

**T.C
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MUHTEMEL OTOİMMÜN LENFOPROLİFERATİF
SENDROM (ALPS) TANISIYLA İZLENEN HASTALARIN
BİLİNEREN MOLEKÜLER DEFEKTLER
YÖNÜNDEN ARAŞTIRILMASI**

Dr. Çağman TAN

İmmünoloji Programı

DOKTORA TEZİ

**TEZ DANIŞMANI
Prof.Dr. Özden SANAL**

**Ankara
2014**

Anabilim Dalı : **PEDİATRİK TEMEL BİLİMLER**

Program : **İMMÜNOLOJİ**

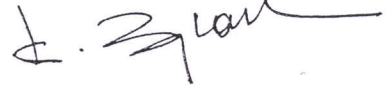
Tez Başlığı : **MUHTEMEL OTOİMMÜN LENFOPROLİFERATİF
SENDROM (ALPS) TANISIYLA İZLENEN
HASTALARIN BİLİNER MOLEKÜLER DEFEKTLER
YÖNÜNDEN ARAŞTIRILMASI**

Öğrenci Adı-Soyadı : **ÇAĞMAN TAN**

Savunma Sınavı Tarihi : **19.06.2014**

Bu çalışma jürimiz tarafından yüksek lisans/doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

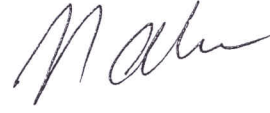
Jüri Başkanı: **Prof. Dr. İlhan TEZCAN**
(Hacettepe Üniversitesi)



Tez danışmanı: **Prof. Dr. Özden SANAL**
(Hacettepe Üniversitesi)



Üye: **Prof. Dr. Nurten AKARSU**
(Hacettepe Üniversitesi)



Üye: **Prof.Dr. Duygu UÇKAN ÇETİNKAYA**
(Hacettepe Üniversitesi)

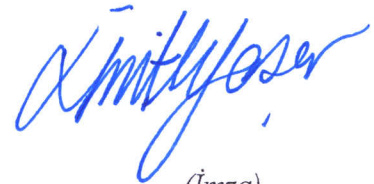


Üye: **Prof. Dr. Cemalettin AYBAY**
(Gazi Üniversitesi)



ONAY

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.



(İmza)
Prof.Dr. Ersin FADILLIOĞLU
Müdür

4.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım süresince her türlü yardım ve desteğini esirgemeyen, bilgi ve tecrübelerini yüksek lisans sürecinde ve bu süreçte benimle paylaşan ve yol gösteren çok kıymetli danışman hocam Sayın Prof.Dr.Özden Sanal'a ve Sayın Prof.Dr.İlhan Tezcan'a sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım. Bu yolda devam etmemi sağlayan çok kıymetli hocam Sayın Prof.Dr.Fügen Ersoy'a teşekkürlerimi sunarım.

Prof.Dr. Rıza Köksal Özgül'e ve Dr.Erdal Coşgun'a yardım ve desteklerinden dolayı, Hacettepe Üniversitesi Pediatrik İmmünoloji Bölümü ve Laboratuvarı çalışma arkadaşlarıma desteklerinden dolayı, biricik kızım ve eşime bu uzun süreçte sabır ve anlayışla yanımda durdukları için , canım anneme ve babama beni her zaman maddi ve manevi yönden destekledikleri için teşekkür ederim.

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi tarafından desteklenmiştir (FON 11/19).

ÖZET

Tan,Ç. Muhtemel Otoimmün Lenfoproliferatif Sendrom (ALPS) Tanısıyla İzlenen Hastaların Bilinen Moleküler Defektler Yönünden Araştırılması.Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü İmmünoloji Doktora Tezi, Ankara,2014. Apoptozis immün sistem homeostazisinde önemli rol oynamaktadır. Apoptozis mekanizmalarında önemli moleküller olan Fas-FasL etkileşimi immün cevabın sonlandırılmasında, lenfosit yaşam süresinin düzenlenmesinde, immün toleransta önemli rol oynamaktadır. Apoptozisi düzenleyen genlerdeki defektler lenfosit homeostazisinin bozulmasına ve kronik lenfadenopati ve/veya splenomegali, başlıca otoimmün sitopeni olmak üzere otoimmün bulgular ve lenfoma gelişmesine yatkınlıkla ortaya çıkan otoimmün lenfoproliferatif sendrom (ALPS); ve ALPS ile ilgili (*ALPS related*) hastalıklara yol açmaktadır. ALPS vakalarının çoğu FAS genindeki mutasyonlarla ortaya çıkar. Somatik FAS mutasyonları ALPS'den ikinci sıklıkta sorumludur. Daha az sayıda hastada FAS Ligand (*FASL*) veya *CASPASE10* (*CASP10*) genlerinde mutasyon mevcuttur. *CASPASE 8*(*CASP8*), *NRAS* ve *KRAS* mutasyonları ALPS ile ilgili az sayıda hastalıktan sorumludur. ALPS tanı kriterlerini taşıyan ancak mutasyon saptanmayan hastalar *ALPS-Unknown* (ALPS-U) olarak sınıflandırılmaktadır. ALPS tanısı alan ancak mutasyonu saptanamayan hastalar tüm olguların yaklaşık 1/3'ünü oluşturmaktadır. ALPS'nun klinik prezentasyonunun FAS defektine ek olarak diğer genlerdeki varyasyonlardan da etkilendiği görülmektedir. FAS, FASL ve CASP8 apoptoziste anahtar rol oynayan moleküllerdir, bunlardaki defekt kanser gelişmesine hassasiyete yol açabilmekte ve prognozunu etkileyebilmektedir. Birçok çalışma FAS genindeki nükleotit değişikliklerinin otoimmün hastalıklara ve kansere yatkınlık ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Bu çalışmada 2009'da gözden geçirilen ALPS tanı kriterleri ile muhtemel ALPS tanısı alan, akraba olmayan 25 hastada ikincil aksesuar tanı kriterlerini oluşturan Biyobelirteç ve altta yatan moleküler eksiklikleri saptamak üzere FAS, FASL ve CASP8 genlerinde DNA dizi analizi yöntemi ile mutasyon taraması yapıldı. FAS, FASL ve CASP8 genlerinde mutasyon tespit edilmedi. Ancak hastalarımızda FAS SNP rs2234978 (homozigot minör T allel) ve CASP8 rs1045487 (heterozigot minör A allel) sıklığı kontrollere göre önemli düzeyde yüksek bulundu (sırasıyla p=0.001 ve p=0.004). Biyobelirteç profili FAS gen defektini düşündüren ancak germline mutasyonu bulunmayan bir hastada DNT (çift negatif T) hücrelerden elde edilen DNA örneğinde de FAS geninde mutasyon tespit edilmedi. Sonuçlar CASP8 özellikle FAS genindeki polimorfizmin ALPS fenotipinin gelişmesine hassasiyete katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir. Bu polimorfizmlerin hastalığa yatkınlığa yol açmasında rol alabilecek olası mekanizmaların belirlenmesi için gen ekspresyonu ve fonksiyonel çalışmaların yapılması; hastalığa yol açabilecek henüz bilinmeyen gen defektlerinin tüm ekzom veya tüm genom analiz yöntemleri ile araştırılması gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: Apoptozis, FAS, CASP8, ALPS, SNP

Destekleyen Kurumlar : H.Ü.B.A.B, (FON 11/19)

ABSTRACT

Tan,Ç. Screening of patients with the diagnosis of probable ALPS for known molecular defects. Hacettepe University Institute of Health Sciences,Ph.D. Thesis in Immunology, Ankara, 2014 Apoptosis plays a crucial role in immune homeostasis. The interaction between Fas and FasL, essential molecules in an apoptosis pathway, play an important role in the termination of the immune response, regulation of lymphocyte survival, and immune tolerance. Defects in genes that have role in apoptosis pathways result in dysregulation of lymphocyte homeostasis and development of ALPS and ALPS related disorders which are characterized by chronic lymphadenopathy and/or splenomegaly, autoimmune features, most commonly autoimmune cytopenias, and susceptibility to development of lymphoma. Most cases of ALPS are associated with germline heterozygous mutations of the *FAS* gene. Somatic(s) *FAS* mutations constitute the second most common genetic defect. In a small number of patients *FASL* and *CASP10* gene defects are responsible for ALPS; *CASP8*, *NRAS* and *KRAS* mutations, for ALPS related diseases. Patients who fulfill ALPS diagnostic criteria in whom no causative mutations can be identified are classified as ALPS-Unknown (ALPS-U) and comprise about one third of all cases. In addition to the Fas defects, clinical presentation of ALPS appears to be influenced by modifier genes. The *FAS*, *FAS ligand (FASL)*, and *CASP8* are key molecules in apoptosis and defects in related genes may create a susceptibility to cancer development and may effect its prognosis. Studies showed that nucleotide changes in Fas gene contribute to susceptibility to autoimmune diseases and cancer. We investigated biochemical markers (sFas-L, IL-10, IL-18, vitamine B12) that constitute the secondary accessory diagnostic criteria for ALPS, and performed sequence analysis to detect underlying *FAS*,*FASL* and *CASP8* gene defects in 25 unrelated patients with the diagnosis of probable ALPS according to criteria revised in 2009. No mutation was found in the *FAS*, *FASL* or *CASP8* genes. However, we found the frequencies of SNP rs 2234987 of *FAS* gene (homozygous minor T allele) and rs1045487 of *CASP8* (heterozygous minor A allele) significantly increased in our patients comparing healthy controls ($p=0.001$ and $p=0.004$ respectively). *sFAS* mutation was studied in DNA sample extracted from DNT (double negative T) cells but not demonstrated in a patient whose biochemical markers' levels were suggestive for Fas defect and without germline *FAS* mutation. Our results suggest that *CASP8* and *FAS* gene polymorphisms in particular, may contribute to the susceptibility to ALPS phenotype. To determine the responsible mechanisms for the possible effect of these polymorphisms on the susceptibility to the disease, functional and gene expression studies; and to discover the mutations in yet unknown genes Whole Exome(WES) and Whole genom (WGS) studies should be done.

Key Words: Apoptosis, *FAS*, *CASP8*, ALPS, SNP

Supported by H.Ü.B.A.B (FON11/19)

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	viii
ŞEKİLLER	ix
TABLolar	x
1.GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. İmmün Sistem ve Tolerans	3
2.2. Programlı Hücre Ölümü	4
2.2.1. Tanım	4
2.2.2. Tip 1 Programlı Hücre Ölümü (Apoptozis)	4
2.2.3. Tip 2 Programlı Hücre Ölümü (Otofaji)	15
2.2.4. Tip 3 Hücre Ölümü	17
2.3. Diğer Hücre Ölüm Mekanizmaları	18
2.3.1. Paraptozis	18
2.3.2. Anoikis	19
2.3.3. Mitotoik Katastrofi	19
2.3.4. Piroptozis	19
2.3.5. Pironekrozis	20
2.3.6. Entozis	20
2.4. Otoimmün Lenfoprolifetaif Sendrom(ALPS)	20
2.4.1. ALPS Tanı Kriterleri	21
2.4.2. ALPS’lu Hastaların Klinik Özellikleri	22
2.4.3. Sorumlu Gen Defektleri	27
2.4.4. ALPS ile İlgili Hastalıklar	32
2.4.5. ALPS ile Benzerlik Gösteren Diğer Hastalıklar	36
2.4.6. Tanı	41

2.4.7. Tedavi ve Prognoz	44
3. BİREYLER ve YÖNTEM	45
3.1.1. Bireylerin Demografik Özellikleri	45
3.1.2. Bireylerin Klinik Özellikleri	45
3.2. Biyokimyasal Çalışmalar	48
3.2.1. Serum Fas-L Düzeyinin Ölçümü	48
3.2.2. Serum IL-10 Düzeyinin Ölçümü	49
3.3 Moleküler Çalışmalar	50
3.3.1. Dizi Analizi İçin Örneklerin Hazırlanması	50
3.3.2. <i>FAS</i> Geni Mutasyon Taraması	52
3.3.3. <i>FASL</i> Geni Mutasyon Taraması	53
3.3.4. <i>CASP8</i> Geni Mutasyon Taraması	54
3.4 LRBA Proteinin Tespiti Western Blot Analizi ile Araştırılması	55
3.4.1. Hücre Kültürü	55
3.4.2. Protein Elde Edilmesi	55
3.4.3. Western Blot Analizi	56
3.5. İstatistiksel Analiz	56
4. BULGULAR	57
4.1. Biyokimyasal Bulgular	57
4.2. DNT Hücre Değerleri	57
4.3. Serum İnterlökin 10 Düzeyleri	57
4.4. Serum IL-18 Düzeyleri	58
4.5. <i>Soluble Fas Ligand</i> Düzeyleri	58
4.6. Vitamin B12 (VitB12) Bulguları	58
4.7. İmmunoglobulin Düzeyleri	58
4.8. DNA Dizileme Yöntemi ile <i>FAS</i> Geni Mutasyon Taraması	60
4.9. DNA Dizilime Yöntemi ile <i>FAS Ligand</i> Gen Mutasyon Taraması	62
4.10. DNA Dizilime Yöntemi ile <i>CASPASE (CASP8)</i> Gen Mutasyon Taraması	62
4.11. Western Blot Yöntemi ile LRBA Protein Varlığının Araştırılması	65
5. TARTIŞMA	67

KAYNAKLAR

76

EKLER

Ek-1. Etik Kurul İzni

SİMGELER VE KISALTMALAR

AAC-11	Antiapoptotik klon-11
AIF	Apoptozis İndükleyici Faktör (<i>Apoptosis Inducing Factor</i>)
ALI	Akut Akciğer Hasarı (<i>Acut Lung Injury</i>)
ALPS	Otoimmün Lenfoproliferatif Sendrom
<i>ALPS Related</i>	ALPS ile ilgili
ALPS-IgG low	IgG düşüklüğü olan ALPS’li hastalar
Apafs	<i>Apoptotic Protease Activating Factors</i>
Apaf-1	<i>Apoptotic Protease Activating Factor-1</i>
Api	Apoptozis inhibitör-5
Apoptozis	Tip 1 programlı hücre ölümü
ASC	<i>Apoptosis-associated speck-like protein containing a CAR</i>
Asp	Asparajin
Bax	Mitokondriden sitokrom-c salınmasını indükleyen proapoptotik protein.
Bcl-2	B-cell CLL/lymphoma 2.
bç	Baz çifti
BID	BH3-ölüm agonisti ile etkileşimli domain
Bik	Bcl-2-interacting killer,
BH	Bcl-2 Homoloji
CAD	Kaspaz aktif DNase (<i>caspase activated DNase</i>)
CARD(s)	<i>Caspase activation and recruitment domains</i>
<i>CED</i>	Nematod solucanlarından <i>Caenorhabditis elegans</i> ’ın hücre ölüm defekt geni
CEDS	Kaspaz 8 Eksiklik Sendromu
CDC4L-LIKE	<i>CELL DIVISION CYCLE 4-LIKE PROTEIN</i>
CVID	<i>Common Variable Immunodeficiency</i> (Sık görülen değişken immün yetmezlik)
CTL	Sitotoksik T hücre
DALD	Dianzani Otoimmün Lenfoproliferatif Hastalık
DED	Ölüm efektör domaini

DISC	<i>Death-Inducing Signaling Complex</i>
DNT	CD4/CD8 çift negatif T
Endo G	Endonükleaz G
ER	Endoplazmik retikulum
ES	Evans Sendromu
ESID	<i>European Society for Immune Deficiencies</i>
FADD	Fas Asosiye Ölüm Domaini (<i>Fas Associated Death Domain</i>)
FIF	<i>Fibroblast growth factor-2 interacting factor</i>
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
HD	Hodgkin Lenfoma
HM	Hepatomegali
HMG-1	<i>High mobility group box-1</i>
IAPs	<i>Inhibitor of Apoptosis Proteins</i>
IBD	İnflamatuvar Barsak Hastalığı
IL-10	İnterlökin 10
IL-18	İnterlökin 18
ILGF-1	<i>İnsülin like growth factor receptor 1</i>
ITP	İmmün -aracılı trombositopeni
KASPAZ	(Caspase) Sistein aracılı Aspartat kesen proteazlar
KFH	Kikuchi Fujimoto Hastalığı
LAP	Lenfadenopati
LRBA	<i>LPS-responsive and beige-like anchor</i>
MAPK	Mitojen aktive protein kinazlar
Mcl-1	<i>Myeloid Leukemia Cell Differentiation Protein</i> , Apoptosis İnhibitörü.
Mitofaji	Mitokondrilerin ortadan kaldırılması
MS	Multipl Skleroz
NALP3	<i>NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3</i>
NF-κB	<i>Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NHL	Non-Hodgkin Lenfoma
OHA	Otoimmün Hemolitik Anemi

Omi/HtrA2	Mitokondriyel Serin Proteaz
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
PAGID	<i>Pan American Group for Immune Deficiency</i>
PARP	<i>Poly (ADP-ribose) polymerase</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PET	Pozitron emisyon tomografi
PLEVA	<i>Pitriyazis Lichenoides et Varoliformis Acuta</i>
Piknozis	Kromatin kondenzasyonu.
PI	Fosfotidilinozitol
PHA	<i>Phytohemagglutinin</i>
PRKCD	Protein Kinaz C δ Eksikliği
PS	Fosfatidilserin
PTC	Papiller tiroid karsinomu
PVDF Membran	<i>Polyvinylidene difluoride</i>
RA	Romatoid Artrit
RALD	Ras-asosiye Lökoproliferatif Hastalık
RAS	Rat sarkoma ailesi
RIPK2	<i>Receptor-Interacting Serine-Threonine kinase 2</i>
RIPK-3	<i>Receptor-interacting protein kinase 3</i>
RDD	Rosai-Dorfman Hastalığı
SAP	<i>Signaling lymphocyte activation molecule,(SLAM), associated protein</i>
SET	Endoplazmik retikulum ilişkili proteinler
SLE	Sistemik Lupus Eritromatozus
SSc	Sistemik skleroz
sFAS-L	<i>Soluble FAS Ligand</i>
SH2D1A	<i>SH2 domain-containing protein 1A</i>
sIg	Sekretuar immünglobulin
SLAM	<i>Signaling Lymphocyte Activation Molecule</i>
SM	Splenomegali

SMAC/DIABLO	Mitokondri kökenli ikinci kaspaz aktivatörü / düşük pI'lı IAP bağlanma proteini
TCR	T Hücre Reseptörü
TdT	<i>Terminal deoksinükleotidil transferaz</i>
TM	Erime sıcaklığı
TMB	<i>Tetrametil benzidin</i>
TNF	Tümör Nekrozis Faktör
TNFR1	Tümör Nekrozis Faktör Reseptör-1
TRAIL-R1	<i>TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand-R1</i>
TBE	<i>Tris Borik EDTA</i>
UTR	<i>Untranslated Region</i>
XLP	X-linked Lenfoproliferatif Hastalık

ŞEKİLLER

2.2.2	Tip1 Apoptozis Safhaları
2.2.2.2.1	Mitokondri Aracılı Apoptoziste Sinyal Kaskadı
2.2.2.2.2	Ekstremsk Yolak
2.2.3	Otofagozom Oluşumu
2.4.3.2	FAS Genindeki Mutasyonların Etkileri
2.4.4	ALPS ve ALPS ile İlişkili Hastalıklara Yol Açan Defektif Moleküller
2.4.6	ALPS Şüphesi Olan Hastalarda İzlenecek Algoritma
4.8	FAS Gen SNP rs2234978 (C>T) Dizi Analizi Kontrol, Heterozigot ve Homozigot Hasta Örnekleri
4.10	CASP8 Gen SNP rs1045487 (G>A). Dizi Analizi Kontrol ve Heterozigot Hasta Örneği
4.11	LRBA Protein Sonuçları

TABLOLAR

2.4.1.1	Eski ve Yeniden Düzenlenen ALPS Sınıflandırması
2.4.1.2	ALPS’da Kesin Kriterler
2.4.1.3	ALPS’da Destekleyici Kriterler
2.4.2.3	ALPS Tanısı Alan 62 Hastanın Klinik Bulguları ve Sıklıkları
2.4.2.7	ALPS’lu Hastaların Laboratuvar Bulguları
2.4.3.2.2	<i>FAS</i> Mutasyonlarının Dağılımı
2.4.4	ALPS ile Benzerlik Gösteren Hastalıklar
3.1.1	Hastaların Demografik Özellikleri
3.1.2.1	Hastaların Çeşitli Klinik Özelliklerinin Görülme Oranları
3.2.1.2	Hastaların Klinik Özellikleri
3.3.1.2	PCR Protokolü
3.3.1.4	Dizi Analizi Reaksiyonu PCR Protokolü
3.3.2	<i>FAS</i> Geni İçin Tasarlanan Primer Dizileri
3.3.3	<i>FASL</i> Geni İçin Tasarlanan Primer Dizileri
3.3.4	<i>CASP8</i> Geni İçin Tasarlanan Primer Dizileri
4.7	Hastaların Ig Düzeyleri ve Takip Sırasındaki Seyri
4.8	<i>FAS</i> rs2234978 SNP Sonuçları
4.9	<i>CASP8</i> rs1045487 SNP Sonuçları
4.12	Hastaların Biyokimya ve Sekans Analiz Sonuçları

1.GİRİŞ

Apoptozis immün sistem homeostazisinde önemli rol oynayan bir mekanizmadır. Lenfositler patojen ile karşılaştıklarında hızla çoğalmakta ve antijen eliminasyonundan sonra antijene cevap veren hücrelerin çoğunluğunun ortadan kaybolduğu kontraksiyon fazı ortaya çıkmaktadır. Bu kontraksiyon fazı aktive olmuş hücrelerin apoptozu ile olmaktadır. Aktive lenfositlerde Fas-FasL etkileşimi immün cevabın sonlandırılmasında, lenfosit yaşam süresinin regülasyonunda rol oynamaktadır (1) . Apoptozis immün toleransta da rol oynamaktadır. Timusta ve kemik iliğinde lenfosit gelişimi sırasında self reaktif T ve B lenfositler apoptozis ile ortadan kaldırılmakta, apoptozis periferal toleransın idamesinde de rol almaktadır. Apoptozisi regüle eden genlerdeki defektler lenfosit homeostazisinin bozulmasına ve ALPS ve ALPS ile ilgili hastalıklara yol açmaktadır (2) . ALPS, poliklonal lenfositlerin birikimi sonucu ortaya çıkan lenfadenopati ve/veya splenomegali, ön planda otoimmün sitopeniler olmak üzere otoimmün hastalık bulguları ve periferik kanda DNT hücrelerin artışı ile karakterize genetik bir hastalıktır. Hastalarda lenfoma gelişmesine de yatkınlık görülmektedir (3) .

