

T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DOĞAL ÖLDÜRÜCÜ (NK) HÜCRE DÜŞÜKLÜĞÜ OLAN
HASTALARDA, NK HÜCRE SİTOTOKSİTELERİNİN VE
FCγRIIIA GEN MUTASYONLARININ ARAŞTIRILMASI**

MEHMET ALİ KARASELEK

DOKTORA TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Ercan KURAR

KONYA 2020

T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DOĞAL ÖLDÜRÜCÜ (NK) HÜCRE DÜŞÜKLÜĞÜ OLAN
HASTALARDA, NK HÜCRE SİTOTOKSİTELERİNİN VE
FCγRIIIA GEN MUTASYONLARININ ARAŞTIRILMASI**

MEHMET ALİ KARASELEK

DOKTORA TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof. Dr. Ercan KURAR

Bu araştırma Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 171418003 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA 2020

TEZ ONAY SAYFASI

Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Doktora Öğrencisi **Mehmet Ali Karaselek**'in “**Doğal Öldürücü (NK) Hücre Düşüklüğü Olan Hastalarda, NK hücre sitotoksitelerinin ve FcyRIIIA Gen Mutasyonlarının Araştırılması**” başlıklı tezi tarafımızdan incelenmiş; amaç, kapsam ve kalite yönünden Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir. Necmettin Erbakan Üniversitesi (N.E.Ü.) - Tıbbi Biyoloji A.D. 24/02/2020

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Ercan KURAR

Necmettin Erbakan Üniversitesi Tıbbi Biyoloji A.D.

Jüri Üyesi

Prof. Dr. Sevgi KELEŞ

Necmettin Erbakan Üniversitesi

Meram Tıp Fakültesi

Çocuk Allerji ve İmmünoloji B.D.

Jüri Üyesi

Prof.Dr. İlhan TEZCAN

Hacettepe Üniversitesi

Tıp Fakültesi

Çocuk İmmünolojisi B.D.

Jüri Üyesi

Doç.Dr. Hatice Gül DURSUN

Necmettin Erbakan Üniversitesi

Meram Tıp Fakültesi

Tıbbi Biyoloji A.B.D.

Jüri Üyesi

Prof.Dr. Hasibe ARTAÇ

Selçuk Üniversitesi

Tıp Fakültesi

Çocuk Allerji ve İmmünoloji B.D.

Yukarıdaki tez, Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun 04/03/2020 tarih ve 06./10... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Kısmet Esra NURULLAHOĞLU ATALIK

Enstitü Müdürü

APPROVAL

We certify that we have read this dissertation entitled “*Investigation of NK Cell Cytotoxicity and FcγRIIIA Gene Mutations in Patients with Low Natural Killer (NK) Cell*” by “**Mehmet Ali Karaselek**” that in our opinion it is fully adequate, in scope and quality, as dissertation for the degree of *Doctor of Philosophy* in the Department of “**Medical Biology**”, Institute of Health Sciences, Necmettin Erbakan University (N.E.Ü), Meram Medicine Faculty, Department of Medical Biology, Konya, Turkey 24/02/2020

Principal Advisor 

Prof. Dr. Ercan KURAR

Necmettin Erbakan University, Medical Biology

Examination Committee Member

Prof. Dr. Sevgi KELEŞ 

Necmettin Erbakan University

Meram Medicine Faculty

Pediatric Allergy and Immunology

Examination Committee Member

Prof. Dr. İlhan TEZCAN 

Hacettepe University

Medicine Faculty

Pediatric Immunology

Examination Committee Member

Assoc. Prof. Dr. Hatice Gül DURSUN 

Necmettin Erbakan University

Meram Medicine Faculty

Medical Biology

Examination Committee Member

Prof. Dr. Hasibe ARTAÇ 

Necmettin Erbakan University

Meram Medicine Faculty

Pediatric Allergy and Immunology



This thesis has approved for the Necmettin Erbakan University, Institute of Health Sciences.

Prof. Dr. Kismet Esra NURULLAHOĞLU ATALIK

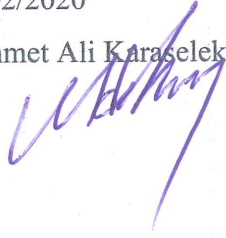
Director of Institute of Health Sciences

BEYANAT

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

24/02/2020

Mehmet Ali Karaselek



TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

Ercan Kurar | Kullanıcı Bilgisi | Mesajlar | Öğretmen | Türkçe | Topluluk | Yardım | Çıkış

turnitin

Odevler Öğrenciler Not Defteri Kutüphaneler Takvim Tartışma Tercihler

GÖRÜNTÜLENİYOR: ANASAYFA > SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ TIBBİ BİYOLOJİ A.D. > DOĞAL ÖLDÜRÜCÜ (NK) HÜCRE DÜŞÜKLÜĞÜ OLAN HASTALARDA, NK HÜCRE SİTOTOKSİTELERİNİN VE FCRIIIA GEN MUTASYONLARININ ARAŞTIRILMASI

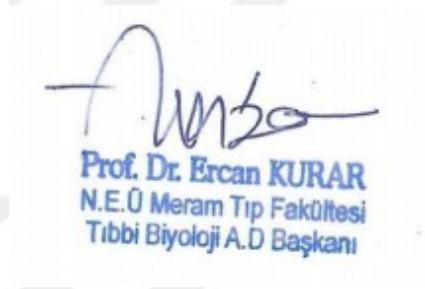
Bu sayfa hakkında
Bu sizin ödev kutunuzdur. Bir yazılı ödevi görüntülemek için yazılı ödevin başlığını seçin. Bir Benzerlik Raporunu görüntülemek için yazılı ödevin benzerlik sütunundaki Benzerlik Raporu ikonunu seçin. Tıklanabilir durumda olmayan bir ikon Benzerlik Raporunun henüz oluşturulmadığını gösterir.

DOĞAL ÖLDÜRÜCÜ (NK) HÜCRE DÜŞÜKLÜĞÜ OLAN HASTALARDA...
GELEN KUTUSU | GÖRÜNTÜLENİYOR: YENİ ÖDEVLER ▾

Dosyayı Gönder

Çevrimiçi Derecelendirme Raporu | Ödev ayarlarını düzenle | E-posta bildirmeyenler

YAZAR	BAŞLIK	BENZERLİK	PUANLA	CEVAP	DOSYA	ÖDEV NUMARASI	TARİH
<input type="checkbox"/>	Mehmet Ali Karaselek	DOĞAL ÖLDÜRÜCÜ (NK) HÜCRE DÜŞÜKLÜĞÜ OLAN...	%5	--	--	1223257437	28-Kas-2019



TEŞEKKÜR

Doktora eğitim sürecinde çalışmalarımın planlamasında, araştırılmasında, yürütülmesinde ve yazımında değerli bilgilerini, deneyimlerini, ilgi ve desteklerini esirgemeyen danışmanım Prof. Dr. Ercan Kurar'a, Çocuk Hastalıkları Anabilim Dalı ve Çocuk Allerji ve İmmünoloji Bilim Dalı Başkanı Prof. Dr. İsmail Reisli ve Çocuk Allerji ve İmmünoloji Bilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Sevgi Keleş'e,

Çalışmalarım boyunca her zaman bilgi ve deneyimleri ile destek olan Tıbbi Biyoloji Öğretim Üyeleri Prof. Dr. Hasibe Vural Cingilli, Doç.Dr. Hatice Gül Dursun, Çocuk Allerji ve İmmünoloji Bilim Dalı Öğretim Üyesi Doç.Dr. Şükrü Nail Güner'e,

Laboratuvar çalışmalarım boyunca her zaman destek olan Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı asistan arkadaşlarım Arş. Gör. Dr. Canan Eroğlu Güneş, Arş. Gör. Ebru Avcı, Arş. Gör. Dr. İlknur Çınar Ayan ile Çocuk Allerji ve İmmünoloji laboratuvar çalışanları arkadaşlarım Öğr. Gör. Şeyma Çelikkilek Çelik, Tuğba Esra Pekcandanoğlu, Selda Keyik ve Uzm. Dr. Hasan Kapaklı'ya,

DNA dizi analizinin gerçekleştirilmesinde yardımcı olan Prof. Dr. Serdar Ceylaner ile INTERGEN Genetik ve Nadir Hastalıklar Tanı Araştırma ve Uygulama Merkezi Moleküler Biyoloji Laboratuvar Koordinatörü Moleküler Biyolog Haldun Doğan'a

Tez çalışmam boyunca hep destek olan Terapötik Aferez ve Kök Hücre Nakil Merkezi çalışma arkadaşlarım Kazım Çamlı, Serkan Hasan Çakmak ve Abdullah Çağlar'a,

Beni canlarından çok seven, bu günlere gelmemi sağlayan ve hiçbir zaman maddi, manevi destekleri esirgemeyen Babam Mustafa Karaselek, Annem Nuriye Karaselek, Kardeşim Şerife Karaselek'e,

Hayatta bana hep kuvvet veren ve destek olan canım eşim Begüm Karaselek ve yaşama sevincim biricik kızım Defne'me,

Ayrıca bu çalışmayı 171418003 proje numarasıyla destekleyen Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne,

Çok teşekkür ederim...

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI	ii
APPROVAL	iii
BEYANAT	iv
TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
KISALTMALAR ve SİMGELER LİSTESİ	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ	xiii
TABLolar LİSTESİ	xv
ÖZET	xvi
ABSTRACT	xvii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. <i>İmmün Sistem</i>	3
2.1.1. <i>Edinsel İmmün Sistem</i>	4
2.1.2. <i>Doğal İmmün Sistem</i>	5
2.2. <i>NK Hücre</i>	6
2.3. <i>NK Hücre Gelişimi</i>	6
2.4. <i>NK Hücre Alt Grupları</i>	8
2.5. <i>NK Hücre Aktivasyon, İnhibisyon Reseptörleri ve Görevleri</i>	9
2.6. <i>NK Hücre Fonksiyonu</i>	11
2.6.1. <i>NK Hücre Sitotoksitesisi</i>	11
2.6.2. <i>Antikor Bağımlı Hücresel Sitotoksitesite</i>	13
2.7. <i>NK Hücre Hastalığı ve Sınıflandırılması</i>	14
2.7.1. <i>Klasik NK Hücre Hastalığı ve Genetik Sebepleri</i>	15
2.7.2. <i>Fonksiyonel NK Hücre Hastalığı ve Genetik Sebepleri</i>	17
2.8. <i>FcyRIIIA Geni ve Fonksiyonu</i>	18
2.9. <i>NK Hücre Sitotoksitesisinin Tespitinde Kullanılan Yöntemler</i>	20
2.9.1. <i>⁵¹Cr Salınım Deneyi</i>	20
2.9.2. <i>CD107a Ekspresyonuna Bağlı Sitotoksitesite Tayini</i>	21
2.9.3. <i>K562 Lizisine Bağlı Sitotoksitesite Tayini</i>	22
2.10. <i>DNA Dizileme Yöntemleri</i>	23

3. GEREÇ ve YÖNTEM	26
3.1. Çalışma Popülasyonu	26
3.2. NK Hücre Alt Gruplarının Akım Sitometrik Olarak Belirlenmesi	27
3.3. NK Hücre Sitotoksitesinin Değerlendirilmesi	29
3.3.1. NK Hücrelerin Hazırlanması ve Hücre Sayısının Tespiti	29
3.3.2. K562 Hedef Hücrelerin Hazırlanması ve Canlılığının Belirlenmesi	29
3.3.3. NK Hücreler ile K562 Hedef Hücrelerin Birleştirilmesi	30
3.3.4. Akım Sitometrik Hücre Sayımı ve Analiz	31
3.4. DNA İzolasyonu	32
3.5. FcγRIIIA Tüm Gen Analizi	32
3.5.1. PZR Primer Dizaynı	33
3.5.2. Gradyent PZR Analizi	34
3.5.3. PZR Protokolü.....	36
3.5.4. PZR Kütüphane Hazırlığı ve Yeni Nesil DNA Dizi Analizi.....	37
3.6. İstatistiksel Analizler.....	38
3.7. Etik Kurul ve Proje Onayı.....	39
4. BULGULAR	40
4.1. Klinik Bulgular.....	40
4.2. Periferik Lenfosit Alt Grup Oranları ve Diğer Laboratuvar Bulguları.....	42
4.3. Akım Sitometrik NK Hücre Alt Grup Oranları	44
4.4. NK Hücre Sitotoksite Sonuçları	46
4.5. FcγRIIIA Geni Analiz Sonuçları	49
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	55
5.1. Öneriler.....	63
6. KAYNAKLAR	64
7. ÖZGEÇMİŞ	73
8. EKLER	74
8.1. EK-A: Etik Kurul Onayı	74
8.2. EK-B: Bilgilendirilmiş Gönüllü Onam Formu.....	75

KISALTMALAR ve SİMGELER LİSTESİ

%	Yüzde
~	Yaklaşık
<	Küçük
°C	Santigrat derece
µl	Mikrolitre
⁵¹C	Chromium
A	Adenin
ADCC	Antikor bağımlı hücrel sitotoksisite
ADP	Adenozin difosfat
ALS	Absolü lenfosit sayısı
AMP	Adenozin monofosfat
ANS	Absolü nötrofil sayısı
APS	Adenozin 5' fosfosülfat
ASH	Antijen sunan hücre
ATP	Adenozin trifosfat
BM	Bone marrow (Kemik iliği)
bp	Base pair
C	Sitozin
CD	Cluster of differentiation (Faklılaşma kümesi)
CFSE	Carboxyfluorescein succinimidyl ester
CMV	Sitomegalo virüs
CNV	Kopya sayısındaki değişiklikler
CNKD	Klasik doğal öldürücü hücre hastalığı
CO₂	Karbondioksit
CRA	⁵¹ Chromium salınım deneyi
CTL	Sitotoksik T lenfosit
CTLR	C-type lectin-like receptor (C-tipi lektin benzeri reseptör)
dATP	Deoksiadenozin trifosfat
dCTP	Deoksisitidin trifosfat
dGTP	Deoksiguanosin trifosfat
dk	Dakika
DNA	Deoksiribo nükleik asit
DNAM-1	DNAX accessory molecule-1

dNDP	Deoksinükleosid difosfat
dNMP	Deoksinükleosid monofosfat
dNTP	Deoksinükleotid trifosfat
dTTP	Timidin trifosfat
EBV	Ebstein-Barr virüs
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
Fab	Fragment antigen-binding (Antijen bağlanma fragmenti)
FasL	Fas ligand
Fc	Fragment crystallizable region
FcγRs	Fc gama reseptörleri
Flt3	Fms-like tyrosine kinase 3
FNKD	Fonksiyonel doğal öldürücü hücre hastalığı
FSC-A	Forward scatter area (İleri saçılım alanı)
G	Guanin
GATA2	GATA binding protein 2
Grz	Granzim
Hbs	Hepatit B
HCT	Hematokrit
HGB	Hemoglobin
HLA	Human leukocyte antigen (İnsan lökosit antijen)
HSC	Hematopoietic stem cell (Hematopoetik kök hücre)
HSV	Herpes simpleks virüs
IFN	İnterferon
IgA	İmmunglobulin A
IgG	İmmunglobulin G
IgM	İmmunglobulin M
IL	İnterlökin
IRF8	Interferon regulatory factor 8
ITAMs	Immunoreceptor tyrosine-based activation motif (İmmünoreseptör tirozin bağımlı aktivasyon motifleri)
ITIMs	Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif (İmmünoreseptör tirozin bağımlı inhibisyon motifleri)
iNK	İmmatür doğal öldürücü hücre
K562	Lösemik hücre soyu

kb	Kilobaz
kD	Kilodalton
KIR	Killer-cell immunoglobulin-like receptor (Öldürücü hücre immünglobulin benzeri reseptör)
LAMP-1	Lysosomal-associated membrane protein-1 (Lizozom bağlı membran protein-1)
LFA-3	Lymphocyte function-associated antigen-3 (Lenfosit fonksiyonu ile ilişkili antijen-3)
LRC	Leukocyte receptor complex (Lökosit reseptör kompleksi)
Ly49 (KLRA)	Killer cell lectin-like receptor subfamily A
mAb	Monoklonal antikör
MCM4	Minichromosome maintenance complex component 4
MHC	Majör histokompatibilite kompleksi
MICA	MHC class I polypeptide-related sequence A
ml	Mililitre
MTOC	Microtubule organizing center (Mikrotübül organizasyon merkezi)
NaAc	Sodyum asetat
NAHR	Non-homolog rekombinasyon
NCAM	Neural cell adhesion molecule (Nöral hücre adezyon molekülü)
ng	Nanogram
NGS	Next generation sequencing (Yeni nesil dizileme)
NK	Doğal öldürücü hücre
NKC	Doğal öldürücü hücre gen kompleksi
NKD	Doğal öldürücü hücre hastalığı
NKG2A	Killer cell lectin like receptor-2A
NKG2D	Killer cell lectin like receptor-2D
NKp30	Natural cytotoxicity receptor30 (Doğal sitotoksisite reseptörü30)
NKp44	Natural cytotoxicity receptor44 (Doğal sitotoksisite reseptörü44)
NKp46	Natural cytotoxicity receptor46 (Doğal sitotoksisite reseptörü46)
NKRP1A	Killer cell lectin-like receptor subfamily B, member 1
NKT	Doğal öldürücü T hücre
O₂	Oksijen
PBS	Phosphate buffered saline (Fosfat tamponlu salin)
pH	Power of hydrogen (Hidrojen gücü)

PI	Propidyum iyodür
PİY	Primer immün yetmezlik
PKMH	Periferik kan mononükleer hücre
PLT	Trombosit
PMA/I	Phorbol-Myristate-Acetate and Ionomycin
pNK	Prekürsör doğal öldürücü hücre
PPi	İnorganik pirofosfat
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
RAET1	Retinoic acid early transcript 1E
RAG1	Recombination activating gene 1 (Rekombinasyon aktive edici gen 1)
rpm	Rounds per minute
RTEL1	Regulator of telomere elongation helicase 1
SLE	Sistemik lupus eritematozus
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SO₄	Sülfat
SSC-A	Side scatter area (Yan saçılım alanı)
T	Timin
TCR	T cell receptor (T hücre reseptörü)
TNF	Tümör nekrosiz faktör
TRAIL	TNF aracılı apoptoz indükleyen ligand
UTR	Untranslated region
VZV	Varisella zoster virüs
WBC	White blood cell (Beyaz kan hücresi)
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
ϵ	Epsilon

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. İmmün sistemin elemanları ve görevleri.	3
Şekil 2. Doğal ve edinsel immün sistem hücreleri.....	4
Şekil 3. Edinsel immün sistemin özgülüğü ve belleği.	5
Şekil 4. NK hücre gelişimi.....	7
Şekil 5. NK hücrelerin aktivasyon ve inhibisyon reseptörleri ile kontrolü.....	9
Şekil 6. NK hücre aktivasyon ve inhibisyon reseptörleri.	10
Şekil 7. NK hücre aracılı hücre ölümüne ait yollar.....	13
Şekil 8. ADCC mekanizması.	14
Şekil 9. NKD tanı algoritması.....	18
Şekil 10. 51Cr salınım deneyi.....	21
Şekil 11. Akım sitometrik CD107a ekspresyonuna bağlı sitotoksinite.....	22
Şekil 12. K562 lizisine dayalı sitotoksinite deneyi.	23
Şekil 13. Pyrosequencing dizileme teknolojisinin şematik gösterimi.	24
Şekil 14. NK alt grup analizi için uygulanan boyama yöntemi.	28
Şekil 15. NK alt grup analizinde uygulanan kapılama yöntemi.	28
Şekil 16. K562 hedef hücrelerinin hazırlanması ve canlılıklarının belirlenmesi.....	30
Şekil 17. Efektör hücre ile hedef hücre karışım oranları.	31
Şekil 18. <i>FcyRIIIA</i> genine ait BLAST sonuçları.....	33
Şekil 19. <i>FcyRIIIA</i> geni tüm gen analizi için primer dizaynında izlenen yol.....	34
Şekil 20. Ekzon 1-3 gradiyent PZR sonuçlarının %2'lik agaroz jel elektoroforezi görüntüsü.....	35
Şekil 21. Ekzon 4-5 gradiyent PZR sonuçlarının %2'lik agaroz jel elektoroforezi görüntüsü.....	36
Şekil 22. <i>FcyRIIIA</i> geninin ekzon 1-3'e ait IGV görüntüsü.	38
Şekil 23. <i>FcyRIIIA</i> geninin ekzon 4-5'e ait IGV görüntüsü.	38
Şekil 24. Bazı hasta ve kontrollere ait NK hücre alt gruplarının akım sitometrik görüntüsü.....	45
Şekil 25. NK alt gruplarına ait istatistiksel analiz sonuçları.....	45
Şekil 26. Kontrolle ait sitotoksinite analiz görüntüleri.....	46
Şekil 27. Hastaya (H4) ait sitotoksinite analiz görüntüleri.	47
Şekil 28. NK hücre sitotoksinite analizinde farklı oranların hedef hücre miktarındaki değişimi.	49
Şekil 29. <i>FcyRIIIA</i> geni ekzon 3 IGV analiz görüntüsü.	50

Şekil 30. <i>FcγRIIIA</i> geni ekzon 4 IGV analiz görüntüsü.....	51
Şekil 31. <i>FcγRIIIA</i> ve <i>FcγRIIIB</i> üzerine yapılan alignmentin IGV görüntüsü.	52
Şekil 32. İlgili bölgenin <i>FcγRIIIA</i> ve <i>FcγRIIIB</i> üzerine yapılan alignmentin IGV görüntüsü.....	53
Şekil 33. <i>FcγR</i> bölgesinin yapısı.....	62



TABLolar LİSTESİ

Tablo 1. NK hücre sınıflamasında NK hücre durumları ve sorumlu genler.	18
Tablo 2. Kontrol ve analiz tüpleri için efektör ve hedef hücre karışım oranları.	31
Tablo 3. <i>FcγRIIIA</i> tüm gen analizinde kullanılan primerler.....	34
Tablo 4. Üç farklı PZR'de uygulanan PZR protokolü.....	36
Tablo 5. Üç farklı PZR protokolü ve uygulanan sıcaklık değerleri.	36
Tablo 6. Hastaların klinik ve diğer özellikleri.....	40
Tablo 7. Hastaların solunum yolunda tespit edilen virüsler.....	42
Tablo 8. Hastaların periferik kan lenfosit oranları, molekül ekspresyonları ve immünglobulin değerleri.....	43
Tablo 9. Hastaların tam kan sayımı, izohemagglütinin titreleri ve özgül antikor yanıtları.	44
Tablo 10. Hasta ve kontrollerin NK hücre alt grup oranları (%).	44
Tablo 11. Hasta ve kontrollere ait sitotoksosite analiz sonuçları (%).	47
Tablo 12. Pearson korelasyon analizi sonuçları8.	49
Tablo 13. <i>FcγRIIIA</i> genine ait NGS sonuçları.....	50
Tablo 14. <i>FcγRIIIA</i> geni tüm gen analizi sonucunda tespit edilen diğer polimorfizmler.....	54

ÖZET

T.C.

NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Doğal Öldürücü (NK) Hücre Düşüklüğü Olan Hastalarda, NK Hücre
Sitotoksitelerinin ve *FcγRIIIA* Gen Mutasyonlarının Araştırılması

Mehmet Ali Karaselek

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Doktora Tezi / KONYA-2020

Doğal öldürücü hücreler (natural killer, NK), organizmayı enfeksiyonlara ve kansere karşı savunmada önemli rol oynayan hücrelerdir. NK hücrelerini organizmada iki önemli görevi bulunmaktadır. Bunlardan birincisi, enfeksiyona neden olan mikroorganizmalara karşı direkt sitotoksik etki, ikincisi ise *FcγRIIIA* geni aracılığıyla gerçekleşen antikor bağımlı hücrel sitotoksisite (ADCC)'dir. NK hücrelerinin sayı veya fonksiyonunda bozukluk(lar), NK hücre eksikliği/bozukluğu (NKD) olarak adlandırılmaktadır. Bu çalışmada, klinik olarak NKD düşünülen hastalar NK hücre alt grupları, NK hücre sitotoksitesi ve *FcγRIIIA* gen mutasyon(lar)u açısından araştırılması ve klinik, laboratuvar ve fonksiyonel analiz sonuçları ile *FcγRIIIA* gen mutasyon(lar)u arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi amaçlandı.

Çalışmaya Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Çocuk Allerji ve İmmünoloji polikliniğine ilk defa başvuran hastalar ile daha önceden takipli 10 hasta ve 7 sağlıklı bireyden oluşan kontrol grubu dahil edildi. Tüm hasta ve kontrol kan örneklerinden, periferik kan lenfosit oranları ve NK hücre alt grupları oranları akım sitometri yöntemiyle, NK hücrelerinin fonksiyonları ise sitotoksisite testi ile değerlendirildikten sonra yeni nesil dizileme yöntemi ile *FcγRIIIA* gen mutasyonları araştırıldı.

Periferik kan akım sitometri yöntemi ile değerlendirilen NK hücre alt grup analizinde $CD56^{bright}CD16^{neg}$, $CD56^{bright}CD16^{int}$ ve $CD56^{dim}CD16^{hi}$ olmak üzere 3 farklı NK hücre alt grubu belirlendi. Hastaların NK hücre alt grupları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında $CD56^{bright}CD16^{neg}$ hücre oranında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmedi. $CD56^{bright}CD16^{int}$ ve $CD56^{dim}CD16^{hi}$ hücre oranları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hastalarda anlamlı derecede düşük olduğu tespit edildi. NK hücre sitotoksitesi, K562 lizisine bağlı yöntem ile değerlendirildi. NK hücre sitotoksisite analizi sonucunda hasta ile kontroller arasında K562 miktarındaki oransal olarak azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi ($p < 0,001$). Hastalardaki K562 hücre azalma oranı kontrollere kıyasla istatistiksel olarak daha az azaldığı tespit edildi. Yeni nesil dizileme yöntemi ile *FcγRIIIA* geninin tüm exom analizinde, ekzon 4 (rs396991) ve ekzon 3 (rs10127939)'de polimorfizmler olduğu belirlendi. Ayrıca dizileme sonucunda *FcγRIIIA* ile *FcγRIIIB* ile benzerlik gösteren olası kimerik bir bölge (ekzon 1 ile ekzon 2 ile ekzon 1 arasındaki intron bölgesi) tespit edildi.

Sonuç olarak bu tez çalışmasında FNKD düşünülen hastalar ileri fonksiyonel ve genetik analizler ile değerlendirildi. Hastalarda NK sayı ve fonksiyonları yönünden farklılıklar tespit edildi. *FcγRIIIA* geni ile ilgili tespit edilen polimorfizmler Türkiye popülasyonunda yapılmış ilk değerlendirme niteliğinde olup, NK hücre araştırmaları alanında yapılacak yeni çalışmalara ışık tutması beklenmektedir.

Anahtar Kelimeler: *FcγRIIIA*, NK, NK alt grup, Sitotoksisite.

ABSTRACT

REPUBLIC of TURKEY
NECMETTİN ERBAKAN UNIVERSITY
INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES

Investigation of Natural Killer (NK) Cell Cytotoxicity and *FcγRIIIA* Gene Mutations
in Patients with Low NK Cell

Mehmet Ali Karaselek

Department of Medical Biology

Dissertation for the Degree of Doctor of Philosophy / KONYA-2020

Natural killer cells (NK) are cells that play an important role in defending the organism against infections and cancer. NK cells have two important functions in the organism. The first is the direct cytotoxic effect against microorganisms that cause infection, Secondly, it is an antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) that is mediated by the *FcγRIIIA* gene product. Considering the important role of NK cells, disorder(s) in the NK cell number or function cause disease. This disease originating from NK cells is called NK cell deficiency / disorder (NKD). From this point, NK cell subgroups, NK cell cytotoxicity and *FcγRIIIA* gene mutation(s) were investigated. The aim of this study was to evaluate the relationship between clinical, laboratory and functional analysis and *FcγRIIIA* gene mutation(s).

The study group consisted of 10 patients who were admitted to Necmettin Erbakan University Meram Medical Faculty Pediatric Allergy and Immunology Polyclinic for the first time and previously monitored and consisting of 7 healthy individuals were included in the control group. All patients and controls were evaluated for the determination of peripheral blood lymphocyte ratios and NK cell subgroups and cytotoxicity tests were performed to evaluate the functions of NK cells. *FcγRIIIA* gene mutations were investigated by next generation sequencing method.

Three different NK cell subgroups, CD56^{bright}CD16^{neg}, CD56^{bright}CD16^{int} and CD56^{dim}CD16^{hi} were identified in the NK cell subgroup analysis evaluated by peripheral blood flow cytometry. No statistically significant difference was found in the ratio of CD56^{bright}CD16^{neg} cells when NK cell subsets of the patients were compared with the control group. CD56^{bright}CD16^{int} and CD56^{dim}CD16^{hi} cell ratios were found to be significantly lower in patients compared to the control group. NK cell cytotoxicity was evaluated by K562 lysis dependent method. As a result of NK cell cytotoxicity analysis, proportional decrease of K562 amount between patient and controls was found to be statistically significant ($p < 0,001$). It was found that the rate of K562 cell reduction in the patients decreased statistically less than the controls. Polymorphisms were detected in exon 4 (rs396991) and exon 3 (rs10127939) in the whole exom analysis of *FcγRIIIA* gene by new generation sequencing method. In addition, a possible chimeric region (exon 1 and exon 2 and exon 1 intron region) similar to *FcγRIIIA* and *FcγRIIIB* was determined by sequencing.

In conclusion, in this study, patients with FNKD were evaluated with advanced functional and genetic analyzes. Differences were found in terms of NK number and functions. *FcγRIIIA* gene polymorphisms were identified related to the population of Turkey is made in the first evaluation will be done in the field of NK cell research is expected to shed light on the new study.

Keywords: *FcγRIIIA*, NK, NK subgroup, Cytotoxicity.

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Doğal öldürücü hücrelerin (natural killer, NK) yıllar önce histolojik olarak tanımlaması yapılmış ve büyük granüler lenfositler olarak isimlendirilmiştir. Daha sonra, major histokompatibilite kompleks (MHC) sınırlaması olmadan, hedef hücreyi spontan öldürebilme yeteneğinden dolayı doğal öldürücü hücreler olarak adlandırılmıştır. NK hücreler kemik iliğinden köken alan ve periferik kan lenfosit havuzunun %5-10'nunu oluşturan lenfositik hücrelerdir. Yabancı, patojenik veya tehlikeli antijenlerle daha önce karşılaşma ihtiyacı olmadan immün yanıt oluşturabilme kapasitesinden dolayı doğal immün sistemin hücreleri olarak kabul edilmektedir. Ayrıca herhangi bir uyarıya gerek duymaksızın (antikor veya antijen) hedef hücreyi öldürme yeteneğine sahip hücrelerdir (Lanier ve ark. 1986).

NK hücreler fenotipik olarak, büyük sitoplazmik granüllerinin varlığı ile diğer lenfositlerden ayrılmaktadır. NK hücreler, CD3, CD4, CD8 ve CD19 gibi lenfosit yüzey belirteçlerini eksprese etmeyip, CD2 (LFA-3; adezyon molekül reseptörü), CD16 (IgG için FcγRIIIa reseptörü), CD56 (NCAM; nöral hücre adezyon molekülü) ve CD335 (viral hemaglutinin için doğal sitotoksik NKp46 spesifik reseptör) eksprese ederler. Dolayısıyla, bu hücreler fenotipik olarak CD3⁻, CD16⁺ ve CD56⁺ olarak karakterize edilmektedir. Periferik kanda bulunan NK hücrelerinin büyük çoğunluğu CD56 molekülünü orta seviyede eksprese ettiğinden CD56^{dim} (CD56^{soluk}) olarak, çok az bir çoğunluğu da (~%5) yüksek oranda CD56 eksprese ettiğinden CD56^{bright} (CD56^{parlak}) olarak isimlendirilirler. NK hücrelerinin bu iki grubu gelişim ve fonksiyonel olarak önemli farklılıklara sahiptirler (Mandelboim ve ark. 2001; Cederbrant ve ark. 2003; Orange 2006).

NK hücreler, virüs ile enfekte olmuş hücreler ve maling hücreleri sitotoksik özellikleri ile ortadan kaldırma özelliklerinin yanı sıra, kemokin ve interferon gama (IFN-γ) gibi sitokinler salgılayarak da bağışıklık yanıtlarını modüle edip doku homeostazına katkıda bulunurlar (Caligiuri 2008; Vivier ve ark. 2008). NK hücrelerin bu görevleri yerine getirmesinde farklı reseptör grupları görev yapmaktadır. Memeli genomunda iki farklı bölgede kümelenmiş genler tarafından kodlanan bu reseptörler, yapısal olarak iki ana gruba ayrılmaktadır. Birinci grup reseptörler, C-tipi lektin benzeri (CTLR) süper ailesi olup, 12. kromozomda lokalize NK gen kompleksi (NKC) tarafından kodlanır. İkinci grup reseptörler ise,

immünoglobulin benzeri NK reseptörü olup 19. kromozomda bulunan lökosit reseptör kompleksi (LRC) tarafından kodlanır. İnhibitör NK reseptörlerinin klasik MHC-I molekülleri ile ligasyonu sonucu LRC veya NKC ilişkili genlerin ekspresyonu düzenlenerek NK hücre aktivasyonu kontrol edilir (Lanier ve ark. 1986).

NK hücrelerinden kaynaklanan hastalık grubu NKD olarak isimlendirilip, iki grupta incelenmektedir. İlk grup NK hücre bozuklukları, periferik kan NK hücre sayısındaki azlığa bağlı olarak tanımlanır ve “klasik NK eksikliği (CNKD)” olarak isimlendirilir. İkinci grup ise, NK hücrelerinin fonksiyonel bozuklukları ile karakterize olup “fonksiyonel NK eksikliği (FNKD)” adlandırılır (Orange 2002).

