren ve içermeyen hasta grupları (hasta ve taşıyıcılar) $\Psi NCF1/ NCF1$ gen oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulundu ($SD= 15$, $p<0.001$). Hasta grupları ile gen oranları arasındaki ilişki Tablo 4.9' ve Tablo 4.10' da verildi.

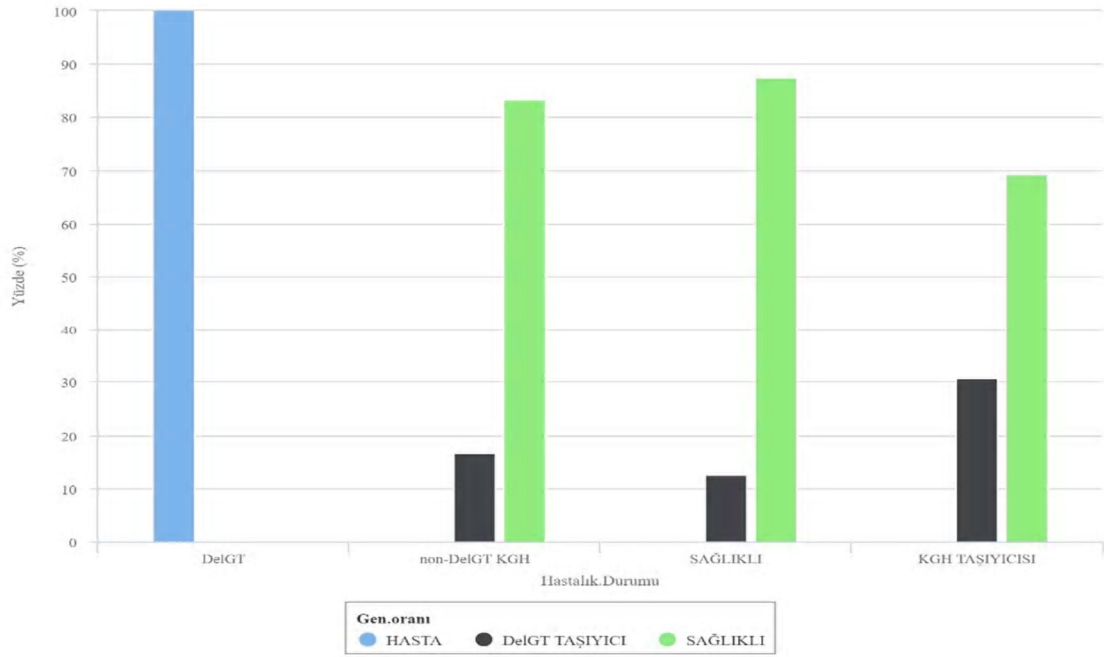
Tablo 4.9. ΔGT bulunduran ve bulundurmeyen KGH hasta, taşıyıcı ve sağlıklı bireylerin sayısı

	ΔGT ve $p47^0$ olan Hastalar	ΔGT ve $p47^0$ olmayan KGH hastaları	Sağlıklı Aile Bireyleri
ΔGT Bulunmayan Bireylerin sayısı	0	20	25
ΔGT Bulunan Bireylerin sayısı	15	4	3

Tablo 4.10. KGH hasta ve aile bireylerinde $\Psi NCF1/NCF1$ gen oranlarının sayı ve yüzde olarak dağılımı

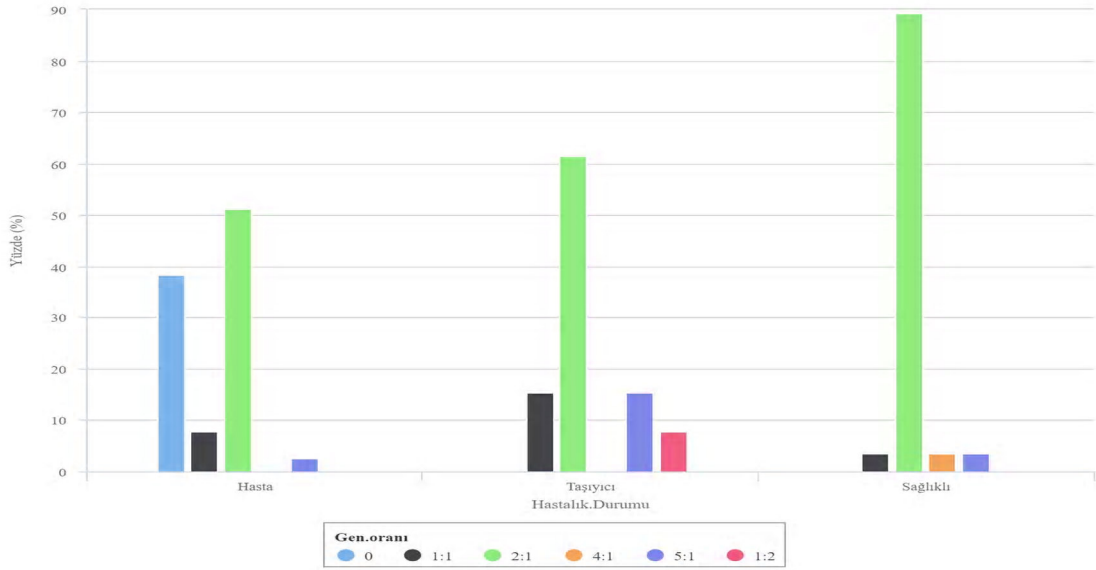
n %	$\Psi NCF1/NCF1$ Gen Oranları						
	Fenotip	0	2:1	1:1	4:1	5:1	1:2
KGH(ΔGT -p47⁰) (ΔGT defekti olan hasta ve aile bireyleri)	Hasta (n=15)	15 %100	0	0	0	0	0
	Taşıyıcı (n=3)	0	1 %33	0	0	2 %67	0
	Sağlıklı (n= 3)	0	2 %67	0	0	1 %33	0
KGH Hasta Grubu (ΔGT defekti olmayan hasta ve aile bireyleri)	Hasta (n= 24)	0	20 %83	3 %13	0	1 %4	0
	Sağlıklı (n= 35)	0	30 %85	3 %9	1 %3	0	1 %3

ΔGT bulunmayan KGH hasta ve aile bireylerinin %16'sında ΔGT taşıyıcılığı saptandı.. Kontrol grubu dışında kalan KGH hastalarının sağlıklı aile bireylerinde heterozigot ΔGT taşıyıcılığı oranı %10 olarak bulundu. Kontrol grubu dahil 48 kişiden oluşan tüm sağlıklı popülasyonda %12 oranında heterozigot ΔGT taşıyıcılığı saptandı. ΔGT bulunduran (DelGT) ve ΔGT bulundurmayan KGH hasta ve aile bireyleri (sağlıklı ve taşıyıcılar) arasındaki ilişki Şekil 4.5' da verildi.



Şekil 4.5. Δ GT bulunduran (DelGT) ve Δ GT bulundurmeyen KGH hasta ve aile bireyleri (sağlıklı ve taşıyıcılar) arasındaki ilişki

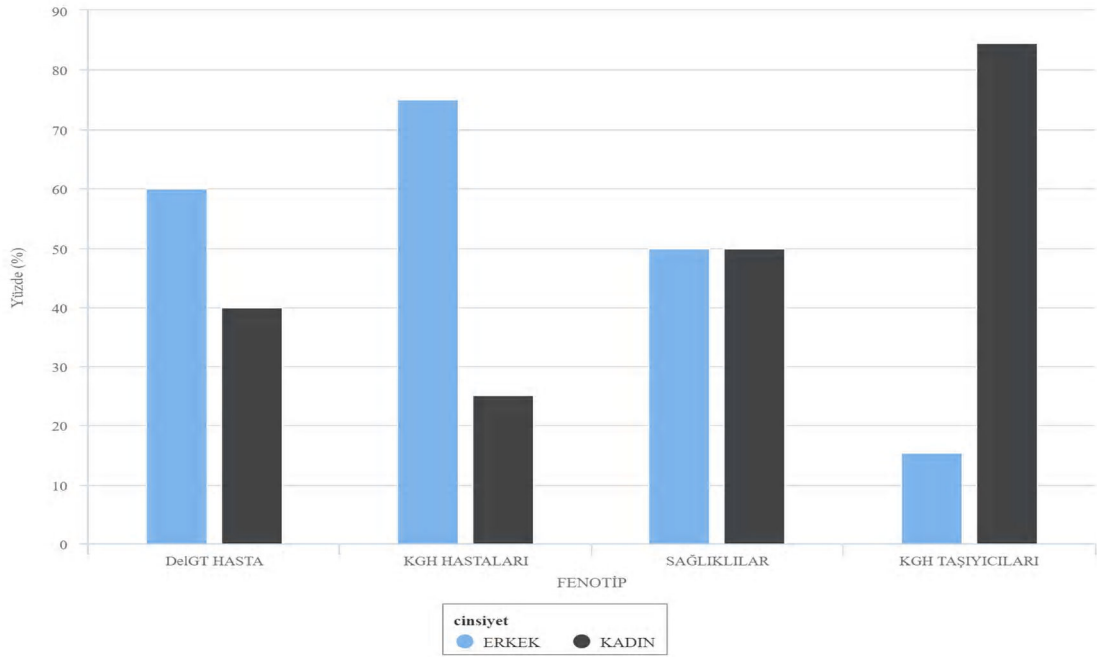
Ayrıca Δ GT bulunmayan KGH hasta ve aile bireylerinde %16 olarak bulunan taşıyıcılık yüzdesinde en sık görülen gen oranının 1:1 (%15.4) ve 5:1 (%15.4) olduğu 4:1 oranının ise en az görülen (%3.6) taşıyıcılık oranı olduğu görüldü. Taşıyıcılık oranlarının dışında literatürde sağlıklı gen oranı olarak belirtilen 1:2 oranı yalnızca KGH taşıyıcısı bir bireyde görüldü ve KGH taşıyıcıları içinde görülme yüzdesi %7.7, tüm KGH hasta ve aile bireyleri içinde görülme sıklığı ise %1.25 olarak bulundu. Fragment analizi sonucunda saptanan gen oranları ve KGH hasta ve aile bireyleri arasındaki ilişki Şekil 4.6' de verildi.