ALPS vakalarının çoğu Fas genindeki mutasyonlarla ortaya çıkar. Somatik FAS mutasyonları ikinci sıklıkta bulunan sorumlu genetik defekti oluşturmaktadır (4). Daha az sayıda hastada Fas-FasL yolağında bulunan efektör moleküller olan FasL veya Casp10 genlerinde defekt mevcuttur. *CASP8*, *NRAS* ve *KRAS* mutasyonları da az sayıdaki hastada ALPS ile ilgili hastalıklardan sorumludur. ALPS tanı kriterlerini taşıyan ancak mutasyon bulunamayan hastalar ALPS-U olarak sınıflandırılmaktadır. Bu vakalardan apoptozis yolaklarındaki diğer molekülleri kodlayan genlerdeki defektler sorumlu olabilir. ALPS tanısı alan ancak mutasyonu bulunamayan hastalar vakaların yaklaşık 1/3'ünü oluşturmaktadır (3) .

ALPS düşünülen hastalarda FAS mutasyonu için öngörü değeri yüksek olduğu belirlenen, soluble FAS ligand (sFasL), interlökin-10 (IL-10), interlökin 18 (IL-18) ve vitamin B12 (VitB12) gibi bir dizi molekülde spesifik değişiklikler bulunduğu yakın zamanda gösterilmiştir (5) . Bu biyobelirteçler, ALPS şüphesi olan hastaların tanısı için uygulanması önerilen algoritmanın bir

parçası haline gelmiştir. Bu algoritma, lenfoproliferasyon ve DNT yüksekliği olan tüm hastalarda FAS (germline) geni sekans analizi yapılmasını, mutasyonu negatif olan hastalarda biyobelirteç profili beklenen spesifik özellikleri içeriyorsa, somatik FAS mutasyon analizini önermektedir (5) .

ALPS'nun klinik prezentasyonunun FAS defektine ek olarak modifiye edici genlerden etkilendiği gözlenmektedir. FAS ve FASL mutasyonu gösteren MLR lpr/lpr ve gld/gld farelerde hastalığı belirleyen özellikler tarif edilmiştir. Bu farelerde hastalığın prezentasyonunun farenin genetik alt yapısından dramatik şekilde etkilendiği belirlenmiştir. Lpr veya gld mutasyonu taşıyan MRL dışındaki kuşaklarda fenotiplerin çok daha hafif olduğu gösterilmiştir (6) . Benzer alt yapı etkisi ALPS mutasyonlarının tam olmayan penetransını açıklayabilir. ALPS'li hastaların çoğunluğu heterozigot FAS mutasyonu taşımaktadır ancak aynı mutasyonu taşıyan ebeveynler genellikle sağlıklıdır. Bu gözlem Fas yolağındaki mutasyonların ALPS'nun ortaya çıkması için gerekli ancak yeterli olmadığına, ek olarak bir veya daha fazla sayıda genin hastalığın penetransını etkileyebildiğine işaret etmektedir (6)

Bu çalışmada 2009'da gözden geçirilen ALPS tanı kriterleri ile muhtemel ALPS tanısı alan, akraba olmayan 25 hastada tanı için ikincil aksesuar kriterleri oluşturan moleküller çalışılmış ve altta yatan moleküler eksiklikleri saptamak üzere *FAS*, *FASL* ve *CASP8* genlerinde DNA dizi analizi yöntemi ile mutasyon taraması yapılarak; Muhtemel ALPS tanısı alan hastaların klinik prezentasyonlarında rol alan faktörlerin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İmmün Sistem ve Apoptosis

Başlıca fizyolojik fonksiyonu enfeksiyonlara karşı koruma olan immün sistemin immün cevap sırasında self toleransı devam ettirmesi ve kendini sınırlayabilmesi gerekmektedir. İmmün sistem patojenlere karşı cevap verecek ancak kendi antijenlerine cevap oluşturmayacak şekilde düzenlenmiştir. Patojenlere karşı hızlı ve agresif immün cevap organizmanın yaşaması ve gelişmesi için ne kadar önemli ise immün sistemin kendi antijenlerine cevap verememesi de o kadar önemlidir (7) .

İmmün sistem homeostazisinde apoptozis çok önemli rol oynamaktadır. Lenfositler patojen ile karşılaştıklarında büyük ölçüde çoğalmakta, antijen eliminasyonunu takiben ise antijene cevap veren hücrelerin çoğunluğunun ortadan kaybolduğu kontraksiyon fazı oluşmaktadır. Bu kontraksiyon fazı aktive olmuş hücrelerin apoptozu ile olmaktadır. Aktive lenfositlerde Fas- Fas-L etkileşimi immün cevabın sonlandırılmasında lenfosit yaşam süresinin regülasyonunda rol oynamaktadır (1) . Timusta ve kemik iliğinde lenfosit gelişimi sırasında self reaktif T ve B lenfositler apoptozis ile ortadan kaldırılır. Apoptozis periferel toleransın idamesinde de rol alır (2) .

Klasik olarak immün yetmezlik hastalıklarının başlıca belirtileri, zayıf patojenik veya virulan, çoklu enfeksiyöz ajanlarla tekrarlayan enfeksiyonlardır. Ancak, immün sistem hastalıkları enfeksiyonlara hassasiyet yanında, otoimmünite, lenfoproliferasyon ile de ortaya çıkabilmektedir. Otoimmünite ve lenfoproliferasyon immün homeostazisi sağlayan mekanizmalarda rol alan moleküllerdeki defektlerle ortaya çıkmaktadır.

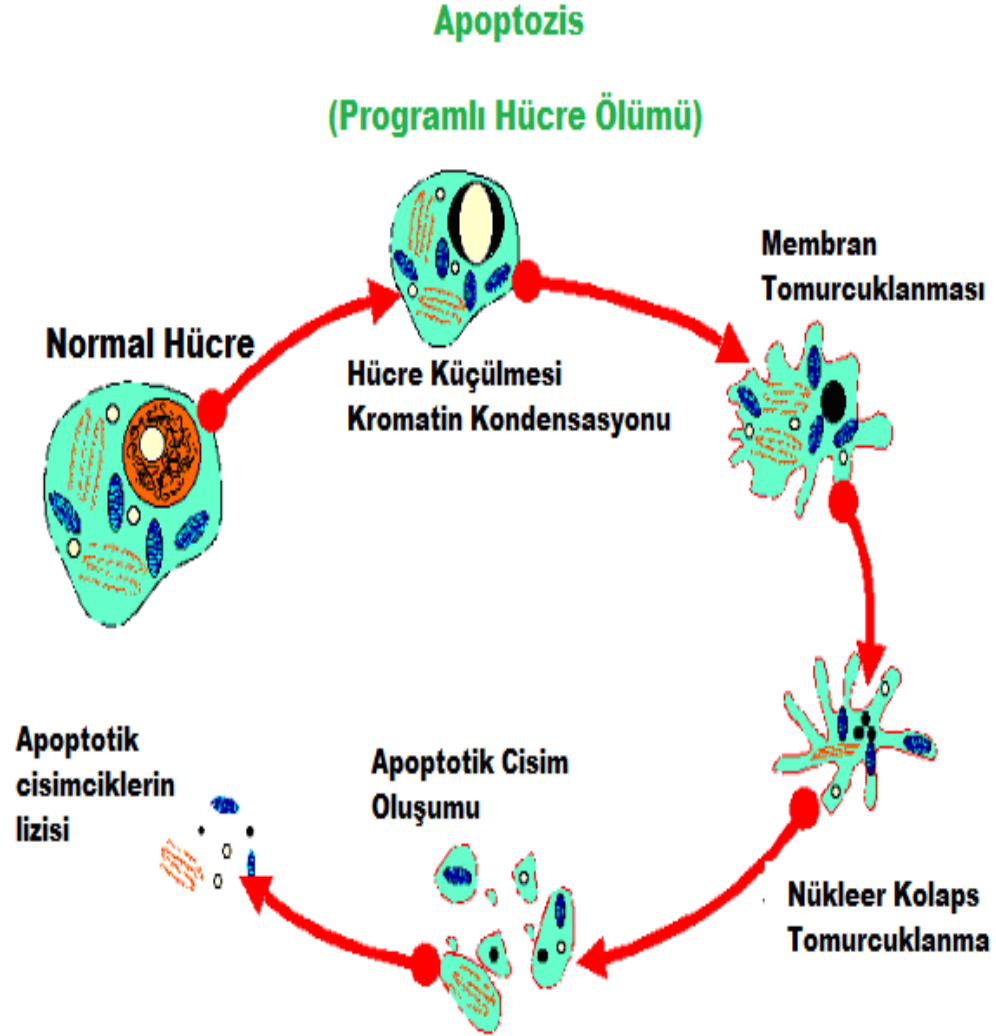
2.2. PROGRAMLI HÜCRE ÖLÜMÜ

2.2.1. Tanım

Programlı hücre ölümü genetik olarak programlanmış, hasarlı veya enfekte hücrelerin ortadan kaldırılmasını sağlayarak çok hücreli organizmaların yaşamlarının devamını sağlayan bir mekanizmadır. Hücre proliferasyonu ile ölümü arasındaki denge organizmanın biyolojik sistemlerinin gelişme ve devamlılığı için esastır (8) . Programlı hücre ölümünün nekrozis, apoptozis ve otofaji olarak üç türü bulunmaktadır. Apoptozis (Tip 1 programlı hücre ölümü) hücrelerde büzülme, yuvarlaklaşma, vakuol ve vezikül oluşumu, nükleer yoğunlaşma, membran tomurcuklanması, nükleer parçalar içeren apoptotik cisimcikler ve bozulmamış organeller ile karakterizedir. Otofaji (Tip 2 programlı hücre ölümü)'nin karakteristik özelliği çift membran vakuollerin bulunmasıdır. Nekrozis (Tip 3 programlı hücre ölümü), hücre şişmesi, organellerin yerleşiminin bozulması, plazma membran parçalanması ve sızıntısı ile karakterizedir (9) .

2.2.2. Tip 1 Programlı Hücre Ölümü (Apoptozis)

Apoptoz sözcüğü Yunancadan gelmektedir. Yaprakların ağaçtan ayrılması anlamına gelir. Apoptozis veya tip 1 programlı hücre ölümü ilk defa 1972 yılında Kerr, Wyllie ve Currie tarafından tarif edilmiştir (10) . Apoptozis hücrelerde spesifik morfolojik ve biyokimyasal değişiklikler ile karakterizedir. Apoptozisin erken evresinde hücre büzülmesi ile hücreler küçülür, kromatin dens hale gelir, nükleer membrana doğru yer değiştirir. Nükleer membran intakt kalmasına rağmen nükleer porların dağılımında değişiklik olur. Apoptotik hücrenin sitoplazmik membranı deforme olur ve tomurcuklaşma oluşur. Endoplazmik retikulumda sisternalar genişler ve birleşir. Hücre membranındaki fosfolipitlerin oryantasyonu değişir ve membranın dış yüzüne geçerler (11) (Şekil 2.2.) . Apoptotik cisimcikler nükleer parçacık taşıyan veya taşımayan sıkıca paketlenmiş organellerden oluşur. Organel bütünlüğü plazma membranı bozulana kadar korunur. Apoptotik cisimcikler dış çevreye salındığında fagositler tarafından alınır, dolayısıyla inflamatuvar reaksiyon oluşmaz (12) .



Şekil-2.2.2. Tip 1 Apoptozis Safhaları (13)

Fizyolojide mitozisin rolü ne kadar önemli ise apoptozisin rolü de o kadar önemlidir. Erişkin bir insanda homeostazisin sağlanması için apoptozis ile ölen hücrelerin yerine günde yaklaşık 10 milyon hücre üretilir (14) . Üretilen hücre sayısı normal gelişim, yaşlanma veya hastalık sırasında apoptozisin artmasıyla belirgin olarak artar. Apoptozis çeşitli gelişim süreçleri sırasında kritik öneme sahiptir. Örnek olarak sinir sistemi hücrelerinde fonksiyonel sinaptik bağlantılarını kuramayan ve immün sistem hücrelerinde antijen spesifitesini oluşturamayan hücreler apoptoza uğrayarak ortadan kaldırılır (15) ,(16) . Ayrıca, organizmalar yaşlandıkça, bazı hücreler hızlı bir oranda harab olmaya başlar ve apoptozis yolu ile ortadan kaldırılır.

Bu yöntemle hücreler ortadan kaldırılamaz ise otoimmün hastalıklar, nörodejenerasyon veya kanser gibi patolojik durumlar ortaya çıkmaktadır (16) .

Apoptotik hücreler; protein parçalanması, protein çapraz bağlanması, DNA kırılması ve fagositik tanıma gibi çeşitli biyokimyasal değişiklikler gösterirler ve bunlar belirli yapısal patolojilere yol açar (17) . Kaspazlar proteolitik aktiviteye sahiptir ve proteinleri aspartik asid residülerinden keserek parçalamaktadır. Protein çapraz bağlanması apoptotik hücrelerin diğer bir özelliğidir ve doku transglutaminazların ekspresyon ve aktivasyonu aracılığı ile başlanır. Ca^{2+} - ve Mg^{2+} - bağımlı endonükleazlar ile DNA 180 ile 200 baz çiftine parçalanır, bu parçalar ultraviyole ışığı altında agaroz jel elektroforezi ile görüntülenebilir (18) . Normalde hücrenin lipid tabakasının iç yüzünde bulunan fosfatidilserin yer değiştirerek plazma membranının dış tabakasına geçer. Fosfatidilserinin eksternalizasyonu ile apoptotik hücre yüzeyinde, tanınmasını sağlayan bir ligand oluşur. Diğer bazı proteinler de apoptotik hücre yüzeyine çıkar (19) . Bunlar Annexin V ve kalretikülidir. Annexin V fosfatidilserin bağlama proteinidir. Bu protein fosfatidilserin kalıntıları ile kuvvetli ve spesifik olarak etkileşime girer ve apoptozisin saptanmasında kullanılabilir (20) . Kalretikülin ise fagosit edilen hücrenin üzerinde bulunan LDL reseptör ilişkili proteine bağlanır ve fosfatidilserin ile birlikte sinyalizasyonda görev alır (21) .

2.2.2.1. Kaspazlar

Kaspazlar inflamatuvar cevapların aktivasyonunda, hücresel yapıların doğrudan yıkımında, hücresel metabolizmanın bozulmasında, hücre ölüm proteinlerinin inaktivasyonunda ve yıkıcı enzimlerin aktivasyonunda rol almasıyla apoptozis sürecinde önemli yer almaktadır. Kaspazların programlı hücre ölümündeki rolü ilk defa nematod solucanlarından *Caenorhabditis elegans*'daki çalışmalarla gösterilmiştir. Hücre ölüm defekt geni (CED) olan Nematod grubu solucanlarda yapılan çalışmalarda ced-3 geninin programlı hücre ölümü için gerekli olduğu gösterilmiştir. 1993'te Yuan ve arkadaşları CED-3'ün insan proteazı ICE ile yakın homoloji gösterdiğini bildirmişlerdir (12) . Daha sonraki çalışmalarda ICE'nin (şimdiki adı kaspaz-1) memeli apoptozunda merkezi rol oynadığı gösterilmiştir. CED3 ve ICE arasındaki homolojinin tanımlanmasından sonra, geniş bir aile olan memeli CED-3/ICE- benzer proteazların apoptozise yol açan yollarda anahtar rol oynadıkları gösterilmiştir. Bundan sonra bu proteazlar kaspaz olarak isimlendirilmiş ve bugüne kadar 13 memeli kaspazının apoptozis ve inflamasyondaki rolleri tanımlanmıştır (22) . Kaspazların amino asit dizilimi, yapısı ve substrat özellikleri ortaktır. Hepsi, bir N-terminal propeptit (veya prodomain), bir büyük alt grup ve bir küçük alt grup olmak üzere üç bölgeden oluşan tek proenzim zinciri ile eksprese olurlar. Kaspaz ailesi 2 gruba ayrılır: apoptozis sırasında aktive olanlar (kaspaz – 2,-3,-6,-7,-8,-9 ve -10) ve inflamatuvar cevapların aktivasyonunda rol alan ICE/kaspaz-1 ile yakından ilişkili olan (kaspaz-1,-4,-5 ve -11) kaspazlardır. Kaspazlar, birçok hücrede inaktif proenzim formunda bulunur ve bir kez aktive olduklarında proteaz kaskadının başlamasına yol açan diğer prokaspazları aktive ederler. Bir kaspazın diğer kaspazı aktive edebildiği bu proteolitik kaskat, apoptotik sinyal yolunu amplifiye eder ve böylece hızlı hücre ölümüne neden olur. Apoptoziste aktive olan kaspazlar bilinen veya hipotetik rollerine göre de apikal ve efektör kaspazlar olmak üzere 2 fonksiyonel gruba ayrılır. Apikal kaspazlar; kaspaz -2, -8, -9 ve -10, kaspaz aktivasyon kaskadının başlamasında birincil rol oynarlar. Apikal kaspaz -8 ve 10, prodomainlerinde adaptör proteinler ile etkileşimi sağlayan bir öldürücü efektör bölge (DED) taşır. Kaspaz -2 ve kaspaz -9 da ise kaspaz toplayıcı domain (CARD)

bulunur adaptör molekülün bağlanması ve efektör kaspazların aktivasyonunda önemlidir (23) . Kaspazlar spesifik olarak Asparagin (Asp) rezidüsünde tetrapeptid sekansını tanır ve parçalar. Efektör kaspazlar etkisini, hücre proteinlerinin proteolizisi ve apoptozis ile ölümüne yol açarak gösterir. En iyi karakterize edilmiş olan kaspaz substratı, DNA onarımında rol alan bir çekirdek proteini poly-(ADP-riboz) polimeraz (PARP)'dır. PARP spesifik kaspaz parçalaması için hedeflenmiş başlangıç proteinlerinden biridir (24) . Laminlerin kaspaz ile parçalanması, çekirdek büzüşmesi, sitozolik yeniden düzenlenmeye yol açan fodrin ve aktin benzeri hücre iskeleti proteinlerinin parçalanmasına yol açar (25) ,(26) . Efektör kaspazlar kaspaz - 3, -6 ve -7'yi içerir. Bu grup apoptozis sırasında hücrenin yıkımı ve dökülmesinden (*shedding*) sorumludur ve prodomainleri kısadır veya kaybolmuştur. Apikal kaspazlar ölüm sinyalleri göndererek efektör kaspazları aktive ederler (27) . Efektör kaspazlar hücre yapının doğrudan yıkımını, hücre metabolizmasının bozulmasını, hücre ölüm inhibitör proteinlerinin inaktivasyonunu ve ek olarak gelen yıkıcı enzimlerin aktivasyonunu yönetir (28) . Efektör kaspazların aktive olmasıyla sitoplazmada bulunan çeşitli endonükleazlar da bu kaspazlar tarafından aktive edilir. Efektör kaspaz 3 molekülü CAD (*caspase activated DNase*) olarak adlandırılan endonükleaz proteininin aktivasyonunu ve bu enzimin çekirdeğe girerek DNA'yı parçalamasını sağlar. DNA fragmentasyonunun gerçekleşmesiyle hücre morfolojik değişikliklere uğrar ve apoptotik cisimcikler oluşur. Kaspaz inhibitörleri apoptozisin biyokimyasal ve morfolojik özelliklerini, özellikle başlama sinyalini geri dönüşümsüz olarak etkin bir şekilde inhibe etmektedir (29) .