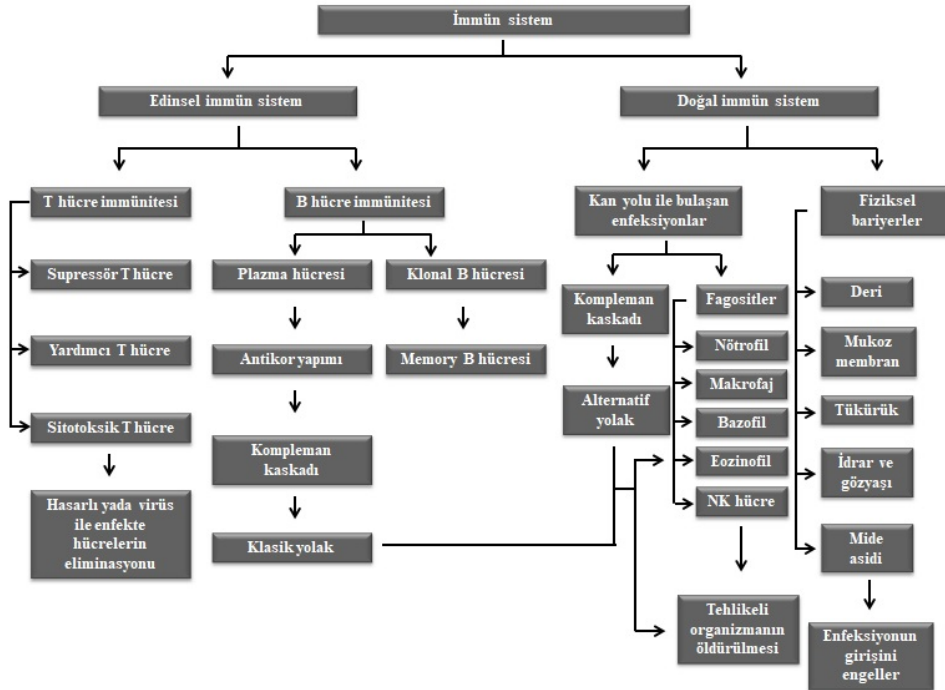
NK hücre bozukluklarında altta yatan moleküler mekanizmalar tam olarak bilinmemektedir. Az sayıda vaka içeren farklı çalışmalarda, hastalığa neden olan birkaç farklı gen (MCM4, GATA2, RTEL1, IRF8) tanımlanmıştır. NKD'den sorumlu aday genlerden bir tanesi de *FcγRIIIA* genidir. *FcγRIIIA* geninde tanımlanan L66H ve V176F mutasyonu ilginç bir şekilde reseptör ekspresyonunu engellemeyip, epitop kaybı ile sonuçlanmaktadır. Bu durum ise akım sitometri analizlerde CD16 reseptör tayinini zorlaştırmaktadır. Ayrıca V176F mutasyonu ADCC'yi, L66H mutasyonu ise NK hücrelerinin sitotoksitesini etkilemektedir. Dolayısıyla NKD tanılı, özellikle FNKD tanısı düşülen hastalarda olası *FcγRIIIA* mutasyonunun tanımlanması önem arz etmektedir (Jawahar ve ark. 1996; Mace ve ark. 2016).

Bu çalışmada, sık enfeksiyon öyküsü (özellikle viral) olan hastalar öncelikle NKD açısından değerlendirilmiş olup, NK hücre düşüklüğü tespit edilen hastalar olası *FcγRIIIA* gen mutasyon(lar)u açısından araştırılmıştır. Bu hastalarda önemli role sahip olan NK hücre fonksiyonu, NK hücre sitotoksitesite testi yöntemi ile değerlendirilmiştir. İlave olarak NK hücre alt grupları da belirlenerek, hastaların NK hücre gelişimi kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır. Böylece NKD tanısı düşünülen hastalar hem fonksiyonel hem de genetik açıdan ayrıntılı bir şekilde araştırılmıştır.

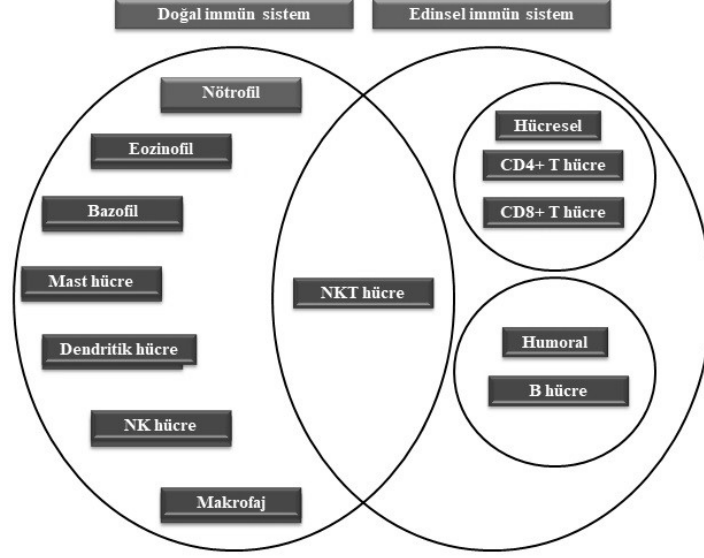
2. GENEL BİLGİLER

2.1. İmmün Sistem

Terminolojik olarak immünite, enfeksiyonlara karşı oluşan direnç olarak tanımlanmaktadır. Enfeksiyonlara karşı savunmayı sağlayan hücrelerin, dokuların ve moleküllerin toplamı da immün sistem olarak adlandırılmaktadır (Abbas 2012). Bu hücrelerin enfeksiyon etmenine karşı verdiği tepki de immün yanıt olarak isimlendirilmektedir. İmmün sistemin temel görevi, konağa zarar verme olasılığı olan yabancı mikroorganizmalara, fiziksel veya kimyasal tehditlere karşı konağı korumak ve organizmada normal şartların devamını sağlamaktır. İmmün sistem organizmayı, bazen yabancı olanı tanıyıp immün yanıt vererek, bazen de kendinden olanı tanıyıp cevapsız kalarak korur. İmmün sistemin asıl görevi, kendinden olmayan enfeksiyon ajanlarını yok etmek olup edinsel ve doğal immün sistem olmak üzere 2 alt grupta incelenmektedir (Şekil 1). Her iki grup immün sistemde görev yapan hücreler bulunmaktadır (Şekil 2; Şekerel 2015; Camcıoğlu ve Deniz 2007; www.virtualmedicalcenter.com).



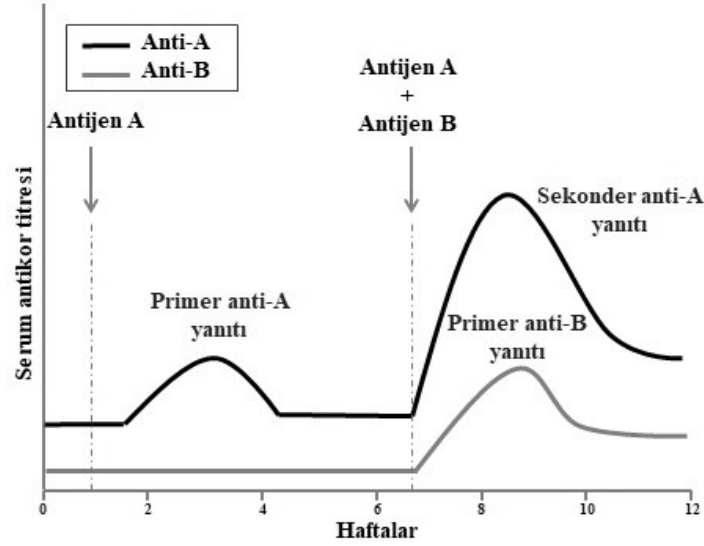
Şekil 1. İmmün sistemin elemanları ve görevleri.



Şekil 2. Doğal ve edinsel immün sistem hücreleri.

2.1.1. Edinsel İmmün Sistem

Mikroorganizmalara karşı oluşturulan immün yanıt, doğal ve edinsel immün sistem elemanları tarafından gerçekleşmektedir. Doğal immün sistem de oluşan yanıtı hızlı ve kısa süreli iken, edinsel immün sistemde ki yanıt, geç ve uzun sürelidir (Zabriskie 2009). Edinsel immün sistemin özgüllük ve bellek olmak üzere iki önemli özelliği bulunmaktadır. Özgüllük, her antijene karşı oluşturulan farklı immün yanıt olarak tanımlanmaktadır. Oluşturulan bu immün yanıtın kaynağı ise lenfositlerin özgüllüğünden kaynaklanmaktadır. Bellek ise, aynı antijen ile tekrar karşılaşma durumunda oluşturulan artmış ve etkili yanıt olarak tanımlanmaktadır (Şekil 3) (Camcıoğlu ve Deniz 2007). Edinsel immün sistem de immün yanıt lenfositlerin antijen reseptörü aracılığıyla ilgili antijeni tanınması ile başlar. T ve B lenfositlerin rol oynadığı immün yanıtı göre edinsel immün sistem, humoral ve hücresel immün sistem olarak iki gruba ayrılır (Adkinson 2013).



Şekil 3. Edinsel immün sistemin özgüllüğü ve belleği.

Humoral immün yanıt, B lenfositler tarafından üretilen antikorlar ile hücre dışı mikroorganizmalara karşı oluşturulan yanıttır. Hücresel immün yanıt ise, yardımcı (CD4+) ve sitotoksik (CD8+) T lenfositler tarafından oluşturulan immün cevap olarak tanımlanmaktadır (Şekerel 2015).

2.1.2. Doğal İmmün Sistem

Tüm çok hücreli canlılar, mikroorganizmaların neden olduğu enfeksiyonlara karşı kendine korumak için intrinsik bir savunma mekanizmasına sahiptir. Bu savunma mekanizması, enfeksiyona neden olan mikroorganizmaları tanıyıp onları etkisiz hale getirmek için doğal olarak mikroorganizmada bulunduğundan doğal immün sistem olarak isimlendirilmektedir (Camcıoğlu ve Deniz 2007). Doğal immün sistem enfeksiyonlara karşı ilk savunma hattını oluşturur, mikroorganizmaların konak dokuya girişini engeller ve konak dokuya girmiş olan mikroorganizmaları da yok eder. Ayrıca doğal immün sistem, edinsel immün sistemin aksine mikroorganizma ile karşılaştığı andan itibaren hızlı bir yanıt oluşturur ve edinsel immün yanıtın şekillenmesine de yardımcı olur (Abbas ve ark. 2012).

Doğal immün sistemin edinsel immün sistemden en önemli farkı bellektir. Doğal immün sistemin bellek özelliği olmayıp aynı tip enfeksiyon etmeni ile tekrar karşılaştığında aynı şiddette yanıt oluşturur. Diğer önemli bir özelliği de, mikroorganizmalar üzerinde ortak olarak bulunan yapıları özgül olarak tanıyıp yanıt oluşturmasıdır. İlave olarak doğal immün sistem, enfeksiyona sebep olmayan yabancı ajanlara karşı yanıt oluşturmazlar (Rich 2013).

Doğal immün sistemde deri ve muköz membran gibi fiziksel engel oluşturan yapılar, antimikrobiyal salgılar ve özelleşmiş hücreler görev yapmaktadır. Bu hücrelerden makrofaj ve nötrofiller fagositoz, mast hücreleri ise heparin ve histamin üretiminden sorumludur. NK hücreleri de sitolitik etkileri ile doğal immün sistemde görev alan önemli hücrelerdir (Abbas ve ark. 2012; Şekerel 2015).

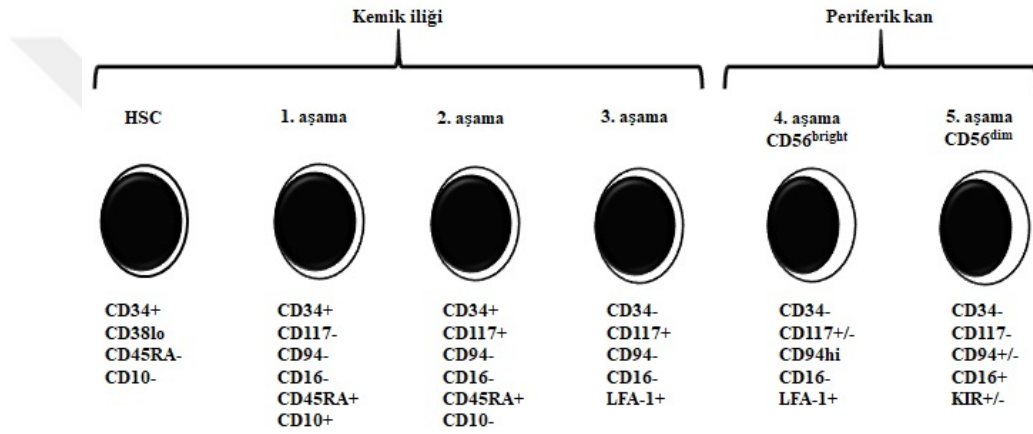
2.2. NK Hücre

NK hücreler, viral enfeksiyonlar ve tümör hücrelerine karşı konak hücreyi savunmada görevli olan hücrelerdir. Bu hücreler, yabancı, patojenik veya tehlikeli antijenlerle daha önce karşılaşma ihtiyacı olmadan yanıt oluşturabildiğinden doğal immün sistem hücreleri olarak kabul edilmektedirler (Biron ve ark. 1999; Miller 2001; Orange ve Ballas 2006). Yıllar önce bu hücreler, doğuştan gelen lenfositler olarak düşünülmüş olup sonradan NK hücrelerinin de diğer lenfositler gibi hafıza fonksiyonu sergiledikleri gösterilmiştir (O'Sullivan ve ark. 2015; Adams ve ark. 2016; Cerwenka ve Lanier 2016). İlave olarak NK hücreler, enfeksiyonlara karşı baskılayıcı hücreler olarak da görev yapabilmektedirler (Morandi ve ark. 2015).

2.3. NK Hücre Gelişimi

NK hücreler, kemik iliğindeki (BM) CD34⁺ hematopoietik kök hücreden (HSC) köken almaktadır (Colucci ve ark. 2003; Yu ve ark. 2013). Genel olarak, gelişimin farklı aşamalarında eksprese ettikleri yüzey moleküllerine göre prekürsör NK (pNK), immatur NK (iNK) ve mature NK olarak isimlendirilmektedirler (Miller ve ark. 1994; Luevano ve ark. 2012). HSC'den NK hücreye yönelmiş hücreler sırayla pNK ve iNK aşamalarından geçerek olgun NK hücresi oluşur (Blom ve Spits 2006). NK/T hücrelerinden pNK hücrelerine geçiş interlökin-2 (IL-2)/15R β (CD122 reseptör) ekspresyonu ile tanımlanır (Ikawa ve ark. 1999). CD122, IL-15'in β zincirinin oluşumunu gösteren bir belirteç olup, lenfoid progenitörlerde kümelenmesi bu hücrelerin NK yönünde farklılaştığını göstermektedir (Luetke-Eversloh ve ark. 2013; Yu ve ark. 2013). NK hücre gelişimi sırasında CD161, CD56, CD94/NKG2A, NKp46, NKG2D ve son olarak da CD16 ve öldürücü hücre immünoglobulin benzeri reseptör (KIR) ifade edilmektedir. Bu bilgiler ışığında, olgun NK hücre oluşumu 5 aşamada gerçekleşmektedir. Bu aşamalardan 4. ve 5. aşama periferik kanda meydana gelir ve sırasıyla CD56^{bright} ve CD56^{dim} ekspresyonları ile tanımlanır (Şekil 4; Yu ve

ark. 2013; Luetke-Eversloh ve ark. 2013; Loza ve ark. 2017; Mahapatra ve ark. 2017). CD56^{bright} hücrelerin CD56^{dim} NK hücrelerin öncülleri olduğu kabul edilmektedir (Cooper ve ark. 2001; Bryceson ve ark. 2010). Çalışmalar, CD56^{bright} popülasyonunun CD56^{dim} popülasyonundan daha uzun telomere sahip olduğunu göstermektedir. Ayrıca CD56^{bright} hücreler progenitör hücrelerde eksprese edilen CD117 eksprese etmekte ancak yaşlanmış hücrelerde eksprese edilen CD57 molekülünü eksprese etmemektedir. Bu da CD56^{bright} hücrelerin CD56^{dim} hücrelere öncülük ettiği ve daha fazla çoğalma kapasitesine sahip olduğunu açıklamaktadır (Matos ve ark. 1993; Brenchley ve ark. 2003; Romagnani ve ark. 2007; Cosan ve ark. 2017; Dobbs ve ark. 2017).



Şekil 4. NK hücre gelişimi.

Hücreler pNK'dan iNK'ya doğru farklılaşırken Flt3 ve IL-7R α ekspresyonu azalır ancak IL-2R β , CD2 ve 2B4 (CD244) ekspresyonu artmaktadır (Yu ve ark. 1998; Sivori ve ark. 2002). iNK hücreler CD161 (CD3⁻CD56⁻CD161⁺) ekspresyonu ile tanımlanır (Lanier ve ark. 2004). IL-15'in NK hücre gelişiminde vazgeçilmez olduğu bilinmesine rağmen, HSC'den pNK oluşumunun IL-15'den bağımsız bir mekanizma ile de oluşabileceği düşünülmektedir. IL-15 ve IL-15 reseptörü olan IL-15R pNK'dan iNK farklılaşmasına aracılık eder (Roychowdhury ve ark. 2005).

NK hücrelerinin son olgunlaşma aşaması, aktive ve inhibe edici reseptör ekspresyonlarının kazanılması ile karakterize edilir. Aktivasyon reseptörü olan NKp44, NK hücre olgunlaşmasının erken safhalarında eksprese olan NK hücre reseptörüdür. Diğer aktivasyon reseptörleri olan NKp46, NKp30, NKG2D ve DNAM-1 NK hücre olgunlaşmasının ileri safhalarında eksprese olan reseptördür (Freud ve ark. 2006).

2.4. NK Hücre Alt Grupları

Periferik kandaki NK hücreler, $CD3^-CD16^+CD56^+$ olarak tanımlanır ve sağlıklı insanda periferik lenfositlerin yaklaşık %1-17'sini oluştururlar (Angelo ve ark. 2015). 1983 yılında NK hücreler ilk defa, Lewis Lanier tarafından fenotipik olarak iki büyük grupta gruplandırılmış ve periferik kanda daha az oranda bulunan $CD56^{bright}$ ile daha baskın olarak bulunan $CD56^{dim}$ olarak isimlendirilmiştir (Lanier ve ark. 1983). $CD56^{bright}$ grubu NK hücreler güçlü sitokin salgılama yeteneğine sahip olup, $CD56^{dim}$ alt grubu ise doğal sitotoksiteden sorumlu olan NK hücreler olarak tanımlanmıştır (De Maria ve ark. 2011; Nielsen ve ark. 2012; Cosan ve ark. 2017). Antikor aracılı hücrel sitotoksitede yeteneklerin anlaşılmasının ardından eksprese ettikleri CD16 ekspresyonlarına göre de gruplandırılmışlardır. Böylece hücreler CD56 ve CD16 ekspresyonlarına göre çeşitli alt gruplara ayrılmıştır. Periferik kanda yaklaşık %90 oranında bulunan $CD56^{dim}CD16^{bright}$ alt grubu NK hücre sitotoksitesinden sorumludur. Periferik kanda ki NK'ların yaklaşık %10'luk kısmını oluşturan grup ise $CD56^{bright}CD16^{dim}$ olan gruptur ve sitokin üretiminde görevlidir (Cooper ve ark. 2001; Michel ve ark. 2016; Cosan ve ark. 2017; Dobbs ve ark. 2017).

Son yıllarda Amand ve ark. (2017) tarafından yapılan çalışmada, $CD56^{dim}CD16^{dim}$ NK hücre alt grubunun da varlığı tespit edilmiştir. Periferik kandan saflaştırılan $CD56^{dim}CD16^{dim}$ hücrelerin $CD56^{dim}CD16^{bright}$ hücrelerden fazla degranüle olduğu tespit edilmekle birlikte $CD56^{dim}CD16^{bright}$ hücrelerin öncüleri oldukları konusunda kesin bir bilgi elde edilememiştir.

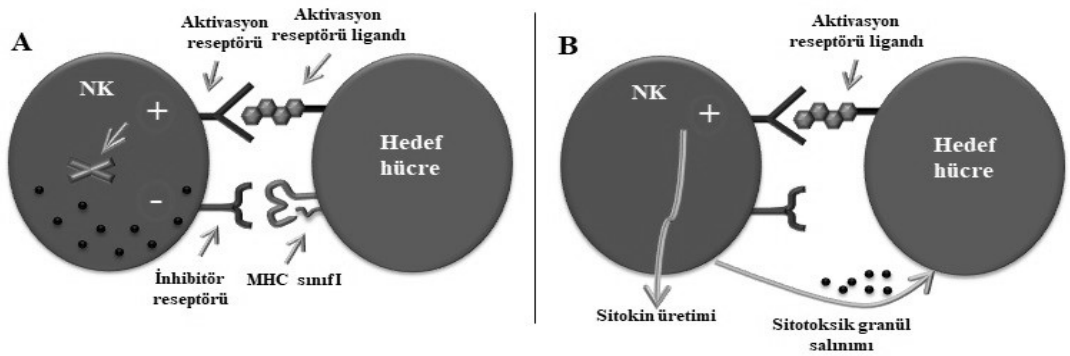
Bu bilgilere ilave olarak NK hücreler, bir integrin olan CD11b ve olgun NK hücre markırı olan CD27 ekspresyonlarına göre de gruplandırılmıştır. Bununla ilgili ilk çalışmalar farelerde gerçekleştirilmiş olup CD27 ekspresyonu açısından negatif olan farelerin NK hücreleri normal gelişim göstermesine karşın uyarılmaya karşı bozuk fonksiyon gösterdiği tespit edilmiş ve NK hücreler CD11b ve CD27 ekspresyonlarına göre 4 gruba ayrılmıştır (Kim ve ark. 2002; Freud ve ark. 2006; Hayakawa ve Smyth 2006; De Colvenaer ve ark. 2011). Periferik kandaki NK hücrelerinin %90'ı $CD11b^+CD27^-$ iken, kord kanındaki NK popülasyonunun %80'i $CD11b^+CD27^-$ ve %20'si C ise $CD11b^+CD27^+$ olarak bulunmuştur. Bu iki grup NK hücresi karşılaştırıldığında, dezidual NK hücrelerinin çoğunluğu immatür olup %60'ı

CD11b⁺CD27⁻ ve %20'si CD27⁺ olarak tespit edilmiştir. CD11b⁻CD27⁺ ve CD11b⁺CD27⁺ NK hücreler sitokin salgılama yeteneğine sahiptir. CD11b⁺CD27⁻ NK hücre grubu ise yüksek sitotoksikite yeteneğine sahip hücre grubu olarak belirlenmiştir. CD11b⁻CD27⁻ NK hücre de olgunlaşmamış NK hücrelerini temsil etmektedir (Vossen ve ark. 2008; Fu ve ark. 2011; Jin ve ark. 2013; Fu ve ark. 2014).

Bazı araştırmacılar tarafından NK hücrelerinin, mikro çevre ile bu çevreden gelen sinyallerden etkilendiği ve bunların etkisiyle fonksiyonel olarak NK^{tolerant}, NK^{cytotoxic} ve NK^{regulatory} olarak 3 gruba ayrılabilceğini savunmaktadır. NK^{cytotoxic} grup, CD56^{dim} veya CD11b⁺CD27⁻, NK^{tolerant} grup, CD56^{bright} veya CD11b⁻CD27⁻ ve NK^{regulatory} hücreler ise CD56^{bright} veya CD27⁺ fenotipe sahip olan hücreler olarak tanımlanmaktadır. Buna ilave olarak, fonksiyonel ve fenotipik olarak farklı özelliklere sahip olan bu hücreler farklı organlarda bulunmaktadır. Örneğin karaciğerde bulunan NK hücreler immün toleransa, dezidual dokuda bulunan NK hücreler maternal-fetal immün regülasyona ve tümör infiltre dokularda bulunan NK'lar da direkt olarak tümörün eliminasyonuna neden olurlar (Shi ve ark. 2011; Arck ve Hecher 2013; Peng ve ark. 2013; Sun ve ark. 2013; Tian ve ark. 2013).

2.5. NK Hücre Aktivasyon, İnhibisyon Reseptörleri ve Görevleri

NK hücre aktivasyonu pozitif ve negatif yönde sinyal sağlayan reseptörler arasındaki denge ile kontrol edilmektedir (Şekil 5; Vivier ve Ugolini 2011; Vivier ve ark. 2012; Carrillo-Bustamante ve ark. 2016).

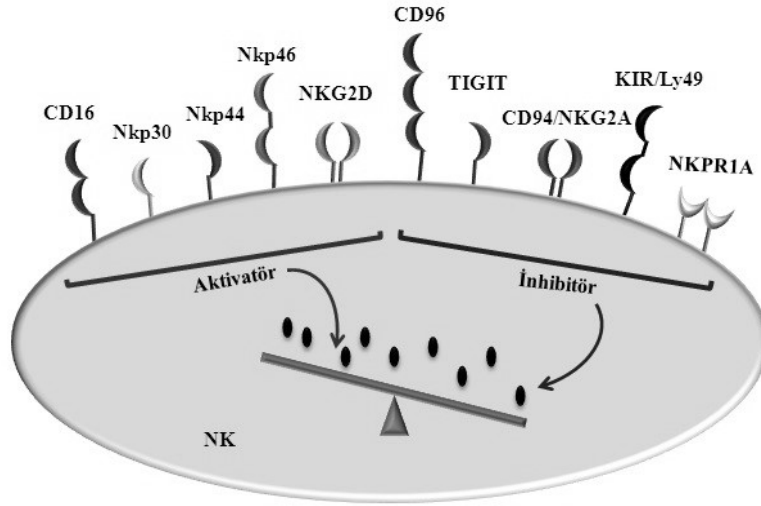


Şekil 5. NK hücrelerin aktivasyon ve inhibisyon reseptörleri ile kontrolü.

(A. Hedef hücrede ki MHC-I molekülleri ile NK hücrede inhibitör reseptör etkileşimi sonucu NK hücre aktivasyon reseptörlerinin inhibisyonu. B. MHC Sınıf I molekülünden yoksun hedef hücrenin NK tarafından eliminasyonu).

Pozitif yönde etki gösteren NK hücre reseptörleri, immüoglobulin benzeri reseptörler (KIR) ve CD16'yı içermektedir. NKG2D, NKp46, NKp30 ve NKp44 KIR grubuna dahil olan reseptörler olup NK hücrelerin aktivasyonunu sağlar, sitotoksiteyi uyarır ve sitokin üretimini tetikler (Şekil 6). Bu reseptörlerden bazıları transmembran sinyal adaptörleri ile reversible olarak ilişkiye girer ve protein tirozin kinaz bağımlı sinyal yolağını aktive eder. Bu adaptör proteinler sitoplazmik bölgelerinde tirozin ve lösince zengin dizilerinden oluşan immünoreseptör tirozin bağımlı aktivasyon motifleri (ITAMs) barındırmaktadır (Yxx(I/L)_{x6}-12Yxx(I/L); Krzewski ve Strominger 2008). Bu motifler normal olarak ligand bağlayan transmembran reseptörlerin sitoplazmik bölgelerinde lokalize olup aktivasyon ve inhibisyona aracılık eder. NK aktivasyonuna doğrudan ITAMs motiflerine bağlanmayan ilave hücre yüzey reseptörleri de katkıda bulunmaktadır. Bu grup hücre yüzey reseptörleri integrin ve sitokin reseptörlerinin yanı sıra DAP10 transmembran adaptör molekül ile ilişkili NKG2D'yi içermektedir (Malhotra ve Shanker 2011). NKG2D reseptörlerinin ligandları olan MICA ve RAET1 ailesi ile Nkp30'un ligandları olan B7H6'nın keşfi bu reseptörlerin normal hücrelerde nadiren eksprese olduğunu, enfeksiyon veya karsinogenez gibi durumlarda ise ifadesinin arttığını göstermektedir (Yoon ve ark. 2015).

NK hücreler aynı zamanda aktivasyon reseptörlerine antagonist, inhibitör reseptörleri de eksprese etmektedir (Krzewski ve Strominger 2008; Narni-Mancinelli ve ark. 2013). NK hücre inhibisyon reseptörleri, CD94/NKG2A, NKRP1A, Ly49, TIGIT ve CD96'yı içermektedir (Şekil 6). Tipik olarak inhibitör NK reseptörleri, kendinden oları tanıyıp negatif yönde sinyaller sağlayarak NK hücre aktivasyonunu bloke etmektedir. İnhibitör reseptörler de KIR grubu reseptörler olup inhibitör KIR olarak isimlendirilir ve sitoplazmik kuyruklarında immünoreseptör tirozin bağlı inhibitör motiflerinin (ITIM) varlığı ile karakterizedirler (Vivier ve Ugolini 2011). İnhibitör KIR reseptörlerin ligandları, majör histokompatibilite kompleksi (MHC) sınıf I molekülleridir. İnhibisyon reseptörler ile ligand etkileşiminin ardından intrasitoplazmik ITIM'lar tirozin rezidülerinden fosforillenir ve NK hücre aktivasyonu inhibe olur (Romagne ve Vivier 2011; Vivier ve ark. 2004).



Şekil 6. NK hücre aktivasyon ve inhibisyon reseptörleri.

2.6. NK Hücre Fonksiyonu

NK hücrelerin iki önemli fonksiyonu bulunmaktadır. Bunlardan birincisi, hücrel sitotoksitedir. NK hücrelerin bu özelliği, herhangi bir uyarana bağlı olmadan hedef hücreyi tanıyıp öldürme yetenekleri olarak tanımlanmaktadır. İkinci önemli fonksiyonu ise, immünoglobulin G (IgG) antikoları aracılığıyla hedef hücreyi elimine etmek için humoral immün sistemle iş birliği halinde olduğu antikor bağımlı hücrel sitotoksitedir (ADCC) (Moretta ve ark. 2002; Lanier 2005).

2.6.1. NK Hücre Sitotoksitesi

NK hücre reseptörleri ile hedef hücre yüzeyinde bulunan ligandların etkileşimi sonucu, NK hücreler hedef hücreyi öldürebilirler. NK hücrelerinin bu özelliği adaptif immün sistem ile etkileşim gerektirmediğinden “doğal” veya “spontan” sitotoksite olarak isimlendirilmektedir (Moretta ve ark. 2001).

NK hücreler gibi sitotoksik T lenfositler’de (CTL), direkt olarak enfekte hücreyi öldürme yeteneğinde olan diğer hücre grubudur. Bu hücreler antijen spesifik olup virüs veya tümöre ait antijenler, antijen sunan hücrelerin (ASH) MHC sınıf I molekülleri ile CTL’lere sunulduğu takdirde sitotoksik özellik gösterebilmektedir. Şaşırtıcı bir şekilde virüs ile enfekte olan hücreler ile tümör hücrelerinde, MHC sınıf I ekspresyonları baskılandığında bu hücreler CTL’nin sitotoksik etkisinden kaçmakta ve NK hücrelerinin hedefi haline gelmektedir (Hewitt 2003; Garcia-Lora ve ark. 2003). Çünkü NK hücreler MHC sınıf I molekülleri kaybolmuş olan hücreleri

tanımakta ve lizozomal enzimler aracılığıyla sitotoksisite meydana gelmektedir. MHC molekülleri bulunan hücrelerde bu reseptörler NK hücrelerinin inhibitör reseptörleri tarafından tanınır ve NK hücre aktivasyonu baskılanır (Moretta ve ark. 2002; Lanier 2005; Waldhauer ve Steinle 2008).

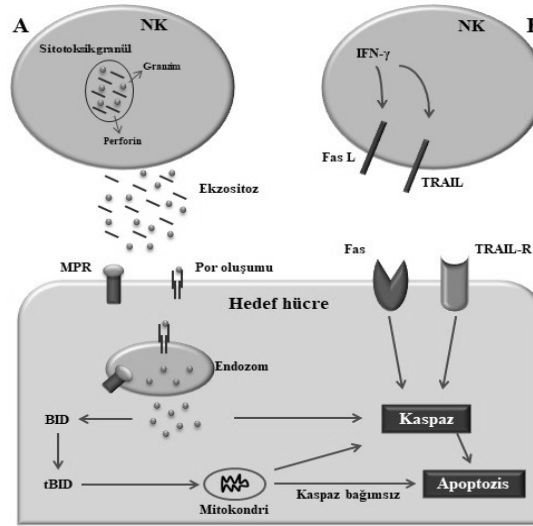
NK hücrelerin sekretuar lizozomlarında bulunan major sitotoksik proteinler perforin ve granzimdir (Lettau 2007; Pipkin ve Lieberman 2007; Chowdhury ve Lieberman 2008). NK hücrelerin hedef hücreler ile etkileşimi sonucu sekretuar lizozomların ekzositozu gerçekleşir ve organelde bulunan sitotoksik enzimlerin salınımı gerçekleşir. Perforin (por-formasyon proteini), granzimlerin hedef hücreye girişini kolaylaştıran proteindir. Granzimler ise kaspazların aktivasyonunu sağlayarak hedef hücrenin lizisine neden olan protein grubudur (Lieberman 2003; Trapani ve Bird 2008).

NK hücrelerinin sitotoksisitesi temel olarak 4 aşamada gerçekleşmektedir. Birinci aşama, hedef hücre ile NK hücre arasındaki litik immünolojik sinaps oluşumu olup bu oluşum aktin isketinin yeniden düzenlenmesi sonucu gerçekleşir. İkinci olarak, NK hücrelerinde mikrotübül organizasyon merkezinin (MTOC) ve sekretuar lizozomların litik sinapsa doğru polarizasyonudur. Üçüncü aşamada, lizozomların litik sinapsdaki plazma membranı ile bağlantısı gerçekleşir ve son aşamada ise plazma membranı ile füzyon gerçekleşerek sitotoksik içerikler hedef hücreye bırakılır. Bu olay “granül aracılı hücre ölümü” olarak isimlendirilmektedir (Warren ve Smyth 1999; Topham ve Hewitt 2009).

Granül aracılı hücre ölümünde asıl görev yapan proteinler perforin ve granzimlerdir. Perforinler, hedef hücre zarında fosfodilkolinlerin baş gruplarına bağlanarak osmotik hasara neden olur, hedef hücrenin lipid çift yapısı bozulur ve hücre zarında porlar meydana gelir (Tschopp ve Nabholz 1990). Oluşan porlardan bir serin proteaz olan granzimler hedef hücre içine girer. İnsanlarda 5 granzim (Grz A, Grz B, Grz H, Grz K ve Grz M) tanımlanmıştır (Trapani ve ark. 2000). GrzB, direkt olarak apoptozu uyarabilmekle birlikte, kaspazların aktivasyonunu sağlayarak da apoptozu başlatabilmektedir. Bundan dolayı Grz B asıl görev yapan bileşendir (Warren ve Smyth 1999). Grz B ile Grz A'nın perforin varlığında sinerjistik etki göstererek hedef hücre ölümüne neden olduğu da gösterilmiştir. Son zamanlarda Grz A ile yapılan çalışmalar kaspaz aktivasyonunu sağlayarak, laminleri parçalayarak ve

DNA tek zincirinde nickler oluşturarak hücre ölümünü tetiklediği gösterilmiştir (Beresford ve ark. 1999; Fan ve ark. 2003). Diğer bir granzim olan Grz M ile yapılan çalışmalarda, perforin varlığında kaspazdan bağımsız hücre ölümüne aracılık ettiği gösterilmiştir (Kelly ve ark. 2004).