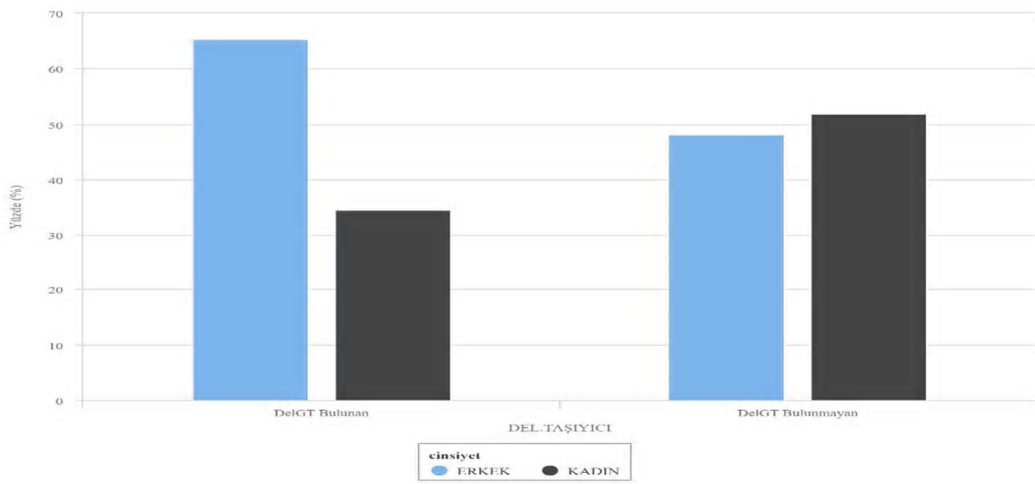
Şekil 4. 6. KGH hasta ve aile bireyleri ile Ψ NCF1/ NCF1 gen oranları arasındaki ilişki

4.4.2. Ψ NCF1/ NCF1 Gen Oranlarının Cinsiyetlere Göre Dağılımı

20 kontrol ve 80 hasta grubundan meydana gelen çalışma grubu toplam 57 erkek, 43 kadından oluştu. Fragment analiz sonuçlarına göre belirlenen Ψ NCF1/ NCF1 gen oranlarına göre erkek ve kadınlardaki sağlıklı, taşıyıcı ve hasta olarak nitelendirilen gen oranlarının ki- kare istatistiksel analizi sonucunda çalışma grubunda yer alan kategoriler arasında cinsiyetleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulundu (SD=3, $p < 0.006$). Δ GT bulunduran bireyler ile Δ GT bulundurmayan bireyler cinsiyetleri bakımından karşılaştırıldı fakat anlamlı bir ilişki bulunmadı. Çalışma grubunda yer alan bireylerin cinsiyetlere göre dağılımları Şekil 4.7 ve Şekil 4.8' de gösterildi.

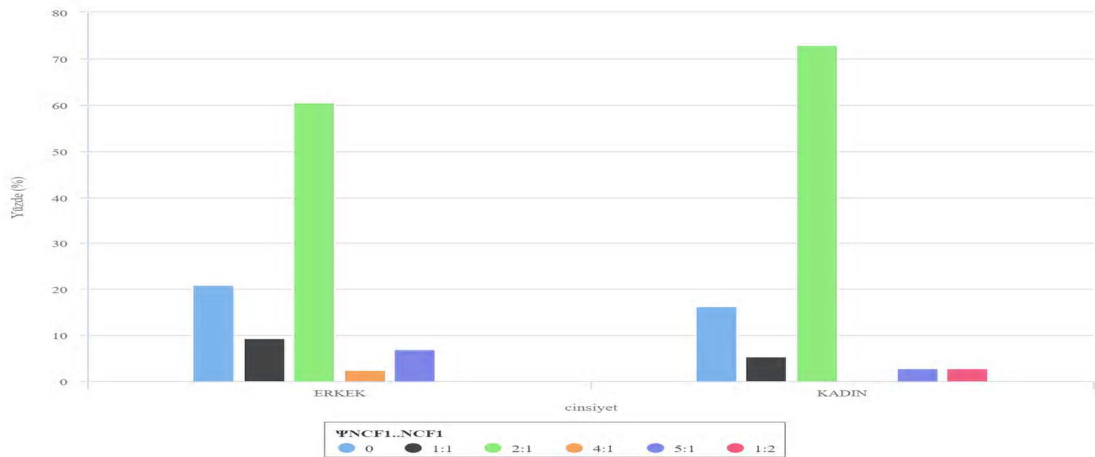


Şekil 4. 7. Çalışma grubunda bulunan erkek ve kadın bireylerin yüzdeler oranları



Şekil 4. 8. ΔGT bulunduran ve ΔGT bulundurmeyen bireylerin cinsiyete göre dağılımları

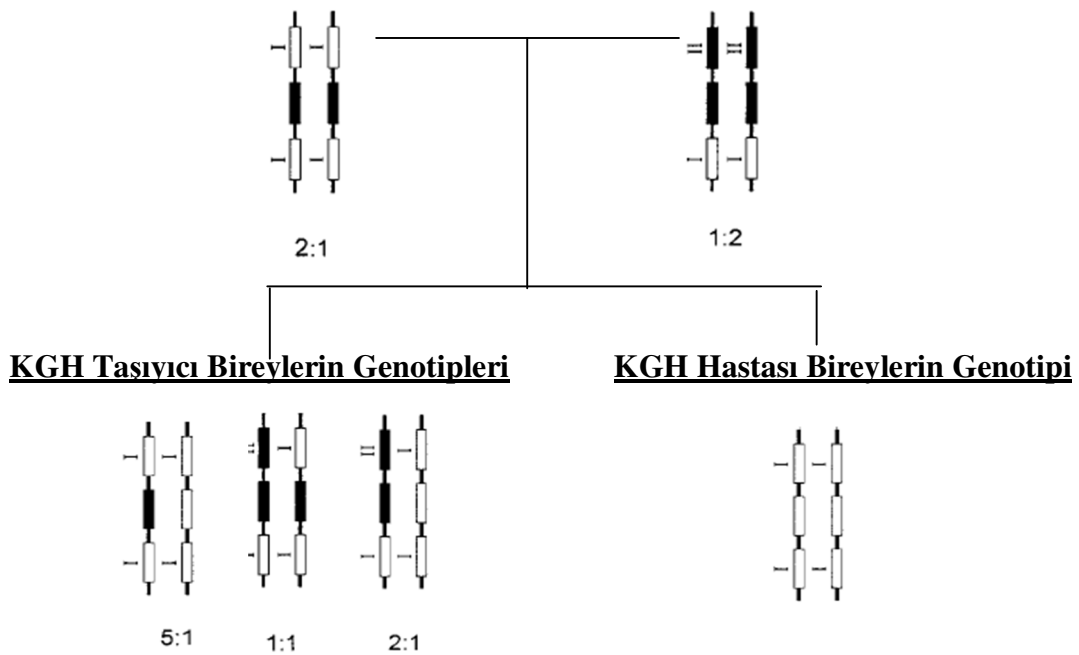
Gen oranları ve cinsiyet dağılımlarının karşılaştırmalı ki- kare analizinde gen oranları ile cinsiyetler arasında anlamlı bir ilişki bulunmadı ($SD=5$, $p=0.576$). Gen oranlarının cinsiyetlere göre dağılımını gösteren grafik Şekil 4.9' de verildi.