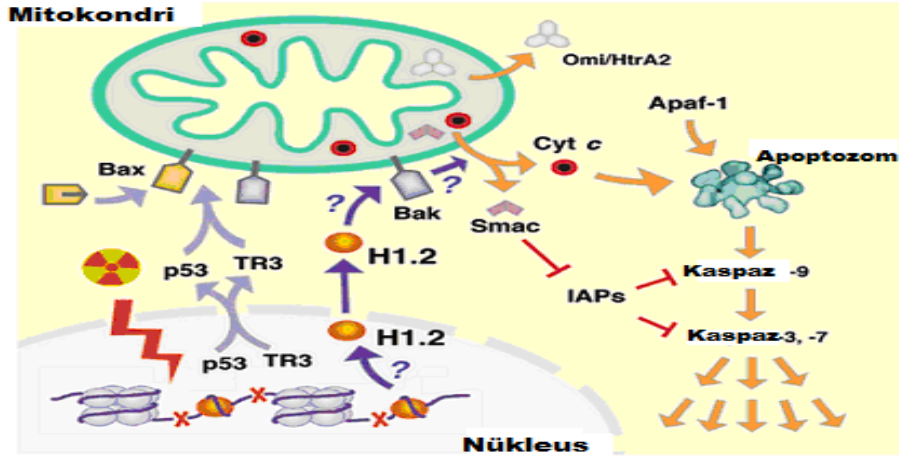
2.2.2.2. Apoptozisin Sinyal Yolakları

Apoptotik sürecin en iyi çalışılan 2 major yolağı ekstrensek ve intrinsek yolaklardır. Bu iki yolak farklı elementlere sahip olmasına rağmen her ikisi de apoptotik mekanizmanın aktivasyonuna yol açmaktadır (10,30) .

2.2.2.2.1 İntrensek (Mitokondriyal) Sinyal Yolağı

Hipoksi, genetik hasar, yüksek konsantrasyonda sitozolik kalsiyum, yoğun oksidatif stres intrensek (mitokondriyal) yolağı uyarır ve mitokondri geçirgenliğinin artmasına, sitokrom C gibi apoptojenik faktörlerin mitokondri membranlarından sitozole salınımına yol açar. Bu yolak hücre içinde başlar ve Bcl-2 ailesine ait bir grup protein tarafından regüle edilir. İntrensek yolağı regüle eden Bcl-2 ailesinin pro-apoptotik ve anti-apoptotik olmak üzere iki grubu bulunmaktadır. Pro-apoptotik proteinler Bax, Bak, Bad, Bcl-Xs, Bid, Bik, Bim ve Hrk, anti-apoptotik proteinler Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, Bfl-1 ve Mcl-1' dir. Pro-apoptotik proteinler mitokondriden sitokrom-C'nin salınımını sağlarken, anti-apoptotik proteinler bu salınımı bloke eder. Apoptozisin başlaması pro ve anti-apoptotik proteinler arasındaki dengeye bağlıdır (31) .

Sitokrom-C sitoplazmaya salındığında sitokrom-C, apoptotik proteaz aktive eden faktör-1(apaf-1) ve kaspaz-9'u içeren apoptozom oluşur ve kaspaz-3'ü aktive eder. Diğer pro-apoptotik proteinler olan ikinci mitokondri kökenli kaspaz aktivatörü / düşük pI ile doğrudan IAP bağlanma proteini (Smac/DIABLO), serin proteaz Omi/HtrA2, endonükleaz G (Endo G) apoptozis indükleyici faktör (AIF) (31) mitokondriyal membranlar arası boşluktan sitoplazmaya salınırlar. Smac/DIABLO veya Omi/HtrA2 apoptozis inhibitör proteinine (IAPs) bağlanır, IAPs'ın kaspaz-3 veya kaspaz-9 ile bağlantısının kopmasına neden olarak kaspaz aktivasyonuna yol açar. Radyasyon çift sarmal DNA kırıklarına yol açmaktadır. Mekanizması henüz bilinmese de Bak, sitokrom C ve diğer Smac/DIABLO gibi proapoptotik proteinlerin salınmasını aktive ettiğinde H1.2 histon bağlantısı nükleustan mitokondriye geçer (31) . Sitokrom C apoptozom oluşumu ve kaspaz 9 aktivasyonuna neden olurken, SMAC/DIABLO IAP aracılı kaspaz inhibisyonunu ortadan kaldırır. Şekil 2.2.2.2.1'de sinyal basamakları gösterilmiştir.



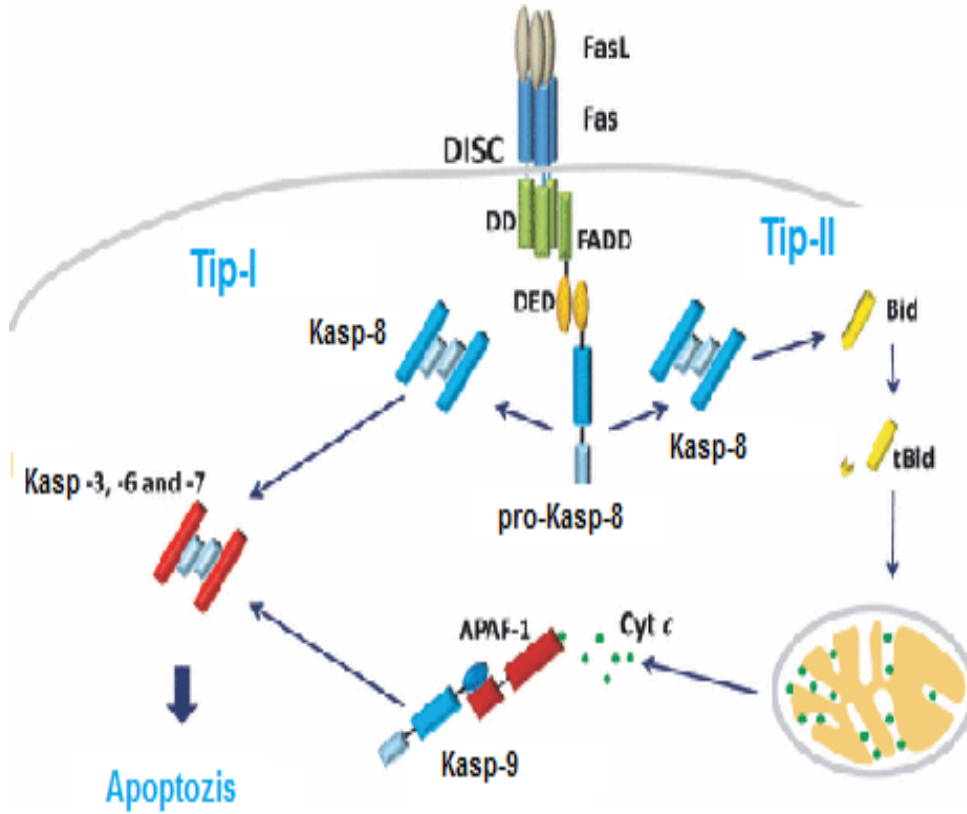
Şekil 2.2.2.2.1 Mitokondri aracılı apoptoziste sinyal kaskadı

(sinyal basamakları; mitokondriden önce mavi, mitokondri içinde turuncu olarak gösterilmiştir. Anti-apoptotik Bcl-2 ve Bcl-xL'de mitokondrinin dış membranında yer almaktadır, şekilde gösterilmemiştir) (32)

2.2.2.2.2 Ekstresek (Ölüm Reseptör Aracılı) Sinyal Yolağı

Tip 1 ve tip 2 ekstresek sinyal yolağı; tümör nekrozis faktör (TNF) reseptör süper ailesine ait hücre yüzey ölüm reseptörlerinin ekstraselüler sinyaller tarafından uyarılmasıyla başlar (33) , (34) . Fas (CD95 veya Apo1) ve TNFR1, sitoplazmik ölüm domainlerine (Fas-L-, TNF α -, Apo3L-, Apo2L- Apo2L-) sahiptir ve ölüm reseptörleri (FasR, TNFR1, DR3, DR4, DR5) içeren adaptör proteinlere bağlanırlar. Fas ligandın trimerik Fas'a bağlanmasıyla başlatılan sinyal iletimi adaptör molekülünden FADD'ın bu komplekse bağlanmasını sağlar. Yine sitoplazmada bulunan ve inaktif durumda olan prokaspaz 8 ya da 10 FADD'ye bağlanır ve ölüm sinyal kompleksi (DISC) oluşmasına neden olarak prokaspaz 8 veya 10'un oligomerizasyon ve enzimatik aktivasyonunun ortaya çıkmasına yol açar. Tetramer yapıdaki kaspaz 8 veya 10 oluşarak kaspaz kaskadı başlatılır. Kaspaz 8 veya 10'un sitoplazmada bulunan prokaspaz 3,6 veya 7'yi aktive etmesiyle tip 1 ölüm reseptör aracılı yolağın son basamağı oluşur. Ekstresek yolak intresek yolaktan gelen ölüm sinyalleri ile de beslenir(35) . Tip 2 ekstresek yolakta ise; aktive edilen kaspaz 8 tarafından pro-apoptotik BH3-only BCL-2 ailesinin üyesi Bid kesilir ve aktif formu (tBid) ortaya çıkar. Kesilmiş olan Bid pro-apoptotik multi-domain Bax ve Bak proteinlerinin mitokondriyal membranlara bağlanmasını bozarak mitokondriyal

geçirgenliği artırır. Ölüm reseptörlerinin bağlanması ölümden başka cevapları da uyarır. Fas stimülasyonu aynı zamanda transkripsiyon faktör NF- κ B ve mitojen aktive protein kinazlar (MAPK), p38 ve ERK1/2'yi aktive eder. Bu sinyal yollarının aktivasyonu ölüm sinyallerini dengeler (35) .



Şekil 2.2.2.2.2 Ekstresek yolak (36)

2.2.2.3 İmmün Homeostazis

Apoptozis immün homeostaziste önemli rol oynar. Apoptotik mekanizmalar T ve B hücre gelişimi, T ve B hücre repertuarının oluşturulması ve periferde immün cevapların oluşmasını sağlayan işlemlerin regülasyonunda, immün toleransta yer alır. Lenfosit gelişimi sırasında her hücre antijen spesifitesini sağlayabilmek için özgül antijen reseptörlerini oluşturmaktadır. Lenfosit gelişimi sırasında antijen

reseptör T hücre reseptörü (TCR) veya sekretuar immunglobulin (sIg) düzenlenmesi, TCR veya sIg pozitif veya negatif seçimi başarısız olduğunda, hücreler apoptozis ile ortadan kaldırılır (6) . Apoptozis; T ve B hücre sayılarının, T hücre hafızasının oluşturulmasının kontrolünde çok önemlidir. İmmün cevap sırasında antijen spesifik lenfositler çoğalmakta, T lenfosit cevapları sırasında lenfosit popülasyonu 1000 kat kadar artmaktadır. Antijenin eliminasyonundan sonra antijene cevap veren hücrelerin çoğunun yok olduğu kontraksiyon fazı oluşmaktadır. Bu kontraksiyon fazı büyük ölçüde aktive olmuş hücrelerin apoptozu ile olmaktadır. Cevabın maksimuma çıkmasından sonra kontrollü apoptozis ile homeostazis oluşmaktadır. Böylece immün sistemde homeostazis yapım ve yıkım arasındaki denge ile kontrol edilmektedir. İmmünolojik sistemde hücre proliferasyonu ve programlı hücre ölümü denge içindedir. Apoptozis koruyucu immün cevabı sağlamak ve neoplazi ve otoimmüniteyi önlemekte kritik öneme sahip bir mekanizmadır (6) .

Apoptozisin immün homeostazdaki önemli rolünün ortaya çıkışı immün sistemde apoptozisle ilgili bozuklukların belirlenmesi apoptoz defektlerinin tanımlanmasına ışık tutmuştur. Bu hastalıklar lenfoproliferasyon, otoimmünite ve kanser riski artışı ya da enfeksiyon riskinin artışı ile ortaya çıkabilmektedir (37) . Bu hastalıklardan ilk tanımlanan lenfosit apoptozisinin ekstrensek yolağındaki genetik defektler nedeniyle oluşan otoimmün lenfoproliferatif sendromdur (ALPS)(38),(39) . Daha sonra apoptozisin intrinsek yolağını etkileyen RAS (Rat sarkoma ailesi) proteinleri (KRAS ve NRAS) ile ilişkili ALPS özellikleri ile benzerlik gösteren hastalıklar tanımlanmıştır (40- 42) .

2.2.2.4 Apoptozisin Düzenlenmesi

Tüm metazoalar ve protozoalar da apoptotik hücre ölümü mevcuttur (43) . Defektif, hasarlı veya organizmanın bütünlüğünü bozacak bir tehditte hücre veya protozoalarda koloni kendini feda eder. Normal veya patofizyolojik süreçler sırasında birçok uyarıcı apoptozisi uyarır (44) ,(39) . Reseptör agonistleri gibi spesifik uyarıcılar dışında intraselüler ve ekstraselüler stres gibi uyarıcılar da intrinsek apoptotik yolağı aktive etmektedirler (39) , (45) . Bu uyarıcılar çeşitli

kemoteropatik ajanlar, ısı ve osmolarite değişiklikleri, DNA zedelenmesine yol açan ajanlar, serbest radikaller (H_2O_2), besin, oksijen veya büyüme faktörü kayıpları, proinflamatuvar sitokinler gibi fizikokimyasal stresler ve de yaşlanma ve büyüme gibi normal fizyolojik süreçlerdir (39) ,(46) .

Strese cevap olarak ortaya çıkan süreç hala tamamen anlaşılmamıştır. Stres pro-apoptotik Bcl-2 ailesi proteinleri olan Bax veya Bak aktivasyonuna yol açmaktadır (47) . Aktive Bax mitokondride toplanır ve sitokrom-C gibi pro-apoptojenik faktörlerin salınımını sağlamak için porlar oluşturur, sitokrom-C'nin ortama katılması ile apoptozom oluşur. Bu oluşum ile intrensek apoptotik sinyal kaskadı başlatılır aynı zamanda hücre ölümüne yol açan başlangıç ve efektör kaspazlar aktive edilmektedir. Uyaranlarla ortaya çıkan reaktif oksijen ürünleri (ROS) bu süreçte temel rol üstlenir(48) ROS terimi süperoksit anyon (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) , serbest hidroksil radikalleri (OH) , nitrik oksit (NO) aynı zamanda bazı ROS kombinasyonları (NO ve O_2^-) ve peroksinit ($ONOO^-$) gibi birçok farklı fizyolojik molekülleri kapsar (49) . Farklı uyaranlar farklı ROS türlerinin oluşumuna yol açar ve bu da farklı cevaplar verilmesine neden olur. Strese karşı oluşturulan cevabın düzeyi mitokondrideki hasarın seviyesini belirler. Yağlar, proteinler ve mitokondrinin kendisi gibi birçok hücresel bileşendeki zedelenme sonucu oluşan uyarılar ile farklı apoptojenik faktörlerin salınımına yol açmaktadır (50) . ROS gibi sfingolipid ve seramid de pro-apoptotik olarak kritik rol oynamaktadır. Seramid pro-apoptotik ikincil habercidir ve çeşitli stres durumlarında düzeyi artmaktadır ancak apoptozisteki etki mekanizması tam olarak bilinmemektedir (51) .

Apoptozisin baskılayıcıları iyi tanımlanmış üç anti-apoptotik aile içinde yer almaktadır. Bu üç aile; FLICE-inhibitör proteinleri, Bcl-2 ve Apoptozis İnhibitör Ailesi (IAP)'dir. Bugüne kadar insanda 6 IAP (NAIP, c-IAP1/HIAP-2, c-IAP2/HIAP-1, XIAP/hILP, Survivin ve BRUCE) tanımlanmıştır (52) . Memelilerde IAP'ların apoptozisin her iki major yolağı ve sitokrom-C bağımsız Apafs (Apoptotik proteaz aktive eden faktörler) yolağında rol oynadığı gösterilmiştir. Ekstresek hücre yüzeyi ölüm reseptörleri yolağında IAP'lar kaspaz-3 ve kaspaz -7'yi bloke ederek kaspaz-8'in apoptozu başlatmasını durdurur. Apafs yolağında IAP'lar; prokaspaz-9

ile doğrudan etkileşim sonucu Apaf-1 bağlanması ile yarışır ve aktive kaspazları doğrudan inhibe ederler. Bcl-2 Bax'ı antagonize ederek sitokrom-C'nin salınımını önler. Apaf-1 Sitokrom-C ve dATP ile bağlandığında apoptozomun oligomerik protein formu oluşur. Bcl-2 aynı zamanda intrinsek yolda uygun olmayan apoptozun önlenmesinde negatif regülatör olarak rol oynar. FLIPs (FLICE İnhibitör Proteinler) ekstrinsek yolağın inhibitörleri olarak yer almaktadır. FLIP'ler kaspaz-8 ile aynı DED domaine sahiptir ve kaspaz-8'in aktivasyonunu inhibe ederek aktive reseptöre bağlanmasını önler (53) .

Anti-apoptotik protein AAC-11(Antiapoptotik klon-11) büyüme faktörü yoksunluğunda apoptozu önler. AAC-11 nükleer bir proteindir Api (Apoptosis inhibitör-5) veya FIF (Fibroblast growth factor-2 interacting factor) olarak da adlandırılır. Yakın zamandaki çalışmalar AAC-11'in anti-apoptotik fonksiyonunu E2F1 transkripsiyon faktörünü baskılayarak gerçekleştirdiğini göstermiştir (54) .