Granül aracılı sitotoksositeye ilaveten, NK hücre yüzeylerinde eksprese ettikleri TNF aracılı apoptoz indükleyen ligand (TRAIL) ve Fas ligandı (FasL) gibi moleküllerle hedef hücre zarındaki Fas ve TNF benzeri hücre ölüm reseptörlerini uyararak hedef hücrede apoptotik süreci başlatabilmektedir. FasL ve TRAIL reseptörlerin ekspresyonu da interferon gamma (IFN- γ) ile indüklenmektedir. Böylece hedef hücre NK hücre tarafından elimine edilmektedir (Smyth ve ark. 2005; (Şekil 7).



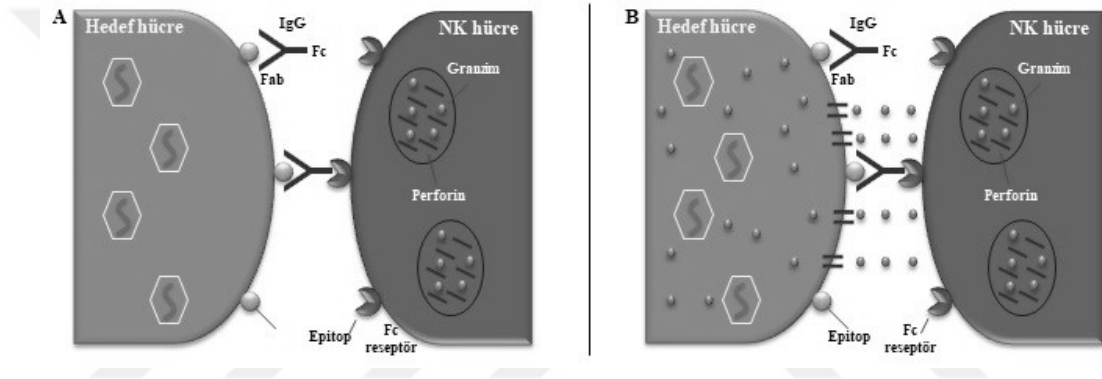
Şekil 7. NK hücre aracılı hücre ölümüne ait yollar. (A. Granül aracılı hücre ölümü B. TRAIL ve Fas L aracılı hücre ölümü).

2.6.2. Antikor Bağımlı Hücrel Sitotoksosite

Hematopoietik hücrelerin çoğu (çoğu T hücre alt grupları hariç) Fc gamma reseptörlerini (Fc γ Rs) eksprese etmektedir (Nimmerjahn ve Ravetch 2008). IgG antikorlarının Fc bölgesini tanıyan 3 çeşit Fc γ Rs vardır. IgG1 ve IgG3 antikorlarına yüksek affiniteli olan Fc γ RI (CD64), nötrofil ve makrofajlarda eksprese olur ve bu hücrelerin fagositozuna aracılık eder. Fc γ RII (CD32) sınıfı reseptör, IgG1, IgG2 ve IgG3 antikorlarına karşı düşük affiniteli olan Fc γ RIIA ve IgG1 ve IgG3 antikorlarına karşı düşük affiniteli olan Fc γ RIIb reseptörlerini içerir. Bu reseptör sınıfı üyeleri Fc γ RI aracılı fagositozu da inhibe eder. Fc γ RIII (CD16) sınıfı reseptörler, *Fc γ RIIA* ve *Fc γ RIIIB* olmak üzere iki reseptör grubunu içerir. *Fc γ RIIIB* reseptörleri,

nötrofillerde eksprese olup nötrofillerin aktivasyonunda görev yapar. *FcγRIIIA*, $CD16^{bright}CD56^{dim}$ NK hücrelerinde eksprese olan ve IgG1 ile IgG3 antikorlarına karşı yüksek affiniteli reseptör olup antikor bağımlı hücrel sitotoksositeye (ADCC) aracılık eder (Seidel ve ark. 2013).

ADCC, NK hücrelerinin antikor aracılı sitotoksosite yeteneğini ifade eder. IgG1 ve IgG3 yapıdaki antikorlar antijen bağlama fragmenti (Fab) bölgesi ile virüs ile enfekte olmuş hücrelere ya da tümör hücresine bağlanır. Daha sonra antikorlar Fc bölgesi ile de NK hücresinde eksprese olan *FcγRIIIA* reseptörüne bağlanır ve bu etkileşim sonucu hedef hücrenin eliminasyonu meydana gelir (Şekil 8; Wang ve ark. 2015).



Şekil 8. ADCC mekanizması.

(A. IgG yapıdaki antikorların Fab bölgesi ile hedef hücredeki epitopa bağlanması. B. Aktivasyon sonrası perforinlerin hedef hücre zarında por oluşturması ve granzimlerin hedef hücreye girişi).

Antikor bağımlı hücre sitotoksosite aktif hale geldiği zaman (i) sitotoksik granüllerin ekzositozu, (ii) TNF aracılı apoptozun aktivasyonu ve (iii) IFN- γ gibi sitokinlerin salınımını içeren 3 olay meydana gelir (Smyth ve ark. 2005; Wang ve ark. 2015). NK hücre tarafından perforin ve granzimlerin salınımı ile TNF ailesi reseptörlerin aktivasyonu, hedef hücrenin apoptozuna neden olurken IFN- γ salınımı, yakın bölgedeki diğer immün sistem hücrelerini aktive ederek antijen sunumunu ve adaptif immün sistemin aktivasyonunu sağlar (Poli ve ark. 2009; Srivastava ve ark. 2013; Kinder ve ark. 2015).

2.7. NK Hücre Hastalığı ve Sınıflandırılması

Bir hasta da NK hücre hastalığını (NKD) düşünebilmek için, NK hücre üzerindeki etkinin hastada ki ana immünolojik anormalliği temsil etmesi gerekmektedir. Çünkü birçok hastalık, ilaç, enfeksiyon ve bazı fizyolojik durumlar

NK hücre sayılarını, fonksiyonlarını veya her ikisini birden etkileyebilmektedir. Bundan dolayı izole NKD tanısını düşünebilmek için, hastanın NK hücre sayısı ve fonksiyonu uzun süre bozuk fonksiyonda kalmalı, hastanın kliniği ile de bu durum uyumlu olmalı ve olası ikincil faktörler dışlanmalıdır (Orange 2013). NKD konjenital olan veya olmayan, ciddi ve sıklıkla ölümcül viral enfeksiyonlarla birlikte maligniteye yatkınlık ile seyreden bir primer immün yetmezlik (PİY)'tir. NKD'ler NK hücrelerinin şiddetli ve tamamının eksikliği ile karakterize "klasik NKD" (CNKD) ve periferik NK hücre sayısı normal olan ancak fonksiyonel olmayan NK'lar ile karakterize "fonksiyonel NKD" (FNKD) olarak sınıflandırılmaktadır (Orange 2012; Orange 2013).

2.7.1. Klasik NK Hücre Hastalığı ve Genetik Sebepleri

CNKD, $CD56^+CD3^-$ NK hücrelerin hem sayısal yokluğu hem de fonksiyonel bozukluğu ile tanımlanmaktadır. (Orange 2012; Mace ve Orange 2016; Voss ve Bryceson 2017). İlk defa 1989 yılında varisella pnömönisi, sitomegalovirüs (CMV) ve herpes simpleks virüs (HSV) enfeksiyonlarını da içeren şiddetli ve yaygın herpesvirüs enfeksiyonu kliniğine sahip adolesan bir kız çocuğunda tanımlanmıştır. Hastanın immünolojik tetkiklerinde $CD56^+CD3^-$ NK hücre hücrelerinin olmadığı ve NK hücre sitotoksitesinin negatif olduğu tespit edilmiştir. Bu hasta CNKD hastalığı için indeks vaka (proband) olmuştur. Ancak o yıllarda ki teknolojik yetersizlikten dolayı hastalığın genetik sebebi açıklanamamıştır (Biron ve ark. 1989). Son yıllardaki teknolojik ilerlemeler ile bu hastalığın altında yatan genetik bozukluklar ortaya çıkarılmaya başlamıştır. Günümüzde, *MCM4* (minichromosome maintenance complex component 4), *GATA2* (GATA binding protein 2), *RTEL1* (regulator of telomere elongation helicase 1) ve *IRF8* (Interferon regulatory factor 8) genlerindeki mutasyonların CNKD'ye sebep olduğu bilinmekle birlikte bu hastalıktan sorumlu başka aday genlerin de olduğu düşünülmektedir (Mace ve Orange 2016).

GATA2, çinko parmak transkripsiyon faktörü olup hematopoezde görev yapar ve HSC'lerin hayatta kalması ve kendini yenilemesi için gereklidir (Rodrigues ve ark. 2012; Collin ve ark. 2015). *GATA2* bozukluğu dendritik hücre alt grupları ve B hücre lenfopenisi ile sonuçlanabilmektedir. *GATA2*'nin fizyolojik görevleri göz önüne alındığında, *GATA2* bozukluğu dendritik hücre ve B hücre dışındaki birçok immün sistem hücrelerinin gelişimini etkileyebilmektedir (Mace ve ark. 2013).

GATA2 genindeki mutasyon(lar)a bağlı CNKD literatürde en fazla rastlanan gruptur. İlk defa 13 yaşında bir kız hastada tanımlanmış olup varisella pnömönisi, NK hücre azlığı ve fonksiyon bozukluğu ile tanımlanmıştır. Daha sonra hastada varisella zoster virüsü (VZV), HSV, CMV enfeksiyonu gelişmiş olup aplastik anemi kliniğe ilave olmuş ve hasta kemik iliği transplantasyonu sonrası kaybedilmiştir (Biron ve ark. 1989; Mace ve ark. 2013). Dizi analizi sonucunda *GATA2* geninde çerçeve kayması mutasyonu tespit edilmiş olup CNKD'nin sebep olduğu açıklanmıştır. *GATA2* mutasyonuna sahip olan bireylerde NK hücre sayısı düşük/normal olsa da belirgin CD56^{bright} NK hücre popülasyonunda düşüklük gözlenmektedir (Mace ve ark. 2013).

MCM4, DNA replikasyonu sırasında helikaz görevi gören bir protein kompleksidir. *MCM4* bütün hücrelerde eksprese edilmekle birlikte fonksiyonundan dolayı bütün hücreler için önemli olduğu düşünölmektedir. Farelerde yapılan çalışmalarda *MCM4* eksikliği olan farelerin embriyonik hayatta öldüğu gösterilmiştir (Bochman ve Schwacha 2009). *MCM4*'ün özelliği göz önüne alındığında NK hücrelerini veya NK hücre gelişiminde görevi bulunan diğer hücreleri etkilediği düşünölmektedir (Orange 2013). *MCM4* eksikliğine bağlı CNKD ilk defa 2012 yılında adrenal yetmezlik, gelişme geriliği, boy kısalığı ile presente olan İrlandalı bir popülasyonda tanımlanmıştır. Bu hastalarda viral enfeksiyonlar CMV ve maligniteye de yatkınlık tespit edilmiştir. Genetik analiz sonucunda splice bölge mutasyonu tespit edilmiştir. İmmünolojik incelemede CD56^{bright} popülasyonda ciddi oranda azalma ile birlikte NK hücre terminal farklılaşmasında da bozulma gözlenmiştir (Hughes ve ark. 2012).

RTEL1, DNA tamirinde ve NK hücre gelişiminde rol oynayan bir protein kompleksidir. *RTEL1* mutasyonuna bağlı CNKD ilk defa 2005 yılında 2 yaşında varisella enfeksiyonundan ölen bir kız çocukta tanımlanmıştır (Etzioni ve ark. 2005). Hastanın immünolojik tetkiklerin immünoglobulin seviyeleri, antikor titreleri, T ve B hücreleri normal olmasına rağmen, NK hücre sayısında azalma ve fonksiyonunda bozukluk tespit edilmiştir. Tüm ekzom analizi (WES) sonucunda *RTEL* geninde homozigot mutasyon tespit edilmiştir. Buna göre de *RTEL*'in de CNKD sebebi olduğu gösterilmiştir (Mace ve Orange 2016).

IRF8, özellikle viral enfeksiyonlarda inflamatuvar yanıtın şekillenmesine yardımcı olan IRF ailesine ait bir transkripsiyon faktörüdür (Emily ve ark. 2017).

Proband aile 1982 yılında tespit edilmesine rağmen 2016 yılına kadar genomik analizler gerçekleştirilememiştir. Hayatta kalan kardeşlerinin ileri analizlerinde NK hücre fonksiyonlarında ve CD56^{dim} hücresinde azalma ile CD56^{bright} hücre sayısında artış tespit edilmiştir. WES analizi sonucunda *IRF8* geninde missense mutasyon tespit edilmiştir (Mace ve ark. 2016). Bunun sonucunda, *IRF8*'in NK hücre terminal olgunlaşmasında kritik işlev gördüğü ve konjenital CNKD'ye neden olduğu ortaya konulmuştur (Emily ve ark. 2017).

2.7.2. *Fonksiyonel NK Hücre Hastalığı ve Genetik Sebepleri*

FNKD, periferik kanda normal sınırlarda CD56⁺CD3⁻ NK hücresi olmasına karşın fonksiyonel olmayan NK hücreleri ile karakterize bir hastalıktır (Komiya ve ark. 1990; Orange 2002; Orange 2013). NK hücre fonksiyonunun bozukluğuna bağlı en iyi bilinen PIY örneği perforin eksikliğidir. Ancak perforin eksikliği, sitotoksik T lenfositlerin litik fonksiyonunu da ortadan kaldırdığı için bir FNKD olarak düşünülmemektedir (Risma ve ark. 2006). Bundan dolayı FNKD, izole NK hücrelerinin fonksiyonunu etkileyen bir hastalık olarak tanımlanmakla birlikte, hastalığın teşhisi hücrenin fonksiyonel testine bağlı olduğu için tanımlanması da oldukça güç bir hastalıktır (Orange 2013).

FNKD'de herpesvirüs hassasiyeti yaygın olup Epstein-Barr virus (EBV), VZV, HPV ve respiratuvar virüs enfeksiyonlarına da rastlanmakla birlikte şu ana kadar yapılan çalışmalar herpesvirüs enfeksiyonlarının daha sık görüldüğünü göstermektedir. Bu hastalarda en sık rastlanılan bulgu tekrarlayan üst solunum yolu enfeksiyonudur (de Vries ve ark. 1996; Grier ve ark. 2012; Orange 2013; Ornstein ve ark 2013).

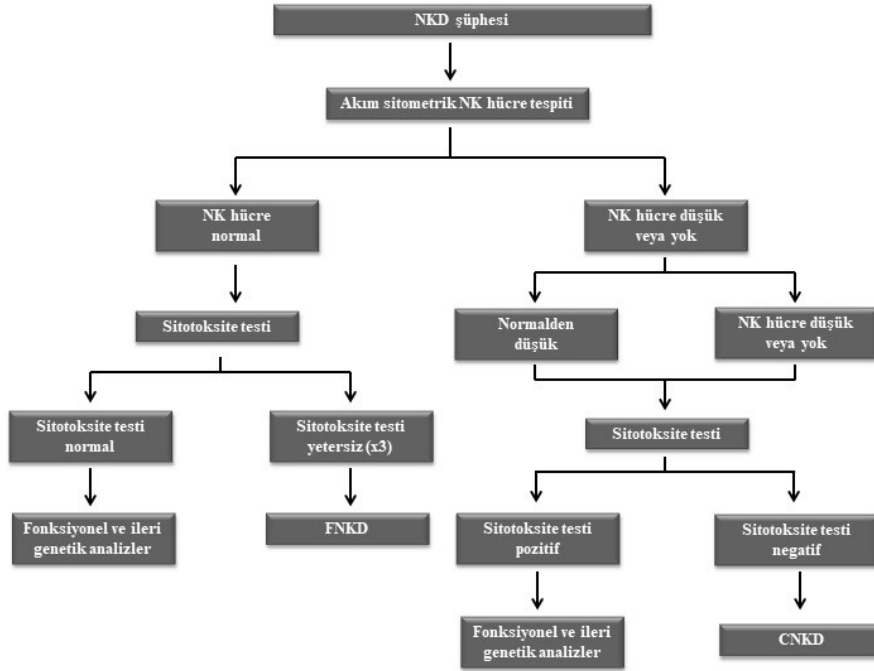
FNKD ilk defa tekrarlayan üst solunum yolu ve tekrarlayan HSV enfeksiyonu olan iki hastada tanımlanmıştır. Hastalara yapılan genetik ve fonksiyonel analiz sonucunda, NK hücrelerin ADCC fonksiyonunun bozulmadığı, sitotoksosite yeteneğinin bozulduğu gösterilmiş olup *FcγRIIIA* geninde L66H missense mutasyon tespit edilmiştir. Bu bilgiler ışığında *FcγRIIIA* geninde meydana gelen bu mutasyonun ADCC'yi etkilemediği NK hücrelerinin sitotoksitelerini etkilediği ortaya koyulmuştur. Ayrıca bu mutasyon CD16 reseptör ekspresyonunu

etkilememekte ve epitop kaybı ile sonuçlanmaktadır (de Vries ve ark. 1996; Jawahar ve ark. 1996).

CNKD ve FNKD'ye ait laboratuvar ve klinik özellikler değişiklik göstermekte olup Tablo 1 ve Şekil 9 özetlenmiştir (Orange 2013).

Tablo 1. NK hücre sınıflamasında NK hücre durumları ve sorumlu genler.

NKD tipi	Periferik kan NK hücre (CD56 ⁺ CD3 ⁻)	CD56 ^{dim} NK Hücre alt grubu	CD56 ^{bright} NK hücre alt grubu	NK hücre fonksiyonu	Aday gen
CNKD	Düşük veya yok	Düşük veya yok	Düşük	Düşük	<i>GATA2</i>
CNKD	Düşük veya yok	Düşük veya yok	Düşük	Düşük	<i>MCM4</i>
CNKD	Düşük veya yok	Düşük	Düşük	Düşük	<i>RTEL1</i>
CNKD	Düşük veya yok	Düşük	Yüksek	Düşük	<i>IRF8</i>
FNKD	Normal	Normal?	Normal?	Düşük	<i>FcγRIIIA</i>



Şekil 9. NKD tanı algoritması.

2.8. *FcγRIIIA* Geni ve Fonksiyonu

FcγRIIIA geni, 1. kromozomun q23.3 bölgesinde lokalize olup 5 ekzondan oluşmakta ve 8345 bp büyüklüğündedir (ENST00000367969.8; www.ensembl.org). Bu gen, 50-70 kD ağırlığında IgG'nin Fc bölgesi için düşük affiniteli bir reseptör olan CD16'yı kodlamaktadır (ENST00000367969.8; www.ensembl.org); NC_000001.11; www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2214).

İntegral zar glikoproteini olan CD16, IgG'nin Fc bölgesi için düşük affiniteli bir reseptör olup NK hücreler ve fagositlerde ifade edilmektedir. CD16'nın CD16A ve CD16B olmak üzere iki formu bulunmakla birlikte CD16A formu NK hücrelerinde eksprese edilen formudur. CD16A yapısal olarak değerlendirildiğinde, iki ekstrasellüler Ig domaini, kısa bir sitoplazmik kuyruğu ve bir transmembran domaini bulunmaktadır. Transmembran bölge TCR ζ ve Fc ϵ RI- γ adaptör proteinleri ile ilişkiyi düzenleyen ITIM bölgelerini içermektedir (Lanier ve ark. 1991). CD16, 3G8 mAb ile tanınabilen membran proksimal Ig domaini ile IgG'ye bağlanır ve CD16 adaptör protein olan TCR ζ 'nın fosforilasyonu ile sinyal iletimi gerçekleşir. İlave olarak IgG, CD16'ya B73.1 mAb ile tanınabilen distal Ig domainine de bağlanabilmekte ve aktivasyon gerçekleşebilmektedir. Ancak bununla ilgili mekanizma tam olarak anlaşılammıştır (Grier ve ark. 2012).

CD16, NK hücrelerinde ADCC'ye aracılık etmektedir. CD16 geninde meydana gelen mutasyon reseptör ekspresyonunu değiştirmekte ve NK hücrelerinin ADCC fonksiyonunu bozmaktadır. Bununla birlikte bu gendeki bazı mutasyonlar ADCC'yi etkilemeyip sadece NK hücre sitotoksitesini bozmaktadır (Mace ve Orange 2016). *Fc γ RIIIA* geninde ilk tanımlanan missense mutasyonu olan T230A transisyonu ile CD16'nın Ig benzeri domaininde L66H amino asit dönüşümü ile sonuçlanmaktadır. Bu mutasyon ilk defa tekrarlayan üst solunum yolu ve HSV enfeksiyonu kliniğinde 5 yaşında bir kız çocukta ve tekrarlayan üst solunum yolu enfeksiyonu, EBV, tekrarlayan HSV ile VZV enfeksiyonuna sahip 3 yaşında bir erkek çocukta tanımlanmıştır. Hastalarda tespit edilen bu mutasyon CD16 reseptör ekspresyonunu etkilemeyip B73.1 mAb klonu ile CD16'yı tespit edilemez hale getirmektedir. Kız hastada NK sitotoksitesi bozulmasına rağmen her iki hastada da NK hücrenin ADCC fonksiyonu etkilememiştir. Bu hastalarda yapılan genetik analizler neticesinde tespit edilen mutasyonun reseptör-IgG etkileşimini bozmadığı göstermektedir (de Vries ve ark. 1996; Jawahar ve ark. 1996). Bu mutasyonla ilgili yapılan ileri moleküler çalışmalar, NK hücre ko-aktivatör olan CD2'nin bağlanmasını bozduğu gösterilmiştir. Bu da NK hücre sitotoksitesinin tam olarak gerçekleşmesi için ko-aktivatör moleküllerinde olması gerektiği göstermektedir (Grier ve ark. 2012).

CD16'da tespit edilen ikinci mutasyon, membran proksimal Ig domaininin 176. amino asidinin fenilalanine dönüşümü (V176F) IgG'nin Fc bölgesine karşı affinitesini etkilemekte ve NK hücrelerinin ADCC fonksiyonunu bozmaktadır. Dolayısıyla gende tanımlanan mutasyonlardan NK hücre fonksiyonları farklı şekilde etkilenmektedir (Grier ve ark. 2012).

2.9. NK Hücre Sitotoksitesinin Tespitinde Kullanılan Yöntemler

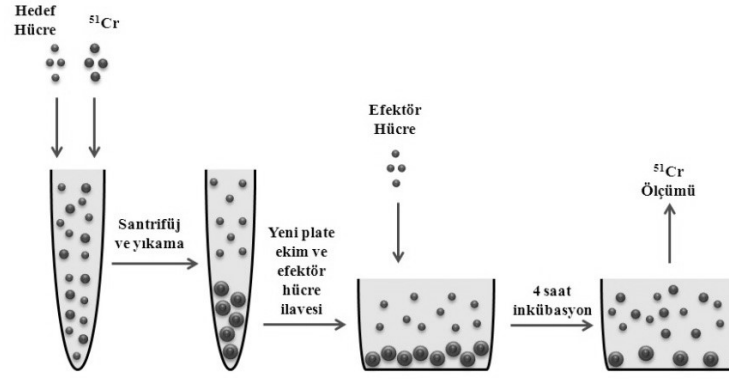
NK hücrelerinin önemli özelliklerinden biri olan hücrel sitotoksite temel olarak iki farklı şekilde gerçekleşmektedir. Bunlardan biri daha önceki bölümlerde bahsedildiği gibi perforin ve granzimler aracılığıyla gerçekleşen sitotoksitedir. İkincisi ise, Fas ve TRAIL gibi moleküllerle hedef hücre zarındaki Fas ve TNF benzeri ölüm reseptörlerini uyararak hedef hücre içerisindeki apoptotik sürecin başlaması şeklinde gerçekleşmektedir (Smyth ve ark. 2005).

NK hücrelerinin sitotoksik aktivitelerinin saptanmasında ^{51}Cr salınım deneyi, CD107a ekspresyonu esaslı yöntem ve K562 hedef hücre lizisine dayalı yöntemler kullanılmaktadır (Deniz ve Demirel 2014).

2.9.1. ^{51}Cr Salınım Deneyi

NK hücre sitotoksitesinin belirlenmesinde $^{51}\text{Chromium}$ kullanımı ilk kez 1964 yılında rapor edilmiş ve $^{51}\text{Chromium}$ salınım deneyi (CRA) olarak tanımlanmıştır (Vainio ve ark. 1964; Brunner ve ark. 1968). Günümüze kadar CRA yöntemi NK hücre sitotoksitesinin belirlenmesinde kullanılacak en uygun yöntem olarak düşünülmüştür. Ancak kullanılan molekülün radyoaktif olması nedeniyle yeni teknikler bu yöntemle tercih edilmeye başlanmıştır (Somanchi ve ark. 2015).

CRA yönteminde diğer yöntemlerde olduğu gibi efektör ve hedef hücreler kullanılmaktadır. Hedef hücre olarak, genellikle kronik myeloid lösemi hastalarından elde edilmiş ve MHC sınıf I ekspresyonundan yoksun hücreler olan K562 hücreler kullanılmaktadır. Hedef hücreler radyoaktif ^{51}Cr ile inkübe edilmektedir. Daha sonra bu hücre karışımına efektör hücreler ilave edilip 4 saat inkübasyonun ardından ^{51}Cr ölçümü yapılmaktadır. Hedef hücrelerden salınan ^{51}Cr oranı, NK hücreler tarafından öldürülen hedef hücreler ile doğru orantılı olup ölçülen ^{51}Cr miktarına göre NK hücre sitotoksitesini belirlenmektedir (Şekil 10; Whiteside ve ark. 1990; Motzer ve 2003).

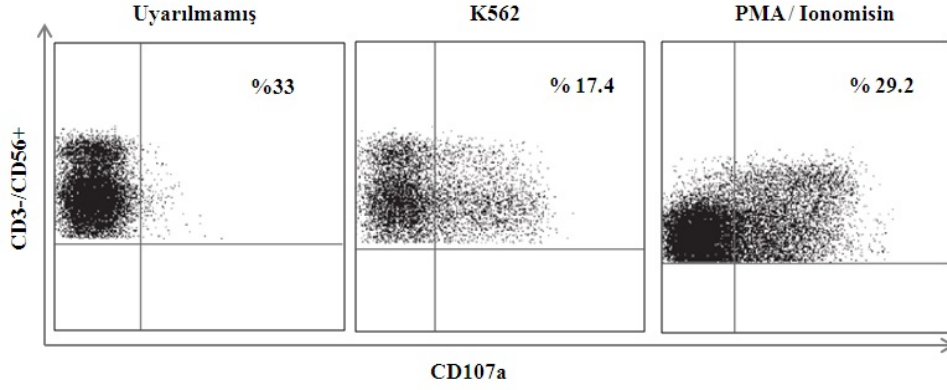


Şekil 10. 51Cr salınım deneyi.

2.9.2. CD107a Ekspresyonuna Bağlı Sitotoksisite Tayini

Akım sitometrik olarak NK hücre sitotoksisitesi değerlendirilmesinde kullanılan diğer bir yöntem CD107a (LAMP-1, lizozom bağlı membran proteini-1) ekspresyonunun belirlenmesidir. Son yapılan çalışmalarda, CD107a'nın NK ve aktive CD8 T hücrelerinin degranülasyonu için bir belirteç olabileceği gösterilmiştir (Deniz ve Demirel 2014).

NK hücrelerin sitoplazmasında perforin ve granzim gibi litik granüller içermektedirler. Hedef hücre ile karşılaştıklarında ve gerekli reseptör etkileşimleri sonrası litik granüllerin hedef hücreye degranülasyonu meydana gelir (Alter ve ark. 2004). Degranülasyon gerçekleştiğinde sekretuar lizozomlar da ortama salınır ve lizozom bağlı membran proteini olan CD107a hücre mebranına taşınır. Bu yöntemde izole edilen periferik kan mononükleer hücreler (PKMH) CD107a mAb ile öncelikle bazal değeri belirlemek amacıyla boyanmaktadır. Daha sonra bu hücreler hedef hücreler ile IL-2, IL-10 veya metil proksitol asetat/ionomisin (PMA/I) varlığında yaklaşık 5 saat 37°C'de inkübe edilir. İnkübasyon sonrası hücreler %1'lik paraformaldehit ile fiske edilir ve CD56, CD8 ve CD107a mAb'ler kullanılarak CTL ve NK hücrelerindeki CD107a'nın ekspresyonu belirlenir (Şekil 11; Aktaş ve ark. 2009; Shabrish ve ark. 2016).



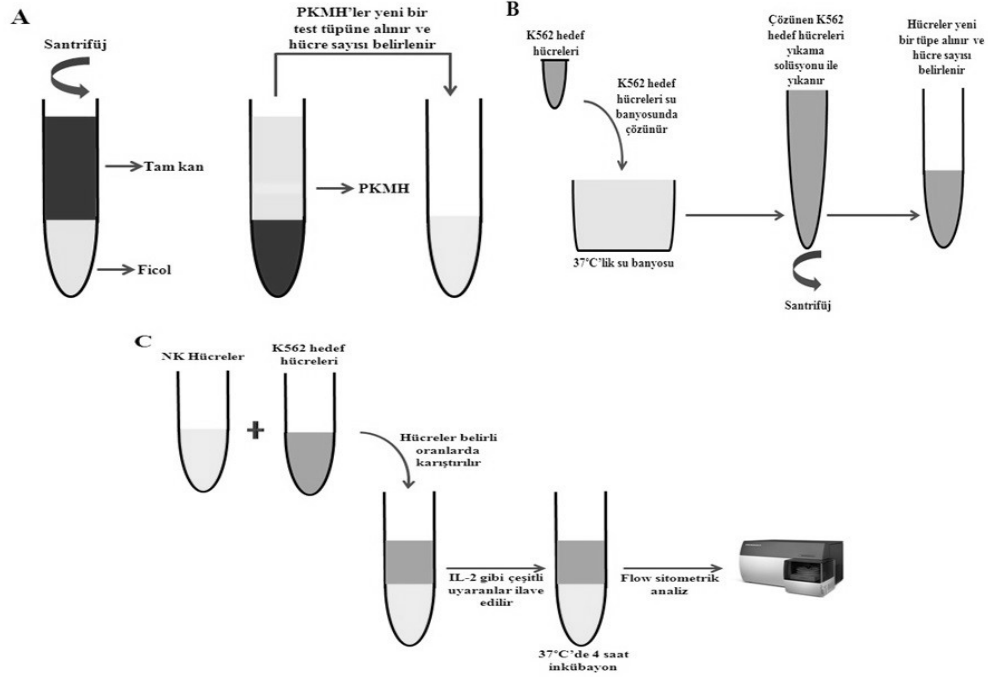
Şekil 11. Akım sitometrik CD107a ekspresyonuna bağlı sitotoksiste. (Alter ve ark. 2004).

2.9.3. K562 Lizisine Bağlı Sitotoksiste Tayini

NK hücre sitotoksitesini değerlendirilmesinde kullanılan diğer bir metot da CFSE (carboxyfluoresan diacetate succinimidly ester) işaretli K652 hücrelerinin lizisini dayalı olan yöntemdir. K562 hücreleri lösemik hücre soyu olup granülositer serinin erken farklılaşma evresini temsil eder ve MHC sınıf I molekülünü eksprese etmeyen hücre grubudur. Ayrıca K562 hücrelerinin normal hücrelere kıyasla uygun kültür ortamında çoğalması ve yaşam süreleri uzun olan hücrelerdir. Bu özelliklerinden dolayı NK hücrelerinin sitotoksiste değerlendirilmesinde hedef hücre olarak kullanılabilirlikle birlikte apoptoz çalışmaları için kullanımı oldukça uygundur (Koeffler ve Golde 1980).

Bu yöntemin ilk basamağını heparinize edilmiş tam kan örneğinden PKMH'lerin izolasyonu oluşturmaktadır. İzole edilen PKMH'ler sitotoksiste için doğrudan kullanılabilirlikle birlikte çeşitli yöntemler ile saflaştırılan NK hücreleri de kullanılabilir. Eğer saflaştırma işlemi gerçekleştirilmiş ise, NK hücre saflığının belirlenmesi amacıyla CD3, CD16 ve CD56 mAb'ler ile kalite kontrollü yapılması gerekmektedir. İkinci aşamada, hedef olarak kullanılan K562 hücreleri hücre zarına bağlanan ve yeşil floresans renk veren CFSE ile işaretlenir. Ardından işaretlenmiş olan K562 hedef hücreler ile saflaştırılmış NK hücreler veya PKMH'ler çeşitli oranlarda (1:1, 5:1, 12.5:1, 25:1) 4 saat boyunca 37°C'de inkübe edilir. İnkübasyonun ardından ölü hücrelerin belirlenmesi amacıyla propidyum iyodür (PI) ile boyama yapılarak Akım sitometrik analizi gerçekleştirilir. PI, kırmızı floresans veren bir boyadır. Canlı K562 hücreleri sadece yeşil floresans renk verirken, ölü K562 hücreleri hem yeşil hem de kırmızı floresans renk vermektedir. Akım sitometri

cihazında iki parametrelili logaritmik histogramlar kullanılarak ölü ve canlı hücrelerin yüzdesi belirlenmektedir (Şekil 12; Aktaş ve ark. 2009; Deniz ve Demirel 2014).



Şekil 12. K562 lizisine dayalı sitotoksosite deneyi.