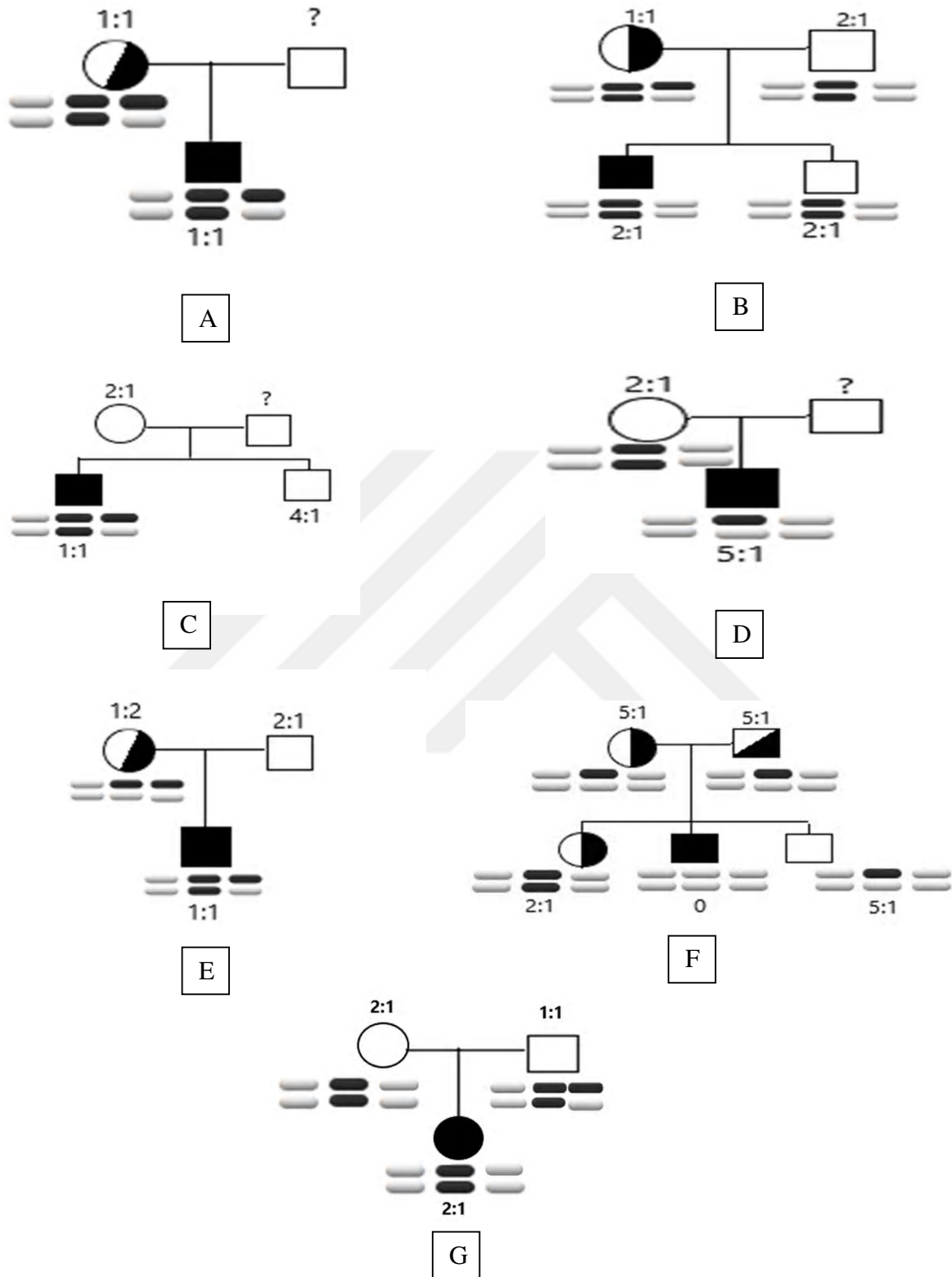
Şekil 4.9. $\Psi NCF1/NCF1$ gen oranlarının cinsiyetlere göre dağılımı

Fragment analizi sonucunda *NCF1* ekzon 2 ΔGT taşıyıcısı olarak saptanan KGH hasta ve aile bireylerin genotipleri belirlendi. KGH' da görülebilen sağlıklı, taşıyıcı ve hasta genotip oranları Şekil 4.10' de gösterildi. Ayrıca hastalığın kalıtım şekli tespit edildi. KGH hasta ve aile bireylerinin fragment analizi sonucu oluşturulan soy ağaçları Şekil 4.11' de verildi.

Sağlıklı Bireylerin Genotipleri



Şekil 4.10. Sağlıklı bireylerde ve KGH hastalarında görülebilen genotip (Siyah; normal gen, Beyaz; psödogen)



Şekil 4.11. Çalışma grubunda fragment analizi sonucunda X-KGH (A ve E), p470-OR-KGH (B,C, D ve F) ve p670-p220-OR-KGH (G) hasta ve aile bireylerinde bulunan gen oranlarının ve kalıtım şekillerinin gösterimi. (○ : Sağlıklı kadın, ◐ : Taşıyıcı kadın, ● : Hasta kadın, □ : Sağlıklı erkek, ◑ : Taşıyıcı erkek ve ■ : Hasta erkek)

5. TARTIŞMA- SONUÇ ve ÖNERİLER

Kronik Granülatöz Hastalık, kişinin yaşamının ilk yıllarında ortaya çıkan, fagositer hücrelerde ROS bağımlı öldürmeyi gerçekleştiren NADPH oksidaz enzimini oluşturan komponentlerin eksikliğine bağılı olarak ortaya çıkan bir hastalıktır (Heyworth ve ark., 2003). Kronik Granülatöz Hastalık, Avrupa’ da 1/250.000 oranında insidansa sahip olduğu belirlenmişken bu oran akraba evliliğı ve etnik köken gibi faktörlere bağılı olarak değışmektedir (Köker, 2009; Winkelstein, Marino, Johnstone ve ark., 2000).

Ülkemizde, KGH konusundaki çalışmalara ilk odaklanma 2006 yılında Hacettepe Üniversitesi’ nde Dr. Köker tarafından yazılan doktora tezi ile başlamıştır. Hastalığın toplumumuzdaki yerini belirlemek için Köker ve ark. 2007 yılında *Eur J of Clin Invest* dergisinde yayınlanan kapsamlı bir çalışmada ülkemizden 12 çocuk hastada KGH hastalığına neden olan mutasyonları ve ilgili genleri açıklamıştır. Bu çalışmayı farklı kılan husus *CYBB* ve *NCF2* genlerinde iki farklı mutasyonun saptanması ve OR-KGH oluşumunda temel nedenin akraba evliliklerinin olduğunun gösterilmesidir (Köker ve ark., 2007).

KGH alanında ülkemizde yapılan en kapsamlı çalışma Köker ve ark. 2013 yılında 73 Türk ailesi içinden 89 KGH hastasının moleküler tanıları gösteren çalışmadır. Çok merkezli olarak yürütölen bu çalışmada, ülkemizdeki KGH hastalarını, genetik, fonksiyonel ve klinik açıdan tanımlamıştır (Köker ve ark., 2013). Çalışmada, Ülkemizde KGH hastalarının %60 ının hastalığın OR-KGH formundan olduğunun da sebebinin homozigot mutasyonlara yol açan akraba evliliklerinden kaynaklandığı gösterilmiştir (Köker ve ark., 2013).

Ülkemizde KGH alanındaki çalışmalardünyadakiçalışmalarla paralel olarak devam etmektedir. Son yıllarda özellikle p47^{phox} proteindefekti gibi OR-KGH ile ilişkili tanısal çalışmalar sık görülmektedir. Bunun sebebi p47^{phox} proteinini kodlayan *NCF1* geninin kendiyile %99 homolog iki adet psödogene sahip olması ve hastalığa sebep olan mutasyonun bu psödogen oluşumuna bağlı gelişmesive Sanger tanı yönteminin yetersizliğinden kaynaklanmaktadır.

1997 yılında Görlach ve arkadaşlarının *NCF1* geninin psödogenlere sahip olduğunu tespit etmesinden sonra p47^{phox} proteini eksikliğine sebep olan mutasyonların anlaşılması daha kolay bir hal almıştır. Görlach ve arkadaşları bu çalışmada *NCF1* geninin 2. ekzonun başlangıç bölgesinde GT baz çiftlerinin eksikliğini bakteriyofajlarla yaptıkları deneylerde tespit etmişler ve sonuçların ancak orijinal genle yüksek derecede homolog bir psödogenden kaynaklandığını öne sürmüşlerdir(Görlachve ark.,1995).

NCF1 geninde psödogenlerin bulunuşu bu genin genomik yapısı hakkında merak uyandırmış ve bu yöndeki çalışmaların artmasına sebep olmuştur. *NCF1* genin genomik yapısını Chanock ve arkadaşları 2000 yılında yaptıkları çalışma ile detaylı bir şekilde açıklamışlardır. Bu çalışmada *NCF1* geninin kendisine komşu iki adet psödogen içerdiği, intron ve ekzon sayıları, nükleotid dizileri ile birlikte genin sık tekrarlanan Aluaminoasitini kodlayan fragmentler içerdiğini belirtmişlerdir (Chanock ve ark., 2000). Chanock ve arkadaşları bu çalışmalarlarıyla bu alanda çalışan araştırmacılara ışık tutmuştur.