2.2.2.5 Perforin/ Granzim Yolağı

Perforin membranda zedelenme oluşturan bir proteindir, serin proteaz ailesi (granzim) ile birlikte litik granüller grubunu oluşturur. Lizis süreci sitotoksik T hücrelerde (CTL) geniş bir şekilde çalışılmıştır, TCR ve uygun MHC sınıf I peptid varlığında CTL ile hedefi arasında sinaptik bir yapı oluşur (55) . Litik granüller mikrotübül yolundan mikrotübül organize merkezine doğru hareket ederek sinapslarda yerleşirler. Bu süreç litik granüllerin CTL-hedef hücre yüzeyinde salınımına yol açar. Perforinin fonksiyonu hedef hücre membranı, plazma membranı veya lizozomal membranın yapısını bozmaktır. Litik lizozom hedef hücreye girmeye başladığında granzimler hücre ölümünü başlatır. Granzimin fonksiyonu proteaz kaskadını başlatmak veya doğrudan substratları parçalamaktır. Serin proteaz Granzim A ve Granzim B granül grubunun en önemli iki bileşenidir. Granzim B'nin önemli bir substratı olan pro-apoptotik protein Bid (BH3-ölüm agonisti ile etkileşimli domain) sitokrom-C gibi mitokondriyal aracılı hücre ölüm medyatörlerini indükler (55) .

Granzim A apoptozisi uyaran ve kaspaz bağımsız yolu aktive eden sitotoksik T hücrelerinde önemlidir. Bir hücrede Granzim A, DNA çentiklemesini bir tümör süpresör gen ürünü olan DNAaz NM23-H1 aracılığı ile aktive eder (56) . Nükleozomda toplanan endoplazmik retikulum ilişkili (SET) proteinler, normal olarak NM23-H1 genini inhibe eder. Granzim A proteaz SET kompleksini parçalar, böylece NM23-H1'in inhibisyonu ortadan kalkar ve apoptotik DNA parçalanması ortaya çıkar (57) .

2.2.3. Tip 2 Programlı Hücre Ölümü (Otofaji)

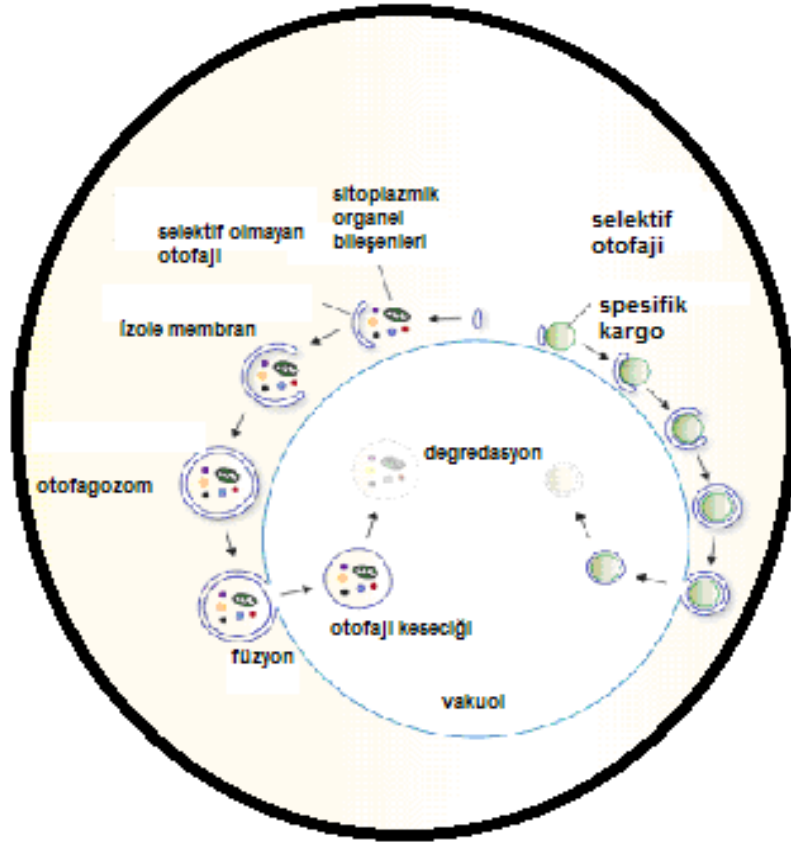
Otofaji, kelime anlamı olarak kendi kendini (auto) yeme (phagy) anlamına gelir ve hücrenin açlıkla karşılaştığı koşullarda, besin elde edilmesi için hücre yapılarının parçalandığını ifade etmek amacı ile kullanılmıştır. Yapılan ilk çalışmalarda otofajinin, besin yokluğunda hücre içi moleküllerin geri dönüşümünü sağlayarak hücrenin stres ortamına uyumuna yardım ettiği böylelikle hücre homeostazisinin korunmasında etkili bir yol olduğu gösterilmiştir (58) . Açlık durumlarındaki önemi dışında otofajinin başka rolleri de mevcuttur. Bazı çalışmalar otofajinin organellerin ortadan kaldırılmasında örneğin, mitokondrilerin ortadan kaldırılmasında (mitofaji) rol aldığını düşündürmektedir. Son on yılda yapılan çalışmalarda ise otofajinin; metabolizmanın düzenlenmesi, morfogenezis, hücre farklılaşması, yaşlanma, hücre ölümü ve bağışıklık sisteminin bir parçası olarak hücre içi patojenlerin yıkımında da etkili bir rol oynadığını ortaya koymuştur (59) . Ayrıca araştırmalar, otofaji anormalliklerinin, kanser, enfeksiyon hastalıkları ve nörodejeneratif hastalıklar gibi önemli sağlık sorunlarının nedenleri arasında da yer aldığını göstermektedir (60) . Çeşitli organizmaların hücre ve dokularında yapılan morfolojik analizler, gelişim sırasında ölen hücrelerde otofajik etkinliğin artmış olduğunu ortaya çıkarmıştır. Tip II programlı hücre ölümü olan otofajik hücre ölümünde en belirgin morfolojik değişiklik, sitoplazmada oluşan iki veya daha fazla katmanlı zarla çevrili keseciklerin oluşmasıdır. Bu kesecikler sitoplazma parçaları ve/veya mitokondri, endoplazmik retikulum (ER) gibi organelleri içerirler. Otofaji keseciklerinin lizozom ile birleşmesi içlerinde taşıdıkları yüklerin lizozomal enzimler tarafından parçalamasına yol açar. Bu hücre için hayati önem taşıyan bazı

proteinlerin ve mitokondri gibi enerji metabolizmasında rol oynayan organellerin yıkımı ile sonuçlanır. Apoptozun mümkün olmadığı durumlarda, uyarıcının türü, süresi ve miktarı gibi değişkenlere bağlı olarak, otofajinin hücre ölümüne doğrudan ya da dolaylı olarak yol açtığı birçok araştırmacının ortak fikridir (61) .

Otofaji mekanizmalarında rol oynayan proteinler (otofajik proteinler ya da kısaca ATG proteinleri) maya hücreleri üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda bulunmuş ve günümüzde 30'dan fazla ATG geni tanımlanmıştır. Otofaji ile ilgili proteinlerin çoğu, otofajik zarların oluşumunda ve bunların uzayarak kesecik haline gelmesinde görev yapmaktadır. Otofagozomun (hücrenin herhangi bir organelini sindirerek tekrar kullanmak üzere primer lizozomlarla birleşmesi sonucu oluşan yapı) daha sonra geç endozom veya lizozomla birleşmesi taşıdığı kargonun parçalanmasına yol açar. Lizozomal enzimler tarafından kargonun yıkımı sonrasında, kargodan (proteinler, organeller vb.) ortaya çıkan yapıtaşları (aminoasitler, yağ asitleri, vb.) tekrar kullanılmak üzere hücreye kazandırılır (62) ,(63) .

Otofaji; makrotofaji, mikrotofaji ve şaperon aracılı otofaji şeklinde en az üç farklı mekanizma ile gerçekleşmektedir. Bunlardan makrotofaji, pek çok hücrede bazal düzeyde oluşmakta, protein parçalarının ve hasar görmüş organellerin parçalanmasında en önemli rolü üstlenmektedir. Mikrotofaji, lizozom membranının içe çökmesi ile sitoplazmanın lizozom tarafından doğrudan yenilmesi ve içeriğinin lizozom içinde hazmedilmesidir. Şaperon aracılı otofaji ise KFERQ motifli proteinlerin lizozom zarına seçici biçimde taşınmasını sağlamaktadır (63) (Şekil 2.2.3) .

Otofaji, apoptozdan çok farklı morfolojik ve moleküler özellikler taşımaktadır. Otofajik hücre ölümünde, kromatin yoğunlaşması gibi çekirdeğe özgü değişiklikler apoptotik hücre ölümüne nazaran çok daha sonra olmaktadır. Ölüm, kaspaz etkinliğine bağımlı olmadığından, DNA merdivenleri ve apoptotik cisim oluşmaz. Ayrıca, otofajide ölü hücrelerin fagositoz ile temizlenmesi apoptozda görüldüğünden çok daha geç ve düzensiz bir biçimde olmaktadır (9) ,(61) . Anti-apoptotik proteinlerden olan Bcl-2 ve Bcl-XL proteinleri apoptoz gibi otofajiyi de inhibe edebilmektedirler (64) .



Şekil.2.2.3. Otofagozom Oluşumu (65)

2.2.4. Tip 3 Hücre Ölümü (Nekroz)

Nekrozis başlangıçta katastrofik, istenmeyen, programsız bir ölüm şekli olarak düşünülmüştür. Uzun yıllar homeostazis ve hastalıklarda rol oynayan programlı hücre ölümünün tek formu apoptozis olarak kabul edilirken nekroz düzensiz ve kontrol edilemez bir süreç olarak kabul edilmiştir. Son zamanlardaki bulgular nekrotik ölümün de genetik ve regüle edilebilen bir işlem olduğuna işaret etmektedir (66) . Nekroptozis hücre ölüm reseptör aracılığı ile ortaya çıkan kaspaz bağımsız, regüle edilen ve morfolojik olarak nekroza benzeyen bir ölüm şekli olarak tarif edilmektedir. Nekroptozis gelişim gibi fizyolojik süreçlerde ve apoptotik yolak

bloke edildiğinde görülmektedir. Nekroptozisin, otofajik hücre ölümü gibi temel apoptotik yolak defektif olduğunda hücre ölümü için ortaya çıkan bir destek sistemi olduğu ifade edilmiştir. Otofajik (kalpain aktivasyonu ile) ve mitokondriyal (Ca^{++} artışı ile) ölüm yollarının çapraz aktivasyonu da nekrotik hücre ölümüne katkıda bulunabilir. Nekroptozis hem eksternal hem de ER kaynaklı ATP düzeylerinin azalması ve Ca^{++} düzeylerinin artışı ile ortaya çıkar. Ca^{++} artışı kalpainleri aktive ederek lizozomal parçalanmaya, katepsinler gibi protezların aktivasyonuna ve salınımına yol açar ve hücre yok edilir (67) ,(68) . Nekrotik hücre ölümünün mayalarda ve memeli hücrelerinde yaşlanmada önemli bir rol oynadığı yakın zamanda gösterilmiştir. Klinik olarak nekroptozis özellikle hasar görmüş beyin hücrelerinde olmak üzere iskemiye giden tüm doku ögelerinde görülür. Nekroptoz özellikle, iskemik zedelenme, nörodejenerasyon ve viral enfeksiyonlar gibi hastalıkların patogenezinde rol alır. Nekroptozis, kaspazlardan bağımsız olarak tümör nekrozis faktör reseptörü (TNFR) ve Fas ligand aktivasyonu ile başlar. Programlı olarak gerçekleşir ancak morfolojik olarak nekroza benzer (68) . TNFR1 gibi ölüm reseptörleri; RIPK-1 (*Receptor-interacting protein kinase 1*) ve RIPK-3 (*Receptor-interacting protein kinase 3*) kinazlarının aktivitesine ihtiyaç duyar. Mitokondriyal, lizozomal ve plazma membranlarının disintegrasyonu bu süreci aktive eder (69) .

2.3. Diğer Hücre Ölüm Mekanizmaları

Apoptozis, Nekroptozis/Nekroz ve otofajinin dışında Paraptozis, Anoikis, Kornifikasyon, Mitotoik Katastrofi, Piroptozis, Pironekrozis ve Entozis olmak üzere diğer hücre ölüm mekanizmaları da tanımlanmıştır.

2.3.1 Paraptozis

Bu terim apoptozisten morfolojik ve biyokimyasal olarak farklı bir programlı hücre ölümü olarak ortaya konulmuştur. Paroptozis çeşitli hücre tiplerinde ILGF-1 (insülin like growth factor receptor 1) ekspresyonu ile tetiklenir. Yaygın sitoplazmik

vakuolizasyon ve mitokondriyal şişme mevcuttur ancak apoptozun diğer morfolojik özelliklerini göstermez. Paroptozis kaspaz inhibitörleri veya antiapoptotik Bcl-2-benzeri proteinlerin ekspresyonunda artış ile önlenememektedir. Mitojen aktive protein kinaz ailesinin spesifik üyelerinin rol aldığı sinyal kaskadları ile ortaya çıkmaktadır (70) .

2.3.2. Anoikis

Anoikis, yetersiz ya da düzensiz integrin aracılı hücre-matriks etkileşimleri ile indüklenen apoptoz olarak tanımlanır. Yunan dilinde evsiz anlamına gelmektedir. Hücre onu destekleyen matriks yapısından ayrılır ve diğer hücrelerle bağlantısı kaybolur. Apoptotik bir hücre ölüm şeklidir (68) .

2.3.3. Mitotik Katastrofi

Mitotik hatalar sırasında veya takip eden dönem içinde ortaya çıkan bir ölüm şeklidir. Bu terimin kullanılması üzerinde tam bir anlaşma yoktur. Mitotik katastrofi apoptotik morfoloji veya nekrozise yol açar. Dolayısıyla “multinükleosyondan önce ortaya çıkan ölüm” ifadelerinin kullanılmasının daha doğru ve daha bilgi verici olduğu bildirilmiştir (70) .

2.3.4. Piroptozis

Bu ölüm yolağı Salmonella ve Shigella suşları ile enfeksiyonda aktive olur. Piroptozis kaspaz-1 bağımlıdır . Kaspaz-1 apoptotik hücre ölümünde yer almaz ve kaspaz-1 eksikliğinde hücre birçok apoptotik sinyale normal cevap verir. Kaspaz-1’in önemli bir fonksiyonu inflamatuvar sitokinler olan IL-1 ve IL-18’in aktif formlarına dönüş sürecinde yer almasıdır. Salmonella veya Shigella ile enfekte makrofajda kaspaz-1’in aktivasyonu sonucu bu sitokinler süreci başlatır ve konak hücresi ölür. PAMP (Patojen asosiye moleküler pattern) , PRR (Patern tanıyıcı reseptörler) ve DAMPs (hasar asosiye moleküler pattern) gibi doğal immünite bileşenleri bu süreçte rol oynar. Proinflamatuvar hücre ölümünü tarif etmek üzere yunan kökenli ateş veya yangın anlamına gelen “pyro” ve dökülmeyi tarif eden “ptosis” tanımları kullanılmıştır. Yapılan çalışmalar kaspaz-1 aktivasyonu veya

kaspaz-1'e bağılı hücre ölümünün immün sistem, merkezi sinir sistemi ve kardiyovasküler sistem gibi farklı biyolojik sistemlerde önemli bir role sahip olduğunu göstermiştir (68) .

2.3.4 Pironekrozis

Bu terim *Shigella flexneri* ile infekte makrofajlarda görülen nekrotik hücre ölümünü tarif etmek için tanımlanmıştır. Pironekroz sürecinde; pattern tanıyıcı reseptör NALP3 ve apoptozis regülatör protein ASC [apoptozis-associated speck-like protein containing a CAR] ve HMG-1 [high mobility group box-1], kaspaz-1 ve IL1-beta rol alır. Pironekrozisin piroptozisten farkı piroptozis için kaspaz1'in gerekli olması, pironekrozis için gerekli olmamasıdır. Piroptozis ve pironekrozisin innate immün sistem dışında rolü henüz bilinmemektedir (68) .

2.3.5. Entozis

Entozis, ilk kez Huntington hastalarının lenfoblastlarında hücre kanibalizm olarak tanımlanmış olan non-apoptotik yeni bir hücre ölüm şeklidir. Memeli epitel hücrelerinde sık görülür. Hücre onu destekleyen matrix yapısından ayrılır. Fagositik olmayan mekanizmalarla (Ro GTPaz ve Rock) bir hücre komşu hücrelerden birisini içine alır. İçeri alınan hücre fagozomu içinde lizozomal yıkımla ortadan kalkar. Nadiren içeri alınan hücre; içine alan hücre içinde çoğalır veya dışarı salınır (68) .

2.4. Otoimmün Lenfoproliferatif Sendrom (ALPS)

ALPS, apoptozisde görev alan çeşitli moleküllerdeki bozukluklar sonucu oluşan kronik ve malign olmayan bir lenfoproliferatif hastalıktır.

Hastalık ilk olarak 1967 yılında Virginia Canale ve Carl Henry Smith tarafından tanımlanmıştır ve Canale-Smith sendromu olarak da bilinir (71) . Bugüne kadar 400 den fazla hasta tanımlanarak bildirilmiştir (72) .

Hastalığın en sık görülen klinik bulguları kronik seyirli lenfadenopati, splenomegali ve tekrarlayan veya kronik otoimmün sitopenidir. Bugüne kadar tanımlanan hastaların hepsinde lenfadenopati ve/veya splenomegali görülmüştür. Periferik

lenfadenopati dışında, torasik ve abdominal lenf nodlarında da büyüme olabilir(73), (74) . Hastalarda klinik bulgular erken çocukluk döneminde ortaya çıkmaktadır. Semptomların başlama yaşı tipik olarak yaklaşık 24 aydır, ancak daha erken dönemde de ortaya çıkabilmektedir. Kronik splenomegali vakaların büyük bir çoğunluğunda mevcuttur. Hepatomegali ise tanımlanan hastaların yaklaşık %45’inde bildirilmiştir (75) .

ALPS’de en sık görülen otoimmün hastalıklar hemolitik anemi, trombositopeni ve nötropenidir. Guillian-Barre sendromu, glomerulonefrit ve üveit gibi otoimmün hastalıklar da bildirilmiştir (76) . Hastalarda hematolojik malignansi gelişme riski yüksektir. Genel popülasyona göre, ALPS hastalarında Hodgkin lenfoma görülme riski 50 kat, non-Hodgkin lenfoma riski ise 14 kat artmıştır. Lenfoma genellikle adölesan dönemden sonra ortaya çıkmaktadır (77) .

2.4.1 ALPS Tanı Kriterleri

Hastalık için kesin tanı kriterlerini 6 aydan fazla devam eden enfeksiyöz veya malign olmayan kronik lenfadenopati, splenomegali ve DNT hücre sayısının artışı; birincil destekleyici kriterleri defektif lenfosit apoptozisi, FAS, FASL,CASP10 mutasyonu, ikincil destekleyici kriterleri ise aile hikayesi, tipik lenf nodu histopatolojisi, otoimmün sitopeni ve Ig yüksekliği oluşturmaktadır. Kesin tanının koyulabilmesi için defektif olan gendeki mutasyonun gösterilmesi gerekir. (Tablo 2.4.1.2, 2.4.1.3). 2009 yılında Amerika Ulusal Sağlık Enstitüsü (NIH-“*National Institute of Health*”) tarafından yapılan çalıştayda daha önce tip 0 – tip III olarak adlandırılan ALPS tiplerinin yenilenen sınıflandırmada defektif olan molekülün adının kullanılması kararlaştırılmıştır (3) (Tablo 2.4.1.1).