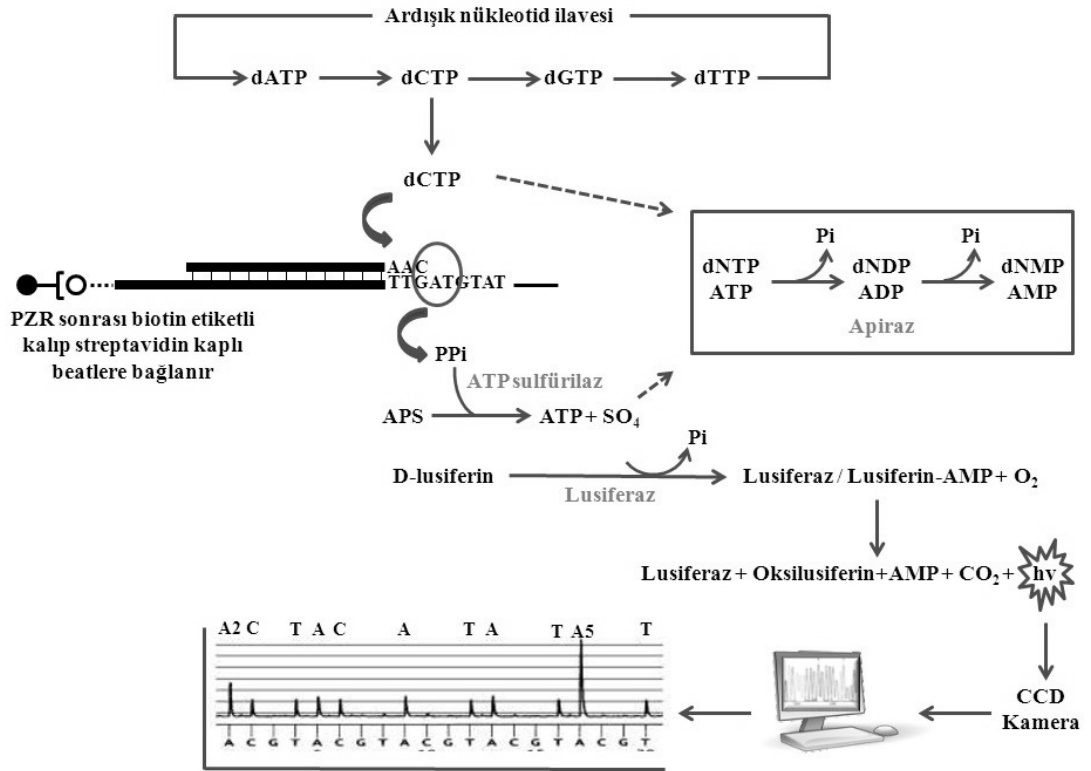
(A. Etketör hücrelerin (NK) periferik kandan izolasyonu. B. K562 hedef hücrelerinin hazırlanması. C. NK hücreleri ile etketör hücrelerin belirli oranlarda karıştırılması, inkübasyonu ve analizi).

2.10. DNA Dizileme Yöntemleri

DNA dizi analizi, günümüzde genom baz dizilim değışikliklerinin incelenmesinde kullanılan en önemli yöntemlerden biridir. DNA dizisinin belirlenmesinde en yaygın kullanılan yöntem dideoksi zincir sonlandırma teknolojisidir (Ronaghi ve ark. 2001). Bu yöntem Sanger DNA dizileme yöntemi olarak tanımlanmakta olup 1977 yılında Frederick Sanger ve ark. (1977) tarafından keşfedilmiştir. Bu tekniğin önemli avantajları bulunmasına rağmen diğer yöntemlerle tamamlanabilecek sınırlamaları da bulunmaktadır. Bu sınırlamalar yeni nesil DNA dizi analizlerinin de temelini oluşturan pyrosequencing teknolojisi ile büyük oranda ortadan kalkmıştır (Ronaghi ve ark. 2001).

Pyrosequencing teknolojisi, Royal Institute of Technology'sinde geliştirilen DNA dizileme teknolojisidir. Geleneksel Sanger sekanslamasının ilk alternatifi olup sentez prensibine göre dizilemeye dayanmaktadır. Bu yöntemde şablon olarak tek iplikli polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) fragmanı kullanılır ve bir nükleotidin polimeraz ile başarılı bir şekilde eklenmesinden sonra serbest kalan PPI,

bir seri enzim kaskadı reaksiyonu ile ışığa dönüştürülür (ATP sülfürlaz APS'nin varlığında PPi'yi ATP'ye dönüştürür). Oluşan ATP, lusiferaz aracılı lusiferinin görünür ışık üreten oksilusiferine dönüşümünü sağlar ve bu da CCD sensörleri tarafından tespit edilerek ham veri çıktısında bir tepe noktası olarak görünür. Oluşan her tepe noktasının yüksekliği kullanılan nükleotidlerin sayısı ile orantılıdır. Pyrosequencing teknolojisi şematik olarak Şekil 13'de gösterilmiştir (Ronaghi ve ark. 2001).



Şekil 13. Pyrosequencing dizileme teknolojisinin şematik gösterimi.

Bu yöntemlerin ticari olarak üretilme şekilleri her ne kadar farklı olsa da iş akışları kavramsal olarak birbirine benzemektedir. Bu yöntemlerin ilk aşaması kütüphane hazırlığı olup bu aşamada DNA'nın restriksiyon enzimler aracılığıyla rastgele fragmentasyonu gerçekleştirilmektedir. Bu aşamayı ortak bağdaştırıcı dizilerin (adaptör eklenmesi) *in vitro* ligasyonu takip etmekte ve bu basamak adaptör ekleme basamağı olarak adlandırılmaktadır. Daha sonra kullanılacak ticari kite bağlı olarak elde edilen amplikonların, gen bölgesine uygun primer veya problemler kullanılarak *in situ* poloniler, emülsiyon PZR veya köprü PZR gibi yöntemlerle amplifikasyonu gerçekleştirilmektedir. Bu işlemi dizileme işlemi takip etmekte ve bu işlem enzim kaynaklı floresans ışımaya bağlı veya görüntü işleme (array) şeklinde

gerçekleştirilmektedir (Adessi ve ark. 2000; Dressman ve ark. 2003; Fedurco ve ark. 2006).

Çalışmaya özellikle virüs kaynaklı sık enfeksiyon öyküsü olan hastalar dahil edilmiştir. NK hücre alt grup oranlarının ve NK hücre sitotoksosite yeteneklerinin *FcγRIIIA* geninde meydana gelen mutasyon veya polimorfizmlerden etkilendiğini düşünülmüştür. Bu noktadan hareketle bu tez çalışmasında NK hücre alt grup oranlarının, NK hücre sitotoksitesi yeteneklerinin ve olası *FcγRIIIA* gen mutasyon(lar)unun araştırılması amaçlanmıştır.



3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Çalışma Popülasyonu

Çalışma popülasyonunu 2016-2018 yılları arasında Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Çocuk Alerji ve İmmünoloji Polikliniğine ilk defa başvuran hastalar ile daha önceden takipli hastalar oluşturmuştur. Çalışmaya dahil edilme kriterleri şu şekilde belirlenmiştir;

- Çocuk Alerji ve İmmünoloji Polikliniğine başvuran ve periferik lenfosit alt grup analizinde CD3-, CD16+, CD56+ NK hücresi düşük ya da olmayan hastalar,
- CD3-, CD16+, CD56+ NK hücresi normal olup NK hücre eksikliği klinik bulguları olan hastalar,
- Sık enfeksiyon öyküsü olan hastalar (özellikle viral).

Çalışmadan dışlanma kriterleri de şu şekilde belirlenmiştir;

- İmmün sistemi etkileyen saptanmış bir genetik defekte sahip olan hastalar.

Çalışmaya dahil edilme kriterlerini taşıyan toplam 15 hasta belirlenmiştir. Bu hastalardan 1 hastada RAG1 mutasyonu tespit edildiğinden çalışmaya alınmamıştır. Diğer 4 hasta ise kontrole gelmemiş olup telefon ile de ulaşılamamıştır. Bundan dolayı çalışma 10 hasta ile gerçekleştirilmiştir.

Kontrol grubunu ise, Çocuk Alerji ve İmmünoloji Polikliniğine başvuran ve aşağıdaki özellikleri taşıyan bireyler oluşturmuştur (N:7). Kontrol grubu için çalışmaya dahil edilme kriterleri şu şekilde belirlenmiştir;

- Hastalar ile yaş uyumlu sağlıklı çocuklar,
- İmmün sistemi etkileyen bir hastalığı olmayan çocuklar,
- Sık viral enfeksiyon öyküsü olmayan çocuklar.

Belirlenen özellikleri taşıyan hastaların uzman doktor tarafından anamnezi alınıp, fizik muayenesi yapılmış olup bununla ilgili bilgiler ayrıntılı bir şekilde

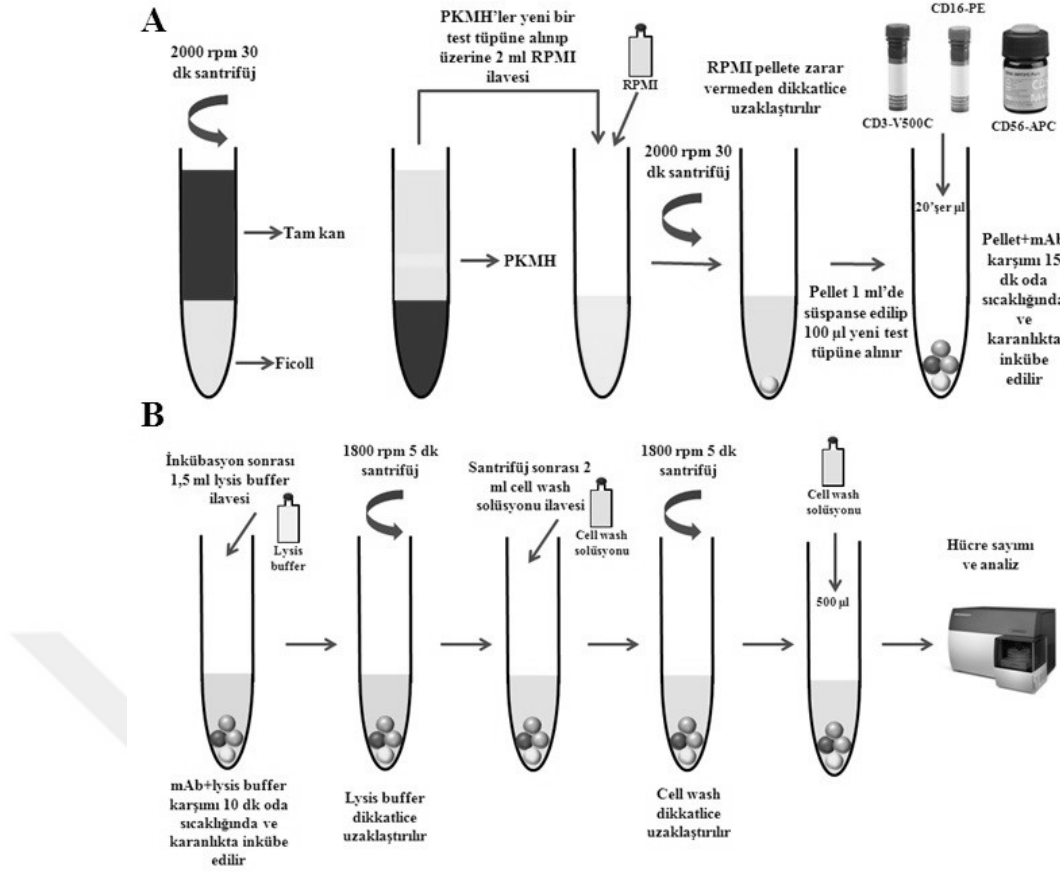
çalışma dosyasına kaydedilmiştir. Ayrıca başvuru sırasında istenen biyokimyasal, akım sitometrik ve serolojik tetkik sonuçları da not edilmiştir.

Hasta ve kontrollerin ebevenyelerine çalışma ile ilgili gerekli bilgilendirme yapılmış olup bilgilendirilmiş onam formu alınmıştır (Bkz. EK-B).

Hasta ve kontrol gruplarından tam kan örnekleri genetik analizler ve NK alt grupları için K3-EDTA'lı tüplere, NK hücre sitotoksitesi için tam kan örnekleri heparinli tüplere alınmıştır.

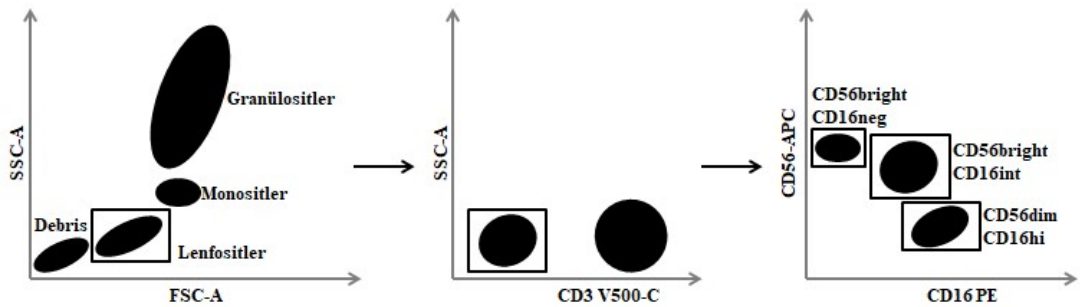
3.2. NK Hücre Alt Gruplarının Akım Sitometrik Olarak Belirlenmesi

NK hücre alt gruplarının belirlenmesi amacıyla öncelikle hasta ve kontrollerden PKMH'ler izole edilmiştir. PKMH hücre izolasyonu için Ficoll-Hypaque (Sigma–Aldrich, Steinheim, Germany) ile 2000 rpm'de 30 dk gradiyent santrifüj işlemi uygulanmıştır. Santrifüj sonrası PKMH'ler toplanıp yeni test tüpüne aktarılmış ve üzerine 2 ml RPMI (Sigma–Aldrich, Steinheim, Germany) ilave edilip 1800 rpm'de 10 dk santrifüj edilip yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra hücreler 1 ml RPMI'de hücreler dikkatlice süspanse edilmiştir. PKMH'lerin hazırlanmasının ardından yüzey boyama aşamasına geçilmiştir. Bu amaçla test tüpüne 20 µl CD3 (V500C-eBioscience, Frankfurt, Germany-eBioscience, Frankfurt, Germany), CD16 (PE-eBioscience, Frankfurt, Germany) ve CD56 (APC-eBioscience, Frankfurt, Germany) mAb ilave edilip üzerine 100 µl PKMH'ler eklenmiştir. Vortekslemenin ardından oda sıcaklığında karanlık ortamda 15 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası tekrar vorteksleme işlemi yapıp üzerine 1,5 ml lysis buffer ilave edilip oda sıcaklığında karanlık ortamda 10 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası hücreler 1800 rpm'de 5 dk santrifüj edilip pellete zarar vermeden lysis buffer dikkatlice uzaklaştırılmıştır. Daha sonra üzerine 2 ml hücre yıkama solüsyonu (cell wash) ilave edilip 1800 rpm'de 5 dk santrifüj edilip cell wash uzaklaştırılmıştır. Pelletin üzerine 500 µl cell wash ilave edilip vortekslemenin ardından Becton Dickinson Canto II (BD Biosciences, Heidelberg, Germany) akım sitometri cihazı ile hücre sayımı yapıp (her bir hasta ve kontrollerden en az 10×10^3 hücre) FACSDiva software version 6.1.3. programı ile analizi gerçekleştirilmiştir. NK hücre alt grup analizinde gerçekleştirilen işlemler Şekil 14'de özetlenmiştir.



Şekil 14. NK alt grup analizi için uygulanan boyama yöntemi. (A.PKMH'lerin hazırlanması ve mAb ilavesi. B. Pellet+mAb ilavesinin inkübasyon sonrası lysis, yıkama ve analiz aşamaları).

Hücre sayımının ardından analiz aşamasına geçilmiştir. Analiz işleminde öncelikle SSC-A / FSC-A grafiğinde lenfositler kapılanmıştır. Daha sonra SSC-A / CD3 grafiğinde CD3- hücreler kapılanmıştır. CD3- hücrelerin içinden NK alt gruplarını belirlemek amacıyla CD56 / CD16 grafiği oluşturulmuş ve hücrelerin ayrımlarına göre $CD56^{bright}CD16^{neg}$, $CD56^{bright}CD16^{int}$ ve $CD56^{dim}CD16^{hi}$ olmak üzere 3 farklı NK hücre oranları belirlenmiştir. Analizlerle izlenen kapılama yöntemi Şekil 15'de gösterilmiştir (Dobbs ve ark. 2017).



Şekil 15. NK alt grup analizinde uygulanan kapılama yöntemi.

3.3. NK Hücre Sitotoksitesinin Değerlendirilmesi

NK hücre sitotoksitesinin değerlendirilmesi çalışması çeşitli aşamalardan oluşmakta olup bu aşamalar aşağıda açıklanmıştır.

3.3.1. NK Hücrelerin Hazırlanması ve Hücre Sayısının Tespiti

NK hücre sitotoksinin değerlendirilmesi amacıyla hastalardan heparinli antikoagulan içeren tüplere 5 ml tam kan örneği alınıp PKMH izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla 15 ml'lik test tüpüne 5 ml Ficoll-Hypaque koyulup üzerine fosfat buffer salin (PBS- Sigma–Aldrich, Steinheim, Almanya) ile 1:2 oranında seyreltilen toplam 10 ml tam kan örneği yavaşça ilave edilmiş ve 2500 rpm'de 30 dk oda sıcaklığında santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası PKMH katmanı dikkatli bir şekilde mikropipet yardımıyla toplanıp 15 ml'lik yeni test tüpüne alınıp 12 ml PBS ilavesini takiben vortekslenmiştir. Vortekslemenin ardından hücreler 1500 rpm'de 10 dk oda sıcaklığından santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant kısım pellete zarar vermeden dikkatli bir şekilde aspire edilmiştir. Pelletin üzerine 1 ml tam medyum (reaktif A-eBioscience, Frankfurt, Almanya) ilave edilip hafifçe vortekslenip hücre sayısı belirlenmiştir.

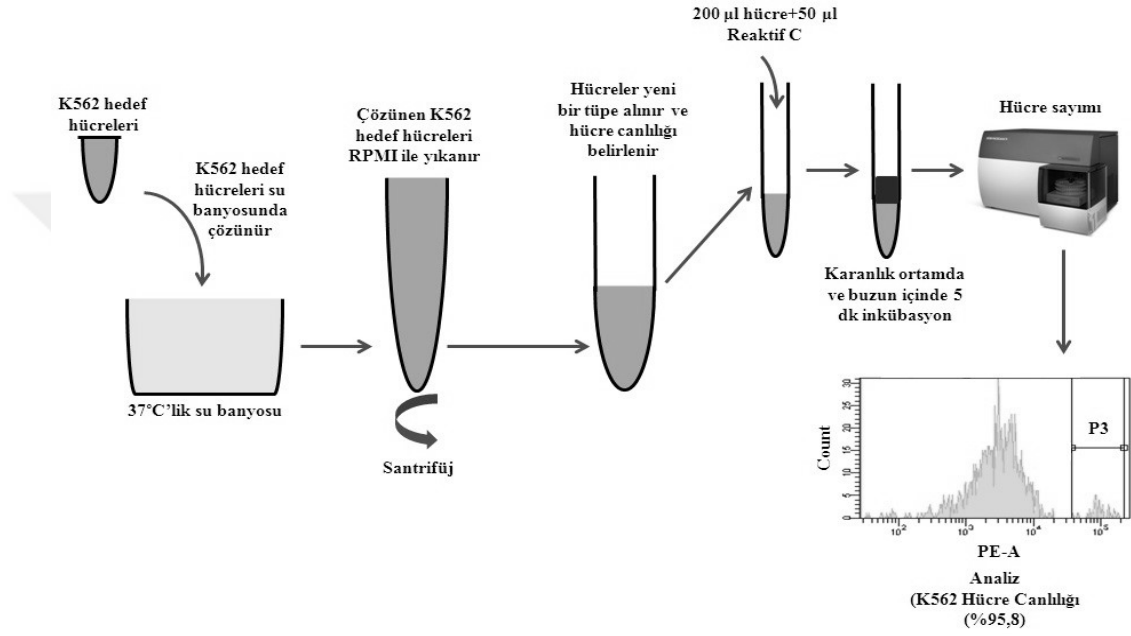
Hücre sayısı thoma lamı kullanılarak belirlenmiştir. 10 µl bromofenol blue, 5 µl PKMH karıştırılıp thoma lamında sayımları gerçekleştirilmiştir.

3.3.2. K562 Hedef Hücrelerin Hazırlanması ve Canlılığının Belirlenmesi

50 ml'lik test tüpü 37°C'ye önceden ısıtılmış olan reaktif A ile doldurulmuştur. Daha sonra ayrı ayrı flakonlar halinde bulunan ve -80°C'de muhafaza edilen K562 (eBioscience, Frankfurt, Almanya) hücreleri çıkarılıp 37°C'lik su banyosunda hızlı bir şekilde çözündürülüp daha önceden doldurulan 50 ml'lik reaktif A içeren test tüpüne aktarılıp hafif şekilde vortekslenmiştir. Vortekslemenin ardından 1000 rpm'de 5 dk oda sıcaklığında santrifüj edilip süpernatant uzaklaştırılmıştır. Pelletin üzerine 4 ml reaktif A ilave edilip K562 hücrelerinin canlılığı belirlenmiştir.

K562 hücrelerinin canlılığının belirlenmesi amacıyla 200 µl hücre 12x75'lik test tüpüne alınıp üzerine 50 µl DNA boyama solüsyonu (reaktif C- eBioscience, Frankfurt, Almanya) ilave edilip vortekslenmiş ve buzun içinde karanlık ortamda 5

dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası canlılık oranı akım sitometri cihazında ölçülmüş ve analiz edilmiştir. Hücre canlılığının %90 ve üzeri olması normal olarak kabul edilmiştir. Hücre canlılıkları %75-80 oranında çıktığından hücreler Ficoll-Hypaque ile tekrar santrifüj edilip yıkanmış ve ölü hücre uzaklaştırılmıştır. Daha sonra K562 hücre canlılığı tekrar değerlendirilmiş olup canlılık ortalama %91 olarak belirlenmiştir. Hedef hücre hazırlanması ve canlılıkların belirlenmesi işlemleri Şekil 16'da özetlenmiştir.



Şekil 16. K562 hedef hücrelerinin hazırlanması ve canlılıklarının belirlenmesi.

Hücre canlılığı analizinin ardından K562 hücre sayısı belirlenmiştir. Hücre sayımı toma lamında gerçekleştirilip hücre sayısı 1×10^5 /ml hücre olacak şekilde ayarlanmıştır.

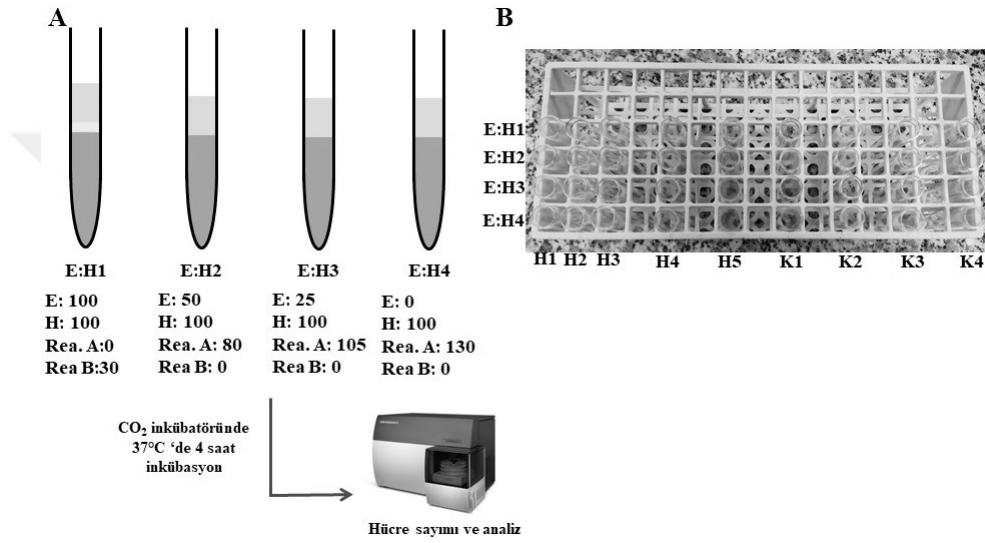
3.3.3. NK Hücreler ile K562 Hedef Hücrelerin Birleştirilmesi

Bu aşamada çalışmanın önceki aşamalarında hazırlanan ve canlılık kontrolleri yapılan NK efektör hücreler (E) ile K562 hedef hücreler (H) değişik oranlarda karıştırılmıştır. Her hasta ve kontroller için 4 farklı oranda tüpler hazırlanmış olup bu işlemde kullanılan oranlar Tablo 2'de gösterilmiştir. Hasta dışındaki kontrol gruplarına ilaveten testin doğruluğu açısından ayrı bir test tüpüne sadece hedef hücre koyulmuş ve kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Daha sonra efektör hücre ve hedef hücre karışımları 4 saat 37°C'de %5'lik CO₂'li ortamda inkübe edilmiştir (Şekil 17). İnkübasyon sonrası test tüplerine 50 µl DNA boyama solüsyonu (reaktif C) eklenip

vortekslenmiştir. Daha sonra hücreler buzun içinde karanlık ortamda 5 dk inkübe edilip 30 dk içinde akım sitometri ile hücre sayımları yapıp analizleri gerçekleştirilmiştir.

Tablo 2. Kontrol ve analiz tüpleri için efektör ve hedef hücre karışım oranları.

Oran (E:H)	Efektör hücre süspansiyonu (E) (µl)	Hedef hücre süspansiyonu (H) (µl)	Tam medyum (Reaktif A) (µl)	Uyaran (Reaktif B) (µl)	Toplam Hacim (µl)
E:H1	100	100	0	30	230
E:H2	50	100	80	x	230
E:H3	25	100	105	x	230
E:H4	0	100	130	x	230



Şekil 17. Efektör hücre ile hedef hücre karışım oranları.

(A. Karışım oranlarının gösterimi B. Laboratuvar çalışması. E: Efektör hücre, H: Hedef hücre, Rea. A: Reaktif A, Rea. B: Reaktif B).

3.3.4. Akım Sitometrik Hücre Sayımı ve Analiz

Efektör hücreler ile hedef hücrelerin inkübasyon sonrası sitotoksitenin belirlenmesi için gerekli hücre sayımı (~3000 hücre) Becton Dickinson Canto II (BD Biosciences, Heidelberg, Almanya) akım sitometri cihazı ile yapılmış olup analizler FACSDiva version 6.1.3. programı ile gerçekleştirilmiştir.

NK hücre sitotoksitenin analizinde en uygun sitotoksitenin hangi hücre oranında olduğunun belirlenmesi amacıyla deney, 4 farklı E:H oranı olacak şekilde tasarlanmıştır. E:H4 oranında efektör hücre olmadığı için testin kendi içinde kontrolü olarak kullanılmıştır. E:H2, E:H3 ve E:H4 oranları sitotoksitenin analizi için kullanılmış olup E:H1'de IL-2'den dolayı aşırı aktivasyon gerçekleştiğinden bütün hasta ve kontrollerde çalışılmış ancak değerlendirmeye alınmamıştır. Kontrol tüpüne

oranla E:H1, E:H2 ve E:H3'de hedef hücre sayısındaki azalma miktarlarına göre NK hücre sitotoksitesi analiz edilmiştir. Testin yorumlanması yapılırken E:H4 ile birlikte E:H2 ve E:H3 ayrı ayrı karşılaştırılmıştır.

3.4. DNA İzolasyonu

FcyRIIIA tüm gen analizinin ilk aşamasını DNA izolasyonu oluşturmaktadır. Bu amaçla, klinik ve laboratuvar bulguları ile fonksiyonel analizler neticesinde belirlenen hasta ve kontrollerden genomik DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Genomik DNA izolasyonunda Fenol: Kloroform: İzooamilalkol içeren prosedür kullanılmıştır. 400 µl tam kan örneği 2 ml'lik ependorf tüplere koyulup üzerlerine 0,5 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) ilave edilmiştir. Bu karışıma 2X lysis buffer ilave edilip 2 ml'ye tamamlanmıştır. 10 dk boyunca tüpler alt üst edilerek karıştırıldıktan sonra 30 dk buz içerisinde inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası 3000 rpm'de +4°C'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırıp pellete 3 ml Salt/EDTA eklenip vortekslenmiştir. Daha sonra 0,3 ml %10'luk SDS (Sodyumdodesil sülfat) solüsyonu, 150 µl proteinaz K (10mg/ml) eklenerek örnekler 55°C'de 3 saat etüvde inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası tüplerin üzerine 3 ml Fenol (pH 8,0) ilave edilip sert bir şekilde karıştırılmıştır. Ardından 3000 rpm'de +4°C'de 10 dk santrifüj edilip, süpernatant kısım yeni steril ependorf tüpe alınmıştır. Daha sonra 3 ml Fenol: Kloroform: İzooamil Alkol (25:24:1) eklenip sert bir şekilde alt üst edilmiş ve 3000 rpm'de +4°C'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda süpernatant yeni bir steril ependorfa alınıp süpernatantın 1/10'u kadar 3M Na Asetat (NaAc, pH=5,2) ile süpernatant 2,5 katı kadar -20°C'de soğutulmuş %95'lik etanol (EtOH) eklenip sert bir şekilde sallanarak DNA'ların çökmesi sağlanmıştır. Sonrasında çöken DNA'lar cam çubuk ile yeni ependorf tüplere alınmıştır. Pelletler kurutulup, alkol uzaklaştırılmış ve pellet 0,5 ml 10 mM Tris (pH 8,0) ile sulandırılmıştır.

Sulandırılan stok DNA'ların kalite ve miktarları 260/280 nm UV kullanılarak Nanodrop / Mrestro cihazı ile belirlenmiştir.

3.5. *FcyRIIIA* Tüm Gen Analizi

FcyRIIIA geni tüm gen dizileme işlemi yeni nesil dizileme teknolojisi (NGS) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. *FcyRIIIA* (NM_000569) genom bölgesine ait DNA

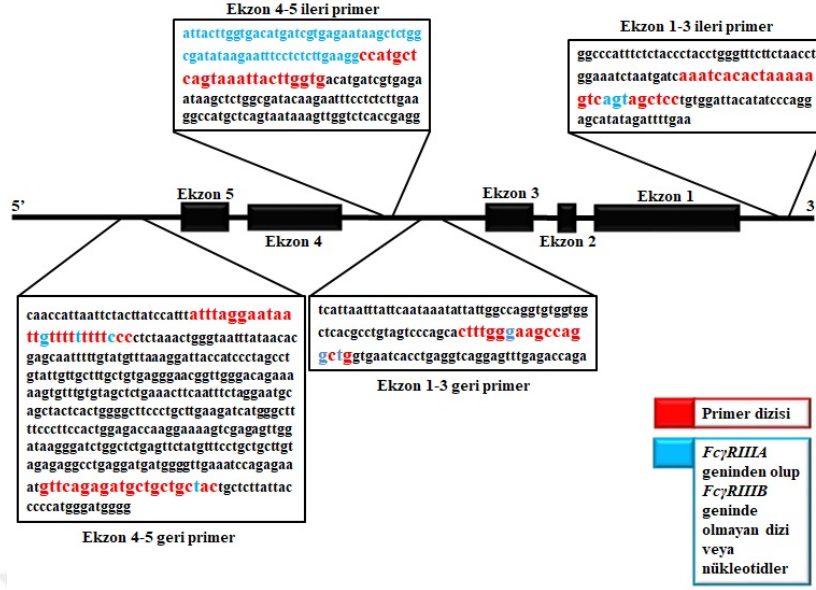
dizisi GenBankası'ndan temin edilmiştir. Biyoinformatik analizler neticesinde *FcyRIIIA* geninin *FcyRIIIB* (NM_000570) genine yaklaşık %98 oranında ortolog olduğu tespit edilmiştir. İki gene ait BLAST analizi sonuçları Şekil 18'de gösterilmiştir (www.ensembl.org; https://www.ncbi.nlm.nih.gov). Bu iki gendeki benzerlikten dolayı *FcyRIIIA* geninin tek parça halinde çoğaltılması, *FcyRIIIB* geninde de amplifikasyona neden olabileceğinden genin iki parça halinde çoğaltılmasına karar verilmiştir.

Genomic Location	Overlapping Gene(s)	Orientation	Query start	Query end	Length	Score	E-val	%ID
1.161541159-161551337	AL590385.2, FCGR3A	Reverse	1	10179	10179	19834.0	0.0e+00	100.00
1.161628296-161631623	FCGR3B	Reverse	1074	4400	3329	6261.0	0.0e+00	98.05
1.161625477-161627029	FCGR3B	Reverse	5759	7305	1553	2926.0	0.0e+00	98.26
1.161622596-161624087	FCGR3B	Reverse	8689	10179	1494	2775.0	0.0e+00	97.93
1.161624091-161625474	FCGR3B	Reverse	7307	8687	1386	2594.0	0.0e+00	98.05
1.161627393-161628295	FCGR3B	Reverse	4411	5313	903	1659.0	0.0e+00	96.68
1.161631980-161632700	FCGR3B	Reverse	1	721	721	1388.0	0.0e+00	98.75
1.161627030-161627387	FCGR3B	Reverse	5326	5682	358	662.0	1.7e-190	98.32
1.161631625-161631967	FCGR3B	Reverse	726	1071	346	655.0	1.9e-188	98.55

Şekil 18. *FcyRIIIA* genine ait BLAST sonuçları.

3.5.1. PZR Primer Dizaynı

FcyRIIIA geni tüm gen dizi analizi için primer dizaynında, iki gen arasında farklılıkların olduğu bölgeler tespit edilip bu bölgelere primerlerin yerleşmesi sağlanmıştır. Primer tasarımı izlenen yol Şekil 19'de gösterilmiştir. Kırmızı ile işaretli nükleotidler primer dizini, mavi ile gösterilen nükleotidler *FcyRIIIA* geninde olup *FcyRIIIB* geninde olmayan nükleotidler ve dizileri göstermektedir. İlave olarak ekzon 4-5 için primer tasarımı *FcyRIIIA* geninde iki kez tekrar eden, *FcyRIIIB* geninde ise bir kez tekrar eden dizi tespit edilmiş ve primer dizaynı bu iki tekrar bölgesinin kesişim noktasına yapılmıştır. 1.-3. ekzon (birinci kısım) için bir primer çifti, 4.-5. ekzon içinde (ikinci kısım) başka bir primer çifti dizayn edilmiştir. İkinci kısım için iki reverse primer dizayn edilmiş olup optimizasyon sonrası ikinci reverse primer (alternatif) ile devam edilmiştir. Çalışmada kullanılan primerler Tablo 3'de gösterilmiştir.



Şekil 19. *FcγRIIIA* geni tüm gen analizi için primer dizaynında izlenen yol.

Tablo 3. *FcγRIIIA* tüm gen analizinde kullanılan primerler.