NCF1 geninin genomik yapısı ve içerdiği psödogenlerin bulunmasıyla ardından p47^{phox} proteinin eksiliğine sebep olan mutasyonlarmoleküler olarak daha net olarak tespit edilebilir hale gelmiştir. Bizim çalışmamıza konu olan *NCF1* geninde bulunan GT delesyon mutasyonunu ilk kez 1991 yılında Casimir ve arkadaşları RNA dan sekans yöntemiyle tespit etmişlerdir (Casimir ve ark.,1991).

Roos ve arkadaşları 9 KGH ailesi ile yaptıkları kapsamlı bir çalışmada 5:1 oranına sahip hasta bireyin ebeveynlerinden birinin de bizim çalışmamızda saptadığımız gibi 5:1 oranına diğerinin ise 2:1 oranına sahip olduklarını göstermişlerdir. Bu durumun, ebeveynlerden birinin hasta çocuğa, 3 psödogen içeren bir *NCF1* allelini diğer ebeveynin ise mutant *NCF1* geni ile sağlam *NCF1* alleli vermiş olduklarından kaynaklandığını ileri sürmüşlerdir (Roos ve ark., 2006).

Biz yaptığımız çalışmada X-KGH hastanın taşıyıcı annesinde $\Psi NCF1/ NCF1$ gen oranını 1:2 olarak saptadık. Heywort ve arkadaşları, yaptıkları çalışma da 44 birey arasında 2 bireyde 1:2 $\Psi NCF1/ NCF1$ gen oranını bulmuşlardır. Böyle bir oranın çıkmasını fonksiyonel gen ile psödogenler arasında gerçekleşen crossing over sonucu 2. ekzonun başlangıcında GT dizisinden ziyade GTGT içeren bir psödogenin sırasıyla bir heterozigot ve homozigot durumda bulunmasıyla açıklamışlardır. Ayrıca bu şekilde başlangıçta GT yerine GTGT içeren psödogenleri tip 2 psödogen olarak tanımlamışlardır ve böyle genlere füzyon gen adını vermişlerdir. Biz de çalışmamızda Heywort ve arkadaşlarının bulduğu oranda (1:2) füzyon gen bulduran bir birey tespit ettik.

Bu çalışma gösteriyor ki, crossingover ile mutasyona uğramış $NCF1$ geni baskın $p47^{phox}$ defekti olan KGH allelihaline gelmektedir ve bu haplotipin varlığı, $\Psi NCF1/ NCF1$ gen oranı 5:1 olan taşıyıcılarla gen oranı 2:1 olan sağlıklı bireylerin ayırımında zorluk çıkarmaktadır. Keza yapılan çalışmada da 5:1 $\Psi NCF1/ NCF1$ sekansını gösteren bireylerin 2:1 gen oranına sahip oldukları tespit edilmiştir. Yaptığımız çalışmada ise fragment analizi ile 5:1 oranına sahip bireyler ayırıcı analizler kullanılmadığından taşıyıcı/ sağlıklı ayırımı yapılmaksızın taşıyıcı olarak değerlendirilmiştir. Hewwort ve arkadaşları $NCF1$ psödogen/gen kimerasının sonucu ortaya çıkan normal popülasyondaki taşıyıcılık oranını %10 olarak bulmuşlardır. Bizim yaptığımız çalışmada ise normal popülasyondaki taşıyıcılık oranını %12 olarak tespit ettik (Heyworth ve ark.,2017). Bizim çalışmamızda denek sayısı sınırlı olmasına rağmen bu alanda ülkemizde yapılan ilk araştırmadır. Elde ettiğimiz taşıyıcı yüzdesi önceki araştırmacıların verileri ile örtüşmektedir.

Fragment analizinin yanında $\Psi NCF1/ NCF1$ gen oranlarını daha güçlü bir şekilde ortaya koymak amacıyla PCR- RFLP, MLPA ya da Droplet PCR gibi destekleyici ve tanıyı kuvvetlendirici yöntemlerle de çalışmalar yürütülmüş ve sonuç olarak da farklı gen oranları tespit edilmiştir. De Boer ve arkadaşlarının Aşkenazi Yahudilerle yaptıkları çalışma sonucunda fragment analizi dışındaki Sanger's sekanslama ve MLPA yöntemi gibi moleküler yöntemler kullanarak daha önce tanımlanmamış bir mutasyon (C. 579G> A) tespit etmişlerdir. Bu çalışmada $p47^{phox}$ defekti taşıyıcısı olarak bilinen aşkenazi bir çift ve bebekleri (fetus) ile yapılan analiz sonucunda ebeveynlerin 3:3 (1:1) $\Psi NCF1/ NCF1$ gen oranında taşıyıcı oldukları

bebeklerinin ise 2:1 sağlıklı orana sahip olduklarını saptamışlardır. Biz yaptığımız çalışmada ise De Boer ve arkadaşlarının buldukları 3:3 (1:1) gen oranına, kontrol grubu olarak seçtiğimiz bireylerinizünde, KGH hastası bireylerin üçünde, KGH hastalarının sağlıklı aile bireylerin yalnızca birinde rastladık. De Boer ve ekibine göre ortaya çıkan 3:3 oranı *NCF1* geninin 5' kısmı ile bir psödogenin 3' kısmının yer değiştirmesinden kaynaklanmaktadır. Aynı çalışmada ilaveten yapılan analizlerde De Boer ve arkadaşları 8 taşıyıcıda 3:3 (1:1) oranı bir bireyde ise füzyon gen tespit etmişlerdir (De Boer ve ark., 2018). Bu çalışmaya paralel olarak bizim çalışmamızda da 3 taşıyıcı bireyde 1:1 oranı ve bir X-KGH hastasında füzyon gen (1:2 oranı) tespit ettik.

Kuhns ve arkadaşları Sanger'ssekanslamaya ek olarak GT delesyonu taşıyan hasta ve taşıyıcıların genotiplerini belirlemek için kendi geliştirdikleri droplet PCR metodu ile $p47^{phox}$ defekti olan OR-KGH hastalarının %84' ünün homozigot GT delesyonu içerdiklerini, sağlıklılarında %79.2' sinde 2/6 oranında iki kopya GTGT, %14.7' sinde 3/6 ve %1.6' sında 4/6 oranında GTGT kopyası bulunduğunu gösteren farklı oranlar saptamışlardır (Kuhns ve ark., 2019). Kuhns ve ekibinin tespit ettiği farklı oranların bulunduğu bir başka çalışmayı 2010 yılında Brunson ve arkadaşları 86 normal popülasyonla yapmış ve sonuç olarak 4 bireyde 5:2 gen oranına, 18 bireyde 2:1 oranına, 23 bireyde 3:2 oranına ve 3 bireyde ise 1:1 oranına rastlamışlardır (Brunson ve ark., 2010).

Çalışmamızda kontrol grubu da dahil KGH hastaların aile bireylerinden hastalığı taşımayan 48 sağlıklı bireyin 6'sında (%12) oranında GT delesyonu taşıyıcılığı tespit ettik. 39 KGH hastasının 3'ünün (%7) 1:1 oranına sahip GT delesyonuna bağlı $p47^{phox}$ defekti taşıyıcısı olduğunu saptadık. Taşıyıcı bireyler arasında en sık rastlanan $\Psi NCF1/NCF1$ gen oranının Wrona ve Roos'un çalışmalarına olduğu gibi 5:1 olduğunu gözlemledik (Wrona ve ark., 2019; Roos ve ark., 2006). Heywort ve arkadaşlarının Sanger'ssekanslama ile yaptıkları çalışmada 5:1 sekansına sahip taşıyıcı bireylerin %10 nun aslında 2:1 $\Psi NCF1/NCF1$ gen oranına sahip olduklarını görmelerine karşılık biz fragment analizi ile bu ayrıma varamadık. Ancak Heywort ve arkadaşlarının normal popülasyonda görülme sıklığının %10 olarak belirttiği ve sağlıklı olarak nitelendirdikleri 1:2 gen oranını biz normal popülasyonda değil X-KGH taşıyıcısı bir annede saptadık (Heywort ve ark., 2017).