Tablo 2.4.1.1 Eski ve Yeniden Düzenlenen ALPS Sınıflandırması

Önceki Sınıflandırma	Yeniden Sınıflandırma	Etkilenen Gen	Tanım
ALPS Tip 0	ALPS-Fas	FAS	Hastalar ALPS tanı kriterlerinin hepsini taşır ve homozigot FAS mutasyonu vardır.
ALPS Tip Ia	ALPS-Fas	FAS	Hastalar ALPS tanı kriterlerinin hepsini taşır ve heterozigot FAS mutasyonu vardır.
ALPS Tip Im	ALPS-sFas	FAS	Hastalar ALPS tanı kriterlerinin hepsini taşır ve somatik FAS mutasyonu vardır.
ALPS Tip Ib	ALPS-Fas-ligand	FASLG	Hastalar ALPS tanı kriterlerinin hepsini taşır ve FAS ligand mutasyonu vardır.
ALPS Tip II a	ALPS-CASP10	CASP 10	Hastalar ALPS tanı kriterlerinin hepsini taşır ve CASP 10 mutasyonu vardır.
ALPS Tip III	ALPS-U	BİLİNMIYOR	Hastalar ALPS tanı kriterlerini taşımasına rağmen genetik defekt tanımlanmamıştır. (FAS, FASL, CASP10'da genetik defekt yoktur.)

Tablo. 2.4.1.2 ALPS'de Kesin Kriterler

Kesin kriterler
Kronik, malign olmayan lenfadenopati ve/veya splenomegali
Artmış DNT hücre sayısı (DNT hücrelerinin Total lenfositlerin % 1,5'unu veya daha fazlasını veya CD3+ lenfositlerin %2,5'unu veya daha fazlasını oluşturmaları)

Tablo. 2.4.1.3 ALPS'de Destekleyici Kriterler

Birincil destekleyici kriterler	İkincil destekleyici kriterler
Lenfosit apoptozisinin bozuk oluşu	Plazma Fas-ligand, IL-10, vitamin B12 ya da IL-18 düzeylerinin yüksek oluşu
FAS, FASL ya da CASP 10 mutasyonu	Tipik immün-histolojik bulgular
	Otoimmün sitopeni ve serum IgG düzeyinin yüksek oluşu
	Aile hikayesi (malign olmayan lenfoproliferasyon)

Kesin tanı için; kesin kriterlerden her ikisini ve birincil destekleyici kriterlerden bir kriteri taşınmalıdır. Muhtemel tanı için; kesin kriterlerden her ikisini ve ikincil destekleyici kriterlerden bir kriteri taşınmalıdır.

2.4.2 ALPS'lu Hastaların Klinik Özellikleri

ALPS nadir görülen bir hastalık olup ırk ve cinsiyet farkı göstermemektedir. Görülme yaş ortancası 24 aydır, ancak erişkin yaşta tanı alan vakalarda mevcuttur (74) . Başlıca klinik bulguları lenfoid hücre proliferasyonu, lenfadenopati ve splenomegali oluşturmakta ancak diğer asosiy klinik özellikler de bulunmaktadır (76) (Tablo.2.4.2.3).

2.4.2.1 Lenfoproliferasyon

ALPS’de lenfoproliferasyon klinik olarak lenfadenopati, splenomegali veya hepatomegali şeklinde ortaya çıkmaktadır. ALPS tanısı için kronik lenfoproliferasyon 6 aydan uzun süreli olmalıdır. Eğer izole lenfadenopati varsa 2 farklı bölge nodunu etkilemiş olmalıdır (3) . Neoplastik ve enfeksiyöz etyoloji dışlanmalıdır. Hastaların %80’inden fazlasında, hassas olmayan kronik lenf nodu büyüklüğü vardır (78) . Splenomegali hastaların %85’inde mevcuttur, genellikle masif ve hayat boyu kalıcıdır. Hepatomegali de ALPS’de görülebilen özelliklerdendir (79) .

2.4.2.2 Otoimmünite

Otoimmünite ALPS hastalarında ikinci sıklıkta görülen klinik bulgudur. Otoimmünite hastaların %70’inden fazlasında kan hücrelerini etkiler (79) . Direk Coombs pozitif otoimmün hemolitik anemi (OHA) ve immün-aracılı trombositopeni (ITP) en sık görülen otoimmün bulgulardır. Otoimmün nötropeni daha az görülür. Hastalarda çoklu sitopeni de görülebilmektedir (80) .

2.4.2.3 Malignite

ALPS’lu hastalarda malign hastalıkların görülme riski yüksektir. %10-20 arasında olduğu belirtilmektedir. Hastalarda genelde lenfoma gelişir ancak lösemi ve solid organ tümörleri de bildirilmiştir. Aile bireylerinde de kanser riski artmıştır. Çok merkezli bir çalışmada ALPS-FAS grubunda olanların genel topluma göre Non-Hodgkin Lenfoma (NHL) gelişme riskinin 14 ve Hodgkin Lenfoma (HD) gelişme riskinin 50 kat arttığı belirlenmiştir (77) . Lenfoma genelde B hücre kökenlidir ve HD, Burkitt’s lenfoma, foliküler B lenfoma ve T hücreden zengin B hücre lenfoma alt tipleri olarak görülür. ALPS’lu hastalarda ateş, kilo kaybı, halsizlik gibi genel semptomlar görülmez. Eğer bu semptomlar mevcutsa, enfeksiyonları veya malign hastalıkları ekarte etmek için ileri çalışmalar yapılmalıdır. Tekrarlayan enfeksiyonlar sık değildir. ALPS’lu hastaların bir alt grubunda (%5 ile 10) yaygın değişken immün

yetmezlik (CVID) fenotipi bulunmaktadır (81) . Tablo 2.4.2.3'te 62 hastayı kapsayan bir çalışmada belirlenen klinik bulguların sıklıkları verilmiştir (76) .

Tablo 2.4.2.3 ALPS Tanısı Alan 62 Hastanın Klinik Bulguları ve Sıklıkları

Klinik bulgular	Vaka ve görülme sayısı	Yüzdesi(%)
Lenfoid hücre proliferasyonu	62	100
Lenfadenopati	54	87
Splenomegali (+/- hipersplenizm)	56	90
Splenektomi	20	32
Hepatomegali	28	45
Otoimmün hemolitik anemi	33	53
Otoimmün trombositopeni	27	44
Otoimmün nötropeni	19	31
Glomerulonefrit	5	8
Otoimmün hepatit	4	6
Gullian-Barr sendromu	3	5
Üveitis (+/- iridosiklit)	3	5
Lenfoma	9	15
Karsinom (tiroid, meme, cilt, dil, karaciğer)	6	10
Multipl neoplazik lezyon(tiroid adenomu, meme adenomu, gliom)	1	2
Ürtiker ve Cilt döküNDüsü	1	2
Vaskülit	1	2
Pannükilit	1	2
Artrit-artralji	4	6
Tekrarlayan oral ülser	1	2
Aplastik Anemi	1	2
Pulmoner infiltrasyon	2	3
Prematür ovaryan yetmezlik	1	2
Hidrops fetalis	2	3
Mental durum değişikliği, nöbet, başağrısı	1	2

2.4.2.4 Patolojik Özellikler

ALPS'da görülen en önemli patolojik bulgu lenf nodüllerinin parakortikal T hücre bölgesinde DNT hücrelerinin artmış olarak bulunmasıdır. Hastadan hastaya bu hücrelerin yaygınlığı değişiklik gösterir. Parakorteksteki T hücreler bu şekilde anormal bir fenotip gösterirken, germinal merkezdeki T hücreler normal fenotip göstermektedirler (82) .

2.4.2.5 Hematolojik Özellikler

Tüm hastalarda lenfoproliferasyon tanımlanmıştır. ALPS'lu hastaların tümünde hastalığın seyrinde lenfadenopati veya splenomegali bulunurken hastaların yaklaşık %50'sinde ayrıca hepatomegali görülmüştür. Bu belirtilerin süresi ve ağırlığı hastadan hastaya değişiklik göstermektedir. Birçok hastada bu belirtiler yaşamın ilk 2 yılında; çoğunluğunda ise 5 yaşına gelmeden ortaya çıkmış olmakla birlikte kesin

yaş sınırı yoktur. Splenomegali genellikle çok büyük boyutlardadır. Hastalarda ilerleyen yaşlarda ciddi hipersplenizm bulgularının ortaya çıkması splenektomi gerektirebilmektedir. Lenfadenopati çoğunlukla servikal ve aksiller bölgede ortaya çıksa da herhangi bir anatomik lokalizasyonda bulunabilir. Otoimmün hastalık gelişme oranı zamanla artar. ALPS ilişkili otoimmünite; kan hücrelerine karşı otoimmünite ve daha seyrek görülen diğer otoimmün olaylar olmak üzere 2 gruba ayrılır. ALPS' deki otoimmünite tipik olarak aktivasyon ve iyileşme periyotları ile seyreder. En sık görülen otoimmün hastalık hemolitik anemi ve ITP dir. Hastalarda şiddetli hemoliz atakları veya çok düşük trombosit değerleri bulunabilir. Kemik iliğinde myeloid serinin normal olduğu hastalar ve splenektomi yapılan hastalarda da nötropeni bulunabilmesi durumun otoimmün mekanizmalarla ortaya çıktığını düşündürmektedir (83) , (84) .

2.4.2.6 Biyokimyasal Özellikleri

Otoimmün hepatit nedeni ile karaciğer fonksiyon testlerinde bozukluk görülebilmektedir. Bazı hastalarda glomerulonefrit ortaya çıkmaktadır. Hastaların çoğunda vitamin B12 düzeyleri yüksektir (76) .

2.4.2.7 İmmünolojik Özellikler

ALPS'lu hastalarda lenfositoz mevcuttur. Lenfopeni bulunan hastalar da tarif edilmiştir. DNT hücrelerinde belirgin artış bulunur. Hastalarda T hücrelerinin çoğu MHC class-II yüzey antijenleri içerir. Bu durum T hücrelerinin aktive olduğunu gösterir. Dokularda bulunan lenfositler bir aktivasyon markeri olan CD69 içerirler. Hastalarda dolaşımda proliferasyon sitokinleri olan IL-4 ve IL-2 düzeyleri ile pro-inflamatuvar sitokinler olan TNF- α , IL-1b ve IL-6 düzeyleri normal bulunmuştur. Buna karşın IL-10 düzeyleri çok yüksektir. Bu hastaların Fas mutasyonları olan ancak klinik bulguları olmayan yakınlarında IL-10 yüksek bulunmamıştır. IL-10 düzey yüksekliğinin monosit-makrofaj sayısının artışı ile ilgili olduğu belirtilmiştir. T yardımcı hücreleri IL-12 ile aktive olan ve interferon γ ve TNF- α üreten Th 1 hücreleri, IL-4 ile aktive olan IL 4, IL 5, IL 6 üreten Th 2 hücreleri olmak üzere iki büyük gruba ayrılır. Birçok immünolojik hastalık bu iki hücre arasındaki dengenin

bozulması sonucu ortaya çıkar. ALPS'lu hastalarda Th2 aktivitesinin yüksek olduğu ve bunun otoantikorların oluşmasında rol oynadığı belirtilmiştir. ALPS'lu hastalarda Th2 aktivitesinin artmış olmasının yüksek IL-10 ve düşük IL-12 düzeyleri ile ilgili olduğu düşünülmektedir. IL-10 üretiminin artmasının B ve T hücreleri üzerinde başka etkileri de vardır. IL-10 anti-apoptoik protein Bcl-2 yi hem B, hem de T hücrelerinde aktive ederek, bu hücrelerin ölümünü geciktirmektedir. Bu nedenle yüksek IL-10 düzeyleri otoreaktif hücre klonlarının, hatta malign hücre klonlarının yaşamasına neden olmaktadır. CD 57+ (HLA-DR+) /CD8+ T hücrelerinin artışının ve CD25+ T hücrelerindeki azalmanın ALPS kliniğinin ortaya çıkışı için spesifik olduğu belirlenmiştir. Çünkü bu anormallikler klinik bulgusu olmayan ancak mutasyonu pozitif olan aile bireylerinde mevcut değildir (85) ,(86) , (87) . Tablo 2.4.2.7'te hastalarda tanımlanan hematolojik, biyokimyasal ve immünolojik özellikleri belirtilmiştir;

Tablo 2.4.2.7: ALPS'lu Hastaların Laboratuvar Bulguları

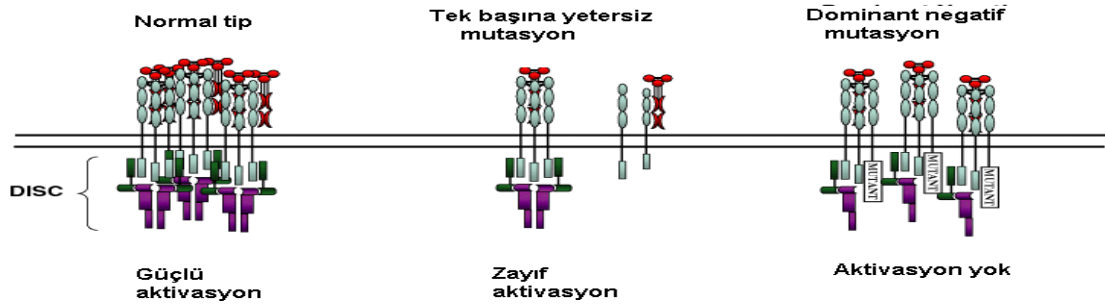
LABORATUVAR BULGULARI		
Hematolojik	Biyokimyasal	İmmünolojik
Lenfositoz Lenfopeni Anemi Retikülositoz Nötropeni Eozinofili Trombositopeni Diseritropoezis	Karaciğer fonksiyon testlerinde bozukluk Proteinüri Vitamin B12 seviyesinde artış	Serum IgG ve Serum IgA düzeyinde artış IgM düzeyinde azalma DNT hücre düzeylerinde artış CD8+ T hücrelerinde artış CD8+/CD57+ T hücrelerinde artış HLADR+ T hücrelerinde artış CD5+ B hücrelerinde artış CD4+/CD25+ T hücrelerinde azalma B hücre CD27 ekspresyonunda azalma CD69+ T hücrelerinde artış Serum IL-10 düzeyinde artış Serum Fas-L düzeyinde artış Otoantikor varlığı (ANA, RF gibi)

2.4.3 Sorumlu Gen Defektleri

Bu güne kadar hastalıktan sorumlu olan *FAS*, *FASL* ve *CASP10* genlerinde mutasyon bildirilmiştir. En sık tanımlanan *FAS* gen mutasyonlarıdır. ALPS' nun en sık rastlanan şekli heterozigot *FAS* mutasyonları ile ortaya çıkan türüdür. *FAS* geninin en çok mutasyona uğrayan bölümü ölüm bölgelerini kodlayan kısımdır. ALPS hastalarının aile bireylerinde yapılan çalışmalarda klinik olarak tamamen normal olan kişilerde de *FAS* mutasyonları saptanmıştır. Bazı aile üyelerinde de ALPS'nun yalnızca birkaç belirtisi mevcuttur. Bu veriler lenfoproliferasyon ve otoimmüitenin ortaya çıkmasında ilave genetik veya çevresel faktörlerin rolü olabileceğini düşündürmektedir (3) .

2.4.3.1 ALPS- FAS

Daha önce ALPS Tip 0 ve ALPS Tip1a olarak adlandırılan homozigot ve heterozigot *FAS* mutasyonlarına sahip hastalar yeniden düzenlenen NIH kriterlerine göre ALPS-FAS olarak adlandırılmaktadır Daha önce ALPS Tip 1a olarak tanımlanan otozomal dominant geçişli, heterozigot *FAS* mutasyonları olan hastalar ise bugüne kadar tanımlanan ALPS'lu hastaların çoğunluğunu (yaklaşık %70) oluşturmaktadır. (3) . Bugüne kadar homozigot *FAS* mutasyonu bulunan hasta sayısı ise 4'tür (88-90). Bu hastalarda klinik penetrans daha yüksektir ve doğumdan itibaren ağır sitopeni mevcuttur. Saptanan mutasyonlar Fas protein ekspresyonunun olmamasına ya da eksprese edilse bile afonksiyonel olmasına yol açar. Fas molekülünün yapısından dolayı, genetik bozuklukluğa neden olan mutasyon dominant negatif etkiye sahiptir. Fas molekülleri hücre yüzeyinde trimerik bir yapı oluştururlar. Yalnızca bir mutant Fas molekülü bile Fas'ın yapısal şeklinin bozulmasına yol açar. Yapısal şeklin bozulması; FADD'nin bu bölgede toplanmasını engellemektedir. Hücre içi mutasyon ise DISC oluşumunu engelleyerek, hücre dışı mutasyon trimerize FasL kompleksinin bağlanmasındaki afiniteyi azaltarak sinyalizasyonun bozuk olmasına yol açar (91), (92) . (Şekil 2.4.3.2)



Şekil 2.4.3.2 FAS Genindeki Mutasyonların Etkileri (92)

Klinik semptomların görülmesine yol açan en önemli mutasyonlar, Fas molekülünün hücre içindeki ölüm bölgesini etkileyen missens mutasyonlardır. Bu hastalarda hücre yüzeyinde Fas ekspresyonu normal olmasına rağmen molekül afonksiyoneldir (93) .

2.4.3.2.1 FAS Gen Yapısı

FAS geni insanlarda 10. kromozomun uzun kolunda yer alır. 9 ekzonu vardır. Fas, apoptoz 1 (APO1) veya CD95 olarak da adlandırılan ve molekül ağırlığı 45 kd olan bir tip 1 membran proteinidir ve tümör nekrozis faktör (TNF) ailesine aittir. Ana fonksiyonu apoptozu tetiklemektir. Agonistik antikörlerin ya da doğal ligandının (FasL) bağlanmasıyla apoptotik sinyali iletir (94) .

2.4.3.2.2 FAS (TNFRSF6) Mutasyonları

Tablo 2.4.3.2.2’de FAS mutasyonlarının çeşitleri ve dağılımları kaç ailde çalışıldığı ve toplam mutasyon sayısı gösterilmiştir.

Tablo : 2.4.3.2.2 FAS Mutasyonlarının Dağılımı

Mutasyon Tipi	<u>Ekzon</u> <u>/Intron</u> 1	<u>Ekzon</u> <u>/Intron</u> 2	<u>Ekzon</u> <u>/Intron</u> 3	<u>Ekzon</u> <u>/Intron</u> 4	<u>Ekzon</u> <u>/Intron</u> 5	<u>Ekzon</u> <u>/Intron</u> 6	<u>Ekzon</u> <u>/Intron</u> 7	<u>Ekzon</u> <u>/Intron</u> 8	<u>Ekzon</u> <u>/Intron</u> 9	<u>Aile Sayısı</u> <u>[Toplam]</u>
Missens		1	2	1		1			22 [20]	27 [25]
Nonsens		2	2				1		5 [3]	10 [8]
İnseriyon: Çerçeve kayması		1							3	4
Delesyon:Çerç eve kayması		2 [1]	1				1		5	9 [8]
<i>Splice</i>	1		3	1		1	3	5 [3]		14 [12]
Kompleks				1	1				2	4
Büyük delesyonlar:									1	1
Toplam	1	6 [5]	8	3	1	2	5	5 [3]	38 [34]	69 [62]

Toplam 69 akraba olmayan aileden 62 mutasyon [parantez içindeki] bildirilmiştir (NIH).