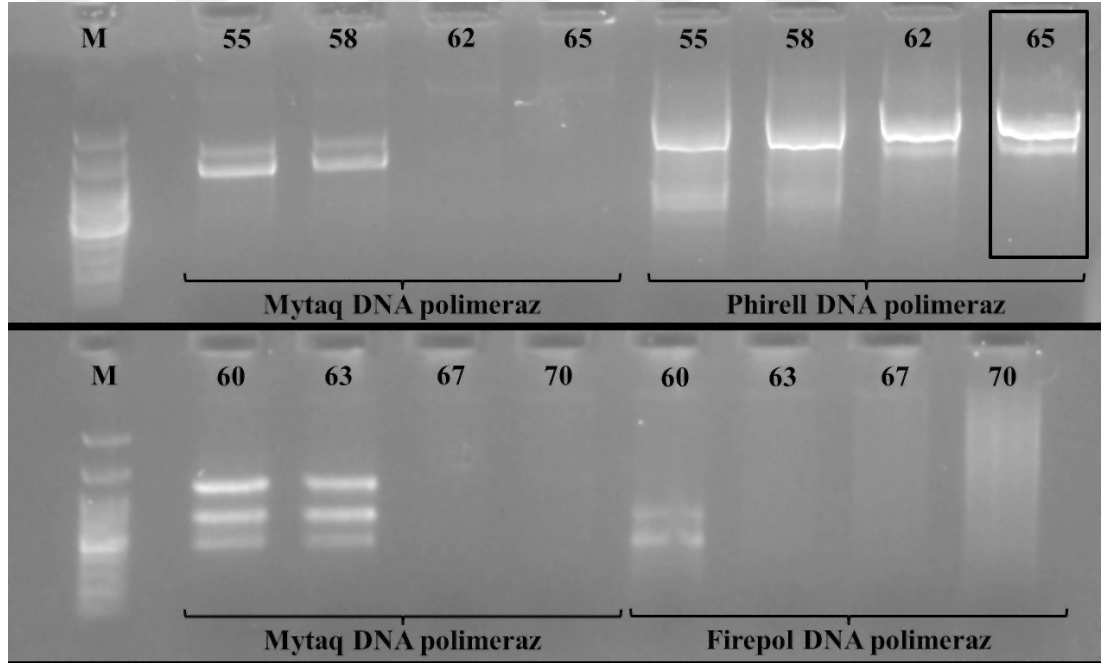
Ekzon	Oryantasyon	Primer dizisi (5'→3')	PZR ürünü (bç)
1-3 (Birinci kısım)	İleri	AAATCACACTAAAAAGTCAGTAGCTCC	2571
1-3 (Birinci kısım)	Geri	ACTTTGGGAAGCCAAGGCTG	
4-5 (İkinci kısım)	İleri	CCATGCTCAGTAAACTTGGTG	2708
4-5 (İkinci kısım)	Geri	ATTTAGGAATAATTGTTTTTTTTTCCC	
4-5 (İkinci kısım)	Geri (Alternatif)	ATGTTTCAGAGATGCTGCTGCTAC	3043

3.5.2. Gradyent PZR Analizi

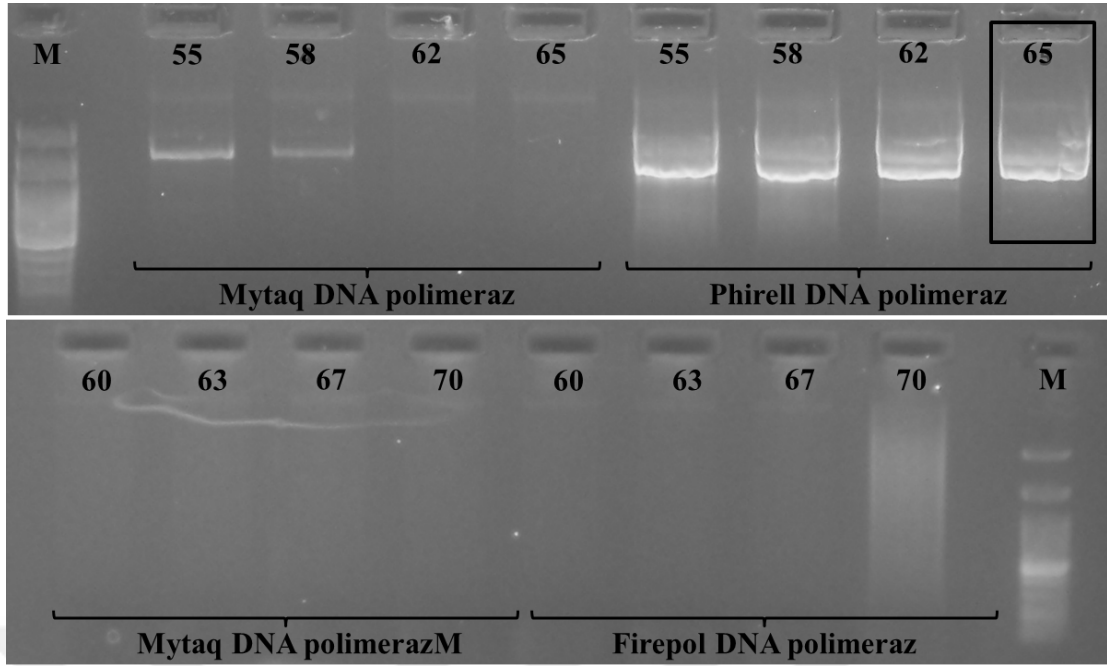
Primer dizaynının ardından optimizasyon için iki ayrı gradyent polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) profili gerçekleştirilmiştir. İlk gradyent PZR profili ilk denatürasyon basamağı 95°C'de 1 dk, 45 döngü 95°C'de 10 sn, 55-65°C'de 10 sn, 72°C'de 20 sn ve 72°C'de 1 dk olarak dizayn edilmiştir. İkinci gradyent PZR profili ilk denatürasyon basamağı 95°C'de 1 dk, 45 döngü 95°C'de 10 sn, 60-70°C'de 10 sn, 72°C'de 20 sn ve 72°C'de 1 dk olarak çalışılmıştır.

PZR reaksiyonu için 5×PZR buffer 5 µl, 10 mM dNTPs 0,5 µl, 5 µM ileri ve geri primer 1'er µl ve Phirell HS DNA polimeraz (Sigma-Aldrich) 0,5 µl, kalıp DNA (20-50 ng/µl) 2 µl son konsantrasyon 25 µl olacak şekilde hazırlanmıştır.

Gradyent PZR sonucu uygun sıcaklık 65°C olarak belirlenmiştir. Gradyent PZR aşamasında farklı Mytaq (Bioline Meridian Bioscience), Firepol (Solis Biodyn) ve Phirell (Thermo Inc.) olmak üzere üç farklı DNA polimeraz ile çalışma gerçekleştirilmiştir. Ekzon 1-3 için 55-65°C ve 60-70°C'de gerçekleştirilen gradyent PZR'de Firepol DNA polimeraz ile hiç band elde edilememiştir. Ekzon 1-3 ve ekzon 4-5 için PZR sonrası elde edilen DNA fragmentleri %2'lik agaroz jel elektroforezinde görüntülenmiştir (Şekil 20 ve Şekil 21). En iyi sonuç Phirell (Thermo Inc.) DNA polimeraz ile alınmış olup çalışma da bu enzim kullanılmıştır.



Şekil 20. Ekzon 1-3 gradyent PZR sonuçlarının %2'lik agaroz jel elektroforezi görüntüsü.



Şekil 21. Ekzon 4-5 gradiyent PZR sonuçlarının %2'lik agaroz jel elektoroforezi görüntüsü.

3.5.3. PZR Protokolü

Gradiyent PZR sonrası ekzon 1-3 ve ekzon 4-5 için uygun annealing sıcaklığı 65°C olarak belirlenmiştir. Daha sonra gradiyent PZR protokolünde kullanılan PZR bileşenleri kullanılarak “M”, “MA” ve “MAK” olarak kodlanan 3 farklı PZR protokolü denenmiştir. Uygulanan PZR protokolü şartları Tablo 4 ve Tablo 5’de gösterilmiştir.

Tablo 4. Üç farklı PZR’de uygulanan PZR protokolü.

Sıcaklık (°C)	Süre (dk:sn)	Döngü
95	A	1
95	B	35
65	C	
72	D	
72	E	1
4	∞	1

Tablo 5. Üç farklı PZR protokolü ve uygulanan sıcaklık değerleri.

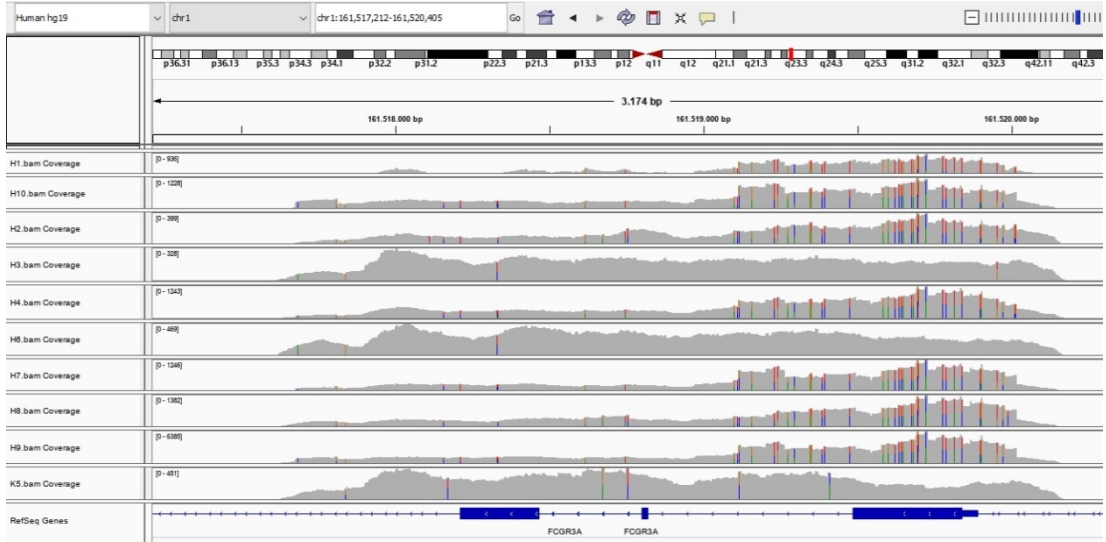
PZR kodu	A	B	C	D	E
M	01:00	00:10	00:10	00:20	01:00
MA	02:00	00:10	00:10	00:40	02:00
MAK	10:00	00:45	00:45	00:45	10:00

Üç farklı PZR protokolünün ardından M protokolü ile PZR gerçekleştirilmiş olup ardından yeni nesil DNA dizi analizine geçilmiştir.

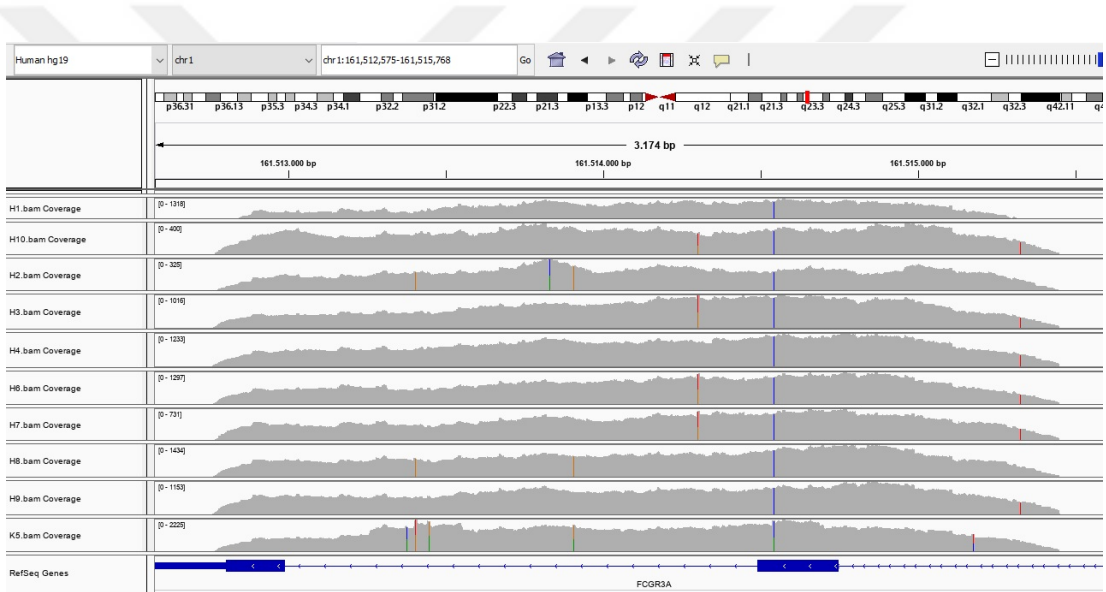
3.5.4. PZR Kütüphane Hazırlığı ve Yeni Nesil DNA Dizi Analizi

PZR işlemi sonrasında her bir örnek için elde edilen iki adet ampikon, reaksiyon verimliliği göz önünde bulundurularak, her bölgenin yaklaşık eşit oranda temsil edileceği şekilde PZR havuzu oluşturulmuştur. Oluşturulan PZR havuzu, NucleoFast® 96 PCR kiti (Macherey-Nagel GmbH) kiti kullanılarak saflaştırılmıştır. Saflaştırılan örneğin, spektrofotometre (Nanodrop N1000, Thermo Inc.) ile kantitasyonu yapılmış olup DNA miktarı 0.5 ng/µl olacak şekilde standardize edilmiştir.

Standardizasyonun ardından örneklerin yeni nesil DNA dizilemeye hazır hale gelmesi için DNA kütüphane hazırlama işlemi gerçekleştirilmiştir. Kütüphane hazırlığı NexteraXT DNA library Prep Kit (Illumina Inc.)'i kullanılarak üretici firmanın protokolüne göre gerçekleştirilmiştir. Kütüphane hazırlığının ilk aşamasında PZR ürünleri transpozazlar aracılığıyla 150 bp'lik fragmentlere ayrılıp adaptör eklenmesi gerçekleştirilmiştir. Bu işlemin ardından fragmentlere ayrılmış olan DNA, PZR ile yükseltgenip indeks eklenmesi sağlanmıştır. Ardından 150 bp'den küçük DNA fragmentlerinin eliminasyonu için saflaştırma işlemi gerçekleştirilmiştir. Saflaştırma aşamasından sonra kütüphanenin normalizasyonu sağlanmış ve her bir örnek tek bir tüpde birleştirildikten sonra örnekler yeni nesil dizileme için Illumina Miseq NGS (Illumina, San Diego, CA, USA) cihazına yüklenmiştir. NGS işlemi İntergen Genetik Hastalıklar Tanı Merkezi laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Cihazdan elde edilen veriler MiSeq Reporter Software (Illumine Inc.) kullanılarak hg19 insan referans genomuna göre dizilenmiş olup IGV 2.5.0 (Broad Institute) yazılımı ile analizleri gerçekleştirilmiştir. İki parça halinde dizi analizi gerçekleştirilen *FcyRIIIA* geninin ekzon 1-3 ve ekzon 4-5'e ait ham IGV analiz görüntüleri Şekil 22 ve Şekil 23'de gösterilmiştir.



Şekil 22. *FcγRIIIA* geninin ekzon 1-3'e ait IGV görüntüsü.



Şekil 23. *FcγRIIIA* geninin ekzon 4-5'e ait IGV görüntüsü.

3.6. İstatistiksel Analizler

Hasta ve kontrol karşılaştırılmasında ilgilenilen parametrelerin normal dağılım varsayım kontrolü shapiro-wilks testi ile yapılmıştır. Değerler Ortalama±Standart hata veya ortanca 1.çeyrek-3.çeyrek olarak ifade edilmiştir. NK hücre alt grupları, B73.1 ve 3G8 klonu ile CD16 ekspresyonlarının karşılaştırılmasında bağımsız *t* testi kullanılmıştır. NK hücre sitotoksiste testinde konsantrasyon değişimleri ile hasta ve kontrol gruplarının karşılaştırılmasında iki yönlü tekrarlı ölçüm varyans analizi (Two-Way Repeated Measures ANOVA) ile Mann Whitney U testi kullanılmıştır. Testin küresellik varsayımı Mauchly's Test of Sphericity tablosu ile değerlendirilmiştir. Within effects of subjects tablosundan

ölçümlerin hem konsantrasyona bağlı değişim hem de bu değişimin gruplar ile interaksiyon ana etkisi değerlendirilmiştir. Ayrıca konsantrasyonlar arasındaki karşılaştırmalar için her grupta basit etki testi (Simple Effect) uygulanmıştır. Çoklu karşılaştırmalarda bonferroni düzeltmesi uygulanmıştır. Sonuçlar F testi değerleri ile birlikte etki boyutu için kısmi eta kare (η^2) birlikte sunulmuştur. NK hücre alt grupları ile NK hücre sitotoksitesitesi arasındaki ilişkinin yönü ve kuvveti pearson korelasyonu ile değerlendirilmiştir. Tüm istatistiksel analizlerde P değeri <0,05 anlamlı olarak kabul edilmiştir. Bu analizlerde JASP Team (2019). JASP (Version 0.11.1) yazılımı kullanılmıştır.

3.7. Etik Kurul ve Proje Onayı

Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi İlaç ve Tıbbi Cihaz Dışı Araştırmalar Etik Kurulu tarafından “Doğal Öldürücü (NK) Hücre Düşüklüğü Olan Hastalarda, NK Hücre Sitotoksitelerinin ve *FcγRIIIA* Gen Mutasyonlarının Araştırılması” başlıklı doktora tez çalışması 27.05.2017 tarihli 2017/936 sayılı karar ile onaylanmıştır (Bkz. EK-A). Ayrıca çalışma Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından 171418003 proje numarası ile desteklenmiştir.

4. BULGULAR

Çalışmaya Necmettin Erbakan Üniversitesi Çocuk Alerji ve İmmünoloji Kliniğine 2016-2018 yılları arasında başvuran toplam 10 hasta (Erkek: 8, Kız: 2) ile yaş uyumlu 7 kontrol dahil edilmiştir (Erkek: 3, Kız: 4). Yaş ve cinsiyet açısından herhangi bir saptanmamıştır.

4.1. Klinik Bulgular

Çalışmaya alınan 10 hastaya ait klinik bulgular, özgeçmiş ve soy geçmişi bilgileri Tablo 6'de özetlenmiştir.

Tablo 6. Hastaların klinik ve diğer özellikleri.

Hastalar	Cinsiyet	Başvuru yaşı	Çalışma sırasında yaş	Başvurudaki özellik	Klinik öykü	Ebeveyn akrabalık	Soygeçmiş
H1	E	4 ay	3 yaş	Sık hastalanma	• Tekrarlayan bronşiolit	Var	• Annenin 3 kardeşi ex
H2	E	9 ay	6 yaş	Yüzde yara	• Yüzde kaşıntılı döküntü • Yüzde yara	Yok	• Yok
H3	E	2 ay	2 yaş	Tekrarlayan bronşit	• Tekrarlayan bronşiolit	Yok	• Yok
H4	E	12 ay	2 yaş	Tekrarlayan bronşit	• Tekrarlayan bronşiolit	Var	• Annenin 1 kardeşi ex • Babanın 1 kardeşi ex
H5	E	10 ay	11 yaş	Tekrarlayan ateş	• Tekrarlayan üst ve alt solunum yolu enfeksiyonları	Yok	• Annenin 2 kardeşi ex
H6	E	6 ay	2 yaş	Sık hastalanma	• Tekrarlayan bronşiolit • Nötropeni	Yok	• Annenin 1 kardeşi 7 aylık IU ex
H7	E	12 yaş	15 yaş	Sık herpes enfeksiyonu	• Sık herpes • Tekrarlayan ÜSYE • Tekrarlayan otit	Yok	• Yok
H8	K	7 ay	2 yaş	Sık hastalanma	• Salmonella ve Rota nedeniyle hastane yatışı • Tekrarlayan üst ve alt solunum yolu enfeksiyonları	Yok	• Yok
H9	K	2 yaş	2 yaş	Sık hastalanma	• Sık bronşiolit	Var	• Yok
H10	E	15 ay	2 yaş	Tekrarlayan bronşit	• Tekrarlayan üst ve alt solunum yolu enfeksiyonları	Yok	• Yok

Hastalara ait özellikler ile klinik bulgular değerlendirildiğinde, başvuru yaşı ortanca 9,5 ay ($2-144 \pm 42$), çalışma sırasındaki yaş ortancası 2 yıl ($2-15 \pm 5$) olarak bulunmuştur. Hastaların kliniğe başvuru sebeplerinin en fazla sık hastalanma ve viral enfeksiyon kaynaklı olduğu tespit edilmiştir.

Hastaların klinik öyküleri değerlendirildiğinde, en sık görülen bulgunun ateş, pnömoni ve bronşit olduğu dikkat çekmektedir. Ayrıca 7 hastada enfeksiyonların kontrol altına alınabilmesi için en az 1 kez hastane yatış öyküsünün olduğu tespit edilmiştir. Üç hastanın ebeveynlerinin akraba olduğu belirlenmiştir. Hastalarının soy geçmişlerinin sorgulanması sonucunda 4 hastanın ebeveynlerinin kardeşlerinin bebeklik çağında bilinmeyen sebeple exitus olduğu tespit edilmiştir.

Hastaların enfeksiyon sırasında alınan kültürlerin pozitiflik durumları da retrospektif olarak değerlendirilmiştir. Hastaların hastaneye başvuruları sırasındaki şikâyeti doğrultusunda solunum yolu viral paneli, boğaz, idrar, burun, kan ve yara kültürleri istenmiştir. Bu sonuçlara göre H1, H3, H5 H6, H8, H9 ve H10'da solunum yolu paneli pozitifliği; H5, H9, H10'da boğaz kültürü, H5, H6, H9, H10'da H5, H8, H9, H10'da burun kültürü, H6, H9, H10'da kan kültürü ve H2, H5 numaralı hastalarda yara kültürü pozitifliği tespit edilmiştir. Solunum yolu panelinde tespit edilen viral enfeksiyon ajanları Tablo 7'da gösterilmiştir.

Tablo 7. Hastaların solunum yolunda tespit edilen virüsler.

Hastalar	Solunum Yolu Virüsleri
H1	İnfluenza Metapneumovirus Rhinovirüs
H2	Çalışılmadı
H3	Respiratuvar sinsitiyal virüs A Respiratuvar sinsitiyal virüs B Rhinovirüs
H4	İnfluenza
H5	Rhinovirüs İnfluenza
H6	Rhinovirüs
H7	Herpes virüs
H8	Respiratuvar sinsitiyal virüs A Respiratuvar sinsitiyal virüs B
H9	Adenovirüs Rhinovirüs Enterovirüs Respiratuvar sinsitiyal virüs A Respiratuvar sinsitiyal virüs B Metapneumovirus
H10	Adenovirüs Rhinovirüs Respiratuvar sinsitiyal virüs A Respiratuvar sinsitiyal virüs B İnfluenza Metapneumovirus

Ayrıca hastalarda gözlenen tekrarlayan enfeksiyonlar bazen anatomik ve fizyolojik bariyerlerin fonksiyon görmemesiyle ve alerjik hastalıklarla da ilişkili olabileceğinden bu bulgular da değerlendirilmiştir. Bununla ilgili herhangi bir bulgu tespit edilmemiştir.

4.2. Periferik Lenfosit Alt Grup Oranları ve Diğer Laboratuvar Bulguları

Çalışmaya alınan hastalardaki klinik bulguları diğer primer immün yetmezliklerde de rastlanılan bulgulara benzer olduğundan, olası primer immün yetmezlikleri dışlamak amacıyla, periferik lenfosit alt grup oranları, immünoglobulin değerleri, tam kan sayımı sonuçları, spesifik antikor yanıtları ve izohemaglutinin titreleri de retrospektif olarak değerlendirilmiştir (Tablo 8 ve Tablo 9).

Tablo 8. Hastaların periferik kan lenfosit oranları, molekül ekspresyonları ve immünglobulin değerleri.

Hastalar	CD3 (%)	CD8 (%)	CD19 (%)	CD4 (%)	CD16 (%) (B73.1) lenfosit kapısı	CD16 (%) (3G8) lenfosit kapısı	CD56 (%)	HLA-DR (%)	HLA-Class I (%)	immünglobulinler (mg/dl)
H1	70	12	22	56	0	3,5	5,3	26	99	Ig G: 368 Ig A: 24 Ig M: 68
H2	65	24	29	40	0,9	0,6	2,1	24	87	Ig G: 488 Ig A: 27 Ig M: 47
H3	59	21	33	40	0,1	1,8	2,1	34	97	Ig G: 771 Ig A: 54,1 Ig M: 42,6
H4	62	29	26	29	0	5,6	6,2	34	97	Ig G: 630 Ig A: 26,7 Ig M: 114
H5	62	22	22	39	0	27	21,7	24	99	Ig G: 538 Ig A: 93 Ig M: 62,8
H6	58	17	38	41	0	4,3	3,9	29	99	Ig G: 336 Ig A: 24,5 Ig M: 71,6
H7	69	34	12	37	0	5,6	12,5	20	97	Ig G: 824 Ig A: 84 Ig M: 51
H8	74	28	20	44	5	2,6	4,8	20	99	Ig G: 654 Ig A: 48 Ig M: 118
H9	51	14*	43	33	0	8,6	3,7	41	99	Ig G: 677 Ig A: 23 Ig M: 73
H10	79	25	22	52	0,2	5,7	5,3	20	99	Ig G: 965 Ig A: 40,9 Ig M: 60,3

(*: Referans değerlerinin altında).

Hasta ve kontrollerin CD16 ekspresyonları B73.1 ve 3G8 olmak üzere iki farklı klondan mAb'ler ile değerlendirilmiştir. Hasta CD56+ NK hücre sayıları ortalama %76 iken kontrollerde ortalama %12,10 bulunmuş olup bu fark istatistiksel olarak anlamlı tespit edilmiştir (p=0,002). Farklı klonlar kullanılarak değerlendirilen CD16 ekspresyonları da hastalarda kontrollere oranla anlamlı derecede düşük bulunmuştur (p<0,001).

Tablo 9. Hastaların tam kan sayımı, izohemagglütinin titreleri ve özgül antikor yanıtları.

Parametreler	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10
WBC (10 ³ /ul)	6,7	10,7	7	5,9	6,9	5,51	7,6	12,3	9,4	9
ANS	2700	3000	3300	1600	2400	220*	5000	2091	3700	2800
ALS	2550	6800	3100	3700	3250	4022	2100	8118	4600	5200
HGB (g/dL)	11,5	13,4	8*	11,8	9,7*	11,2	14,5	12,2	11	11,7
HCT (%)	34,4	39,7	21,8	34,8	29,6	32,8	44	36,5	31	33,5
PLT (10 ³ /ul)	273	316	583	346	341	435	202	187	205	341
İzohemagglütinin	1/32	1/32	X	1/32	1/64	1/16	1/16	X	1/8	1/8
Anti HbS (mIU/ml)	<2*	725	301	814	85	840	48,62	220	191	1000
Pnömonokok Ig (mu/ml)	4800	2900	X	450	2300	3300	10500	X	X	X
Tetanoz Ig (IU/ml)	0,65	0,85	0,6	2,3	1,28	0,10	4,06	1	2,2	0,01*
CD25 aktivasyonu (Kat)	23	X	X	X	43	13	19	21	X	X

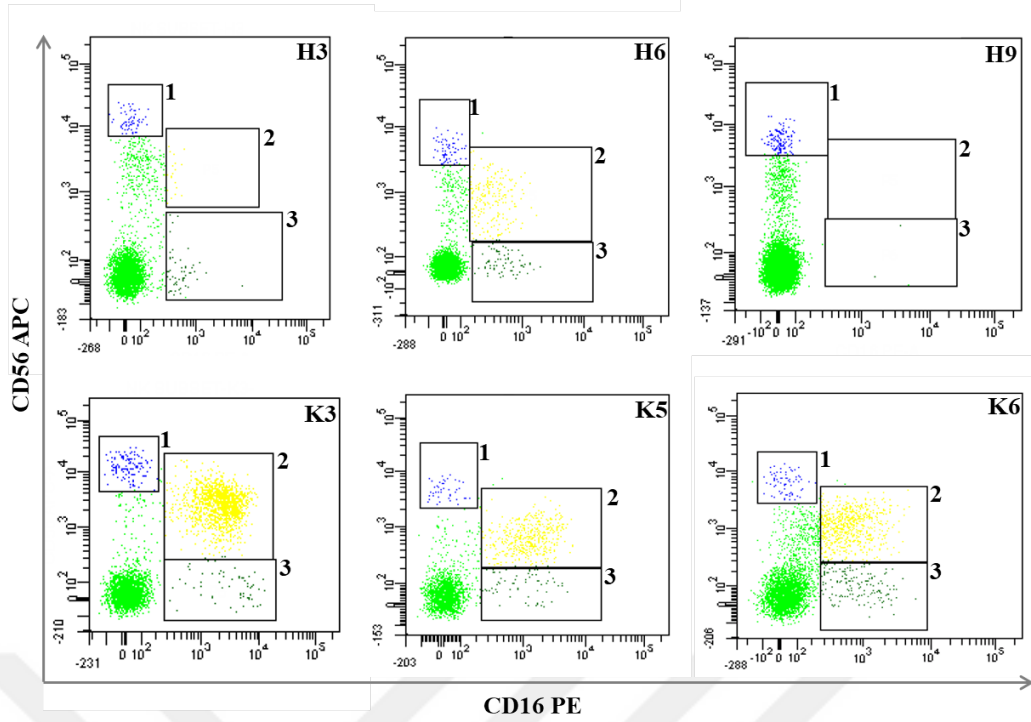
(*: Referans değerlerinin altında; X: Çalışılmadı).

4.3. Akım Sitometrik NK Hücre Alt Grup Oranları

Çalışma kapsamında değerlendirilen NK hücre alt grup analizinde CD56^{bright}CD16^{neg}, CD56^{bright}CD16^{int} ve CD56^{dim}CD16^{hi} olmak üzere 3 farklı NK alt grubu belirlenmiştir (Dobbs ve ark. 2017). Hasta ve kontrollere ait akım sitometri görüntüsü Şekil 24’de gösterilmiş olup NK hücre alt grup oranları da Tablo 10’de özetlenmiştir.

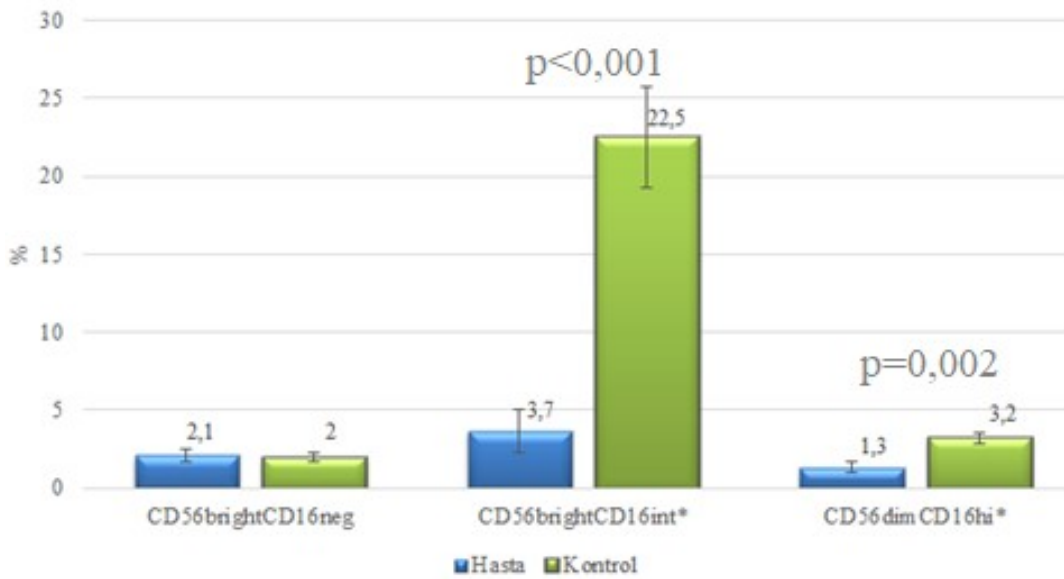
Tablo 10. Hasta ve kontrollerin NK hücre alt grup oranları (%).

Hasta ve kontroller	CD56 ^{bright} CD16 ^{neg}	CD56 ^{bright} CD16 ^{int}	CD56 ^{dim} CD16 ^{hi}
H1	1,5	0	0,8
H2	1,7	13	2
H3	1,7	0,6	1,3
H4	1,7	0	0
H5	4,8	0	0,1
H6	1,6	4,6	1,8
H7	1,7	7,6	3,4
H8	0,8	4,8	4,3
H9	1,5	0	0
H10	3,5	6,2	1,7
K1	2,5	27,2	4,3
K2	1,9	23	3,4
K3	3,2	38,5	1,7
K4	2	11,4	2,4
K5	2	20,3	3,8
K6	1,9	16	4,3
K7	0,5	20,8	2,6



Şekil 24. Bazı hasta ve kontrollere ait NK hücre alt gruplarının akım sitometrik görüntüsü. (1: CD56^{bright}CD16^{neg}, 2: CD56^{bright}CD16^{int}, 3: CD56^{dim}CD16^{hi})

NK hücre alt grup analizinde elde edilen veriler kontrol grubu ile karşılaştırıldığında CD56^{bright}CD16^{neg} hücre gruplarındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı (p=0,931), CD56^{bright}CD16^{int} ve CD56^{dim}CD16^{hi} NK hücre alt grubun da ise istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunduğu tespit edilmiştir (p değerleri sırasıyla; p<0,001; p=0,002). NK hücre alt grup analizinde elde edilen veriler Şekil 25’de gösterilmiştir.

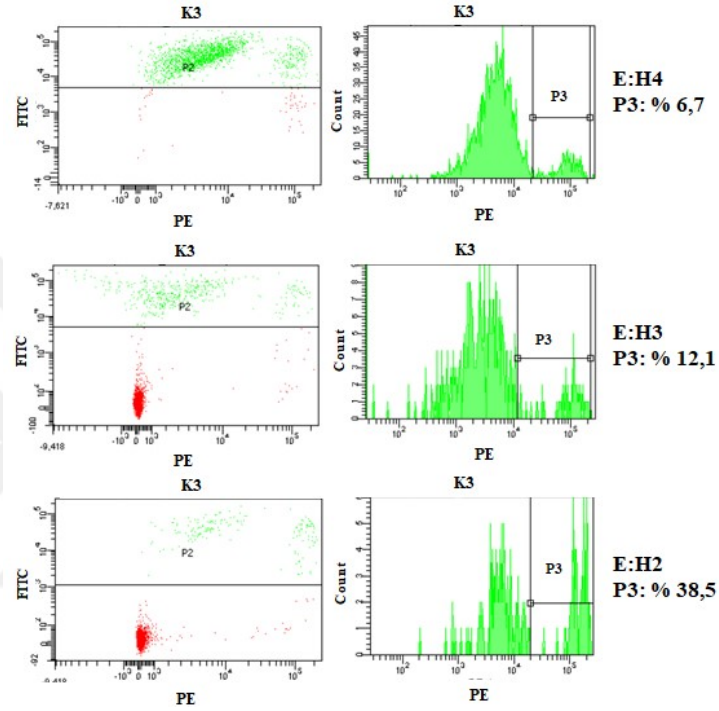


Şekil 25. NK alt gruplarına ait istatistiksel analiz sonuçları.