Çalışmamızın neticesinde, Avrupa ve Asya' da yürütülen tüm bu çalışmaların yanı sıra ülkemizde Türk toplumda sağlıklı bireyler arasında %12 GT delesyonu taşıyıcılığı tespit ettik. Etnik kökene ya da ırklara bağlı olarak ΔGT taşıyıcılığının değişebildiği gösterildi. Ayrıca *NCF1* ve psödogenleri arasında oluşan crossingover sonucunda meydana gelen füzyon geni içeren alleli taşıyan 1:2 gen oranına sahip sağlıklı bireylerin bulunma sıklığının %1 olduğunu saptandı. Ayrıca KGH tanısı bulunan bireylerin sahip olabileceği genotip şekilleri belirlendi. Heywort ve arkadaşlarının sağlıklı olan bireylerde bulunduğu 1:2 gen oranı biz KGH taşıyıcısı bir hastada fragment analizi ile tespit ettik. Gen ve psödogenler arasındaki crossingover olayına bağlı olarak farklı $\Psi NCF1/ NCF1$ gen oranlarına sahip fenotiplerin görülebildiği saptandı. Ayrıca hem hastalar hem de ailelerin çalışmaya katılmasıyla hastalığın kalıtım şekilleri ortaya çıkarıldı. $\Psi NCF1/ NCF1$ oranlarının saptanması dışında yalnızca X-KGH hastalarının bir tanesinde psödogen fragment boyutunun fonksiyonel gene oranla artmış olduğu fragment analiziyle tespit edilebildi. Bu durumun bize işlenmiş psödogenlerin sonradan fonksiyonel füzyon genlere dönüşebileceği kanaatini ortaya çıkarmakla birlikte fragment analizinin psödogenlerin fonksiyonel genlere dönüşümünün gösterilmesinde de uygulanabilecek bir yöntem olabileceğini gösterdi.

Çalışmamızda, dizi analizi gibi analiz öncesi karmaşık ve uzun protokollere gerek kalmadan, DNA pürifikasyonu yapmadan fragment analizi yaptık. Bu analiz yöntemini GT delesyonu içeren psödogenlerintespitinde ve gerçek fonksiyonel genile arasındaki ilişkinin (crossingover gibi) ortaya çıkarılmasında kullandık. Fragment analizi ile zamandan tasarruf ederek daha hızlı ve ucuz GT delesyonuna bağlı $p47^{phox}$ defekti olan otozomal KGH hastalarının tanısını koyabildik. Çalışmanın neticesinde fragment analizinin tanıyı güçleştiren psödogenlere sahip özel genlerin, içerdiği mutasyonların tespitinde efektif olarak kullanılabilir pratik bir yöntem olduğunu tespit ettik. Bu yöntemle psödogen/ gen oranlarından başka çalışmamızda gözlemlediğimiz gibi bazı işlenmiş psödogenlerin fragment boyutlarına bağlı olarak fonksiyonel gene dönüşümlerini de göstermenin mümkün olabileceğini saptadık.

Bu çalışma, özellikle heterozigot ΔGT taşıyıcılığın toplumda yaygınlığının bilinmesine ışık tutmuştur. Ayrıca bu çalışma ile KGH tanısız çalışmalarında, heterozigot ΔGT taşıyıcılığının göz önünde bulundurulması gerektiği anlaşıldı. KGH homozigot ΔGT bulunan hastalar ile heterozigot ΔGT taşıyıcısı olan bireylerin ayırımında fragment analizinin ideal bir yöntem olarak kullanılabilirdiği anlaşıldı.

Fragment analizi dışında son zamanlarda geliştirilen yeni yöntemler ve yaklaşımlar da mevcuttur. Bunlar arasında real time PCR yöntemine dayalı çeşitli PCR metodları geliştirilip kullanılabilir (Wrona ve ark., 2019). Özellikle *NCF1* geni gibi psödogenlere sahip olan özel genler için eş zamanlı ve daha hızlı tanı koymaya yardımcı farklı real time PCR uygulamaları ile ilgili yaklaşımlar geliştirilebilir.



6.KAYNAKLAR

- Al-Zadjali S, Al-Tamemi S, Elnour I, AlKindi S, Lapoumeroulie C, Al-Maamari S, Pathare A, Dennison D, Krishnamoorthy R. Clinical and molecular findings of chronic granulomatous disease in Oman: family studies. *Clin Genet*, 2015; 87, 185-189.
- Arnold DE, Heimall JR. A Review of Chronic Granulomatous Disease. *Adv Ther*, 2017; 34, 2543-2557.
- Babior B, Lambeth J, Nauseef W. The neutrophil NADPH oxidase, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2002; 397, 342-344.
- Baehner RL, Nathan DG. Leukocyte oxidase: defective activity in chronic granulomatous disease. *Science*, 1967; 155, 835-836.
- Balakirev ES, Ayala FJ. Pseudogenes: are they “junk” or functional DNA? . *Annual Review of Genetics*, 2003; 37, 123-151.
- Baldrige C, Gerard RW. The extra respiration of phagocytosis. *Am j physiol*, 1932; 103, 235-236.
- Bánfi B, Clark RA, Steger K, Krause KH. Two novel proteins activate superoxide generation by the NADPH oxidase NOX1. *Journal of Biological Chemistry* 2003; 278, 3510-3513.
- Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*, 2007; 87, 245-313.
- Ben-Farhat K, Ben-Mustapha I, Ben-Ali M, Rouault K, Hamami S, Mekki N, Benchhida A, Larguèche B, Fitouri Z, Abdelmoula S, Khemiri M, Guedishe MN,

- Boukthir S, Barsaoui S, Chemli J, Barbouche MR. A founder effect of c. 257+2T> C mutation in NCF2 gene underlies severe chronic granulomatous disease in eleven patients. *J Clin Immunol*, 2016; 36, 547-554.
- Bentli E. NADPH oksidazın bazı fonksiyonel analiz testleri ve X'e bağlı kronik granülomatöz hastalık tanısında moleküler testlerle uygulaması. Yüksek liisans tezi, Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kayseri, 2018: 35-40.
- Bischof JM, Chiang AP, Scheetz TE, Stone EM, Casavant TL, Sheffield VC, Braun TA. Genome-wide identification of pseudogenes capable of disease-causing gene conversion. *J Human Mutation*, 2006; 27, 545-552.
- Björkman U, Ekholm R. Generation of H₂O₂ in isolated porcine thyroid follicles. *J Endocrinology* 1984; 115, 392-398.
- Brunson T, Wang Q, Chambers I, Song Q. A copy number variation in human NCF1 and its pseudogenes. *J BMC*, 2010; 11, 13.
- Cabanillas D, Regairaz L, Deswarte C, García M, Richard ME, Casanova JL, Bustamante J, Perez L. Leukocyte adhesion deficiency type 1 (LAD1) with expressed but nonfunctional CD11/CD18. *J Clin Immunol*, 2016; 36, 627-630.
- Casimir CM, Bu-Ghanim HN, Rodaway AR, Bentley DL, Rowe P, Segal AW. Autosomal recessive chronic granulomatous disease caused by deletion at a dinucleotide repeat. *J PNAS*, 1991; 88, 2753-2757.
- Chanock SJ, Roesler J, Zhan S, Hopkins P, Lee P, Barrett DT, Christensen BL, Curnutte JT, Görlach A. Genomic structure of the human p47-phox (NCF1) gene. *J BC, Molecules and Diseases*, 2000; 26, 37-46.
- Condino-Neto A, Newburger PE. Interferon-gamma improves splicing efficiency of CYBB gene transcripts in an interferon-responsive variant of chronic granulomatous disease due to a splice site consensus region mutation. *J Blood*, 2000; 95, 3548-3554.
- Condino-Neto A, Whitney C, Newburger PE. Dexamethasone but not indomethacin inhibits human phagocyte nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase activity by down-regulating expression of genes encoding oxidase components. *J Immunol*, 1998; 161, 4960-4967.

- Connelly JA, Marsh R, Parikh S, Talano J. Allogeneic hematopoietic cell transplantation for chronic granulomatous disease: controversies and state of the art. *J PIDS*, 2018; 7, S31-S39.
- Crockard A, Thompson J, Boyd N, Haughton D, McCluskey D, Turner C. Diagnosis and carrier detection of chronic granulomatous disease in five families by flow cytometry. *Int Arch Allergy Immunol*, 1997; 114, 144-152.
- D'Errico I, Gadaleta G, Saccone C. Pseudogenes in metazoa: origin and features. *JBIFG*, 2004; 3, 157-167.
- De Boer M, Gavrieli R, van Leeuwen K, Wolf HR, Dushnitzki M, Bar-Yosef Y, Bar-Ziv A, Behar D, Lipitz S, Miller TE. A false-carrier state for the c. 579G> A mutation in the NCF1 gene in Ashkenazi Jews. *J BMJ*, 2018; 55, 166-172.
- De Boer M, Singh V, Dekker J, Di Rocco M, Goldblatt D, Roos D. Prenatal diagnosis in two families with autosomal, p47phox-deficient chronic granulomatous disease due to a novel point mutation in NCF1. *J Pd*, 2002; 22, 235-240.
- De Boer M, Tzur S, van Leeuwen K, Dencher PC, Skorecki K, Wolach B, Gavrieli R, Nasidze I, Stoneking M, Tanck MW, Roos D. A founder effect for p47(phox)Trp193Ter chronic granulomatous disease in Kavkazi Jews. *Blood Cells Mol Dis*, 2015; 55, 320-7.
- De Ravin SS, Naumann N, Cowen EW, Friend J, Hilligoss D, Marquesen M, Balow JE, Barron KS, Turner ML, Gallin J. Chronic granulomatous disease as a risk factor for autoimmune disease. *J ACI*, 2008; 122, 1097-1103.
- De Ravin SS, Reik A, Liu P-Q, Li L, Wu X, Su L, Raley C, Theobald N, Choi U, Song AH. Targeted gene addition in human CD34+ hematopoietic cells for correction of X-linked chronic granulomatous disease. *J Nature Biotechnology*, 2016; 34, 424.
- Dekker J, de Boer M, Roos D. Gene-scan method for the recognition of carriers and patients with p47phox-deficient autosomal recessive chronic granulomatous disease. *J Experimental Hematology*, 2001; 29, 1319-1325.
- Demaurex N, Nunes P. The role of STIM and ORAI proteins in phagocytic immune cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2016; 310, C496-508.