2.4.3.2.2.1 Tek Nükleotid Polimorfizm (SNP)

SNP (tek nükleotid polimorfizm), tüm genomik DNA’lardaki tek baz değişimidir ve bu özellik genetik belirleyici olarak kullanıma olanak sağlayan bir özelliktir. SNP’ler transisyon (bir pürin bazın “A, G” diğer bir pürin bazıyla veya bir pirimidin bazın “C, T” diğer pirimidin bazıyla değişmesi) ve transversiyon (bir pürin bazının bir pirimidin bazına değişimi veya tersi) gibi baz değişimlerini içermektedir. G>A ve C>T transisyonları, insan genomundaki SNP’lerin % 25’ini oluşturmaktadır. Bir popülasyondaki tek baz değişiminin frekansı % 1’den büyük ise bu değişim SNP, % 1’den küçük ise mutasyon olarak adlandırılır. Aynı SNP frekansı toplumlar arasında farklılık göstermektedir. SNP ortalama her 100–300 bç (baz çifti)’nde bir bulunur. İnsan genomu yaklaşık 2.91 milyar baz çiftine ve 35.000 gene sahiptir. Tüm insanların baz diziliminin % 99.9’u birbirinin aynıdır. Gen dizilimindeki % 0,1’lik farklılık, yani varyasyon insanlar arasındaki genetik çeşitliliğin temelini oluşturur. SNP’ler kendi başlarına hastalık oluşturmazlar, ancak bazı hastalıkların gelişmesinde

rol oynarlar. Birçok SNP sessizdir (silent), gen fonksiyonu veya fenotip üzerinde belirlenen bir etkileri yoktur. Bazı hastalıklara bireysel yatkınlık veya ilaçlara reaksiyonda rolleri bulunmaktadır. Ayrıca tek gen hastalıklarında hastalıktan sorumlu olan genin yanında diğer genlerde bulunan SNP'ler hastalığın gelişmesine katkıda bulunabilir. Allelik varyasyonların promoter bölgede bulunması transkripsiyon faktör bağlanma bölgesini veya diğer regülatör domainleri değiştirerek genin ekspresyonunu kalitatif veya kantitatif olarak etkileyebilir.

SNP'ler sinonim ve non-sinonim SNP olmak üzere 2 gruba ayrılırlar. Non-sinonim SNP'ler genin kodlanan bölgesinde bulunur amino asit değişikliği veya premature stop kodon oluşumuna neden olarak proteinin yapısını veya fonksiyonunu değiştirmesine rağmen, toplumda %1'den fazla görülüyorsa bu değişim SNP olarak kabul edilir. Sinonim SNP'ler amino asit değişikliğine neden olmaz ancak bazen hastalıklara yatkınlıkta rol oynarlar (95) .

2.4.3.2.4 ALPS-sFAS

ALPS benzeri klinik fenotip gösteren, DNT hücreleri artmış ancak normal Fas aracılı apoptozise sahip bazı hastalarda somatik *FAS* mutasyonları tanımlanmıştır. Bu hasta grubunda somatik heterozigot *FAS* mutasyonları belli hücre popülasyonlarında (özellikle DNT hücrelerinde daha az sayıda olmak üzere CD4 + ve CD8 + lenfositler, monositler ve CD34 + hematopoietik hücre öncülleri) mevcuttur (96) . Normal in vitro lenfosit apoptozisi gösteren ve sporadik olarak görülen bu hastalarda somatik mutasyonların gösterilebilmesi için izole edilen DNT hücrelerinden elde edilen örneklerde sekans analizi yapılmalıdır.

2.4.3.3 ALPS *FAS-Ligand*

Bugüne kadar *Fas-Ligand* geninde defekt bulunan 4 hasta tanımlanmıştır. 2 hastada heterozigot *FASL* mutasyonu tespit edilmiştir. İlk olarak 1996 yılında Wu ve arkadaşları tarafından tipik SLE sendromlarıyla izlenen 52 yaşında bir erkek hastada *FASL* geninde heterozigot bir mutasyon gösterilmiş (97) , tanımlanan ikinci hastada ise homozigot mutasyon tespit edilmiş, İkinci hastada Fas-Ligand fonksiyonu bozulmasına rağmen Fas-ligand ekspresyonun normal olduğu belirlenmiştir.

Lenfadenopati, splenomegali, DNT hücrelerinde artış ve otoimmün trombositopeni ile izlenen diğer bir hastada da heterozigot mutasyon saptanmıştır (98) . Bu hastada Fas-L fonksiyonu ve ekspresyonu defektif bulunmuştur. Bu gendeki homozigot ve heterozigot mutasyonlar hastalığa yol açabilmektedir. 4. hastada; 8 aylıkken ağır hepatosplenomegali, çoklu servikal lenf nodları ve bilateral akciğer infiltrasyonu görülmüştür. Hastada *FASL* geninde homozigot null (fonksiyon kaybı) mutasyon tespit edilmiştir (4) .

2.4.3.3.1 *FAS-Ligand* Geni

FAS-L geni birinci kromozomun uzun kolunda bulunur (1q.23), 4 ekzona sahiptir ve 40 kd büyüklüğündedir.

2.4.3.4 *ALPS-CASP10*

Bugüne kadar *CASP10* gen defekti bulunan 3 vaka tanımlanmıştır. İlk olarak Wang ve arkadaşları tarafından 1999 yılında 2 hastada gösterilmiştir (99) . Hastalardan birinde asemptomatik anneden kalıtılan heterozigot kaspaz 10 mutasyonu, diğerinde ise her iki alleli mutant olan homozigot defekt gösterilmiştir. Her iki hastada da yaşamın ilk yılından itibaren lenfoproliferasyon, otoimmün bozukluklar, yüksek DNT hücre düzeyleri mevcuttur. Hastalarda Fas aracılı apoptoziste bozuklukla beraber, TNF aracılı apoptoziste bozukluk gösterilmiştir. Ayrıca dendritik hücre apoptozunun da bozuk olduğu saptanmıştır.

2.4.3.4.1 *CASP10* Geni

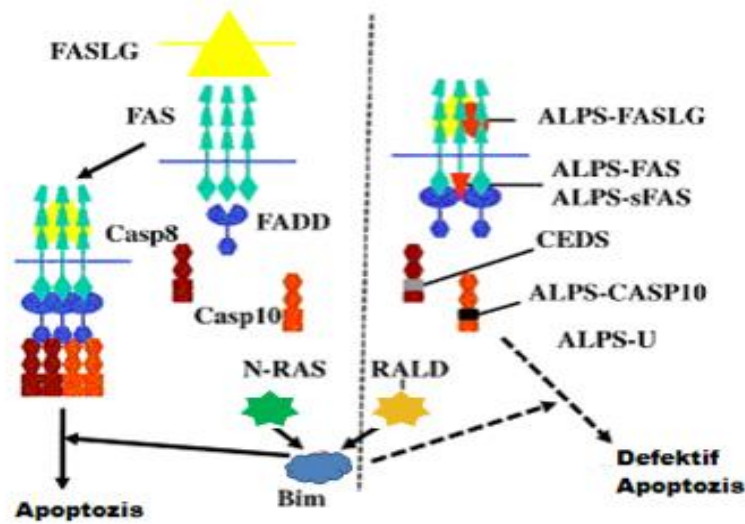
Kaspaz 10 geni 2q23'de lokalizedir ve 10 ekzondan oluşur, 48 kd büyüklüğündedir. Kaspaz 10 molekülü ekstrensek apoptozis yolağında hem kaspaz 8'in hem de efektör kaspazların aktivasyonunu sağlamaktadır (100) .

2.4.4. ALPS ile İlgili Hastalıklar

Daha önce ALPS fenotipi ile çıkan özellikler gösteren hastalıklar tarif edilmiştir. 2009'dan önceki sınıflandırmalarda ALPS'nun bir tipi (Tip IIb) olarak sınıflandırılan *Caspase 8* eksiklik sendromu (CEDS), Ras-asosiye Lökoproliferatif Hastalık (RALD), Dianzani Otoimmün Lenfoproliferatif Hastalık (DALD), X-linked lenfoproliferatif hastalık (XLP), yeniden düzenlenen sınıflandırmaya göre ALPS ile ilgili hastalıklar olarak belirlenmiştir (Tablo 2.4.4) (3) .

Tablo 2.4.4 ALPS ile İlgili Hastalıklar

Önceki Sınıflandırma	Yeniden Düzenlenen Sınıflandırma	Gen	Tanım
ALPS type IIb	CEDS(<i>Caspase8</i> Eksiklik sendromu)	<i>CASP8</i>	Hastalarda lenfadenopati ve/veya splenomegali bulunur, sınırlı düzeyde DNT yüksekliği, tekrarlayan enfeksiyonlar mevcuttur, defekt kaspaz 8 genindedir.
ALPS type IV	RALD (Ras-asosiye lökoproliferatif hastalık)	<i>NRAS</i>	Hastalarda otoimmünite, lenfadenopati ve/veya splenomegali bulunur, DNT sayıları yüksek veya normal sayıdadır, <i>NRAS</i> geninde somatik mutasyon vardır.
		<i>KRAS</i>	Hastalarda otoimmünite, lenfadenopati ve veya splenomegali bulunur, DNT normal sayıdadır, <i>KRAS</i> geninde somatik mutasyon vardır.
DALD	DALD(Dianzani Otoimmün Lenfoproliferatif Hastalık)		Hastalarda otoimmünite, lenfadenopati ve/veya splenomegali bulunur, DNT normal sayıdadır ve invitro FAS aracılı apoptozis yetersizdir.
XLP1	XLP1 (X-linked lenfoproliferatif hastalık)	<i>SH2D1A</i>	Hastalarda akut Epstein-Barr virus enfeksiyonu, hipogammaglobulinemi veya lenfoma gelişir.



Şekil 2.4.4 ALPS ve ALPS ile İlgili Hastalıklara Yol Açan Defektif Moleküller

2.4.4.1. Caspase 8 (CASP8) Eksiklik Sendromu (CEDS)

CASP 8 eksikliği lenfadenopati ve splenomegali, DNT hücrelerinde belirgin artış, FAS aracılı apoptoziste bozukluk, tekrarlayan bakteriyel ve viral enfeksiyonlar, T, B ve doğal öldürücü hücre (NK) aktivasyonunda bozukluk ile karakterize bir sendromdur (101). CASP 8 eksikliği başlangıçta otoimmün lenfoproliferatif sendrom tip IIb olarak adlandırmış ancak B ve T lenfositler ve NK hücrelerinde apoptoz defektinin daha ağır oluşu, hastalarda tekrarlayan viral ve bakteriyel enfeksiyonların bulunması ile ALPS'ten farklılık göstermesi nedeni ile daha sonra CASP8 eksikliği ALPS ile ilgili hastalık grubunda sınıflandırılmıştır (78).

2.4.4.2. Ras-asosiye Lökoproliferatif Hastalık (RALD)

2009 yılında Tip IV ALPS olarak adlandırılmış olan ve *NRAS* mutasyonu ile ortaya çıkan bu hastalık yeni sınıflandırmada RAS asosiye lökoproliferatif bozukluk (RALD) olarak adlandırılmıştır (3) . Somatik *NRAS* mutasyonu bulunan bu hastalarda DNT yüksekliği görülmemektedir. Hastalarda JMML'ye (juvenile miyelomonositik lösemi) benzer şekilde miyeloid seri hücre sayılarında yükseklik görülmektedir (102) . *NRAS* mutasyonu lenfositlerde intrinsek mitokondriyal apoptozis defektine neden olmaktadır. Bu da ALPS fenotipi ve hematolojik malignansilere yol açmaktadır (42) .

2.4.4.3. Diansani Otoimmün Lenfoproliferatif Hastalık (DALD)

Diansani ve arkadaşları 1997 yılında defektif FAS fonksiyonu, otoimmünite ve lenfoproliferasyon, normal DNT düzeyleri bulunan hastalarda ALPS'nun farklı bir formunu tanımlamışlardır. Bu varyant form Victor McKusick tarafından *Diansani Autoimmune Lymphoproliferative Disease* (DALD) olarak adlandırılmıştır (96) . DALD hastalarında *FAS*, *FASL* veya *CASP10*'da mutasyon bulunmamaktadır, ancak birçok hasta ve ebeveynlerinde Fas yolağında defekt gösterilmiştir. Bu bulunan defekt DALD'a neden olan mutasyonların yolakta daha aşağıda Fas yolağının efektörlerini kodlayan bölgede olduğunu düşündürmektedir. Önceki çalışmalarda perforin genindeki belli varyantların ALPS/DALD gelişimi ile bağlantılı olduğu gösterilmiştir. *Perforin1*(*PRF1*)'deki FHL geliştirme yeteneği olmayan heterozigot değişimler Fas fonksiyonu defektif olan kişilerde ALPS/DALD gelişiminde yatkınlık geni olarak rol oynayabilir (103) . Yakın zamanda yapılan çalışma, serum IL-17A, IL-17F ve IL-17AF düzeylerinin ALPS ve DALD hastalarında yüksek bulunduğunu ve bu yüksek düzeylerin nedeninin defektif Fas fonksiyonu sonucu meydana gelen lenfosit apoptozu ile ilgili olabileceğini göstermiştir. Aynı çalışma IL-1 β düzeylerinin ALPS ve DALD'da yüksek olduğu ve bunun nedeninin IL-1 β 'nın IL-17 ekspresyonunda anahtar rolü olabileceğini göstermiştir (104) .

2.4.4.4. X-linked lenfoproliferatif hastalık (XLP)

X'e bağılı geçiş gösteren lenfoproliferatif sendrom (XLP) Epstein Barr virus (EBV) enfeksiyonu sonrası gelişen ciddi klinik seyirli bir primer immün yetmezlik hastalığıdır. Tıp literatüründe ilk kez 1975 yılında, Purtillo tarafından, Duncan ailesinde lenfoproliferatif hastalık nedeniyle ölen 6 erkek hastanın otopsi ile tanımlanmıştır (105) . Hastalık başlangıçta “X'e bağılı ilerleyici sık görülen değışken immün yetmezlik” veya tanımlanan aileye atfen “Duncan Hastalığı” olarak adlandırılmıştır. Etkilenen başka hastaların da bildirilmeye başlanması üzerine 1976 yılında adı “ X'e bağılı lenfoproliferatif hastalık” olarak değıştirilmiştir. Hastalığın etyoloji, patogenezi ve tedavisinin daha iyi aydınlatılabilmesi için 1978 yılında, Purtillo tarafından oluşturulan kayıt sistemine 2000 yılı sonuna kadar 89 aileden 309 hasta bildirilmiştir (106) . 1998 yılında birbirinden bağımsız üç grup tarafından XLP hastalığından sorumlu defektin *SH2D1A* (Src homology domain cotaining protein 1A- Src homoloji bölgesi içeren protein 1A) veya SAP [*Signaling lymphocyte activation molecule*, (SLAM), *associated protein* Lenfosit aktivasyon sinyal molekülü ilişkili protein] geninde olduğu belirlenmiştir (107) . XLP nadir görülen bir hastalıktır. İnsidansı 1-3/1000000 erkek olarak tahmin edilmektedir (108) . Irk ve etnik grup ayırımı gözetmez (106) .

X-linked inhibitör apoptozis (XIAP) 2006 yılında XLP'ye neden olan ikinci gen olarak tanımlandı. XIAP proteinini kodlayan *BIRC4* genindeki mutasyonlar XLP-2'ye yol açmaktadır. XIAP eksikliği olan hastalarda lenfosit apoptozisin artmış olduğu görülmektedir. SAP eksikliği olan hastalarda olduğu gibi, XIAP eksikliği olan hastalarda da NKT hücrelerinde belirgin azalmış olması SAP ve XIAP'ın NKT hücrelerinin normal değışimi ve fonksiyonu için gerekli olduğunu göstermektedir. (109) .

2.4.5 ALPS ile Benzerlik Gösteren Diğer Hastalıklar

FADD Eksikliği, Protein Kinaz C δ Eksikliği, Evans Sendromu, Rosai Dorfman Hastalığı, Castleman Hastalığı, Kikuchi-Fujimoto Hastalığı, Sık Görülen Değişken İmmün Yetmezlik (CVID), LRBA (*LPS-responsive and beige-like anchor*) Eksikliği bugüne kadar tanımlanan ALPS ile ilgili, fakat sınıflandırmada yer almayan hastalıklardır.

2.4.5.1. FADD Eksikliği

FADD apoptoziste yer alan kaspaz-8 ile bir köprü oluşturarak DISC'in aktivasyonunu sağlayan adaptör bir moleküldür. Yakın zamanda 4 akraba hastada FADD eksikliğine yol açan homozigot mutasyon tespit edilmiştir. FADD. Hastalarda defektif lenfosit apoptozisi, artmış DNT düzeyi, yüksek serum biyobelirteçleri ve otoantikorlar görülmesine rağmen, hastaların hiç birinde ALPS tanısında gerekli kriterlerden olan lenfadenopati veya splenomegali görülmemiştir. Buna karşılık hastaların hepsinde klasik ALPS'de görülmeyen genelde viral enfeksiyonlarla bağlantılı ensefelopati ve karaciğer fonksiyon bozukluğu olduğu görülmüştür. FADD eksikliği olan deneysel sistemlerde saptanan tip 1 interferon cevap bozukluğu bu hastaların birisinde de saptanmıştır. Hastalarda aynı zamanda invazif pnömokok enfeksiyonu, fonksiyonel aspleni, kardiyovasküler bozukluklar ve serebral atrofi görülebilmektedir (110) .

2.4.5.2. Protein Kinaz C δ Eksikliği

2013 yılında Protein Kinaz C δ (PRKCD) eksikliğine bağlı iyi huylu lenfoproliferatif hastalık farklı etnik gruptan olan iki hastada tarif edilmiştir. Hastalar kronik splenomegali, lenfadenopati ve otoimmün sitopeni varlığı ile ALPS'e benzer özellik göstermekte ancak hastalık kriterlerini karşılamamaktadır PKC hücre proliferasyonu, apoptozis ve diferansiyasyon gibi çeşitli hücre süreçlerinin regülasyonunda anahtar rol oynayan serin/threonin kinaz ailesine aittir. PK C δ 'nın B

hücre sinyalizasyonu ve otoimmünitede önemli rolleri vardır. Hastalarda görülen lenfoproliferasyonun nedeni defektif B hücre apoptozisi ile açıklanabilir (111) .

2.4.5.3. Evans Sendromu

Evans sendromu İTP ve OHA'nin birlikte veya ardarda görülmesi ile karakterizedir. İmmün baskılayıcı tedavi hastaların çoğunda yetersiz kalmakta ve hastalık kronikleşmekte ya da tekrarlamaktadır. Mortalite oranı yüksektir. Hastaların önemli bir kısmında nötropeni de mevcuttur. Hastalarda eritrosit, trombosit ve nötrofillere karşı oluşan antikorların varlığı gösterilmiştir (112-114). Evans sendromu tanısı alan hastaların bir kısmının daha sonra ALPS olduğu belirlenmiştir (116) .

2.4.5.4 Rosai Dorfman Hastalığı

Masif lenfadenopati ile giden sinüs histiositosizi veya diğer adıyla Rosai-Dorfman Hastalığı (RDD) ilk kez 1969 yılında Rosai J. ve Dorfman R.F tarafından tanımlanmıştır (117) . Bugüne kadar 500 civarında vaka bildirilmiştir (118) . Kliniği ve patolojisi iyi anlaşılmış nadir bir hastalık olmasına karşın etyolojisi bilinmemektedir. Tüm yaş gruplarını etkilemekle birlikte çocukluk ve adölesan yaşta daha sık görülmektedir. Histopatolojik olarak lenfatik sinüslerde histiositik proliferasyon ile karakterizedir. Hastaların çoğunluğunda bilateral ağrısız servikal lenfadenopati bulunur ve genellikle ateş, lökositoz, artmış sedimentasyon hızı ve hipergamaglobulinemi eşlik etmektedir. Hastaların % 43'ünde lenfadenopatiyle birlikte ektranodal tutulum mevcuttur (118-119) . Lenfadenopati ile prezente olan hastalar sıklıkla malign lenfoma ile karıştırılırken, ektranodal tutulumu olan hastalar organa özgü malignite olarak değerlendirilebilmektedir (120) . ALPS-FAS olduğu bilinen 44 hastada yapılan çalışmada 18 hastada RDD histolojik özellikleri olan lezyonlar saptanmıştır (121) .