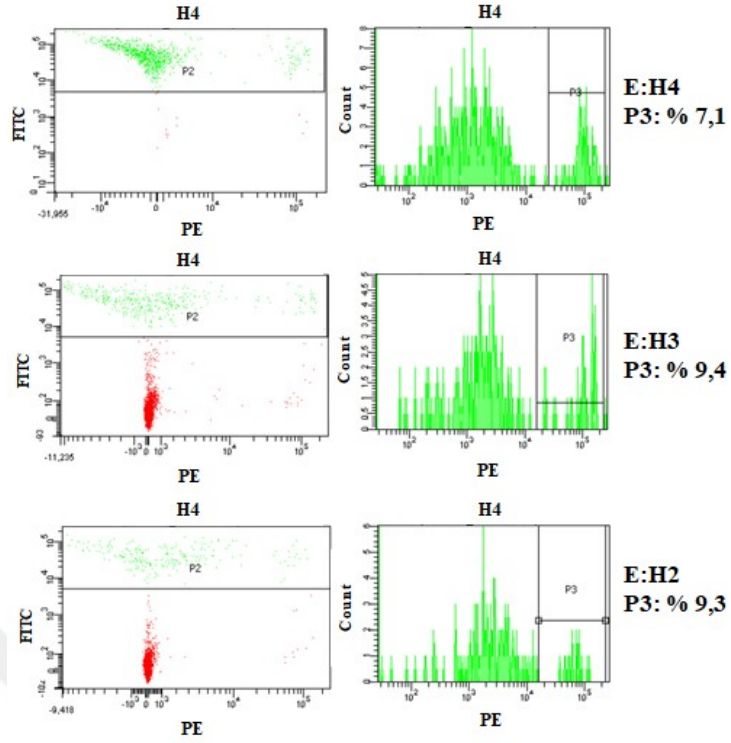
Tespit edilen 3 NK hücre alt grubuna ilaveten $CD56^{dim}CD16^{neg}$ bir NK hücre alt grubu tespit edilmiş olup bu grup hasta ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir ($p=0,233$).

4.4. NK Hücre Sitotoksosite Sonuçları

Çalışma gerçekleştirilen kontrole ait sitotoksosite görüntüleri Şekil 26'de hastaya ait sitotoksosite analiz görüntüleri Şekil 27'de gösterilmiştir.



Şekil 26. Kontrole ait sitotoksosite analiz görüntüleri.



Şekil 27. Hastaya (H4) ait sitotoksitate analiz görüntüleri.

Sitotoksitate analizi gerçekleştirilen hasta ve kontrollere ait analiz sonuçları Tablo 11’de gösterilmiştir.

Tablo 11. Hasta ve kontrollere ait sitotoksitate analiz sonuçları (%).

Hasta ve Kontroller	E:H4	E:H3	E:H2
	E: 0 K562: 100	E: 25 K562: 100	E: 50 K562: 100
H1	7,1	19,5	20,9
H2	7,1	9	11,2
H3	8,3	10,6	10,7
H4	7,7	9,4	9,3
H5	7,7	11,4	11,2
H6	38	40,4	39,8
H7	38	43,2	35,5
H8	36	37,1	39,3
H9	25	29,8	42,5
H10	32	34,3	39,4
K1	5,7	12,5	32
K2	10,8	18,2	46
K3	6,8	12,1	38,5
K4	30	71	69
K5	15	42	49
K6	18	54	71
K7	16	58	55

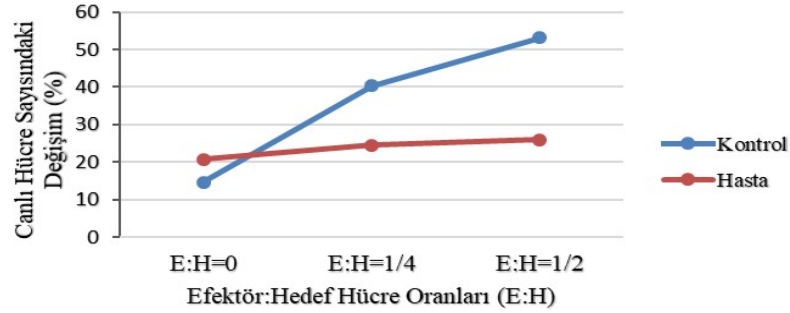
NK hücre sitotoksosite testi sonucunda elde edilen veriler hem kendi içinde hem de kontroller ile karşılaştırılarak analiz edilmiştir. Öncelikle analiz sonuçlarının küresellik varsayımını karşılayıp karşılamadığı Mauchly's Test of Sphericity testi ile değerlendirilmiş olup elde edilen verilerin küresellik varsayımını karşıladığı tespit edilmiştir ($W=0,87$; $\chi^2(2) =1,96$; $p=0,376$). Within Subjects Effect tablosundan tüplerdeki efektör hücre konsantrasyonuna bağlı değişimin ana etkisi değerlendirildiğinde, hedef hücre miktarındaki değişim istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($F(1, 30) =56,084$; $p<0,001$, $\eta^2: 0,79$).

Sitotoksosite analizinde konsantrasyona bağlı değişime grupların dahil edildiği interaksiyon etkisi değerlendirildiğinde efektör hücre konsantrasyonundaki değişimin anlamlı olduğu tespit edilmiştir ($F(1, 30) =32,093$; $p<0,001$, $\eta^2: 0,68$). Bu durumda hasta ve kontrol arasında efektör hücre konsantrasyondaki değişimin hedef hücre miktarında farklılık gösterdiği anlamına gelmemektedir. Ayrıca hasta ve kontrol gruplarındaki tüpler ayrı ayrı değerlendirildiğinde kontrol grubundaki tüplerdeki efektör hücre miktarındaki değişimin hedef hücre miktarındaki azalmaya istatistiksel olarak anlamlı etki ettiği bulunmuştur ($F(2, 12) =36,820$; $p<0,001$, $\eta^2: 0,68$).

Hasta ve kontrol örneklerinde hedef hücre miktarındaki azalma çift karşılaştırılmalı olarak değerlendirilmiştir. Kontrol grubu için, E:H4 ile E:H3 ($p=0,011$) ve E:H4 ile E:H2 ($p<0,001$) arasındaki hedef hücre miktarındaki değişimin istatistiksel olarak anlamlı olduğu, E:H3 ile E:H2 ($p=0,098$) arasındaki değişimin anlamlı olmadığı sonucuna varılmıştır. Hasta grubu içinde istatistiksel olarak benzer sonuçlar elde edilmiştir (p değerleri sırasıyla; $p=0,017$; $p=0,066$; $p>0,05$).

Hasta ve kontrol grupları birbiri arasında tek tek değerlendirildiğinde kontrol grubunda hedef hücre miktarındaki azalma E:H4 (%13) ile E:H3 (%40) arasında 3,07 kat, E:H4 ile E:H2 (%53) 4,07 kat iken hasta grubunda bu değişimler her iki oranlar arasında ortalama 1,25 kat olarak tespit edilmiştir. Kontrol ve hasta grubunun efektör hücre konsantrasyonuna bağlı hedef hücre miktarındaki değişim Şekil 28'de gösterilmiştir. Bundan dolayı sonuçlar, kontrol grubunda NK hücre sitotoksitesinin pozitif, hasta grubunda negatif olduğu yönünde değerlendirilmiştir. Ayrıca E:H3 ile E:H2 arasındaki değişimin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı sonucu testin gerçekleştirilirken bu tüpe ihtiyaç duyulmaması gerektiği böylelikle hem hedef hem

de efektör hücre miktarının daha az miktarda kullanılarak testin gerçekleştirilebileceği sonucunu vermektedir.



Şekil 28. NK hücre sitotoksitesinde farklı oranların hedef hücre miktarındaki değişimi.

NK hücre sitotoksitesinde kullanılan E:H2 ile E:H3 konsantrasyonlarında ayrı ayrı korelasyon analizi gerçekleştirilmiş olup E:H2 ile E:H3 için de ayrı veriler elde edilmiştir. Öncelikle genel sitotoksitesite değerlendirildiğinde E:H2’de korelasyon katsayısının daha güçlü olduğu tespit edilmiştir. Daha sonra NK hücre alt grubunun sitotoksitesite üzerindeki etkisi değerlendirilmiş olup $CD56^{bright}CD16^{int}$ ve $CD56^{dim}CD16^{hi}$ NK hücre alt grubu ile NK hücre sitotoksitesitesi arasında pozitif bir korelasyon tespit edilmiştir (p değerleri sırasıyla $p=0,044$; $p=0,018$). $CD56^{bright}CD16^{neg}$ NK alt grubu ile NK hücre sitotoksitesitesi arasında negatif korelasyon tespit edilmiş olup bu değişim istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,433$). Korelasyon analiz sonuçları Tablo 12’de gösterilmiştir.

Tablo 12. Pearson korelasyon analizi sonuçları8.

NK Hücre Alt Grup	Efektör ve Hedef Hücre Oranları	
	E:H3	E:H2
$CD56^{bright}CD16^{neg}$	p: 0,233 r: -0,306	p: 0,433 r: -0,191
$CD56^{bright}CD16^{int}$	p: 0,546 r: 0,158	p: 0,044* r: 0,493
$CD56^{dim}CD16^{hi}$	p: 0,113 r: 0,399	p: 0,018* r: 0,546

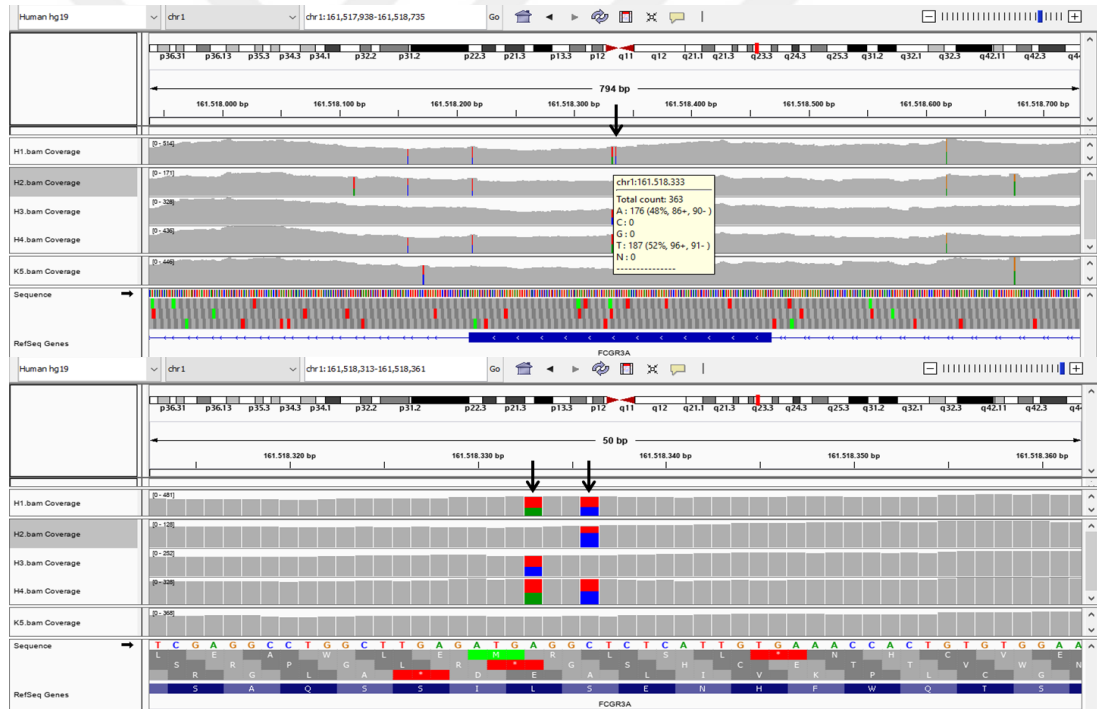
4.5. *FcyRIIIA* Geni Analiz Sonuçları

Bu çalışmada *FcyRIIIA* geninin, NGS ile gerçekleştirilen tüm gen analizi ile ekzon 3 ve ekzon 4’de polimorfizmler tespit edilmiştir. Ekzon 4’deki (rs396991; g.161514542 A>C; p.V176F) polimorfizm bütün hastalarda tespit edilmiştir. Ekzon 3’de (rs10127939; g.161518333 A>C, A>T; p.L66H) tespit edilen değişiklik bütün hastalarda farklı genotipde bulunmuştur. Referans genoma ilaveten bir kontrolde

(K5) gerçekleştirilen NGS analizi sonucunda ekzon 4 için heterozigot (AC), ekzon 3 içinde homozigot normal (AA) genotipinde olduğu belirlenmiştir. Sonuçlar ile ilgili elde edilen veriler Tablo 13’de gösterilmiştir. İlave olarak ekzon 4 ve ekzon 3’e ait NGS analiz görüntüleri sırasıyla Şekil 29 ile Şekil 30’de gösterilmiştir.

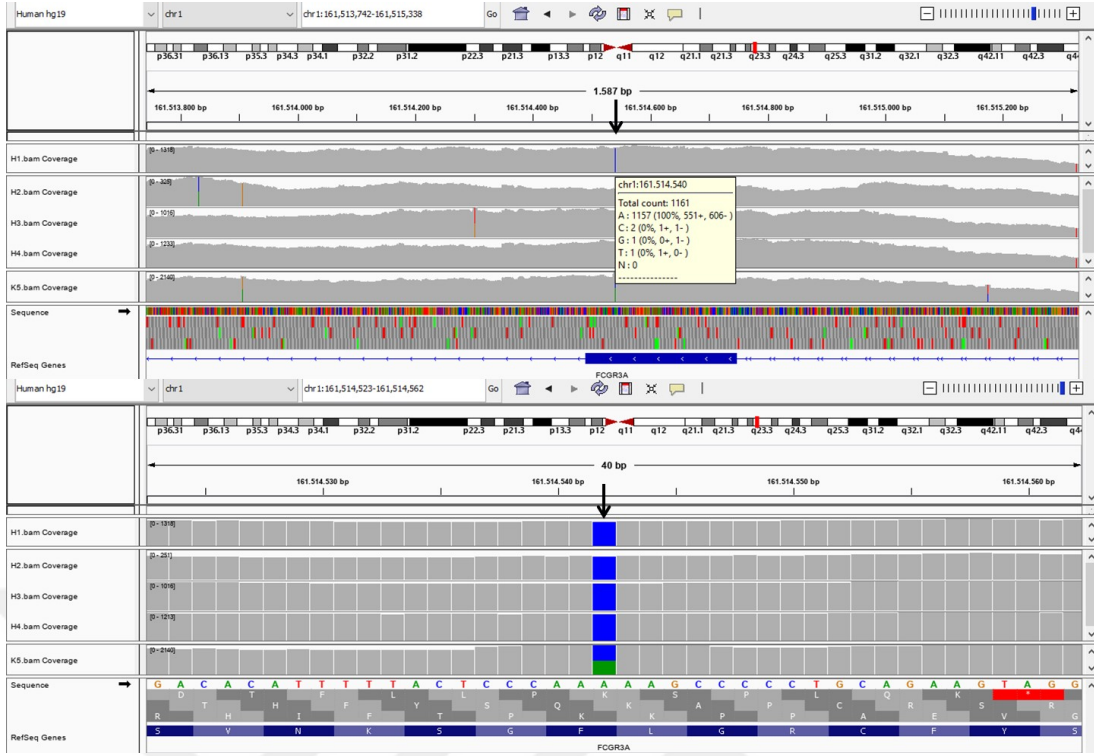
Tablo 13. *FcyRIIIA* genine ait NGS sonuçları.

Hastalar	Ekzon 3 (rs10127939) Wild tip (AA)	Ekzon 4 (rs396991) Wild tip (AA)
H1	AT	CC
H2	AA	CC
H3	AC	CC
H4	AT	CC
H6	AC	CC
H7	AT	CC
H8	AA	CC
H9	AT	CC
H10	AT	CC
K5	AA	AC



Şekil 29. *FcyRIIIA* geni ekzon 3 IGV analiz görüntüsü.

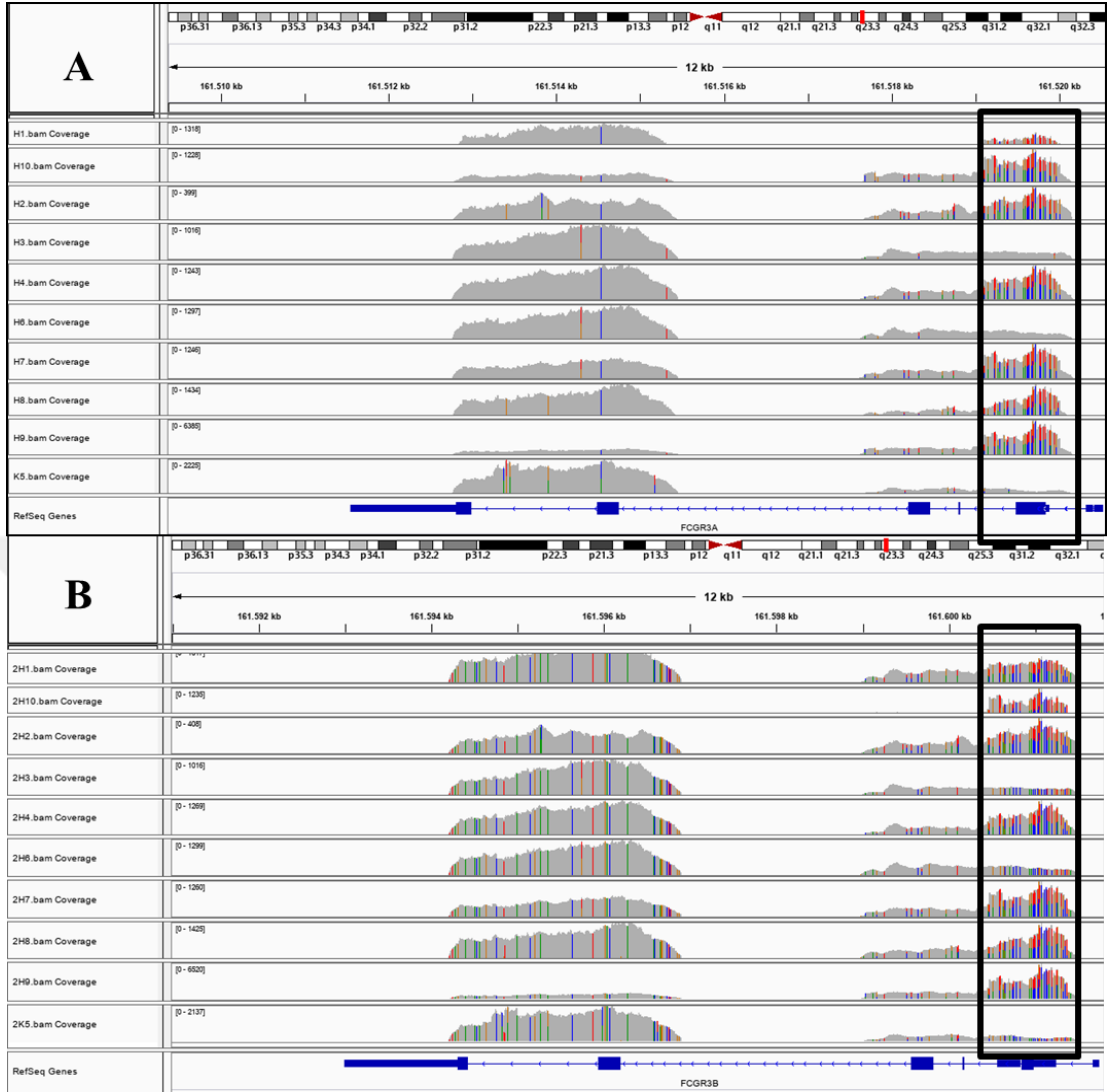
(Ok işareti polimorfik bölgeyi göstermektedir. A: IGV analizi genel görünümü, B: Yakınlaştırılmış görüntü).



Şekil 30. FcγRIIIA geni ekzon 4 IGV analiz görüntüsü.

(Ok işareti polimorfik bölgeyi göstermektedir. A. IGV analizi genel görünümü, B. Yakınlaştırılmış görüntü).

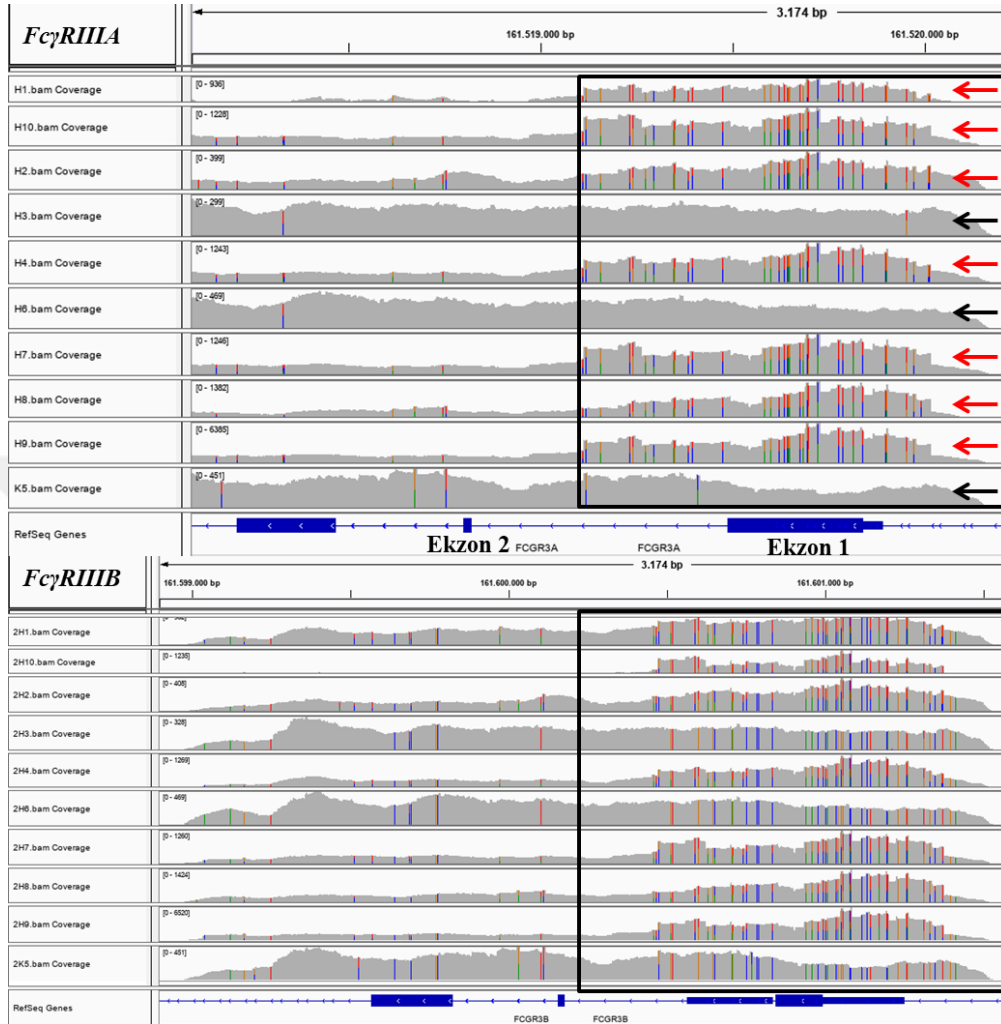
NGS sonuçlarının analizleri sırasında ekzon 1 ile ekzon 2 arasındaki intron 1 bölgesi ile özellikle ekzon 1’de fazla sayıda polimorfizm olduğu gözlenmiştir. *FcγRIIIA* geni ile *FcγRIIIB* genleri arasındaki yüksek DNA dizi benzerliği olası polimorfizmin *FcγRIIIB* geni kaynaklı olup olmadığı sorusu akla gelmiştir. Bundan emin olabilmek için *FcγRIIIA* geni üzerine yapılan alignment işlemi *FcγRIIIB* geni üzerinden de gerçekleştirilip sonuçlar karşılaştırılmıştır. Her iki kısım içinde gerçekleştirilen analizler Şekil 31A (*FcγRIIIA* geni üzerine yapılan alignment) ve Şekil 31B (*FcγRIIIB* geni üzerine yapılan alignment)’de gösterilmiştir. İlgili bölge çerçeve içine alınmıştır.



Şekil 31. *FcγRIIIA* ve *FcγRIIB* üzerine yapılan alignmentin IGV görüntüsü.
(A: *FcγRIIIA* geni üzerine yapılan alignment. B: *FcγRIIB* geni üzerine yapılan alignment).

FcγRIIIA ve *FcγRIIB* geni üzerine yapılan alignmentler detaylı bir şekilde analiz edilmiştir. Ekzon 1, intron 1 ve ekzon 2 bölgesinin detaylı analiz görüntüsü Şekil 32’de gösterilmiştir. Analizlerde de görüldüğü gibi *FcγRIIIA* DNA dizisi kullanılarak yapılan alignmentde daha az polimorfik bölge gözlenmiştir. Ancak *FcγRIIB* DNA dizisi kullanılarak gerçekleştirilen alignmentde ilgili bölge daha karmaşık hale gelmektedir. Bu durumda sekanslanan bölgenin *FcγRIIIA* genine ait bölge olduğunu göstermektedir. İlave olarak H3, H6 ve K5 örneklerinde *FcγRIIIA* geni üzerine yapılan alignmentde bölgenin normal olduğu *FcγRIIB* üzerine

alignment yapıldığında bölgenin karmaşık hale geldiği açıkça görülmektedir. Bu analizler de bölgenin *FcγRIIIA* gen bölgesi olduğunu desteklemektedir.



Şekil 32. İlgili bölgenin *FcγRIIIA* ve *FcγRIIIB* üzerine yapılan alignmentin IGV görüntüsü.

Bu analizlerin ardından ekzon 1 ile ekzon 2 ile arasındaki intron 1 bölgesi ile ekzon 1'i kapsayan yukarıda detaylı analizleri yapılan bölgenin dizisi çıkarılıp bu bölge ile detaylı araştırma yapılmıştır. Elde edilen dizi BLAST programı aracılığıyla alignment yapılmış olup *FcγRIIIA* geni ile %97 *FcγRIIIB* geni ile %96 oranında benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir ([https://blast.ncbi.nlm.nih.gov](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov;); <https://genome.ucsc.edu>).

FcγRIIIA geni tüm gen analizi sonucunda tespit edilen diğer polimorfizmler Tablo 14'de gösterilmiştir.

Tablo 14. *FcyRIIIA* geni tüm gen analizi sonucunda tespit edilen diğer polimorfizmler.

Polimorfik bölge		H1	H2	H3	H4	H6	H7	H8	H9	H10	K5
Ekzon 3	161.158.214 (TT)*	TA	TA	TT	TA	TT	TA	TA	TA	TA	TT
	161.518.333 (AA)*	AT	AA	CT	AT	CT	AT	AA	AT	AT	AA
	161.518.336 (CC)*	CT	CT	CC	CT	CC	CT	CT	CT	CT	CC
Ekzon 1	161.519.584 (AA)*	AG	AG	AA	AG	AA	AG	AG	AG	AG	AA
	161.519.601 (AA)*	AG	AG	AA	AG	AA	AG	AG	AG	AG	AA
	161.519.622 (CC)*	CT	CT	CC	CT	CC	CT	CT	CT	CT	CC
	161.519.637 (CC)*	CT	CT	CC	CT	CC	CT	CT	CT	CT	CC
	161.519.645 (CC)*	CT	CT	CC	CT	CC	CT	CT	CT	CT	CC
	161.519.646 (AA)*	AG	AG	AA	AG	AA	AG	AG	AG	AG	AA
	161.519.650 (AA)*	AG	AG	AA	AG	AA	AG	AG	AG	AG	AA
	161.519.677 (CC)*	CT	CT	CC	CT	CC	CT	CT	CT	CT	CC
	161.519.684 (GG)*	AG	AG	AA	AG	AA	AG	AG	AG	AG	AA
	161.519.695 (GG)*	CG	CG	GG	CG	GG	CG	CG	CG	CG	GG
	161.519.700 (GG)*	GT	GT	GG	GT	GG	GT	GT	GT	GT	GG
	161.519.723 (CC)*	AC	AC	CC	AC	CC	AC	AC	AC	AC	CC
	161.519.724 (CC)*	CT	CT	CC	CT	CC	CT	CT	CT	CT	CC
	161.519.777 (TT)*	CT	CT	TT	CT	TT	CT	CT	CT	CT	TT
	161.519.788 (TT)*	CT	CT	TT	CT	TT	CT	CT	CT	CT	TT
	161.519.815 (AA)*	AT	AT	AA	AT	AA	AT	AT	AT	AT	AA
	161.519.839 (CC)*	CT	CT	CC	CT	CC	CT	CT	CT	CT	CC
	161.519.840 (AA)*	AT	AT	AA	AT	AA	AT	AT	AT	AT	AA

* hg19 insan referans genom dizisine göre WT genotipler

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu tez projesinde, klinik ve rutin laboratuvar bulgular doğrultusunda NKD özellikle FNKD düşünölen hastalar çalışmaya alınmıştır. Hastalara periferik lenfosit alt grup ile NK hücre alt grup ve NK hücre sitotoksisite (NK hücre fonksiyon tespiti için) analizi uygulanmıştır. NK hücre sitotoksisite analizinde kontrole oranla sitotoksisite yeteneği düşük olan hastaların *FcγRIIIA* gen mutasyon(lar)u açısından araştırılması amaçlanmıştır. Hastaların NK alt grupları, NK hücre sitotoksisite sonuçları ve *FcγRIIIA* gen mutasyonları, klinik özellikleri birbirleri ile ilişkilendirilmiştir. Bu karşılaştırılma neticesinde klinik olarak NKD düşünölen hastaların NK hücre alt grupları ile sitotoksisite açısından farklı olduğu ve farklı alt grupların hastaların kliniklerinin kötü yönde etkilediği belirlenmiştir.

Çalışmaya alınan hastaların kliniğe başvuru şikayetlerinin değerlendirilmesi sonucu en sık şikayetin sık hastalanma olduğu dikkati çekmektedir. Sık hastalanma sebepleri sorgulandığında üst solunum yolu enfeksiyonuna bağlı olduğu tespit edilmiştir. Literatürde *FcγRIIIA* mutasyonuna bağlı ilk vakanında şikayeti incelendiğinde tekrarlayan üst solunum yolu enfeksiyonlarının sık göröldüğu dikkati çekmektedir. Dolayısıyla çalışmaya alınan hastaların literatürle uyumlu olduğu gözlenmektedir (Jawahar ve ark. 1996; de Vries ve ark. 1996; Mace ve Orange 2016). Hastaların enfeksiyon dönemlerinde alınan kültür ve moleküler mikrobiyolojik çalışmalarda solunum panelinde sık rastlanılan viral ajanın rhinovirüs, respiratuvar sinsitiyal virüs A ve B (RSV) ve influenza olduğu tespit edilmiştir. Bu viral ajanların uzaklaştırılmasında sitotoksik T lenfositler görev yapmaktadır. Sitotoksik T lenfositlerin etkin olarak görev yapmasında NK hücreler salgıladıkları IFN- γ aracılığıyla bu yanıtı düzenlemektedir (Kos ve Engleman 1996; He ve ark. 2004; Culley 2009). Çalışma grubunda bulunan hastaların CD8+ sitotoksik T hücre oranları normal düzeyde tespit edilmiştir. NK hücre fonksiyonundaki bozukluk ve sayısındaki azlık bu tip viral ajanlara bağlı enfeksiyon sıklığını açıklayabilir.

Hastaların tam kan sayımları, periferik lenfosit alt grup analizleri, serum Ig düzeyleri ve diğer immünolojik testleri diğer primer immün yetmezlikleri dışlanma açısından değerlendirilmiştir. Tam kan sayımlarında herhangi bir anormallik tespit edilememiştir. Bir hastada (H9), hafif CD8+ sitotoksisite, T hücre düşöklüğu, bir

hastada (H10) ise hafif CD19+ B hücre düşüklüğü tespit edilmiş olup takiplerinde düzelme saptanmıştır. Ig düzeyleri açısından; 4 hastada (H3, H5, H6 ve H10) IgG değerlerinde hafif düşüklük, bir hastada (H3) IgG'ye ilave olarak IgM düşüklüğü, bir hastada ise (H5) IgG ile birlikte IgA düşüklüğü tespiti edilmiştir. Hastaların aşı cevapları ve izohemaglutinin titreleri de değerlendirilmiştir. İki hastanın (H3 ve H8) yaşından dolayı izohemaglutinin sonuçları değerlendirilmemiştir. Bunun dışında diğer immünolojik testlerde de bir anormallik tespit edilememiştir. Hastaların laboratuvar bulguları literatürdeki vakalarda ile karşılaştırıldığında izole NKD için uyumlu görünmektedir (Jawahar ve ark. 1996; de Vries ve ark. 1996; Mace ve Orange 2016).

Hastaların şikayetleri doğrultusunda sık hastalanan çocuğa yaklaşım kriterleri (Jeffrey modell foundation) ile hastalar değerlendirilmiş veolası PİY açısından hastalar araştırılmıştır (<http://www.info4pi.org/hq>). Bu amaçla, birinci ve ikinci basamak testler gerçekleştirilmiştir. Bunlar neticesinde diğer PİY'ler dışlanmış ve hastalar izole NKD olarak kabul edilmiş ve bunun ile ilgili ileri analizler gerçekleştirilmiştir.