- Dinauer MC. Primary immune deficiencies with defects in neutrophil function. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*,2016; 2016, 43-50.
- Doan T, Melvold, R., Viselli, S., Waltenbaugh, C. 2014. *Immunology*, İstanbul, Nobel Tıp Kitapevleri.
- Dorman SE, Guide SV, Conville PS, DeCarlo ES, Malech HL, Gallin JI, Witebsky FG .Holland SM. Nocardia infection in chronic granulomatous disease.*JCid*, 2002; 35, 390-394.
- El-Benna J, Dang PM, Gougerot-Pocidallo MA & Elbim C. Phagocyte NADPH oxidase: a multicomponent enzyme essential for host defenses. *Arch Immunol TherExp. (Warsz)*, 2005; 53, 199-206.
- El Hassani RA, Benfares N, Caillou B, Talbot M, Sabourin J-C, Belotte V, Morand S, Gnidehou S, Agnandji D, Ohayon L. Dual oxidase2 is expressed all along the digestive tract. *J Mucosal Biology*, 2005; 288, G933-G942.
- El Hawary R, Meshaal S, Deswarte C, Galal N, Abdelkawy M, Alkady R, Elaziz DA, Freiburger T, Ravcukova B, Litzman J. Role of flow cytometry in the diagnosis of chronic granulomatous disease: the Egyptian experience. *J Clin Immunol*2016; 36, 610-618.
- Ellegren H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nat Rev Genet*, 2004; 5, 435-45.
- Emmendorffer A, Nakamura M, Rothe G, Spiekermann K, Lohmann-Matthes ML, Roesler J. Evaluation of flow cytometric methods for diagnosis of chronic granulomatous disease variants under routine laboratory conditions. *J Cytometry*, 1994; 18, 147-155.
- Ezekowitz R, Orkin SH, Newburger PE. Recombinant interferon gamma augments phagocyte superoxide production and X-linked chronic granulomatous disease gene expression in X-linked variant chronic granulomatous disease. *J Clin Immunol*,1987; 80, 1009-1016.
- Filiz S, Kocacik D, Yeğın O. Kronik granüloamatöz hastalık. *Turk J Immunol*,2013; 1, 22-31.

- Flannagan RS, Jaumouille V, Grinstein S. The cell biology of phagocytosis. *Annu Rev Pathol*, 2012; 7, 61-98.
- Forteza R, Salathe M, Miot F, Forteza R, Conner GE. Regulated hydrogen peroxide production by Duox in human airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2005; 32, 462-469.
- Gallin JI, Alling DW, Malech HL, Wesley R, Koziol D, Marciano B, Eisenstein EM, Turner ML, DeCarlo ES, Starling JM. Itraconazole to prevent fungal infections in chronic granulomatous disease. *N Engl J Med*, 2003; 348, 2416-2422.
- Gansner JM, Berliner N. Disorders of Phagocytic Function: Diagnosis and Treatment. *Nonmalignant Hematology*, 2016:585-594.
- Gardiner DJ, Deffit SN, McLetchie S, Perez L, Walline CC, Blum CS. A role for NADPH oxidase in antigen presentation, *Front. Immunology*, 2013; 4, 295
- Gaziev A, Shaikhaev G. Nuclear mitochondrial pseudogenes. *JMB*, 2010; 44, 358-368.
- Gennery A. Recent advances in understanding and treating chronic granulomatous disease. *JF*, 2017; 6.
- Gordon S. Phagocytosis: an immunobiologic process. *J Immuni*, 2016; 44, 463-475.
- Gorlach A, Roesler J, Hopkins P, Christensen B, Lee P, Green E, Chanock S, Curnutte J. The p47-phox gene has a pseudogene carrying the most common mutation for p47-phox deficient chronic granulomatous disease. *Blood*, 1995:1027-1027.
- Gutte R, Holmukhe S, Garg G, Kharkar V, Khopkar U. Childhood granulomatous periorificial dermatitis in children with extra-facial involvement. *I JDVL*, 2011; 77, 703.
- Harper LV, Hilton AC, Jones AF. RT-PCR for the pseudogene-free amplification of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene (gapd). *Molecular and Cellular Probes*. 2003; 17, 261-265.
- Hayrapetyan A, Dencher PC, van Leeuwen K, de Boer M, Roos D. Different unequal cross-over events between NCF1 and its pseudogenes in autosomal p47(phox)-

- deficient chronic granulomatous disease. *Biochim Biophys Acta*, 2013a; 1832, 1662-72.
- Hayrapetyan A, Dencher PC, Van Leeuwen K, de Boer M, Roos D. Different unequal cross-over events between NCF1 and its pseudogenes in autosomal p47phox-deficient Chronic Granulomatous Disease. *J BBA Molecular Basis of Disease*. 2013b; 1832, 1662-1672.
- Heather JM, Chain B. The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics*, 2016; 107, 1-8.
- Heerebeek VL, Mehischl C, Stooker W, Meijer CJLM, Niessen HWV, Roos D. NADPH oxidase(s): new source(s) of reactive oxygen species in the vascular system?. *J C Lin Paht*, 2002.
- Heyworth PG, Cross AR, Curnutte JT. Chronic granulomatous disease. *JT Curnutte* 2007; 15, 578-584.
- Holland SM. Chronic granulomatous disease. *J Cria and immunology*, 2010; 38, 3-10.
- Holley RW, Everett GA, Madison JT, Zamir AJ. Nucleotide sequences in the yeast alanine transfer ribonucleic acid. *JoBC1*, 1965; 240, 2122-2128.
- Horton MA, Larson KA, Lee JJ, Lee NA. Cloning of the murine eosinophil peroxidase gene (mEPO): characterization of a conserved subgroup of mammalian hematopoietic peroxidases. *J LB*, 1996; 60, 285-294.
- Huang D, Tocmo R. Assays based on competitive measurement of the scavenging ability of reactive oxygen/nitrogen species. *JMoAA, Trends CR and Applications*. 2018, 21-38.
- Hur K, Kim SH, Kim JM. Potential Implications of Long Noncoding RNAs in Autoimmune Diseases. *Immune Netw*. 2019; 19.
- Jacq C, Miller J, Brownlee G. A pseudogene structure in 5S DNA of *Xenopus laevis*. *J C*, 1977; 12, 109-120.
- Janeway CA, Craig J, Davidson M, Downey W, Gitlin D. Hypergammaglobulinemia associated with severe recurrent and chronic nonspecific infection. *Ama american journal of diseases of children*, 1954:388-392.

- Jirapongsananuruk O, Malech HL, Kuhns DB, Niemela JE, Brown MR, Anderson-Cohen M, Fleisher TA. Diagnostic paradigm for evaluation of male patients with chronic granulomatous disease, based on the dihydrorhodamine 123 assay. *JJoA & Immunology C.*, 2003; 111, 374-379.
- Kchouk M, Gibrat JF, Elloumi M. Generations of sequencing technologies: From first to next generation. *JB and Medicine.*2017; 9.
- Keller MD, Notarangelo LD, Malech HL.. Future of care for patients with chronic granulomatous disease: gene therapy and targeted molecular medicine. *J PIDS* 2018; 7, S40-S44.
- Knaus UG, Leto, T.L. 2019. *NADPH Oxidases Methods and Protocols* UK, Springer Science+Business Media.
- Koker MY. The evaluation of dihydrorhodamine 123 assay in chronic granulomatous disease. *Pediatr Infect Dis J*, 2010; 29, 190-1
- Koker MY, Camcioglu Y, van Leeuwen K, Kilic SS, Barlan I, Yilmaz M, Metin A, de Boer M, Avcilar H, Patiroglu T, Yildiran A, Yegin O, Tezcan I, Sanal O, Roos D. Clinical, functional, and genetic characterization of chronic granulomatous disease in 89 Turkish patients. *J Allergy Clin Immunol*, 2013; 132, 1156-1163 e5.
- Koker MY, Sanal O, De Boer M, Tezcan I, Metin A, Ersoy F, Roos D. Mutations of chronic granulomatous disease in Turkish families. *Eur J Clin Invest*, 2007; 37, 589-95.
- Koker MY, Sanal O, de Boer M, Tezcan I, Metin A, Tan C, Ersoy F, Roos D. Skewing of X-chromosome inactivation in three generations of carriers with X-linked chronic granulomatous disease within one family. *Eur J Clin Invest*, 2006; 36, 257-64.
- Koker MY, van Leeuwen K, de Boer M, Celmeli F, Metin A, Ozgur TT, Tezcan I, Sanal O, Roos D. Six different CYBA mutations including three novel mutations in ten families from Turkey, resulting in autosomal recessive chronic granulomatous disease. *Eur J Clin Invest*, 2009; 39, 311-9.