2.4.5.5 Castleman Hastalığı

Castleman Hastalığı veya anjiofolliküler lenfoid hiperplazi, ilk olarak 1956 yılında Dr.Benjamin Castleman tarafından tanımlanan, heterojen lenfoproliferatif hastalık grubunun nadir görülen bir üyesidir. Lokalize ve multisentrik olmak üzere iki formu ve plazma hücreli, hyaline-vasküler ve miks tip olarak tanımlanan histolojik alt tipleri bulunmaktadır. Multisentrik form özellikle bir IL-6 homoloğu olan viral IL-6 salgılayan Human Herpes Virüs - 8 ile ilişkilidir ve immün sistemi baskılanmış hastalarda sık görülmektedir. Hyalin-vasküler tip plazma hücreli tipten daha iyi prognozludur, benign klinik gidişe sahiptir ve daha sık olarak lokalize formda görülmektedir. Plazma hücreli tip ise kötü prognozludur, klinik seyri agresiftir ve multisentrik formda daha sık görülmektedir (122) . Otoimmün hemolitik anemi, lenfadenopati, splenomegali ve trombositopeni ALPS ile ortak klinik özellikleridir.

2.4.5.6. Kikuchi-Fujimoto Hastalığı

Kikuchi Fujimoto hastalığı (KFH) ilk kez 1972’de Japonya’da Kikuchi ve Fujimoto tarafından tanımlanmıştır (123) . Uzak Doğu Asya ülkelerinde daha sıklıkla görülen nadir bir hastalıktır. Dünyanın diğer bölgelerinde de seyrek olarak rapor edilmiştir. Hastalık, nekrotizan lenfadenit, Kikuchi hastalığı, histiositik nekrotizan lenfadenitis gibi farklı isimler ile anılmaktadır (124) . Hastalık ülkemizde nadirdir. KFH’da hücre ölüm mekanizmaları iyi çalışılmamıştır. Oshima ve ark.’nın çalışmasında KFH’nın patogenezinde apoptozosin rolünün olabileceğini belirtmişlerdir. Hastaların çoğunda lenfadenopati görülmesinin yanında bazılarında splenomegali, hepatomegali, anemi ve trombositopeni de bulunmaktadır (125) .

2.4.5.7. Sık Görülen Değişken İmmün Yetmezlik (CVID)

Sık görülen değişken immün yetmezlik [Common variable İmmünodeficiency (CVID)] antikor yapım eksikliği, hipogammaglobulinemi ve tekrarlayan ve/veya ağır enfeksiyonlar, otoimmünite ve malignansi gelişmesine yatkınlık ile karakterize her yaş grubunda görülebilen klinik ve genetik olarak heterojen bir immün yetmezliktir. Bu hastaların %25'inde otoimmünite görülmektedir. En yaygın otoimmünite trombositopeni ve hemolitik anemidir. CVID semptomatik immün yetmezlik hastalıklarının en sık görülen formudur. CVID'li hastalarının yaklaşık yarısında malabsorbsiyon ile birlikte kronik ishal görülmektedir. Hastalarda dolaşımdaki B hücreler genelde normal sayıdadır ancak B hücre sayıları düşük bulunan vakalar da mevcuttur. CVID hastalarının birçoğunda enfeksiyonlar 10 yaşından sonra başlar. Aile hikayesi vakaların yaklaşık %10 ile %20'sinde bulunmaktadır (126) , (127) .

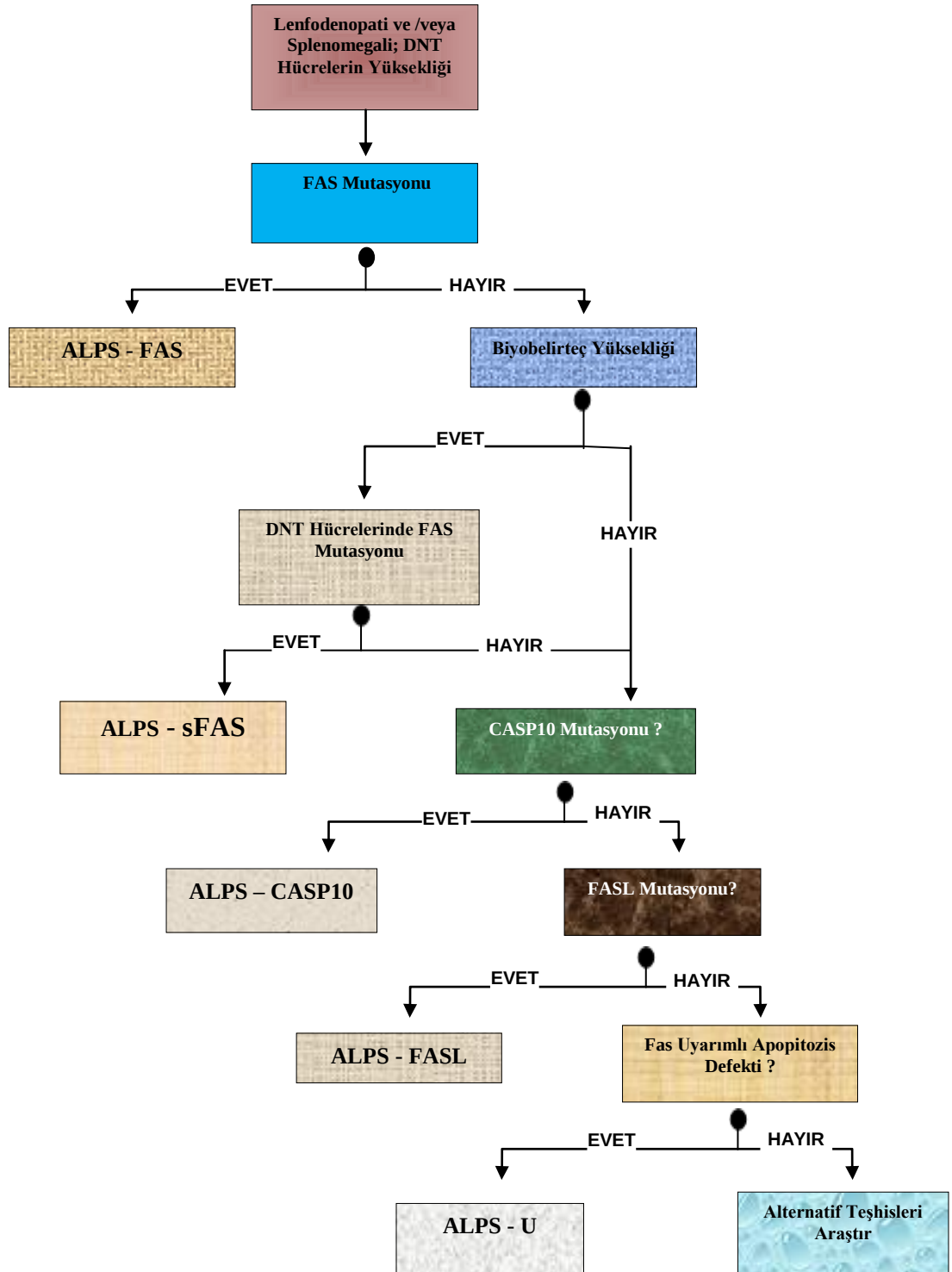
Çeşitli tanı kriterleri önerilmesine rağmen genel olarak 1999 yılında *European Society of Immune Deficiencies (ESID)* ve *Pan American Group for Immune Deficiency (PAGID)* tanı kriterleri kullanılmaktadır. Bu kriterler ile CVID 'probable' ve 'possible' olmak üzere 2 grupta incelenmekte; kriterler ; 'Probable' CVID için; 1) IgG ve IgA düzeyinin 2 standart deviasyonun altında oluşu, 2) Aşı cevabı yanıtsızlığı ve/veya izohemaglutinin yokluğu, 3) Tanı yaşının 2 yaş ve üstü olması (bu yaş daha sonra 4 olarak belirlenmiştir) 4) Diğer hipogamaglobulinemi nedenlerinin ekarte edilmiş olması, 'Possible' için ise; 1) IgG, IgM ve IgA düzeylerinin birisinin 2 standart deviasyonun altında oluşu, 2) Aşı cevabı yanıtsızlığı ve/veya izohemaglutinin yokluğu, 3) Tanı yaşının 2 yaş ve üstü olması 4) Diğer hipogamaglobulinemi nedenlerinin ekarte edilmiş olmasını içermektedir (128) . Bugüne kadar CVID ICOS (129) , TACI (130), CD19 (131) , BAFFR (132) , CD20 (133) , CD81 (134) , CD21 (135) , LRBA (136) genlerindeki mutasyonlar ile ortaya çıkabildiği gösterilmiş, olmasına rağmen hastalığa neden olan genetik defektlerin önemli kısmı henüz bilinmemektedir. CVID hastalarının çoğu poligenik hastalık gösterirken az bir kısmında tek gen defekti tespit edilmiştir. ICOS, CD19, CD20,

CD21 ve *CD81* gen defektleri ağır hücrel ve humoral immün defektlere neden olmaktadır. *TACI*, *BAFFR* gen defektleri daha nadir görülmektedir. Bu genlerdeki mutasyonlar sağlıklı kişilerde de tespit edilmiş ancak sağlıklı bireylerde görülme sıklığı semptomatik hasta sayısına göre çok daha düşük bulunmuştur. CVID hayatın 70–80 yaşlarında da görülebildiğinden bu sağlıklı bireylerin ileride semptomatik olabileceği de düşünülmelidir. Lenfoproliferasyon ve otoimmün sitopeni CVID ve ALPS'in birbiriyle örtüşen özellikleridir ve bazı muhtemel ALPS düşünülen hastaların CVID olabileceği düşünülmüştür. LRBA mutasyonu 2012 yılında CVID ve Muhtemel ALPS fenotipi gösteren bir grup hastada gösterilmiştir. LRBA mutasyonları, hipogamaglobulinemi ve otoimmünite ile seyreden klinik tabloya yol açmaktadır. Tarif edilen hastalardaki humoral immün yetmezlik, inflamatuvar barsak hastalığı (IBD) ile birlikte kronik ishal, otoimmün sitopeni ve EBV ile ortaya çıkan lenfoproliferatif hastalık CVID fenotipiyle benzerlik gösteren özellikleridir. Ayrıca hipogamaglobulinemisi bulunmayan ancak otoimmünite gösteren Pakistanlı bir hastada LRBA mutasyonu saptanmıştır. LRBA eksikliği, B hücre proliferasyon, plazma hücrelerine değişim veya antikör üretiminde bozukluk, apoptozise artmış yatkınlık, otofaji bozukluğu ve hücrel organellerin anormal kümelenmesi ile karakterizedir. LRBA birçok dokuda eksprese edilmektedir, ancak T ve B hücrelerinde ekspresyon düzeyi daha yüksektir. LRBA 4. kromozomda bulunur. Alternatif isimleri LBA, Hücre bölünme döngüsü 4-benzer protein (CELL DIVISION CYCLE 4-LIKE PROTEIN) ; CDC4L, CDC4-LIKE Protein'dir. Protein sinyal iletimi, veziküler trafik, hücre iskeletinin yapısı, hücre döngüsü, apoptozis, kromatin dinamikleri ve transkripsiyonel düzenlemede önemli görevleri mevcuttur (136) . *LRBA* eksikliği olan bireylerde görülen otoimmün özelliklerin nedeni defektif otofaji ve artmış apoptozis olduğu düşünülmektedir.

2.4.6. Tanı

Klinik bulgularla ALPS tanısı düşünülen hastalarda ilk olarak periferik kanda $TCR\alpha\beta^+ CD4^+CD8^-$ (DNT) hücreleri flow sitometri ile değerlendirilmelidir (116) . DNT hücrelerinin yükseklik kriteri bu hücrelerin total lenfositlerin %1,5 veya üzerinde, T lenfositlerin ise %2,5 veya üzerinde değerlerde olmasıdır (3) . ALPS'lu hastalarda DNT hücre popülasyonu homojen yapıdadır, CD45RA, CD57, CD27, CD28, perforin ve HLA-DR ekspresyon eder, CD56 ve CD45RO ekspresyon etmez (137) Buna karşılık sağlıklı kontrollerin periferik kan DNT popülasyonları heterojendir. Hastalarda DNT'nin kökeni tam olarak bilinmemekle beraber CD8 ekspresyonunu kaybetmiş CD8+ hücrelerden köken aldığı düşünülmektedir (138) . Yakın zamanda yapılan bir çalışmada timik kökenli regülatör T hücrelerin bir alt grubu olduğu ileri sürülmüştür (139) . Hastalığın diğer bir önemli laboratuvar bulgusu in vitro lenfosit apoptozisinin bozuk oluşudur. Apoptozdaki bozukluk çeşitli testlerle değerlendirilebilir. Bunlardan birisi Fas aktivasyonundan sonra ölen (apoptoz) lenfositlerin yüzdesinin saptanmasına dayanır (140) . Hasta sonuçları mutlaka sağlıklı kontrolle birlikte değerlendirilmelidir. Hasta hücrelerinin sağlıklı hücrelerine göre %50 veya daha az düzeyde hücre ölümü göstermesi anormal olarak kabul edilir (3) . Normal hücrelerde membran lipidlerinden olan fosfatidilserin (PS) hücre zarının sitoplazmik yüzünde bulunmaktadır. Hücre apoptoza gittiğinde normalde iç yüzde yerleşmiş olan PS molekülleri hücre zarının dış yüzüne yer değiştirir. Bu yer değiştirme hücre membran bütünlüğünün henüz bozulmadığı apoptotik hücre ölümünün erken dönemlerinde meydana gelir. Bu özellik erken dönem hücre ölümünün AnnexinV ile değerlendirilebilmesini sağlar. Hücreler FITC ile işaretlenen Annexin (Fosfatidilserine bağlanabilen bir proteindir) ile muamele edildiğinde hücre yüzüne yer değiştiren fosfatidilserin aracılığı ile apoptotik hücre görüntülenebilir (141) . Nekrotik hücrelerin yüzeylerinde de Annexin-V bağlanması görülebildiği için normal, erken apoptotik ve nekrotik hücreler birbirinden ayırt edilebilmesi için ikinci boya olarak propidyum iyodür eklenmektedir. Hücreler Annexin V-FITC (green fluorescence) ve non-vital boya olan propidium iodide (red fluorescence) ile birlikte değerlendirildiğinde, canlı hücreler iki boya ile de

işaretlenmezken (FITC-PI-) , erken apoptotik hücreler yalnızca FITC ile boyanmakta ve geç apoptotik veya nekrotik hücreler her ikisi ile de boyanmaktadır (FITC+PI+) (142) . Apoptozun belirlenmesinde kullanılan diğer bir yöntem ise TUNEL yöntemidir. DNA kırıklarının in situ olarak belirlenmesine dayanır (143) . Apoptotik parçalanma sonucu ortaya çıkan DNA uçları, DNA polimeraz veya Klenow parçacığı kullanılarak işaretlenebilmektedir. Ancak terminal deoksinükleotidil transferaz (TdT) kullanılarak yapılan işaretleme göreceli olarak daha duyarlı bir yöntem olarak bulunmuştur. Konvansiyonel parafin kesitleri, TdT ve nonizotopik işaretli nükleotidler (sıklıkla biyotinli dUTP) kullanılarak yapılan in situ işaretleme ardından floresan veya enzimatik görüntüleme, apoptotik hücreleri diğer hücrelerden ayırmada kullanılabilir (55) . Oliveria ve arkadaşları'nın ALPS düşünülen hastalarda tanı için önerdikleri algoritma Şekil.2.4.6'da verilmiştir. Algoritmada defektif moleküllerin araştırılma sırası FAS, FASL, CASP-10, CASP-8 olarak verilmiştir. Son iki eksiklik (CASP-10 ve CASP-8 eksikliği) bugüne kadar çok az sayıda hastada (sırası ile 3 ve 4 hasta) tarif edilmiştir. CASP-8 eksikliğin daha önce ALPS grubunda sınıflandırılırken 2009 da gözden geçirilen sınıflandırmada "ALPS benzeri hastalıklar' grubuna alınması algoritmadaki sıralamada CASP-10'un öne alınmasının nedeni olabilir. *CASP8* eksikliği olan hastalarda ALPS'na ek olarak klasik immün yetmezliklere benzer bulguların varlığı hastalarımızın bazılarında da CASP 8'i düşündürebilecek özelliklerin olması (Ig düşüklüğü, bazılarında enfeksiyon varlığı) nedeniyle *CASP 8* defektinin araştırılması daha ön plana alınmış ancak *CASP10* geninde mutasyon taraması da yapılması planlanmıştır (3) .



Şekil 2.4.6 ALPS şüphesi olan hastalarda izlenecek algoritma (3)

2.4.7 Tedavi ve Prognoz

ALPS'lu hastalar ALPS ilişkili sitopeniler için immün baskılayıcı tedavi uygulanmalı ve hastalar lenfoma gelişmesi yönünden takip edilmelidir. Nadiren homozigot veya *compound* heterozigot hastalarda kemik iliği transplantasyonu gerekmektedir. Buna rağmen hastaların birçoğu bir tek ajanla kontrol altında tutulabilmektedir (144) .

ALPS'te immün sitopenide tedavi sporadik sitopenisi olan diğer hastalardakine benzer şekilde parenteral yüksek doz metilprednizolon ve yüksek doz IVIG uygulanmaktadır. Otoimmün nötroopenisi olup enfeksiyon geçiren hastalarda düşük doz G-CSF kullanılabilir. Kronik steroid tedavisi gerektiren refraktör otoimmün sitopenisi olan hastalarda mikofenolat mofetil kullanımının yararlı olabildiği, diğer immünsupresif ajanların kullanımı ve splenektomi gereksinimini azalttığı gösterilmiştir. Hipersplenizm ve birlikte sitopenisi olan hastalarda sirolimus tedavisi ile önemli düzeyde düzelme gösterdiği belirlenmiştir (145) .

Hastalar lenfadenopati yönünden düzenli olarak takip edilmeli ve fizik muayene yanında, periyodik olarak boyun, karın ve pelvis CT taraması ile lenfadenopatiler değerlendirilmelidir. Pozitron emisyon tomografi (PET) taraması lenfadenopatinin iyi huylu veya malign ayrımının yapılmasında yararlıdır (146) . Ateş, gece terlemesi, halsizlik, iştahsızlık ve kilo kaybı ALPS ilişkili iyi huylu lenfadenopatinin maligniteden ayrımında yardımcı olmaktadır. Deneyimler yalnızca lenfadenopatisi olan ALPS hastaları için “bekle ve izle” yaklaşımı uygulanması gerektiğini göstermektedir. Ancak birçok hasta otoimmün sitopenileri nedeniyle tedaviye ihtiyaç duymaktadır. Otoimmün sitopeni epizotları kortikosteroidlere iyi cevap vermekte ve kısa süreli yüksek doz tedavi bu durumun kontrolünde daha etkili olmaktadır. Hastaların birçoğu akut sitopeni tedavisini takiben normale dönebilmektedir. Episotların görülme sıklığı ve ağırlığı hastalar adolesan döneme girdiğinde azalmaktadır. Ancak bazı hastalarda erişkin dönemde de görülebilmektedir. Önceleri splenektomi ağır hipersplenizm veya refraktör sitopeni ve nadiren de splenik rüptürü önlemek için ALPS'lu hastaların yaklaşık yarısına uygulanmaktaydı. Ancak önceden polisakkarit aşı ve profilaktik antibiyotik verilmesine rağmen birçok hastada fatal sepsise yol açtığı saptanmıştır (138) . Günümüzde splenektomi ağır hipersplenizmi ve masif splenomegali olan hastalara uygulanmaktadır.

3. BİREYLER ve YÖNTEM

3.1. BİREYLER

Hacettepe Üniversitesi Etik Kurulu'nun 24 Mart 2011 tarihli toplantısında FON11/19-23 karar numarasıyla etik kurul onayı alınmıştır (Bkz. EK1).