NKD'nin ileri immünolojik analizleri için NK hücre alt grupları ve hastaların NK hücre sitotoksinite yetenekleri değerlendirilmiştir. Ortalama CD56+ NK hücre oranları hastalarda %6,7 iken kontrollerde %18,8 olarak tespit edilmiş ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,002$). Ancak yaşa göre kıyaslandığında normal aralıklarda yer aldığı ve literatür ile uyumlu olduğu tespit edilmiştir. Ancak CD56+ NK hücrelerin CD16 ekspresyonu, B73.1 ve 3G8 olarak farklı iki klon ile değerlendirildiğinde 3G8 açısından hasta ve kontrollerde istatistiksel olarak bir fark olmamasına rağmen, B73.1 klonu ile yapılan CD16 ekspresyon analizlerinde farkın anlamlı olduğu saptanmıştır ($p<0,001$). Bu sonuçlar da hastaların B73.1 ile ekspresyon kaybının *FcγRIIIA* geninde oluşan bir mutasyondan kaynaklandığını akla getirmektedir. Bu amaçla gerçekleştirilen literatür araştırmasında, *FcγRIIIA* geninde meydana gelen c.230T>A tranversiyonunun L66H amino asit değişikliğine yol açtığı ve bu mutasyonun homozigot olması durumunda da NKD ve özellikle FNKD'nin sebebi olduğu belirtilmektedir (Jawahar ve ark. 1996; de Vries ve ark. 1996; Grier ve ark. 2012). Lenart ve ark. benzer klinikleri taşıyan 167 hastayı L66H varyantı açısından değerlendirmişler ve sadece 30 hastada bu varyant açısından homozigot mutasyon tespit etmişler ve bu mutasyonun nadir görülen bir mutasyon olduğunu

belirtmişlerdir. İlave olarak NK hücrelerdeki B73.1 klonu ile gastrointestinal malignitesi olan hastalarda da CD16 kaybına rastlamışlardır. Buradan NK hücre analizinin PİY olan hastalara ilaveten malignitesi olan hastalarda da değerlendirilmesi gerektiğini vurgulamışlardır. CD16'nın B73.1 kolonu ile tespit edilememesi, reseptörün etkilendiğini akla getirmektedir. B73.1 mAb ile epitop kaybı göz önüne alındığında, L66H mutasyonun CD16'nın üç boyutlu (3D) yapısında değişikliği neden olduğu ve bunun sonucunda bağlı B73.1 mAb ile tespit edilemediği açıklanmıştır (Grier ve ark. 2012).

Hastalarda gerçekleştirilen *FcγRIIIA* tüm gen analizi neticesinde ve ekzon 3'de (rs10127939; g.161518333 A>C, A>T; p.L66H) değişiklikler tespit edilmiştir. Sekiz hastanın bu bölge açısından heterozigot olduğu iki hastanın da homozigot normal genotipe sahip olduğu tespit edilmiştir (Tablo 13). Ancak bu hastaların hepsinde B73.1 klonu ile CD16 ekspresyonu tespit edilememiştir. Bu da sadece bu mutasyonun epitop kaybına sebep olmadığı, henüz tespit edilmemiş başka olası gen(ler) mutasyonlarının epitop kaybına sebep olabileceğini düşündürmektedir. Lenart ve ark. (2010) tarafından yapılan bir çalışmada, B73.1 mAb ile epitop kaybının sadece L66H mutasyonuna bağlı olmadığı başka mutasyonların da epitop kaybına sebep olabileceği bildirilmiştir. Bu tez çalışmasında elde edilen veriler Lenart ve ark. (2010) yaptığı çalışma ile uyuşmakta, CD16 epitop kaybına sebep olacak başka gen mutasyonlarının da olabileceğini düşündürmektedir.

NK hücre alt grup analizlerinin değerlendirilmesi sonucunda oluşturulan 3 NK hücre alt grubundan $CD56^{bright}CD16^{neg}$ ($p=0,931$) NK alt grubunun hasta ve kontrol gruplarında istatistiksel olarak farklı olmadığı, $CD56^{bright}CD16^{int}$ ($p<0.001$) ve $CD56^{dim}CD16^{hi}$ ($p= 0,002$) gruplarındaki farkın istatistiksel olarak farklı olduğu tespit edilmiştir. Literatürde NK hücre alt gruplarının, NKD ile ilişkili olarak farklı genlerde meydana gelen mutasyonlarla değişiklik gösterdiği bildirilmiştir (Mace ve Orange 2016; Mahapatra ve ark. 2017). Ayrıca bu gen mutasyonları sahip olan vakalarda CD16 ekspresyonunun klonal farkına bağlı bilgi bulunmamaktadır. Bu tez çalışmasının vakalarında CD16 epitop kaybı tespit edilmiş olup NK hücre alt grupları açısından da literatürle uyumlu sonuçlar elde edilmiştir. Bütün NK hücre alt grupları değerlendirildiğinde, $CD56^{bright}CD16^{neg}$ grubu kontroller ile kıyaslandığında istatistiksel olarak bir fark olmadığı dikket çekmektedir ($p=0,931$). Bu hücrelerin

normal sınırlarının ne olduğuna dair literatürde de çok az bilgi olmasına rağmen Angelo ve ark. (2015) 40 sağlıklı birey ile yaptıkları çalışmada CD56^{bright}CD16^{neg} hücre grubunun NK hücrelerinin %6,9-8,56'sını oluşturduğu belirtilmiştir. Bu tez çalışmasının kontrol grubunda CD56^{bright}CD16^{neg} hücre oranı %2,04 olarak belirlenmiş olup çalışmadaki (Angelo ve ark. 2015) hücre oranına göre düşük olarak tespit edilmiştir. Angelo ve ark. (2015) çalışması yetişkin donörlerde gerçekleştirilmiş olup bu tez çalışması pediatrik grupta gerçekleştirildiğinden CD56^{bright}CD16^{neg} hücre düşüklüğü yaş grubunun farklı olması ile ilişkilendirilmiştir.

Ayrıca CD56^{bright} hücrelerin, CD56^{dim} NK hücrelerinin öncülleri olduğu kabul edilmektedir (Cooper ve ark. 2001; Bryceson ve ark. 2010). CD56^{bright} hücreler progenitor hücrelerde ifade edilen CD117'yi eksprese etmektedir. Ancak yaşlanmış hücrelerde eksprese edilen CD57'yi ifade etmemektedir. Bu da CD56^{bright} hücrelerin CD56^{dim} hücrelere öncülük ettiği ve daha fazla çoğalma kapasitesine sahip olduğunu açıklamaktadır (Brenchley ve ark. 2003; Matos ve ark. 1993; Romagnani ve ark. 2007). Bu tez çalışmasında CD56^{bright}CD16^{neg} popülasyonda hasta ile kontroller arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemesi NK hücre gelişiminin önemli basamağı olan CD56^{bright} aşamaya kadar gelişmesinde herhangi bir problem olmadığını göstermektedir.

CD56^{bright} NK hücreler güçlü sitokin salgılama yeteneğine sahip olup CD56^{dim} alt grubu ise doğal sitotoksiteden sorumlu olan NK hücreler olarak tanımlanmıştır (De Maria ve ark. 2011; Nielsen ve ark. 2012). Periferik kandan saflaştırılan CD56^{dim}CD16^{dim} hücrelerin CD56^{dim}CD16^{bright} hücrelerden fazla degranüle olduğu tespit edilmiştir (Amand ve ark. 2017). Bu çalışmada, hastalarda tespit edilen CD56^{dim} özellikle CD56^{dim}CD16^{hi} (ortalama değer hastalar: %1,3; kontroller: %3,2; p=0,002) hücre düşüklüğü literatür ile uyumlu bulunmuştur.

NK hücre fonksiyonları, NK hücre sitotoksitesite analizi ile değerlendirilmiş olup hastalardaki sitotoksitesite kontroller ile karşılaştırıldığında düşük/negatif tespit edilmiştir. NK hücre sitotoksitesitesi, hedef hücre olarak MHC Sınıf I ekspresyonundan yoksun K562 lösemik hücreler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. NK sitotoksitesite analizinde ⁵¹Cr salınım analizi, CD107a ekspresyonu temeline bağlı ve K562 hedef hücre lizisine dayalı yöntemler bulunmaktadır (Deniz ve Demirel 2014). ⁵¹Cr salınım analizinde NK hücre sitotoksitesite analizinde hedef hücre olarak

K562 hücreler radyoaktif ^{51}Cr ile inkübasyon sonrası ^{51}Cr salınımının tespiti ile belirlenmektedir (Whiteside ve ark. 1990; Motzer ve 2003). Bu yöntem NK hücre sitotoksitesinin belirlenmesinde kullanılan altın standart yöntem olarak düşünülmüştür. Ancak teknik olarak radyoaktif izotoplar kullanılması nedeniyle yerini alternatif yöntemlere bırakmaktadır (Somanchi ve ark. 2015). Bundan dolayı bu çalışmada K562 hedef hücrelerin ölüm oranlarının değerlendirilmesiyle sitotoksite analizi gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemde 4 farklı konsantrasyonda NK hücreleri kullanılmıştır. Tüpün birine sadece hedef hücre konulmuş (E:H4) diğerlerine de hedef hücre ile birlikte efektör hücre (NK) ilave edilip ve K562 hedef hücre ölümüne bağlı değerlendirme yapılmıştır. Bulgular neticesinde, sitotoksitenin değerlendirilmesinde yalnızca kontrol ve bir NK hücre-hedef hücre oranının kullanılmasının NK hücre sitotoksitesinin değerlendirmesinde yeterli olacağı kanısına varılmıştır. Kontrol ile farklı konsantrasyonda NK hücrelerini içeren tüpler karşılaştırılması sonucunda bütün tüplerdeki değişimin istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir (E:H4/E:H3 $p=0,011$; E:H4/E:H2 $p<0,011$; E:H3/E:H2 $p=0,098$). Bundan dolayı bu yöntem ile sitotoksite değerlendirilmesinde tek konsantrasyonda (E:H4 ile E:H3 veya E:H4 ile E:H2) NK hücrelerinin kullanılması ile değerlendirme yapılabileceği tespit edilmiştir. Böylece teknik olarak zor ve maliyetli olan bu testin nispeten kolaylaştırılmış olabileceği kanısına varılmıştır.

NK hücre sitotoksitesinden sorumlu NK hücre alt grubunun CD56^{dim} grup olduğu literatürde belirtilmesine rağmen (De Maria ve ark. 2011; Nielsen ve ark. 2012) tespit edilen farklı kapılama yöntemleri ile tespit edilen NK alt gruplarından hangisinin daha etkili olduğuna dair henüz veri bulunmamaktadır. Bundan dolayı NK alt grupları ve NK hücre sitotoksitesi arasında korelasyon analizi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler değerlendirildiğinde $\text{CD56}^{\text{bright}}\text{CD16}^{\text{neg}}$ NK alt grubu ile NK hücre sitotoksitesi arasında negatif, $\text{CD56}^{\text{bright}}\text{CD16}^{\text{int}}$ ve $\text{CD56}^{\text{dim}}\text{CD16}^{\text{hi}}$ NK alt grubu ile NK hücre sitotoksitesi arasında ise pozitif korelasyon tespit edilmiştir. $\text{CD56}^{\text{bright}}\text{CD16}^{\text{neg}}$ NK hücre alt grubu ile NK hücre sitotoksitesi arasındaki negatif korelasyon (korelasyon katsayısı E:H3 için; $r: -0,306$ $p: 0,233$ ve E:H2 için; $r: -0,191$ $p: 0,463$) tespit edilmiş olup bu korelasyon istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Hastaların $\text{CD56}^{\text{bright}}\text{CD16}^{\text{neg}}$ hücre grubu arasında anlamlı bir fark tespit edilmemesi bu korelasyonu desteklemektedir.

CD56^{bright}CD16^{int} ile CD56^{dim}CD16^{hi} NK hücre alt grubu ile NK hücre sitotoksitesisi arasında pozitif korelasyon (korelasyon katsayısı sırasıyla; r: 0,493 p:0,044; r: 0,546 p:0,018) tespit edilmiştir. Bu korelasyon hasta CD56^{bright}CD16^{int} ve CD56^{dim}CD16^{hi} hücre sayıları ile kıyasladığında sonuçlar birbirini desteklemektedir. Çünkü hastalarda CD56^{bright}CD16^{int} hücre sayısı ortalama %3,7 iken kontrollerde %22,5, CD56^{dim}CD16^{hi} hücre sayıları (%1,3) kontrol hücre sayılarından (%3,2) anlamlı derecede düşük olarak tespit edilmiştir (p değerleri sırasıyla ve p=0,002 ve p<0,001). Dolayısıyla bu bulgu, CD56^{bright}CD16^{int} ile CD56^{dim}CD16^{hi} NK hücre alt hücre gruplarının NK hücre sitotoksitesinden sorumlu olduğunu düşündürmektedir.

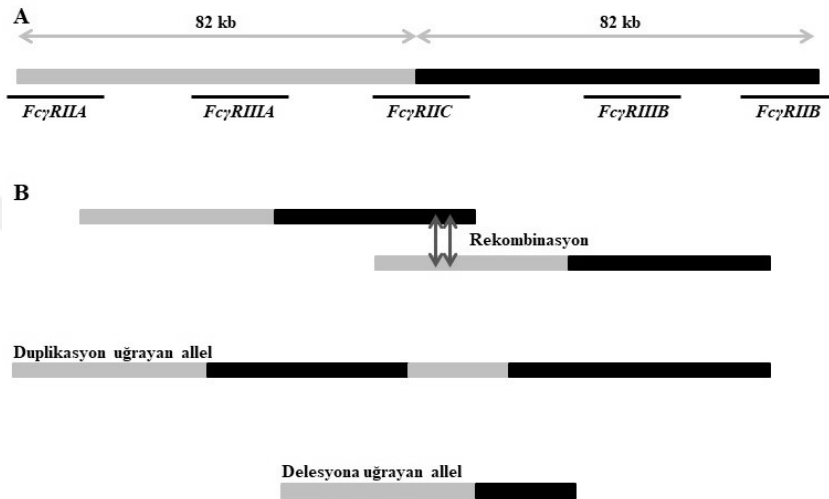
Korelasyon analizi sonuçları NK hücre sitotoksitesinin gerçekleşmesinde CD16 molekülünün önemli rol oynadığını göstermektedir. Çünkü CD56^{dim} ekspresyonu ile birlikte CD16 eksprese etmeyen hücre grubunun sitotoksiteyi negatif yönde etkilediği, CD16'yı eksprese eden hücre grubunun ise sitotoksiteyi pozitif yönde etkilediği ve dolayısıyla NK hücre sitotoksitesinde önemli bir rol oynadığı anlaşılmıştır. Nitekim CD56^{bright}CD16^{neg} NK hücre alt grubunun sitotoksiteyi negatif etkilediği gösterilmiştir. NK alt grubu ile NK hücre sitotoksitesisi arasındaki korelasyon analizi neticesinde daha fazla sayıda hasta ile gerçekleştirilecek çalışma ile CD56^{bright}CD16^{int} ile CD56^{dim}CD16^{hi} NK alt grubunun değerlendirilmesi sonucunda, NK hücre sitotoksite yeteneklerinin NK hücre sitotoksite analizine gerek kalmadan yorumlanabileceği düşünülmektedir.

FcγRIIIA tüm gen analizi neticesinde ekzon 4'de (rs396991; g.161514542 A>C; p.F176V) polimorfik değişiklikler tespit edilmiştir. *FcγRIIIA* genindeki A>C; p.F176V transversiyonu sonucunda homozigot valin (V/V) veya heterozigot (V/F) valin varlığının, homozigot fenilalanin (F/F) genotipine kıyasla, NK hücrelerinin IgG1 veya IgG3 antikoruna bağlanma afinitesini arttırdığı gösterilmiştir. Bu durum, NK hücre aracılı ADCC'yi etkilemektedir. Bu bölgenin aşırı polimorfizm gösterdiği farklı popülasyonların, farklı genotiplere olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir (Chu ve ark. 2004; Wu ve ark. 1997; Dai ve ark. 2013). Ancak, Türkiye popülasyonu ile ilgili literatürde herhangi bir veri bulunmamaktadır (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs396991#frequency_tab; Mahaweni ve ark. 2018). Farklı popülasyonlarda bu bölgedeki polimorfizmin (rs396991; g.161514542 A>C; p.F176V, sistemik lupus eritematozus (SLE), non-Hodgkin lymphoma, HER-

2/neu pozitif meme kanseri, metastatik kolorektal kanser gibi malignite tedavilerinde kullanılan spesifik mAb ilaçlara (örn. rituximab, cetuximab ve trastuzumab) farklı yanıtlara neden olduğu gösterilmiştir (Weng ve ark. 2003; Kim ve ark. 2006; Nishio ve ark. 2009; Whirl-Carrillo ve ark. 2012; Dai ve ark. 2013; Mahaweni ve ark. 2018). Çin polülasyonunda 732 SLE hastası ile 886 kontrol içeren bir çalışmada (Dai ve ark. 2013), SLE hastaları ve kontrol hastalarında farklı genotipler tespit edilmiştir. SLE hastalarında farklı genotiplerin farklı klinik presentasyonla ortaya çıktığı gösterilmiştir. Kontrol hastalarında da genotiplerin farklılık göstermesi *FcyRIIIA* geninin bu bölgenin polimorfik olduğunu göstermektedir (Dai ve ark. 2013). Bu bölge için AA, AC genotipinde olan meme kanseri hastalar ile CC genotipinde olan hastalar karşılaştırıldığında, AA ve AC genotipine sahip olan hastalarda trastuzumab yanıtlarının azaldığı ve progresyonsuz hayatta kalma sürelerinin kısaldığı gösterilmiştir (Musolino ve ark. 2008; Tamura ve ark. 2011). Benzer şekilde AA genotipli rituksimab ile tedavi edilen lenfoma hastalarında AC veya CC genotipli hastalara göre tümör küçülme olasılığı daha düşük, AC ve CC genotipli lenfoma hastalarının AA genotipli hastalara göre tümör küçülme olasılığının daha yüksek olabileceği gösterilmiştir (Weng ve 2003; Kim ve ark. 2006; Nishio ve ark. 2009). Bu bölge transplant hastalarında da araştırılmış olup ilginç bir şekilde, miyeloid maligniteler için kemik iliği nakli üzerine yapılan bir araştırma, alıcılarda bu bölge polimorfizminin nakil sonuçlarını öngörebileceğini ve alıcılardaki CC genotipinin varlığının akut ve kronik graft-versus-host hastalığı riskinde belirgin bir şekilde azalmaya işaret edebileceğini göstermiştir (Takami ve ark. 2011). Ayrıca, AA veya AC genotipli hastaların karaciğer nakli sonrası artmış enfeksiyon insidansına sahip olduğu bildirilmiştir (Shimizu ve ark. 2016). Her ne kadar AA genotipinin tedavi yanıtı ve hastalığın olaysız sağkalımı üzerine etkisi olsa da, ADCC'yi inceleyen bir çalışmada, en az bir valin kopyasının iyileşmiş klinik sonucu açıklayabileceğini ileri sürmektedir. Bununla ilgili moleküler mekanizmalar halen tam olarak açık olmasa da heterozigot bireylerin daha iyi kliniğe sahip olabileceği düşünülmektedir (Hatjiharissi ve ark. 2012). Literatürde de gösterildiği gibi farklı popülasyonların farklı genotipe sahip olduğu bildirilmekle birlikte Türkiye popülasyonu ile yapılmış bir çalışma henüz bulunmamaktadır. Bu çalışma sınırlı sayıda hasta ve kontrol ile gerçekleştirilse de ekzon 4 için ilk çalışma özelliği göstermektedir. Belirlenen CC genotipinin literatürden elde edilen veriler ışığında farklı mAb tedavilerine karşı

daha iyi yanıtlar verebileceğini ve olası kanser durumunda progresyonunun daha iyi olabileceğini ön bilgi olarak göstermektedir.

FcγRIIIA geni tüm gen analizi sonucunda ekzon 2 ile ekzon 1 arasındaki intron bölgesi ile ekzon 1'i içeren bölgenin aşırı polimorfik olduğu dikkat çekmiştir. *FcγRIIIA* ile *FcγRIIIB* geni arasındaki yüksek ortolojiden dolayı *FcγRIIIB*'nin de yükseltgenmiş olabileceği düşünülmüş ancak yapılan biyoinformatik analizler neticesinde *FcγRIIIB* geni olmadığı gösterilmiştir (Şekil 32). Amplifiye olan bölge incelendiğinde *FcγRIIIA* ve *FcγRIIIB* genine benzediği ve kimerik bir gen, lokus ya da haplotip olabileceği düşünülmüştür. İnsanlarda *FcγRIIIA*, *FcγRIIIB*, *FcγRIIA*, *FcγRIIB* ve *FcγRIIC* tarafından kodlanan beş düşük afiniteli reseptör bulunmaktadır (Rahbari ve ark. 2017). Bu beş genin tamamı, 1q23.3 kromozomu üzerinde 82.5 kb tandem olarak düzenlenmiştir (Şekil 33A: *FcγR* genleri, Şekil 33B: Homolog rekombinasyon olayı, duplike ve delesyon olan allel).



Şekil 33. *FcγR* bölgesinin yapısı.

Bu genlerde tespit edilen artmış polimorfizmler *FcγRIIIA*, *FcγRIIIB* ve *FcγRIIC* genlerini içeren artmış kopya sayısındaki değişiklikler (CNV) sonucu meydana gelmektedir (Machado ve ark. 2012; Mueller ve ark. 2012). Bu genlerdeki varyasyonların derecesi bu bölgenin genomik yapısının analiz edilmesini zorlaştırmaktadır. Genel olarak kopya sayısı değişiminin, *FcγRIIIA* ve *FcγRIIC*'nin birlikte veya *FcγRIIIB* ve *FcγRIIC*'nin birlikte silinmesi veya çoğalması sonucu, 82.5 kb'lık tam segmental bölgenin kopyalarının bir sonucu olduğu kabul edilmektedir (Hollox 2009). *FcγR* delesyon ve duplikasyon oluşum mekanizmalarında *FcγRIIIA*

ve *FcγRIIB* genindeki kırılma noktalarının aracılık ettiği non-homolog rekombinasyonun (NAHR) rol oynadığı gösterilmiştir (Machado ve ark. 2012; Nagelkerke 2015). Delesyonlarda ve duplikasyonlarda rol oynayan CNR1 ve CNR3 olarak isimlendirilen kırılma noktaları belirlenmiştir. Belirlenen kırılma noktalarının konumları hala tam olarak belli değildir. Her bir kırılma noktasının kesin lokalizasyonu belirlemek genellikle mümkün olmamakla birlikte, birden fazla kişiden kozmid klonlarının analizi, tam bir paralog sekans varyant olmadığını göstermektedir (Mueller ve ark. 2012; Rahbari ve ark. 2017). Bu bilgiler ışığında belirlenen bu genomik bölgenin CNV sonucu oluşmuş kimerik bir bölge olabileceği düşünülmektedir.

Bu tez çalışmasında, klinik ve laboratuvar bulguları ile FNKD düşünülen hastalar ileri fonksiyonel ve genetik analizler ile değerlendirilmiştir. NK hücre düşüklüğü diğer PİY'lerden ve malignite durumlarında da düşük seyredebilmektedir. İzole NKD tanısında NK hücre sitotoksosite analizinin önemli bir yeri bulunmaktadır. NK hücre sitotoksosite analizi uygulaması güç olan bir analiz olup Türkiye'de az sayıda merkez tarafından değerlendirilmektedir. Bu analiz için NK hücrelerin hassaslığından dolayı NK hücre sitotoksitesini için kan örneğinin başka merkeze gönderilmesi testin doğruluğunu etkilemektedir. Bundan dolayı hastanın başvurduğu merkezde bu testin yapılması önem arz etmektedir. Çalışma ile NK hücre sitotoksosite analizi Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi'nde yapılabilir hale gelmiştir. Ayrıca *FcγRIIA* gen dizi analizi ile ilgili literatürde az veri bulunmakla birlikte Türkiye popülasyonu ile yapılmış henüz bir çalışma bulunmamaktadır. Tez projesi kapsamında ancak sınırlı sayıda hasta ve kontrol örneğinin *FcγRIIA* gen dizi analizi gerçekleştirilmiş olmasına rağmen, sonuç olarak, NK hücrelerin fizyolojik öneminden dolayı bu hastalık grubunun tanı alması hastalığın seyri, genetik tanı ve malignite açısından önem arz etmektedir.

5.1. Öneriler

- Çalışma bulgularının daha uzun süre hasta izlemleri ile daha fazla hasta ve kontrol ile desteklenmesi,
- NK hücre alt grup ile periferik lenfosit alt grup analizleri belli periyotlarda takip edilerek düşük yada yüksek hücre alt gruplarının tekrar değerlendirilmesi,

- NK hücre sitotoksitesinin moleküler temelini tam açık olmadığından konu ile ilgili daha detaylı moleküler çalışmaların gerçekleştirilmesi,
- NK hücre sitotoksitesinin negatif olduğu durumlarda NK hücrelerde bulunan pozitif ve negatif yönde sinyaller sağlayan reseptörlerin ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi,
- ADCC analizinin gerçekleştirilmesi,
- mAb tedavisi alan hastalarda *FcγRIIIA* geni ekzon 4’de mutasyonlarının tespiti,
- *FcγRIIIA* genin ekzon 3’de tespit edilen ve B73.1 klonu ile epitop kaybına sebep olan mutasyonun heterozigot ve homozigot durumda da olması, bu olaya literatürde de belirtildiği üzere başka gen mutasyonlarının sebep olduğu açıkça görünmektedir. Bununla ilgili daha detaylı genomik çalışmalar (tüm ekzom analizi) gerçekleştirilmesi ve,
- *FcγRIIIA* geni tüm gen analizi sırasında tespit edilen olası kimerik bölgenin genomik karakterizasyonu ve fonksiyonel bir özelliğinin tanımlanmasına yönelik çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.
- Yapılan çalışma Türkiye popülasyonunda gerçekleştirilen ilk çalışma olup bundan sonra konu ile ilgili yapılacak diğer çalışmalara ışık tutması beklenmektedir.

6. KAYNAKLAR

- Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and Molecular Immunology. Elsevier/Saunders, 7th Edition, Philadelphia, USA, 2012, p: 55-88.
- Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and Molecular Immunology., Elsevier/Saunders, 7th Edition, America, 2012, p:55-8.
- Adams NM, O’Sullivan TE, Geary CD, Karo JM, Amezcua RA, Joshi NS, Kacch SM, Sun JC. NK cell responses redefine immunological memory. J Immunol. 2016;197(8):2963–70.
- Adessi C, Matton G, Ayala G, Turcatti G, Mermod JJ, Mayer P, Kawashima E. Solid phase DNA amplification: characterisation of primer attachment and amplification mechanisms. Nucleic Acids Res. 2000;28(20):E87.
- Adkinson NF. Middleton’s Allergy Principles ve Practice. 8th Edition, China, 2013, p:20-9.
- Aktaş E, Küçüksezer UC, Bilgiç S, Erten G, Deniz G. Relationship between CD107a expression and cytotoxic activity. Cell Immunol. 2009;254(2):149–54
- Alter G, Malenfant JM, Altfeld M. CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. J Immunol Methods. 2004;294(12):15-22.
- Amand M, Iserentant G, Poli A, Sleiman M, Fievez V, Sanchez IP, Sauvageot N, Michel T, Aouali N, Janji B, Trujillo-Vargas CM, Seguin-Devaux C, Zimmer J. Human CD56dimCD16dim cells as an individualized natural Killer cell subset. Front Immunol. 2017;19;8:699.

- Angelo LS, Banerjee PP, Monaco-Shawver L, Rosen JB, Makedonas G, Forbes LR, Mace EM, Orange JS. Practical NK cell phenotyping and variability in healthy adults. *Immunol Res.* 2015;62(3):341–56.
- Arck PC, Hecher K. Fetomaternal immune cross-talk and its consequences for maternal and offspring's health. *Nat Med.* 2013;19(5):548–56.
- Beresford PJ, Xia Z, Greenberg AH, Lieberman J. Granzyme A loading induces rapid cytolysis and a novel form of DNA damage independently of caspase activation. *Immunity.* 1999;10(5):585–94.
- Biron CA, Byron KS, Sullivan JL. Severe herpesvirus infections in an adolescent without natural killer cells. *N Engl J Med.* 1989;320(26):1731–5.
- Biron CA, Nguyen KB, Pien GC, Cousens LP, Salazar-Mather TP. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu Rev Immunol.* 1999;17:189–220.
- Blom B, Spits H. Development of human lymphoid cells. *Annu Rev Immunol.* 2006;24:287–320.
- Bochman ML, Schwacha A. The Mcm complex: unwinding the mechanism of a replicative helicase. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2009(4);73:652–83.
- Brenchley JM, Karandikar NJ, Betts MR, Ambrozak DR, Hill BJ, Crotty LE, Casazza JP, Kuruppu J, Migueles SA, Connors M, Roederer M, Douek DC, Koup RA. Expression of CD57 defines replicative senescence and antigen-induced apoptotic death of CD8⁺ T cells. *Blood.* 2003;101(7):2711–20.
- Brunner KT, Mauel J, Cerottini JC, Chapuis B. Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on 51-Cr-labelled allogeneic target cells in vitro; inhibition by isoantibody and by drugs. *Immunology.* 1968;14(2):181–96.
- Bryceson YT, Fauriat C, Nunes JM, Wood SM, Björkström NK, Long EO, Ljunggren HG. Functional analysis of human NK cells by flow cytometry. *Methods Mol Biol.* 2010;612: 335–52.
- Caligiuri MA. Human natural killer cells. *Blood.* 2008;112(3):461–9.
- Camcıoğlu Y, Deniz G. Temel İmmünoloji: İmmün sistemin Fonksiyonları ve Bozuklukları. İstanbul Tıp Kitabevi, 1st Baskı, İstanbul, Türkiye, 2007; p:3-10.
- Carrillo-Bustamante P, Kesmir C, J. de Boer R. The evolution of natural killer cell receptors. *Immunogenetics.* 2016; 68(1):3–18
- Cederbrant K, Marcusson-Ståhl M, Condevaux F, Descotes J. NK-cell activity in immunotoxicity drug evaluation. *Toxicology.* 2003;185(3):241–50.
- Cerwenka A, Lanier LL. Natural killer cell memory in infection, inflammation and cancer. *Nat Rev Immunol.* 2016;16(2):112–23.
- Chowdhury D, Lieberman J. Death by a thousand cuts: granzyme pathways of programmed cell death. *Annu Rev Immunol.* 2008;26:389–420.
- Chu ZT, Tsuchiya N, Kyogoku C, Ohashi J, Qian YP, Xu SB, Mao CZ, Chu JY, Tokunaga K. Association of Fcγ receptor IIb polymorphism with susceptibility to systemic lupus erythematosus in Chinese: a common susceptibility gene in the Asian populations. *Tissue Antigens.* 2004;63(1):21–7.
- Collin M, Dickinson R, Bigley V. Haematopoietic and immune defects associated with GATA2 mutation. *Br J Haematol.* 2015;169(2):173–87.
- Colucci F, Caligiuri MA, Di Santo JP. What does it take to make a natural killer? *Nat Rev Immunol.* 2003;3(5):413–25.
- Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol.* 2001;22(11):633–40.
- Cooper MA, Fehniger TA, Turner SC, Chen KS, Ghaheri BA, Ghayur T, Carson WE, Caligiuri MA. Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset. *Blood.* 2001;97(10):3146–51.
- Cosan F, Aktas Cetin E, Akdeniz N, Emrence Z, Cefle A, Deniz G. Natural killer cell subsets and their functional activity in Behçet's disease. *Immunol Invest.* 2017;46(4):419–32.