- Köker MY. *Kronik Granülomatöz Hastalık ve Alt Grupların Tanısında DHR 123 Testi ve Anti- NADPH Oksidaz Komponent Antikorların Akım Sitometrik Analizinin Yeri*. Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2006
- Koker M, Metin A, Ozgur TT, de Boer M & Roos D. Prenatal diagnosis of chronic granulomatous disease in a male fetus. *Iran J Allergy Asthma Immunol*, 2009; 8, 57-61.
- Kuhns DB 2019. Diagnostic Testing for Chronic Granulomatous Disease. *NADPH Oxidases*. Springer.
- Kuhns DB, Hsu AP, Sun D, Lau K, Fink D, Griffith P, Huang DW, Priel DAL, Mendez L & Kreuzburg S. NCF1 (p47phox)-deficient chronic granulomatous disease: comprehensive genetic and flow cytometric analysis. *J BA*, 2019; 3, 136-147.
- Kulkarni M, Hule G, de Boer M, van Leeuwen K, Kambli P, Aluri J, Gupta M, Dalvi A, Mhatre S, Taur P, Desai M, Madkaikar M. Approach to Molecular Diagnosis of Chronic Granulomatous Disease (CGD): an Experience from a Large Cohort of 90 Indian Patients. *J Clin Immunol*, 2018; 38, 898-916.
- Ladouceur M, Dastani Z, Aulchenko YS, Greenwood CM, Richards JB. JPg. The empirical power of rare variant association methods: results from sanger sequencing in 1,998 individuals. *J PG*, 2012; 8, e1002496.
- Lawrence JG, Hendrix RW, Casjens S. JTim. Where are the pseudogenes in bacterial genomes? *JTIM*, 2001; 9, 535-540.
- Leavey PJ, Gonzalez-Aller C, Thurman G, Kleinberg M, Rinckel L, Ambruso DW, Freeman S, Kuypers FA, Ambruso DR. A 29-kDa protein associated with p67 phox expresses both peroxiredoxin and phospholipase A2 activity and enhances superoxide anion production by a cell-free system of NADPH oxidase activity. *JBC*, 2002; 277, 45181-45187.
- Levinsky R, Harvey B, Rodeck C, Soothill J. Phorbol myristate acetate stimulated NBT test: a simple method suitable for antenatal diagnosis of chronic granulomatous disease. *JC and immunology*, 1983; 54, 595.

- Lozano ML, Rivera J, Sánchez-Guiu I, Vicente V.. Towards the targeted management of Chediak-Higashi syndrome. *JOJORD*.2014; 9, 132.
- Lublin M, Bartlett DL, Danforth DN, Kauffman H, Gallin JI, Malech HL, Shawker T, Choyke P, Kleiner DE, Schwartzentruber DJ. Hepatic abscess in patients with chronic granulomatous disease. *JAOS*, 2002; 235, 383.
- Lyon M. Lyonization of the X-chromosome. *Br Med J*.1963; 12, 1120-1.
- MacLeod J. The role of oxygen in the metabolism and motility of human spermatozoa. *JAJOP-LC*.1943; 138, 512-518.
- Mahmood T, Yang PC.. Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *JNAJOMS*,2012; 4, 429.
- Malech HL, Choi U, Brenner SJ. Progress toward effective gene therapy for chronic granulomatous disease. *J JID*,2004; 57, S27-8.
- Marciano BE, Rosenzweig SD, Kleiner DE, Anderson VL, Darnell DN, Anaya-O'Brien S, Hilligoss DM, Malech HL, Gallin JI, Holland SM. Gastrointestinal involvement in chronic granulomatous disease. *J P*,2004; 114, 462-468.
- Martire B, Rondelli R, Soresina A, Pignata C, Broccoletti T, Finocchi A, Rossi P, Gattorno M, Rabusin M, Azzari C. Clinical features, long-term follow-up and outcome of a large cohort of patients with chronic granulomatous disease: an Italian multicenter study. *J CI*,2008; 126, 155-164.
- Mattick JS, Makunin IV. Non-coding RNA. *JHMG*.2006; 15, R17-R29.
- 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, Dinanuer 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*, 2009a; 114, 3309-15.
- Matute JD, Arias AA, Wright NA, Wrobel I, Waterhouse CC, Li XJ, Marchal CC, Stull ND, Lewis DB, Steele M. A new genetic subgroup of chronic granulomatous disease with autosomal recessive mutations in p40phox and selective defects in neutrophil NADPH oxidase activity. *J B*, 2009b; 114, 3309-3315.

- Maxam AM, Gilbert W.. A new method for sequencing DNA. *J POTNAOS*,1977; 74, 560-564.
- Merling RK, Sweeney CL, Chu J, Bodansky A, Choi U, Priel DL, Kuhns DB, Wang H, Vasilevsky S, De Ravin SS. An AAVS1-targeted minigene platform for correction of iPSCs from all five types of chronic granulomatous disease. *J MT*, 2015; 23, 147-157.
- Metan G, Keklik M, Dinç G, Pala Ç, Yıldırım A, Saraymen B, Köker MY, Kaynar L, Eser B, Cetin M. Performance of galactomannan antigen, beta-d-glucan, and Aspergillus-lateral-flow device for the diagnosis of invasive aspergillosis. *JJOH and Transfusion B.*, 2017; 33, 87-92.
- Mighell A, Smith N, Robinson P, Markham A. Vertebrate pseudogenes. *J FI*, 2000; 468, 109-114.
- Mortaz E, Azempour E, Mansouri D, Tabarsi P, Ghazi M, Koenderman L, Roos D, Adcock IM. Common Infections and Target Organs Associated with Chronic Granulomatous Disease in Iran. *Int Arch Allergy Immunol*, 2019; 179, 62-73.
- Mousallem T, Urban TJ, McSweeney KM, Kleinstein SE, Zhu M, Adeli M, Parrott RE, Roberts JL, Krueger B, Buckley RH. Clinical application of whole-genome sequencing in patients with primary immunodeficiency. *JJOA& Immunology C.*, 2015; 136, 476-479. e6.
- Mukherjee S, Thrasher A. Gene therapy for PIDs: progress, pitfalls and prospects. *J JG*, 2013; 525, 174-181.
- Nunes P, Demaux N, Dinayer MC. Regulation of the NADPH oxidase and associated ion fluxes during phagocytosis. *JT*, 2013; 14, 1118-1131.
- O'Neill S, Brault J, Stasia MJ, Knaus UG. Genetic disorders coupled to ROS deficiency. *JRB*, 2015; 6, 135-156.
- Pink RC, Wicks K, Caley DP, Punch EK, Jacobs L, Carter DRF. Pseudogenes: pseudo-functional or key regulators in health and disease? *J R*, 2011; 17, 792-798.
- Porras A, Zuluaga S, Valladares A, Álvarez AM, Herrera B, Fabregat I, Benito M. Long-term treatment with insulin induces apoptosis in brown adipocytes: role of oxidative stress. *JE*, 2003; 144, 5390-5401.

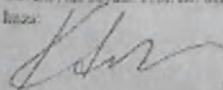
- Raad H, Derkawi RA, Tlili A, Belambri SA, Dang PM, El-Benna J. Phosphorylation of gp91(phox)/NOX2 in Human Neutrophils. *Methods Mol Biol*, 2019; 1982, 341-352.
- Richardson AM, Moyer AM, Hasadsri L, Abraham RS. Diagnostic tools for inborn errors of human immunity (primary immunodeficiencies and immune dysregulatory diseases). *JCA and reports*, 2018; 18, 19.
- Roesler J. Remarks on the article Genetics and immunopathology of chronic granulomatous disease by Marie José Stasia and Xing Jun Li. *Seminars in immunopathology*, 2008. Springer, 365-365.
- Roos D. Chronic granulomatous disease. *Br Med Bull*, 2016; 118, 50-63.
- Roos D, de Boer M. Molecular diagnosis of chronic granulomatous disease. *Clin Exp Immunol*, 2014; 175, 139-49.
- Roos D, de Boer M, Koker MY, Dekker J, Singh-Gupta V, Ahlin A, Palmblad J, Sanal O, Kurenko-Deptuch M, Jolles S, Wolach B. Chronic granulomatous disease caused by mutations other than the common GT deletion in NCF1, the gene encoding the p47phox component of the phagocyte NADPH oxidase. *Hum Mutat*, 2006; 27, 1218-29.
- Rossi F, Zatti M. Biochemical aspects of phagocytosis in poly-morphonuclear leucocytes. NADH and NADPH oxidation by the granules of resting and phagocytizing cells. *J E*, 1964; 20, 21-23.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *J POTNAOS*, 1977; 74, 5463-5467.
- Segal BH, Leto TL, Gallin JI, Malech HL, Holland SM. Genetic, biochemical, and clinical features of chronic granulomatous disease. *J M*, 2000; 79, 170-200.
- Seger RJN. Chronic granulomatous disease: recent advances in pathophysiology and treatment. *J M*, 2010; 68, 334-40.
- Sheppard FR, Kelher MR, Moore EE, McLaughlin NJ, Banerjee A, Silliman CC. Structural organization of the neutrophil NADPH oxidase: phosphorylation and translocation during priming and activation. *JJOLB*, 2005; 78, 1025-1042.


- Song E, Jaishankar GB, Saleh H, Jithpratuck W, Sahni R, Krishnaswamy G. Allergy M. Chronic granulomatous disease: a review of the infectious and inflammatory complications. *J C*,2011; 9, 10.
- Sumimoto H. Structure, regulation and evolution of Nox-family NADPH oxidases that produce reactive oxygen species. *JTFJ*, 2008; 275, 3249-3277.
- Suzuki N, Miller G, Morales J, Shulaev V, Torres MA, Mittler R.. Respiratory burst oxidases: the engines of ROS signaling. *JCOIPB*,2011; 14, 691-699.
- ThermoFisher. 2019. *Fragment Analysis* [Online]. Available: <https://www.thermofisher.com/tr/en/home/global/forms/fragment-analysis-guide-registration-form.html>(Erişim tarihi: 12.12.2019).
- Topaloğlu T, Şener EF, Canatan H. Nöropsikiyatrik Hastalıklarda Yeni Nesil Sekans Teknolojisinin Kullanımı ve Güncel Yaklaşımlar. *Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 2016; 25, 92-99.
- Torrents D, Suyama M, Zdobnov E, Bork P. A genome-wide survey of human pseudogenes. *JGR*, 2003; 13, 2559-2567.
- Trinkle LS, Wellhausen SR, McLeish KR. A simultaneous flow cytometric measurement of neutrophil phagocytosis and oxidative burst in whole blood. *Diagn Clin Immunol*, 1987; 5, 62-8.
- Vallet P, Charnay Y, Steger K, Ogier-Denis E, Kovari E, Herrmann F, Michel JP, Szanto I. Neuronal expression of the NADPH oxidase NOX4, and its regulation in mouse experimental brain ischemia. *J N*,2005; 132, 233-238.
- Van De Geer A, Nieto-Patlán A, Kuhns DB, Tool AT, Arias AA, Bouaziz M, De Boer M, Franco JL, Gazendam RP, Van Hamme JL. Inherited p40 phox deficiency differs from classic chronic granulomatous disease. *JTJOI*, 2018; 128, 3957-3975.
- Vignais P, The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism. *JC CMLS MLS*, 2002; 59, 1428-1459.
- Weiss SJ.. Tissue destruction by neutrophils. *JNEJOM*,1989; 320, 365-376.

- Winkelstein JA, Marino MC, Johnston JR, Boyle J, Curnutte J, Gallin JI, Malech HL, Holland SM, Ochs H, Quie P. Chronic granulomatous disease. Report on a national registry of 368 patients. *JM*, 2000; 79, 155-169.
- Wrona D, Siler U, Reichenbach J.. Novel Diagnostic Tool for p47phox-Deficient Chronic Granulomatous Disease Patient and Carrier Detection. *JMT-M and Development C.*, 2019; 13, 274-278.
- Wrona D, Siler U, Reichenbach J.. CRISPR/Cas9-generated p47 phox-deficient cell line for Chronic Granulomatous Disease gene therapy vector development. *JSR*, 2017; 7, 44187.
- Yu JE, Azar AE, Chong HJ, Jongco AM, 3rd & Prince BT. Considerations in the Diagnosis of Chronic Granulomatous Disease. *J Pediatric Infect Dis Soc*, 2018; 7, S6-s11.
- Zhan S, Vazquez N, Wientjes F, Budarf M, Schrock E, Ried T, Green E, Chanock S. Genomic structure, chromosomal localization, start of transcription, and tissue expression of the human p40-phox, a new component of the nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase complex. *JB*, 1996; 88, 2714-2721.
- Zhang Z, Gerstein M. Large-scale analysis of pseudogenes in the human genome. *J Coig and development*, 2004; 14, 328-335.
- Zhang ZD, Frankish A, Hunt T, Harrow J, Gerstein M. Identification and analysis of unitary pseudogenes: historic and contemporary gene losses in humans and other primates. *JGB*, 2010; 11, R26.
- Zhao J, Ma J, Deng Y, Kelly JA, Kim K, Bang SY, Lee HS, Li QZ, Wakeland EK, Qiu R. A missense variant in NCF1 is associated with susceptibility to multiple autoimmune diseases. *JNG*, 2017; 49, 433.

EKLER

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU		
ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Kronik Granülomatöz Hastalık (KGH) Moleküler Tanısında Gen Scan Analizi ve NGS Yönteminin Uygulanması	
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU		
ETİK KURULU BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	ERCIYES ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
	AÇIK ADRES	Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Malikgazi/KAYSERİ
	TELEFON	0 382 437 49 10 - 11
	FAKS	0 382 437 62 06
	E-POSTA	etik@erciyes.edu.tr
BAŞVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR / SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI / ADI / SOYADI	Prof. Dr. Mustafa Yavuz Köker
	KOORDİNATÖR SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	[İnceleme]
	KOORDİNATÖR / SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	[Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Kayseri]
	VARSA İDARI SORUMLU UNVANI ADI / SOYADI	
	DESTEKLEYİCİ	
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ İMZA/ADI/SOYADI (TUSİTAK vb. gibi kaynaklardan destek alanlar için)	
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLÇİSİ	
ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1	<input type="checkbox"/>
	FAZ 2	<input type="checkbox"/>
	FAZ 3	<input type="checkbox"/>
	FAZ 4	<input type="checkbox"/>
	Gözetimsel/teşhis amaçlı	<input type="checkbox"/>
	Tıbbi amaçlı klinik araştırma	<input type="checkbox"/>
	In vitro/İTDR ile cihazlar ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları	<input type="checkbox"/>
İngilizce klinik araştırma	<input checked="" type="checkbox"/>	
Diğer (se belirtiniz)	[Biyosel Araştırma Projesi]	
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEKMERKEZ <input checked="" type="checkbox"/> ÇOKMERKEZ <input type="checkbox"/> ULUSAL <input checked="" type="checkbox"/> ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>	

Etik Kurul Başkanı
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Sena Kader Köker
İmza: 

ASLI GİZLİDİR

Fund. HANCIZMECİ
Etik Kurul Sekreteri

Not: Etik Kurul Başkanı, istenilen her alanda bir yazıya imza atmalıdır.

Kronik Granülomatoz Hastalık Moleküler Tanısında Gen-Scan Analizinin Uygulanması, ZEYNEP AKİDAĞI

ORJİNALLIK RAPORU

%3	%1	%0	%2
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİ KAYNAKLAR

1	Submitted to Erciyes Üniversitesi Öğrenci Ödevi	%1
2	www.turkishimmunology.org İnternet Kaynağı	<%1
3	Submitted to Inonu University Öğrenci Ödevi	<%1
4	Submitted to TechKnowledge Turkey Öğrenci Ödevi	<%1
5	Submitted to Mersin Üniversitesi Öğrenci Ödevi	<%1
6	libratez.cu.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
7	acikerisim.dicle.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
8	avesis.hacettepe.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1

ÖZ GEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı: Zeynep AKİDAĞI

Uyruğu: Türkiye (T.C)

Doğum Tarihi ve Yeri:18.05.1985

Medeni Durumu: Evli

Tel:0 505 644 54 80

Email:zeynepakidagi@gmail.com

Yazışma Adresi: Kapadokya Üniversitesi KMYO Sağlık Programları Binası
Kavaklıönümah. ÜRGÜP/ NEVŞEHİR

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
--------	-------	------------------

Lisans:	Gazi Üniversitesi Biyoloji Bölümü	2007
---------	-----------------------------------	------

Lise:	Bursa Cumhuriyet Süper Lisesi	2003
-------	-------------------------------	------

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görev
-----	-------	-------

2008-2009:	Özel Versa Hastanesi-	Biyolog
------------	-----------------------	---------

2011-2017:	Özel Kapadokya Hastanesi-	Biyolog
------------	---------------------------	---------

2017- Devam Etmekte:	Kapadokya Üniversitesi Tıbbi Laboratuvar Önlisans Programı- Öğretim Görevlisi- Program Başkanı	
----------------------	---	--

YABANCI DİL: İngilizce