- Culley FJ. Natural killer cells in infection and inflammation of the lung. *Immunology*. 2009 Oct;128(2):151-63.
- Dai M, Zhou Z, Wang X, Qian X, Huang X. Association of FcγRIIIa-158V/F with systemic lupus erythematosus in a Chinese population. *Int J Rheum Dis*. 2013;16:685-91.
- De Colvenaer V, Taveirne S, Delforche M, De Smedt M, Vandekerckhove B, Taghon T, Boon L, Plum J, Leclercq G. CD27-deficient mice show normal NK cell differentiation but impaired function upon stimulation. *Immunol Cell Biol*. 2011;89(7):803–11.
- De Maria A, Bozzano F, Cantoni C, Moretta L. Revisiting human natural killer cell subset function revealed cytolytic CD56(dim)CD16+ NK cells as rapid producers of abundant IFN-gamma on activation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011;108(2):728–32.
- de Vries E, Koene HR, Vossen JM, Gratama JW, von dem Borne AE, Waaijer JL, Haraldsson A, de Haas M, van Tol MJ. Identification of an unusual Fcγ receptor IIIa (CD16) on natural killer cells in a patient with recurrent infections. *Blood*. 1996;88(8):3022-7.
- Deniz G, Demirel GY. Akan Hücre Ölçer. Yelken Ajans Reklamcılık, İstanbul, 2014.
- Dobbs K, Tabellini G, Calzoni E, Patrizi O, Martinez P, Giliani SC, Moratto D, Al-Herz W, Cancrini C, Cowan M, Blesing J, Booth C, Buchbinder D, Burns SO, Chatila TA, Chou J, Daza-Cajigal V, Ott de Bruin LM, de la Morena M, Di Matteo G, Finocchi A, Geha R, Goyal RK, Hayward A, Holland S, Huang CH, Kanariou MG, King A, Kaplan B, Kleva A, Kuijpers TW, Lee BW, Lougaris V, Massaad M, Meyts I, Morsheimer M, Neven B, Pai SY, Parvaneh N, Plebani A, Prockop S, Reisli I, Soh JY, Somech R, Torgerson TR, Kim YJ, Walter JE, Gennery AR, Keles S, Manis JP, Marcenaro E, Moretta A, Parolini S, Notarangelo LD. Natural killer cells from patients with recombinase-activating gene and non-homologous end joining gene defects comprise a higher frequency of CD56bright NKG2A+++ cells, and yet display increased degranulation and higher perforin content. *Front Immunol*. 2017;17(8):798.
- Dressman D, Yan H, Traverso G, Kinzler KW, Vogelstein B. Transforming single DNA molecules into fluorescent magnetic particles for detection and enumeration of genetic variations. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 2003;100 (15):8817–22.
- Etzioni A, Eidenschenk C, Katz R, Beck R, Casanova JL, Pollack S. Fatal varicella associated with selective natural killer cell deficiency. *J Pediatr*. 2005;146(3):423–5.
- Fan Z, Beresford PJ, Zhang D, Xu Z, Novina CD, Yoshida A, Pommier Y, Lieberman J. Cleaving the oxidative repair protein Ape1 enhances cell death mediated by granzyme A. *Nat Immunol*. 2003;4(2):145–53.
- Fedurco M, Romieu A, Williams S, Lawrence I, Turcatti G. BTA, a novel reagent for DNA attachment on glass and efficient generation of solid-phase amplified DNA colonies. *Nucleic Acids Res*. 2006;34(3):e22.
- Freud AG, Caligiuri MA. Human natural killer cell development. *Immunol Rev*. 2006;214:56–72.
- Freud AG, Yokohama A, Becknell B, Lee MT, Mao HC, Ferketich AK, Caligiuri MA. Evidence for discrete stages of human natural killer cell differentiation in vivo. *J Exp Med*. 2006;203(4):1033–43.
- Fu B, Wang F, Sun R, Ling B, Tian Z, Wei H. CD11b and CD27 reflect distinct population and functional specialization in human natural killer cells. *Immunology*. 2011;133(3):350–9.
- Fu B, Tian Z, Wei H. Subsets of human natural killer cells and their regulatory effects. *Immunology*. 2014;141(4):483-9.
- Garcia-Lora A, Algarra I, Garrido F. MHC class I antigens, immune surveillance, and tumor immune escape. *J Cell Physiol*. 2003;195(3):346–55.
- Grier JT, Forbes LR, Monaco-Shawver L, Oshinsky J, Atkinson TP, Moody C, Pandey R, Campbell KS, Orange JS. Human immunodeficiency-causing mutation defines CD16 in spontaneous NK cell cytotoxicity. *J Clin Invest*. 2012;122(10):3769-80.
- Hatjiharissi E, Xu L, Santos DD, Hunter ZR, Ciccarelli BT, Verselis S, Modica M, Cao Y, Manning RJ, Leleu X, Dimmock EA, Kortsaris A, Mitsiades C, Anderson KC, Fox EA, Treon SP. Increased natural killer cell expression of CD16, augmented binding and ADCC activity to rituximab among

- individuals expressing the Fc γ RIIIa-158 V/V and V/F polymorphism. *Blood* J. 2012;110(7):2561–4.
- Hayakawa Y, Smyth MJ. CD27 dissects mature NK cells into two subsets with distinct responsiveness and migratory capacity. *J Immunol*. 2006;176(3):1517–24.
- He XS, Draghi M, Mahmood K, Holmes TH, Kemble GW, Dekker CL, Arvin AM, Parham P, Greenberg HB. T cell-dependent production of IFN- γ by NK cells in response to influenza A virus. *J Clin Invest*. 2004;114(12):1812–9.
- Hewitt EW. The MHC class I antigen presentation pathway: strategies for viral immune evasion. *Immunology*. 2003;110(2):163–9.
- Hollox EJ, Detering JC, Dehnugara T. An integrated approach for measuring copy number variation at the FCGR3 (CD16) locus. *Hum Mutat*. 2009;30:477–84.
- <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>.
- <https://genome.ucsc.edu>.
- <https://www.ensembl.org>.
- <http://www.info4pi.org/hq>
- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
- https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs396991#frequency_tab.
- <https://www.virtualmedicalcenter.com>.
- Hughes CR, Guasti L, Meimaridou E, Chuang CH, Schimenti JC, King PJ, Costigan C, Clark AJ, Metherell LA. MCM4 mutation causes adrenal failure, short stature, and natural killer cell deficiency in humans. *J Clin Invest*. 2012;122(3):814–20.
- Ikawa T, Kawamoto H, Fujimoto S, Katsura Y. Commitment of common T/ natural killer (NK) progenitors to unipotent T and NK progenitors in the murine fetal thymus revealed by a single progenitor assay. *J Exp Med*. 1999;190(11):1617–26.
- Jawahar S, Moody C, Chan M, Finberg R, Geha R, Chatila T. Natural killer (NK) cell deficiency associated with an epitope-deficient Fc receptor type IIIA (CD16-II). *Clin Exp Immunol*. 1996;103(3):408–13.
- Jin J, Fu B, Mei X, Yue T, Sun R, Tian Z, Wei H. CD11b-CD27- NK cells are associated with the progression of lung carcinoma. *PLoS One*. 2013;8:e61024.
- Kelly JM, Waterhouse NJ, Cretney E, Browne KA, Ellis S, Trapani JA, Smyth MJ. Granzyme M mediates a novel form of perforin-dependent cell death. *J Biol Chem*. 2004; 279(21):22236–42.
- Kim DH, Jung HD, Kim JG, Lee JJ, Yang DH, Park YH, Do YR, Shin HJ, Kim MK, Hyun MS, Sohn SK. FCGR3A gene polymorphisms may correlate with response to frontline R-CHOP therapy for diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 2006;108(8):2720-5.
- Kim S, Iizuka K, Kang HS, Dokun A, French AR, Greco S, Yokoyama WM. In vivo developmental stages in murine natural killer cell maturation. *Nat Immunol*. 2002;3(6):523–8.
- Kinder M, Greenplate AR, Strohl WR, Jordan RE, Brezski RJ. An Fc engineering approach that modulates antibody-dependent cytokine release without altering cell-killing functions. *MAbs*. 2015; 7(3):494–504.
- Koeffler H, Golde D. Human myeloid leukemia cell lines: a review. *Blood*. 1980;56(3):344-50.
- Komiyama A, Kawai H, Yabuhara A, Mitsuhiro Y, Miyagawa Y, Ota M, Hasekura H, Akabane T. Natural killer cell immunodeficiency in siblings: defective killing in the absence of natural killer cytotoxic factor activity in natural killer and lymphokine activated killer cytotoxicities. *Pediatrics*. 1990;85(3):323-30.
- Kos FJ, Engleman EG. Role of natural killer cells in the generation of Influenza virus-specific cytotoxic T cells. *Cell Immunol*. 1996;173(1):1–6.
- Krzewski K, Strominger JL. The killer's kiss: the many functions of NK cell immunological synapses. *Curr Opin Cell Biol*. 2008;20(5):597-605.

- Lanier LL, Chang C, Phillips JH. Human NKR-P1A. A disulfide-linked homodimer of the C-type lectin superfamily expressed by a subset of NK and T lymphocytes. *J Immunol.* 1994;153(6):2417–28.
- Lanier LL, Le AM, Phillips JH, Warner NL, Babcock GF. Subpopulations of human natural- killer cells defined by expression of the Leu-7 (Hnk-1) and Leu-11 (Nk-15) antigens. *J Immunol.* 1983; 131(4):1789–96.
- Lanier LL, Phillips JH, Hackett J JR, Tutt M, Kumar V. Natural killer cells: definition of a cell type rather than a function. *J Immunol.* 1986;137(9):2735-9.
- Lanier LL, Yu G, Phillips JH. Analysis of Fc gamma RIII (CD16) membrane expression and association with CD3 zeta and Fc epsilon RI-gamma by site-directed mutation. *J Immunol.* 1991;146(5):1571–6.
- Lanier LL. NK cell recognition. *Annu Rev Immunol.* 2005;23:225–74.
- Lenart M, Trzyna E, Rutkowska M, Bukowska-Strakova K, Szaflarska A, Pituch-Noworolska A, Szczepanik A, Zembala M, Siedlar M. The loss of the CD16 B73.1/Leu11c epitope occurring in some primary immunodeficiency diseases is not associated with the FcgammaRIIIa-48L/R/H polymorphism. *Int J Mol Med.* 2010;26(3):435-42.
- Lettau M, Schmidt H, Kabelitz D, Janssen O. Secretory lysosomes and their cargo in T and NK cells. *Immunol Lett.* 2007;108(1):10–9.
- Lieberman J. The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nat Rev Immunol.* 2003;3(1):361–70.
- Loza MJ, Zamai L, Azzoni L, Rosati E, Perussia B. Expression of type 1 (interferon gamma) and type 2 (interleukin-13, interleukin-5) cytokines at distinct stages of natural killer cell differentiation from progenitor cells. *Blood.* 2002;99(4):1273-81.
- Luetke-Eversloh M, Killig M, Romagnani C. Signatures of human NK cell development and terminal differentiation. *Front Immunol.* 2013;4:499.
- Luevano M, Madrigal A, Saudemont A. Generation of natural killer cells from hematopoietic stem cells in vitro for immunotherapy. *Cell Mol Immunol.* 2012;9(4):310–20.
- Mace EM, Bigley V, Gunesch JT, Chinn IK, Angelo LS, Care MA, Maisuria S, Keller MD, Togi S, Watkin LB, LaRosa DF, Jhangiani SN, Muzny DM, Stray-Pedersen A, Coban Akdemir Z, Smith JB, Hernández-Sanabria M, Le DT, Hogg GD, Cao TN, Freud AG, Szymanski EP, Savic S, Collin M, Cant AJ, Gibbs RA, Holland SM, Caligiuri MA, Ozato K, Paust S, Doody GM, Lupski JR, Orange JS. Biallelic mutations in IRF8 cause human NK cell deficiency. 17th Biennial Meeting of the European Society for Immunodeficiencies. 2016, Barcelona, Spain.
- Mace EM, Bigley V, Gunesch JT, Chinn IK, Angelo LS, Care MA, Maisuria S, Keller MD, Togi S, Watkin LB, LaRosa DF, Jhangiani SN, Muzny DM, Stray-Pedersen A, Coban Akdemir Z, Smith JB, Hernández-Sanabria M, Le DT, Hogg GD, Cao TN, Freud AG, Szymanski EP, Savic S, Collin M, Cant AJ, Gibbs RA, Holland SM, Caligiuri MA, Ozato K, Paust S, Doody GM, Lupski JR, Orange JS. Biallelic mutations in IRF8 impair human NK cell maturation and function. *J Clin Invest.* 2017;127(1):306-20.
- Mace EM, Hsu AP, Monaco-Shawver L, Makedonas G, Rosen JB, Dropulic L, , Cohen JI, Frenkel EP, Bagwell JC, Sullivan JL, Biron CA, Spalding C, Zerbe CS, Uzel G, Holland SM, Orange JS. Mutations in GATA2 cause human NK cell deficiency with specific loss of the CD56(bright) subset. *Blood.* 2013;121(14):2669–77.
- Mace EM, Orange JS. Genetic Causes of human NK cell deficiency and their effect on NK cell subsets. *Front Immunol.* 2016;2;7:545.
- Mace EM, Hsu AP, Monaco-Shawver L, Makedonas G, Rosen JB, Dropulic L, Cohen JI, Frenkel EP, Bagwell JC, Sullivan JL, Biron CA, Spalding C, Zerbe CS, Uzel G, Holland SM, Orange JS. Mutations in GATA2 cause human NK cell deficiency with specific loss of the CD56(bright) subset. *Blood.* 2013;121(14):2669-77.
- Machado LR, Hardwick RJ, Bowdrey J, Bogle H, Knowles TJ, Sironi M, Hollox EJ. Evolutionary history of copy-number-variable locus for the low-affinity Fcγ receptor: mutation rate, autoimmune disease, and the legacy of Helminth infection. *Am J Hum Genet.* 2012;90(6):973–85.

- Mahapatra S, Mace EM, Minard CG, Forbes LR, Vargas-Hernandez A, Duryea TK, Makedonas G, Banerjee PP, Shearer WT, Orange JS. High-resolution phenotyping identifies NK cell subsets that distinguish healthy children from adults. *PLoS One*. 2017;12(8):e0181134.
- Mahaweni NM, Olieslagers TI, Rivas IO, Molenbroeck SJJ, Groeneweg M, Bos GMJ, Tilanus MGJ, Voorter CEM, Wieten L. A comprehensive overview of FCGR3A gene variability by full-length gene sequencing including the identification of V158F polymorphism. *Sci Rep*. 2018; 29;8(1):15983. doi: 10.1038/s41598-018-34258-1.
- Malhotra A, Shanker A. NK cells: immune cross-talk and therapeutic implications. *Immunotherapy*. 2011;3(10):1143–66.
- Mandelboim O, Lieberman N, Lev M, Paul L, Arnon TI, Bushkin Y, Davis DM, Strominger JL, Yewdell JW, Porgador A. Recognition of haemagglutinins on virus-infected cells by NKp46 activates lysis by human NK cells. *Nature*. 2001;409(6823):1055-60.
- Matos ME, Schnier GS, Beecher MS, Ashman LK, William DE, Caligiuri MA. Expression of a functional c-kit receptor on a subset of natural killer cells. *J Exp Med*. 1993;178(3): 1079–84.
- Michel T, Poli A, Cuapio A, Briquemont B, Iserentant G, Ollert M, Zimmer J. Human CD56bright NK cells: an update. *J Immunol*. 2016;196(7):2923–31.
- Miller JS, Alley KA, McGlave P. Differentiation of natural killer (NK) cells from human primitive marrow progenitors in a stroma-based long-term culture system: identification of a CD34+7+ NK progenitor. *Blood*. 1994;83(9):2594–601.
- Miller JS. The biology of natural killer cells in cancer, infection, and pregnancy. *Exp Hematol*. 2001;29(10):1157-68.
- Morandi F, Horenstein AL, Chillemi A, Quarona V, Chiesa S, Imperatori A, Zanellato S, Mortara L, Gattorno M, Pistoia V, Malavasi F. CD56brightCD16-NK cells produce adenosine through a CD38-mediated pathway and act as regulatory cells inhibiting autologous CD4+ T cell proliferation. *J Immunol*. 2015;195(3):965–72.
- Moretta A, Bottino C, Vitale M, Pende D, Cantoni C, Mingari MC, Biassoni R, Moretta L. Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol*. 2001;19:197-223.
- Moretta L, Biassoni R, Bottino C, Cantoni C, Pende D, Mingari MC, Moretta A. Human NK cells and their receptors. *Microbes Infect*. 2002;4(15):1539–44.
- Motzer SA, Tsuji J, Hertig V, Johnston SK, Scanlan J. Natural killer cell cytotoxicity: a methods analysis of 51chromium release versus flow cytometry. *Biol Res Nurs*. 2003;5(2):142-52.
- Mueller M, Barros P, Witherden AS, Roberts AL, Zhang Z, Schaschl H, Yu CY, Hurles ME, Schaffner C, Floto RA, Game L, Steinberg KM, Wilson RK, Graves TA, Eichler EE, Cook HT, Vyse TJ, Aitman TJ. Genomic pathology of SLE-associated copy-number variation at the FCGR2C/FCGR3B/FCGR2B locus. *Am J Hum Genet*. 2012;92(1):28–40.
- Musolino A, Naldi N, Bortesi B, Pezzuolo D, Capelletti M, Missale G, Laccabue D, Zerbinì A, Camisa R, Bisagni G, Neri TM, Ardizzoni A. Immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms and clinical efficacy of trastuzumab-based therapy in patients with HER-2/neu-positive metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*. 2008;26(11):1789-96.
- Nagelkerke SQ, Tacke CE, Breunis WB, Geissler J, Sins JW, Appelhof B, van den Berg TK, de Boer M, Kuijpers TW. Nonallelic homologous recombination of the FCGR2/3 locus results in copy number variation and novel chimeric FCGR2 genes with aberrant functional expression. *Genes Immun*. 2015;16:422–9.
- Narni-Mancinelli E, Ugolini S, Vivier E. Tuning the threshold of natural killer cell responses. *Curr Opin Immunol*. 2013; 25(1):53–8.
- Nielsen N, Ødum N, Ursø B, Lanier LL, Spee P. Cytotoxicity of CD56(bright) NK cells towards autologous activated CD4+ T cells is mediated through NKG2D, LFA-1 and TRAIL and dampened via CD94/NKG2A. *PLoS One*. 2012;7(2):e31959.
- Nimmerjahn F, Ravetch JV. Fc gamma receptors as regulators of immune responses. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(1):34–47.

- Nishio M, Endo T, Fujimoto K, Yamamoto S, Obara M, Yamaguchi K, Takeda Y, Goto H, Kasahara I, Sato N, Koike T. FCGR3A-158V/F polymorphism may correlate with the levels of immunoglobulin in patients with non-Hodgkin's lymphoma after rituximab treatment as an adjuvant to autologous stem cell transplantation. *Eur J Haematol*. 2009;82(2):143-7.
- O'Sullivan TE, Sun JC, Lanier LL. Natural killer cell memory. *Immunity*. 2015;43(4):634–45.
- Orange JS, Ballas ZK. Natural killer cells in human health and disease. *Clin Immunol*. 2006; 118(1):1-10.
- Orange JS. Human natural killer cell deficiencies and susceptibility to infection. *Microbes Infect*. 2002;4(15):1545–58.
- Orange JS. Unraveling human natural killer cell deficiency. *J Clin Invest*. 2012;122(3):798–801.
- Orange JS. Natural killer cell deficiency. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;132(3):515–25.
- Ornstein BW, Hill EB, Geurs TL, French AR. Natural killer cell functional defects in pediatric patients with severe and recurrent herpesvirus infections. *J Infect Dis*. 2013;207(3):458-68.
- Peng H, Jiang X, Chen Y, Sojka DK, Wei H, Gao X, Sun R, Yokoyama WM, Tian Z. Liver-resident NK cells confer adaptive immunity in skin-contact inflammation. *J Clin Invest*. 2013;123(4):1444–56.
- Pipkin ME, Lieberman J. Delivering the kiss of death: progress on understanding how perforin works. *Curr Opin Immunol*. 2007;19(3):301–8.
- Poli A, Michel T, Thérésine M, Andrès E, Hentges F, Zimmer J. CD56bright natural killer (NK) cells: an important NK cell subset. *Immunology*. 2009;126(4):458–65.
- Rahbari R, Zuccherato LW, Tischler G, Chihota B, Ozturk H, Saleem S, Tarazona-Santos E, Machado LR, Hollox EJ. Understanding the genomic structure of copy-number variation of the low-affinity Fcγ receptor region allows confirmation of the association of FCGR3B deletion with rheumatoid arthritis. *Hum Mutat*. 2017;38(4):390-9.
- Rich TT. *Clinical Immunology. Principles and Practice*. Elsevier British Library Cataloguing in Publication Data, 4th Edition, China, 2013, p:35-46.
- Risma KA, Frayer RW, Filipovich AH, Sumegi J. Aberrant maturation of mutant perforin underlies the clinical diversity of hemophagocytic lymphohistiocytosis. *J Clin Invest*. 2006;116(1):182-92.
- Rodrigues NP, Tipping AJ, Wang Z, Enver T. GATA-2 mediated regulation of normal hematopoietic stem/progenitor cell function, myelodysplasia and myeloid leukemia. *Int J Biochem Cell Biol*. 2012;44(3):457-60.
- Romagnani C, Juelke K, Falco M, Morandi B, D'Agostino A, Costa R, Ratto G, Forte G, Carrega P, Lui G, Conte R, Strowig T, Moretta A, Münz C, Thiel A, Moretta L, Ferlazzo G. CD56brightCD16- killer Iglike receptor- NK cells display longer telomeres and acquire features of CD56dim NK cells upon activation. *J. Immunol*. 2007;178(8):4947–55.
- Romagne F, Vivier E. Natural killer cell-based therapies. *F1000 Med Rep*. 2011;3:9.
- Ronaghi M, Karamohamed S, Pettersson B, Uhlen M, Nyren P. Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release. *Anal. Biochem*. 1996;242(1):84-9.
- Roychowdhury S, Blaser BW, Freud AG, Katz K, Bhatt D, Ferketich AK, Bergdall V, Kusewitt D, Baiocchi RA, Caligiuri MA. IL-15 but not IL-2 rapidly induces lethal xenogeneic graft-versus host disease. *Blood*. 2005;106(7):2433–5.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 1977;74(12):5463-7.
- Seidel UJ, Schlegel P, Lang P. Natural killer cell mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity in tumor immunotherapy with therapeutic antibodies. *Front Immunol*. 2013;27;4:76.
- Shabrish S, Gupta M, Madkaikar M. A modified NK cell degranulation assay applicable for routine evaluation of NK cell function. *J Immunol Res*. 2016;2016:3769590.
- Shi FD, Ljunggren HG, La Cava A, Van Kaer L. Organ-specific features of natural killer cells. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(10):658–71.

- Shimizu S, Tanaka Y, Tazawa H, Verma S, Onoe T, Ishiyama K, Ohira M, Ide K, Ohdan H. Fc- γ receptor polymorphisms predispose patients to infectious complications after liver transplantation. *Am. J. Transplant.* 2016;16(2): 625–33.
- Sivori S, Falco M, Marcenaro E, Parolini S, Biassoni R, Bottino C, Moretta L, Moretta A. Early expression of triggering receptors and regulatory role of 2B4 in human natural killer cell precursors undergoing in vitro differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002;99(7):4526–31.
- Smyth MJ, Cretney E, Kelly JM, Westwood JA, Street SE, Yagita H, Takeda K, van Dommelen SL, Degli-Esposti MA, Hayakawa Y. Activation of NK cell cytotoxicity. *Mol Immunol.* 2005;42(4):501-10.
- Somanchi SS, McCulley KJ, Somanchi A, Chan LL, Lee DA. A novel method for assessment of natural killer cell cytotoxicity using image cytometry. *PLoS One.* 2015;22:10(10):e0141074.
- Srivastava RM, Lee SC, Andrade Filho PA, Lord CA, Jie HB, Davidson HC, Andrés López-Albaitero, Sandra P. Gibson, William E. Gooding, Soldano Ferrone, Robert L. Ferris. Cetuximab-activated natural killer and dendritic cells collaborate to trigger tumor antigen-specific T-cell immunity in head and neck cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2013;19(7):1858–72.
- Sun HY, Sun C, Tian ZG, Xiao WH. NK cells in immunotolerant organs. *Cell Mol Immunol.* 2013;10(3):202–12.
- Şekerel BE. Çocukluk Çağında Alerji Astım İmmünoloji. 1st Baskı, Ankara, Türkiye, 2015, p:21-42.
- Takami A, Espinoza JL, Onizuka M, Ishiyama K, Kawase T, Kanda Y, Sao H, Akiyama H, Miyamura K, Okamoto S, Inoue M, Ohtake S, Fukuda T, Morishima Y, Kodera Y, Nakao S; Japan Marrow Donor Program. A single-nucleotide polymorphism of the Fc γ receptor type IIIA gene in the recipient predicts transplant outcomes after HLA fully matched unrelated BMT for myeloid malignancies. *Bone Marrow Transplant.* 2011; 46(2):238–43.
- Tamura K, Shimizu C, Hojo T, Akashi-Tanaka S, Kinoshita T, Yonemori K, Kouno T, Katsumata N, Ando M, Aogi K, Koizumi F, Nishio K, Fujiwara Y. Fc γ R2A and 3A polymorphisms predict clinical outcome of trastuzumab in both neoadjuvant and metastatic settings in patients with HER2-positive breast cancer. *Ann Oncol.* 2011;22(6):1302-7.
- Tian Z, Chen Y, Gao B. Natural killer cells in liver disease. *Hepatology.* 2013; 57(4):1654– 62.
- Topham NJ, Hewitt EW. Natural killer cell cytotoxicity: how do they pull the trigger?. *Immunology.* 2009; 128(1):7–15.
- Trapani JA, Bird PI. A renaissance in understanding the multiple and diverse functions of granzymes?. *Immunity.* 2008;29(5):665–7.
- Trapani, JA, Davis J, Sutton VR, Smyth MJ. Proapoptotic functions of cytotoxic lymphocyte granule constituents in vitro and in vivo. *Curr Opin Immunol.* 2000;12(3):323–9.
- Tschopp J, Nabholz M. Perforin-mediated target cell lysis by cytolytic T lymphocytes. *Annu Rev Immunol.* 1990;8:279-302.
- Vainio T, Koskimies O, Perlmann P, Perlmann H, Klein G. In Vitro Cytotoxic Effect of Lymphoid Cells from Mice Immunized with Allogeneic Tissue. *Nature.* 1964; 204:453–5.
- Vivier E, Nun`es JA, V`ely F. Natural killer cell signaling pathways. *Science.* 2004; 306(5701):1517–9.
- Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S. Functions of natural killer cells. *Nat Immunol.* 2008;9(5):503-10.
- Vivier E, Ugolini S, Blaise D, Chabannon C, Brossay L. Targeting natural killer cells and natural killer T cells in cancer. *Nat Rev Immunol.* 2012;12(4):239–52.
- Vivier E, Ugolini S. Natural killer cells: from basic research to treatments. *Front Immunol.* 2011;2:18.
- Voss M, Bryceson YT. Natural killer cell biology illuminated by primary immunodeficiency syndromes in humans. *Clin Immunol.* 2017;177:29-42.
- Vossen MT, Matmati M, Hertoghs KM, Baars PA, Gent MR, Leclercq G, Hamann J, Kuijpers TW, van Lier RA. CD27 defines phenotypically and functionally different human NK cell subsets. *J Immunol.* 2008;180(6):3739–45.

- Waldhauer I, Steinle A. NK cells and cancer immunosurveillance. *Oncogene*. 2008;27(45):5932–43.
- Wang W, Erbe AK, Hank JA, Morris ZS, Sondel PM. NK cell-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity in cancer immunotherapy. *Front Immunol*. 2015;6:368.
- Warren HS, Smyth MJ. NK cell and apoptosis. *Immuno Cell Biol*. 1999;77(1):64-75.
- Weng WK, Levy R. Two immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms independently predict response to rituximab in patients with follicular lymphoma. *J Clin Oncol*. 2003;21(21):3940-7.
- Whirl-Carrillo M, McDonagh EM, Hebert JM, Gong L, Sangkuhl K, Thorn CF, Altman RB, Klein TE. Pharmacogenomics knowledge for personalized medicine. *Clin Pharmacol Ther*. 2012;92(4):414-7.
- Whiteside TL, Bryant J, Day R, Herberman RB. Natural killer cytotoxicity in the diagnosis of immune dysfunction: criteria for a reproducible assay. *J Clin Lab Anal*. 1990;4(2):102-14.
- Wu J, Edberg JC, Redecha PB, Bansal V, Guyre PM, Coleman K, Salmon JE, Kimberly RP. A novel polymorphism of FcγRIIIa (CD16) alters receptor function and predisposes to autoimmune disease. *J Clin Invest*. 1997;100(5):1059-70.
- Yoon SR, Kim TD, Choi I. Understanding of molecular mechanisms in natural killer cell therapy. *Exp Mol Med*. 2015;47(2):e141.
- Yu H, Fehniger TA, Fuchshuber P, Thiel KS, Vivier E, Carson WE, Caligiuri MA. Flt3 ligand promotes the generation of a distinct CD34(+) human natural killer cell progenitor that responds to interleukin-15. *Blood*. 1998;92(10):3647–57.
- Yu J, Freud AG, Caligiuri MA. Location and cellular stages of natural killer cell development. *Trends Immunol*. 2013;34(12):573–82.
- Zabriskie JB. *Essential Clinical Immunology*. Cambridge University Press, 2nd Edition USA, 2009, p:47-49.

7. ÖZGEÇMİŞ

Mehmet Ali Karaselek 1986 yılında Konya’da doğdu. Lise eğitimini Muhittin Güzel Kılınç Lisesi’nde 2004 yılında Konya’da tamamladı. 2005 yılında Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümüne başladı ve 2009 yılında mezun oldu. 2009 yılında Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisansa başladı ve 2012 yılında mezun oldu. 2013 yılında Necmettin Erbakan Üniversitesi (N.E.Ü.), Meram Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında doktora eğitimine başladı. 2013 yılında N.E.Ü., Meram Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Hematoloji Bilim Dalı, Kök Hücre Nakil Merkezi’ne Öğretim Görevlisi olarak atandı. Halen N.E.Ü., Meram Tıp Fakültesi, Hematoloji Bilim Dalı, Terapötik Aferez ve Kök Hücre Nakil Merkezinde Öğretim Görevlisi olarak çalışmaktadır. Aynı zamanda Kemik İliği Nakil Koordinatörlüğü görevini yürütmektedir. Evli ve bir çocuk babasıdır.

8. EKLER

8.1. EK-A: Etik Kurul Onayı

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

Toplantı Sayısı:51	Toplantı Tarihi: 26.05.2017
--------------------	-----------------------------

Karar Sayısı:2017/936:Fakültemiz Temel Tıp Bilimleri Bölümü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Ercan KURAR' ın "Doğal Öldürücü (NK) Hücre Düşüklüğü Olan Hastalarda, NK Hücre Sitotoksitelerinin ve FcγRIIIA Gen Mutasyonlarının Araştırılması" başlıklı doktora tez çalışması ile ilgili 23.05.2017 tarihli dilekçesi ve ekleri görüşüldü, Uzm. Mehmet Ali KARASELEK' in doktora tez çalışmasının Fakültemiz Temel Tıp Bilimleri Bölümü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Ercan KURAR' ın sorumluluğunda bütçe desteğinin sağlandığına dair belgenin İlaç ve Tıbbi Cihaz Dışı Araştırmalar Etik Kuruluna sunulduktan sonra çalışmanın başlamasının uygun olduğuna oybirliği ile karar verilmiştir.

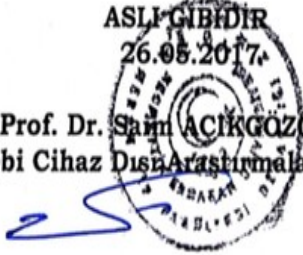
Not: Çalışma ile ilgili gerekli izin ve yasal sorumluluk araştırmacılara aittir.

Sorumlu Araştırmacı: Doç. Dr. Ercan KURAR

Yardımcı araştırmacılar: Uzm. Mehmet Ali KARASELEK, Prof. Dr. İsmail REİSLİ

ASLI GİBİDİR
26.05.2017

Prof. Dr. Sami ACIKGOZOĞLU
İlaç ve Tıbbi Cihaz Dışı Araştırmalar Etik Kurul Başkanı



8.2. EK-B: Bilgilendirilmiş Gönüllü Onam Formu

Çalışmanın Adı: Doğal Öldürücü (NK) Hücre Düşüklüğü Olan Hastalarda, NK Hücre Sitotoksitelerinin ve *FcγRIIIA* Gen Mutasyonlarının Araştırılması

Bir araştırma çalışmasına katılmanız istenmektedir. Çalışmaya katılıp katılmama kararı tamamen size aittir. Katılmak isteyip istemediğinize karar vermeden önce araştırmanın neden yapıldığını bilgilerinizin nasıl kullanılacağına çalışmanın neleri içerdiğini ve olası yararlarını, risklerini ve rahatsızlık verebilecek konuları anlamanız önemlidir. Lütfen aşağıdaki bilgileri dikkatlice okumak için zaman ayırınız. Eğer çalışmaya katılmaya karar verirsiniz imzalamanız için size bu Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu verilecektir. Çalışmadan herhangi bir zamanda ayrılmakta özgürsünüz.

Çalışmanın Konusu ve Amacı: NK eksiklikliği olan hastalar enfeksiyonlara (özellikle viral) duyarlı hale gelir ve eksiklik derecesine bağlı olarak hastaların yaşam kaliteleri ciddi anlamda bozulabilir. Periferik kanda NK hücre düşüklüğü ve/veya yokluğu ile karakterize ve kalıtsal olan bu hastalığa NK hücre eksikliği/bozukluğu (NKD) adı verilmektedir. NKD'nin patogenezi tam olarak açık olmadığı için, bu hastalık için özel bir tedavi seçeneği bulunmamakta, sadece enfeksiyona yönelik tedaviler uygulanmaktadır. Bu hastalıkların tanısı klinik ve laboratuvar testleri ile koyulabilse de hastalığın patogenezinde rol oynayan genetik sebeplerin tespit edilmesi hastalığın tedavisinin belirlenmesinde önemli rol oynamaktadır. NKD'ye sebep olduğu düşünülen bazı aday genler (MCM4, GATA2, RTEL1, IRF8) olmakla birlikte bu genlerden biri de CD16 reseptörünü kodlayan *FcγRIIIA* reseptör genidir. Bundan dolayı çalışmamızda hastalığa neden olduğu düşünülen *FcγRIIIA* genindeki mutasyonlar araştırılacaktır. Ayrıca NK hücrelerinin fonksiyonlarının belirlenmesi amacıyla da sitotoksite testi gerçekleştirilecektir. Bundan dolayı çalışmada hastalığın hem fonksiyonel hem de genetik yönünün araştırılması amaçlanmaktadır.

Çalışma İşlemleri: Çalışmaya katılmayı kabul ettiğiniz takdirde çocuğunuzdan ve gerektiğinde sizden bir tüp kan alınması gerekmektedir.

Çalışmaya Katılmanın Olası Yararları: Çocuğunuzun hastalığından sorumlu olduğu düşünülen *FcγRIIIA* geninde mutasyon tespit edilirse çocuğunuzun tedavi seçenekleri değişebilir ve daha yararlı bir tedavi seçeneği sunulabilir. Ayrıca sizdeki

taşıyıcılı tespit edilirse bir sonraki çocuğunuzda oluşabilecek riskler hakkında size bilgi verilebilir.

Çalışmaya Katılmanın Olası Riskleri: Bu çalışmaya katılmanız sonucunda sizin veya çocuğunuz için herhangi bir risk oluşmayacaktır.

Kişisel Bilgilerim Nasıl Kullanılacak: Bu formu imzalayarak araştırmaya katılım için onay vermiş olacaksınız. Bununla birlikte kimlik bilgileriniz çalışmanın herhangi bir aşamasında açıkça kullanılmayacaktır. Çalışmadan elde edilen sonuçlar sadece bilimsel amaçlar için kullanılacaktır. Bilgileriniz hiçbir kimse ile ya da ticari bir amaç için paylaşılmayacaktır.

Soru ve Problemler için Başvurulacak Kişiler:

Prof. Dr. Ercan Kurar, Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Konya. Telefon: 0332 2237976 / 0542 557 13 66

Prof. Dr. İsmail Reisli, Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi, Çocuk Allerji ve İmmünoloji Bilim Dalı, Konya. Telefon: 0332 2236690 / 0532 344 55 11

Öğr. Gör. Mehmet Ali Karaselek, Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Konya. Telefon: 0332 2237194/ 0505 924 44 21

Çalışmaya Katılma Onayı: Bu bilgilendirilmiş olur belgesini okudum ve anladım. Bu araştırmaya katılmayı kabul ediyorum ve bu onay belgesini kendi hür irademle imzalıyorum. Bu onay, ilgili hiçbir kanun ve yönetmeliği geçersiz kılmaz. Araştırmacı saklamam için bu belgenin bir kopyasını çalışma sırasında dikkat edeceğim noktaları da içerecek şekilde bana teslim etmiştir.

Gönüllü Adı Soyadı:		Tarih ve İmza:
Adres ve Telefon:		
Veli / Vasinin Adı Soyadı:		Tarih ve İmza:
Adres ve Telefon:		
Tanık Adı Soyadı:		Tarih ve İmza:
Adres ve Telefon:		
Araştırmacı Adı Soyadı:		Tarih ve İmza:
Adres ve Telefon:		