3.1.1 Bireylerin Demografik Özellikleri

2009–2013 yılları arasında bölümümüzde takip edilen ve Muhtemel ALPS ön tanısı alan 7 kız, 18 erkek çalışmaya alınmıştır. Hastaların yaş ortalaması 15.8 (değişim sınırı 3–35) olup ortalama 15 yıldır. Vakaların %40'ında anne baba arasında akrabalık mevcuttu.

Tablo 3.1.1. Hastaların Demografik Özellikleri

	Hasta sayısı	Yüzde (%)	Yaş Ortancası
Erkek	18	72	15.5
Kız	7	28	15
Toplam	25	100	15
Anne-Baba Akrabalığı	10	40	-

3.1.2 Bireylerin Klinik Özellikleri

Tablo 3.1.2. Hastaların Çeşitli Klinik Özelliklerinin Görülme Oranları

Klinik bulgular (Vaka Sayısı n=25)	Vaka ve görülme sayısı	Yüzde(%)
LAP	19/25	76
SM	15/25	60
HM	11/25	44
ITP	16/25	60
OHA	5/25	20

LAP:Lenfadenopati

SM:Splenomegali

HM:Hepatomegali

ITP:İmmün trombositopeni

OHA:Otoimmün hemolitik anemi

Tablo 3.1.2.1 Hastaların Klinik Özellikleri

Hasta No	Yaş-ilk şikayet yaşı(yıl) Doğum Tarihi	SM başlangıç yaşı ve süresi (yıl)	HM (başlangıç yaşı ve süresi (yıl)	LAP	ITP	OHA	Aile Hikayesi
1	11-6 17/09/2003	6-3	6-3	3 Yıl, lap her iki servikal ve submandibular 3 cm, bilateral submandibular sağ 3x3 cm, sol 3x2 cm	+	+	-
2	12-6/12 25/01/2002	5 -4	3,şu an yok 1-2, ila 3-4 cm	5 yıl Submandibular 1.5x1,5 cm	+	+	-
3	20-3/12 27/11/1994	4 - 14	4 -14	14 İntraabdominal yaygın 22x17 cm	-	+	Ablasında OHA, annenin babaannesinde lösemi
4	18-11 19/02/1996	-	-	5 7x8 cm baş boyun 7x2 cm servikal	+	-	Aile büyüklerinde Ca hikayesi
5	23-3/12 30/01/1991	3-12 19.5	11-10	19.5 1X2 cm servikal, multiple	+	-	-
6	26-6 25/09/1988	-	-	1	+	-	Bir Kardeş 4.5 yaşında ex 1.5 aylıkken konvulsion geçirmiş, fizik ve mental gelişim gerliği.
7	19-4.5 15/01/1995	-	-	7 Sağ aksiler 38x18 cm sol aksiler 36x14cm	+	-	Annede hashimato, anneanne teyzede DM
8	13-6 14/04/2001	9-2	9-2	2 Batin içinde multiple	-	-	Babada gastrektomi , babaanne barsak ca
9	15-2 06/12/1999	4	3	-	+	-	Baba MDS? kardeşle ITP?
10	10-17/12 20/10/2004	-	-	bilateral inguinal	+	-	-
11	17-12 28/07/1997	-	-	-	+	-	-
12	10-3/12 yıl 25/04/2004	8	8	+ 2x1 cm sağ inguinal,sol inguinal 1x0.5 cm multiple mikro lap	-/+	-	Annede böbrek yetmezliği,babad a vitiligo,babanın dayı oğlunda HSM,lenf

							bezlerinde büyükölük.
Hasta No	Yaş-ilk şikayet yaşı(yıl) Doğum Tarihi	SM başlangıç yaşı ve süresi (yıl)	HM (başlangıç yaşı ve süresi (yıl)	LAP	ITP	OHA	Aile Hikayesi
13	12-3 15/12/2002	+	+	+ Sağ servikalde 0.5x0.5 cm Bilateral submandibular 2x2 cm	+	-	
14*	15-10 17/02/1999	-	-	Sağ post. Servikal 1X1 cm İntraabdominal 16x8 cm	-	-	
15	28-24 29/11/1986	3	-	+	+	-	Kızkardeş,dayı ve dayı çocuklarında tekrarlayan oral aft.
16	14 15/08/1998	3	-	+	+	-	Bir kızkardeş ITP,OHA,Evans Sendromu? Nedeniyle ex, kardeş abortus,
17	9-1 15/06/2005	-	-	3 yıl, +	-	-	-
18	37-34 01/10/1977	3 10 cm	3 4 cm	-	+	-	
19	23-8 17/07/1991	+	+	7 yıl + her iki aksillada 5cm,servikal LAP reaktif, mezenterik yağ dokusu içinde sağ böbrek yakınında 9 mm	+	-	Annenin teyzesinin kızı menenjit nedeniyle ex. Dede kolon Ca. Baba psöriazis.
20	27-9 02/07/1987	+(Splenektomi)	-	-	-	+	-
21*	14-9/12 06/02/2000	-	-		-	-	Kardeşinde de aynı belirtiler
22	17-3/12 24/11/1997	-	-	+	-	-	
23	19-15 23/08/1995	3/+	-	+	+	-	
24	4-17/12 09/03/2010	-	-	-	-	kronik	
25	5-3 11/06/2009	+	+	+	+	-	Anneanneninin ikizinde Behçet H.

* Hastalarda belirgin lenfoproliferasyon olmamakla birlikte otoimmünite varlığı ve DNT yüzdelilerinin belirgin yüksek olması (%8 ve %11) nedeni ile ALPS yönünden değerlendirildi.

3.2. BİYOKİMYASAL ÇALIŞMALAR

3.2.1 Serum Fas-L Düzeyinin Ölçümü

Serum Fas-L düzeyinin ölçümü Human sFas-L Platinum ELISA

*BMS260/2/ BMS260/2TEN Bender MedSystems GmbH Campus Vienna Biocenter 2
1030 Vienna, Austria www.eBioscience.com* kiti satın alınarak çalışılmıştır.

3.2.1.1 Deneyin Yapılışı

1. Kullanılacak sayıda mikro kuyucuk şeritleri hazırlanır.
2. Yıkama tamponu ile kuyucuklar 2 defa yıkanır.
3. Standartlar sulandırılır.
4. 100 µl Örnek sulandırıcısı blank kuyucuklarına eklenir.(2'li çalışma)
5. 50 µl Örnek sulandırıcısı örnek kuyucuklarına eklenir.
6. Tasarlanmış örnek kuyucuklarına 2'li olacak şekilde 50 µl birey örneği eklenir.
7. Biotin konjugat hazırlanır.
8. 50 µl biyotin konjugat tüm kuyucuklara eklenir.
9. Kuyucukların üstü kapatılarak 18–25°C arasında 2 saat süresince inkübe edilir.
10. Streptavidin-HRP hazırlanır.
11. Mikro kuyular 4 defa yıkama tamponu ile yıkanır.
12. 100 µl sulandırılmış Streptavidin-HRP tüm kuyulara eklenir.
13. Kuyucukların üstü kapatılarak 18–25°C arasında 1 saat süresince inkübe edilir.
14. Mikro kuyucuklar 4 defa yıkama tamponu ile yıkanır.
15. 100 µl TMB (tetrametil benzidin) Substrat solüsyonu tüm kuyulara eklenir.
16. 18–25°C arasında 10 dakika süresince inkübe edilir.
17. 100 µl reaksiyon durdurma çözeltisi tüm kuyulara eklenir.
18. 450 nm'de renk yoğunluğu ölçülerek standart grafikte hesaplamalar yapılır.

3.2.2.Serum IL–10 Düzeyinin Ölçümü

Serum IL–10 Düzeyi; Human sIL–10 Instant ELISA BMS215 INST Bender MedSystems GmbH Campus Vienna Biocent 2 1030 Vienna, Austria www.eBioscience.com kiti satın alınarak ölçülmüştür.

3.2.2.1 Deneyin Yapılışı

Standart şeritleri A1/A2 ile H1/H2 arasına yerleştirilir.

Örnek kuyularına 100 µl distile su eklenir.

50 µl örnekleri tasarlanan kuyulara eklenir.

- Kuyuların üzeri kapatılır ve oda sıcaklığında 3 saat 400 rpm mikropalak çalkalayıcıda inkübe edilir.

Mikro kuyular 400 µl yıkama tamponu ile 6 defa yıkanır.

Blank dahil tüm kuyulara TMB substrat solüsyonu eklenir.

- 18–25°C arasında 10 dakika süresince inkübe edilir.
- 100 µl reaksiyon durdurma çözeltisi tüm kuyulara eklenir.

450 nm’de renk yoğunluğu ölçülerek standart grafikte hesaplamalar yapılır

Solid Faz Sandwich Immunoassay (Luminex) Yöntemi ile Serum IL–10 Düzey Ölçümü: Luminex yöntemiyle serum IL–10 düzey ölçümü Cytokine Human 30-plex Panel, LHC6003, (Luminex platform; Life Technologies; Carlsbad, CA) ticari kiti kullanılarak, kit protokolüne göre ölçülmüştür.

3.3. MOLEKÜLER ÇALIŞMALAR

3.3.1 Dizi Analizi İçin Örneklerin Hazırlanması

3.3.1.1 Otomatik DNA İzolasyonu

Bireylerden EDTA'lı tüpe 2cc kan alındıktan sonra aşağıda belirtilen protokole göre DNA izolasyonu için örnekler 200 µl alınarak örnek tüplerine eklendi.

Cihaza yerleştirme düzeni:

1. Elüsyon tüpleri (1,5 ml). İlk sıraya yüklenir
2. İçinde filtrelili pipet uçları olan pipet tutucular 2. sıraya yüklenir
3. %80 etanol yıkama basamağı seçilmediyse 3.sıra boş kalacaktır, bu basamak seçilirse 2 ml'lik tüplere 1800 µl %80'lik etanol eklenerek cihaza yüklenir.
4. 2ml'lik örnek tüpleri 4. sıraya yüklenir
5. Reaktif kartuşları kartuş bölümüne yüklenir.(143)

Cihazdan 17 dakika sonra 200 µl kan örneği için 200 ul elüsyon tamponu içinde 4–8 µg miktarında DNA çözeltisi elde edilir.

3.3.1.2 PCR Protokolü

Her bir örnek tüpü için 1 µl DNA örneği (1/10 sulandırılarak alındı), 1 µl ileri primer (10 pmol), 1 µl geri primer (10 pmol), 2,5 µl buffer, 2,5 µl 25 mM MgCl₂, 0,2 µl konsantrasyon 2 mM olacak şekilde dATP, dGTP, dCTP, dTTP karışımı (Fermentas, Litvanya), 0,3 µl Taq DNA Polimeraz (Fermentas, Litvanya) . Son hacim 20 µl'ye ddH₂O ile tamamlanarak polimeraz zincir reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. PCR protokolü tablo 3.3.1.2'de belirtilmiştir.

Tablo. 3.3.1.2 PCR Protokolü

Reaksiyon Aşaması	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
İlk Denatürasyon	95	10 dakika	1
Denatürasyon	95	15 saniye	35
Bağlanma (Annealing)	Primere göre TM değişir	1 dakika	
Uzama (Extension)	72	30 saniye	
Son Uzama	72	5 dak	1
Soğutma	4	sonsuz	-

3.3.1.3 Agaroz Jel Elektroforezi

Agaroz, kırmızı alg cinsleri olan *Gelidium* ve *Gracilaria*'dan izole edilen doğrusal bir polisakkarittir. Agaroz sıcak suda çözündürülüp soğutulduğu zaman, polimerizasyon ile karşılıklı hidrojen bağlarının oluşumu sonucunda jel yapısına dönüşür. Bu oluşum geri dönüşümlüdür. %2'lik jel hazırlamak için 2 gr agaroz (Lonza, Rockland, USA) ve 100 ml Tris Borik EDTA (TBE) tamponu (Dr.Zeydanlı Hayat Bilimleri, Türkiye) içerisinde 3 dakika mikrodalga fırında kaynatma yolu ile çözündürüldü. Agaroz jel, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) sonuçlarını görüntüleme amacıyla kullanılmıştır. Hazırlanan agaroz jele yüklenen örnekler elektriksel alanda belirli bir süre boyunca boyutlarına ve moleküler ağırlıklarına göre ayrıştırılmıştır.

3.3.1.4 Dizi Analizi Protokolü

Her örnek için 4 µl BigDye (AB Austin TX 78744,USA), 3.3 pmol uygun primer (ileri veya geri), 1 µl PCR ürünü, 14 µl ddH₂O 0.2'lik steril tüplere eklenerek belirtilen protokole göre ABI Prism (9700) Termal Cyclers amplifiye edildi. Dizi analizi reaksiyonu için PCR protokolü tabloda belirtilmiştir.

Tablo 3.3.1.4 Dizi Analizi PCR Protokolü

Reaksiyon Aşaması	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
Denatürasyon	96	10 saniye	25
Bağlanma (Annealing)	50	5 saniye	
Uzama (Extension)	60	4 dakika	
Soğutma	4	sonsuz	-

3.3.1.5 Dizi Analizi Yapılan Örneklerin Pürifikasyonu

Dizi analizi PCR'ı biten örnekler ZymoResearch ticari kiti kullanılarak pürifiye edildi ve analizi için ABI 310 dizi analizi cihazına 1 µl pürifiye örnek, 20 µl dH₂O eklenerek yüklendi.

3.3.1.5.1 Pürifikasyon Protokolü

240 µl sekans bağlama tamponu 5–20 µl sekans reaksiyonu üzerine eklendi. *Zymo-Spin™ IB* kolonları toplama tüplerine yerleştirildi. 13.000 rpm’de (15,000 – 16,000 x g) 30 saniye santrifüj edildi. 300 µl sekans yıkama tamponu kolonlara eklendi. 13.000 rpm’de (15,000 – 16,000 x g) 30 saniye santrifüj edildi. Kolon filtrelerinin üzerine 20 µl distile su eklendi. Kolonlar 1,5 ml’lik mikrosantrifüj tüplerine yerleştirildi ve 13.000 rpm’de (15,000 – 16,000 x g) 15 saniye santrifüj edildi. Elde edilen pürifiye örnekler analiz edilene kadar karanlık ortamda tutuldu.

3.3.2 FAS Geni Mutasyon Taraması

Muhtemel ALPS tanısı düşünülen hastalardan elde edilen DNA örneklerinde uygun primerler (Tablo 3.3.2) kullanılarak *FAS* genindeki görülebilecek mutasyonların varlığı araştırılmıştır. *FAS* geninin 9 ekzonu bulunmaktadır.

Tablo 3.3.2. *FAS* Geni İçin Tasarlanan Primer Dizileri

FAS geninin 9 ekzonuna ait primer dizisi, G/C oranı, TM (erime sıcaklığı), primerlerin uzunlukları ve baz dizisi aşağıdaki tabloda belirtilmiştir.

Ekzon No	G/C Oranı (%)	TM değeri (°C)	Uzunluğu (bç)	Baz Dizisi
1F	55	60	495	GTGAGCTCGTCTCTGATCTC
1R	42.1	53	495	AAGAAAAGCAAGTCCTCCA
2F	40	54	331	ACTTGTTTACCACGTTGCTT
2R	40	54	331	TAGGGGAACCAAAAACCTGTA
3F	40	54	396	ATCTTCTCCCCATTGTATT
3R	50	58	396	GTGTCAACATAGCACCACAG
4F	47.6	59	479	GGGAGACGTCTAAGTATTGGT
4R	42.9	57	479	ACAGTCATCTAGTTGCTTGGA
5-6F	28.6	52	590	ACAAAGTGCCATTGAAAATTA
5-6R	38.1	55	590	TGTTTCATAGGAAGGATGAGAA
7F	38.1	55	269	TGTTCTCACATGCATTCTACA
7R	33.3	54	269	ACTCCATCTCAAACAAAATGA
8F	38.1	55	201	GTCTTTCTCTGCTTCCATTTT
8R	42.9	57	201	CTTTATGCTGAGCAGGTAGAA
9F	40	54	617	TCAAGGTTGTCTTGTCTTCTG
9R	35	52	617	TCTTCAGCGCTAATAAATGA

3.3.2.2 DNT Hücrelerinin Toplanması

DNT hücreleri hastadan alınan EDTA'lı kan örneğinden uygun monoklonal antikorlar (CD4, CD8, TCR $\alpha\beta$, CD3) ile inkübe edilerek Flow Sitometri (Coulter) Sorting cihazında toplanarak elde edildi.

3.3.2.2.1 DNT Hücrelerinden DNA Elde Edilmesi

İnvitrogen adli tıp (*Forensics DNA*) DNA izolasyon ticari kiti ile protokole uygun olarak DNA elde edildi.

3.3.2.2.2. Somatik FAS Mutasyonu Taraması

Somatik FAS mutasyonu düşünülen hastadan Flow sitometri sorting ile elde edilen DNT hücrelerinden izole edilen DNA örneğinde FAS geni için tasarlanan primerler kullanılarak FAS geni somatik mutasyon varlığı araştırılmıştır.

3.3.3 FASL Geni Mutasyon Taraması

Muhtemel ALPS tanısı düşünülen hastalardan elde edilen DNA örneklerinde uygun primerler (Tablo.3.3.3.) kullanılarak FASL geni mutasyon varlığı araştırılmıştır.

Tablo 3.3.3. FASL Geni İçin Tasarlanan Primer Dizileri

Ekzon No	G/C Oranı (%)	TM değeri (°C)	Uzunluğu (bp)	Baz Dizisi
1F	55	60	505	TCCTTGACACCTCAGCCTCT
1R	52.6	57	505	ACTTTGCAAGCCAGGCAGT
2F	50	58	216	GACGATTCTGCCTCTTTTGC
2R	47.6	59	216	GAAACCAAAGTGTGGGACAGA
3F	45.5	60	301	TATGAATCCTGCAGTTCAGACC
3R	50	58	301	GAGCCTGGTAATGGAAACCA
4F	50	58	501	GCCCACAGTTTTGCCTTAGA
4R	45	56	501	TGGAAAGAATCCCAAAGTGC

3.3.4 CASP8 Geni Mutasyon Taraması

Muhtemel ALPS tanısı düşünülen hastalardan elde edilen DNA örneklerinde uygun primerler (Tablo 3.3.4) kullanılarak *CASP8* geni mutasyon varlığı araştırılmıştır.

Tablo 3.3.4 *CASP8* Geni İçin Tasarlanan Primer Dizileri

Ekzon No	G/C Oranı (%)	TM değeri (°C)	Baz Dizisi
1F	55	60	CTTTCTGCTGGAGGGAAGTG
R	55	60	CTCAGAAGGGCAGATCCAAG
2F	45	56	CTTTGATGAACAAGCCAGCA
R	55	60	CTTTAGCAGGACCACCCAAG
3F	55	60	GTCACCACACCAGCCTCTTT
R	55	60	GCAGCACTTCGGTCTAAAGG
4F	50	58	CAGGTCCTTGGTTGGAGAAA
R	56	45	TAAAAGGGGAAACCCCAAAC
5F	45	56	GTTTGGGGTTTCCCCTTTTA
R	45	56	AGGCAGGAGATTTGCTTGAA
6F	50	58	CCTTTCCTGCCATGTCTCAT
R	45	56	TTTCTGCCCCTTGTCAGTTT
7F	50	58	GCAATGGAAAGCAAGTCCTC
7R	45	56	GAAACATGGCCCTTTTGGTA
8F	55	60	CTCCAGCTGTGGTCTGTGAA
8R	55	60	TCCCCTTGGACAGTTCTCTG
9F	55	60	TCTGAGCACAGCAGAGGAGA
9R	57.9	59	AGATCACGCCACTGCACTC

3.4 LRBA Proteinin Western Blot Analizi ile Araştırılması

3.4.1. Hücre Kültürü

Western Blot yöntemi LRBA proteinin bulunup bulunmadığının gösterilmesi için kullanılmıştır. Bunun için hasta ve sağlıklı gruptan sodyum heparinli (anti-koagülan) tüplere 8'er cc kan alındı ve hücre kültürü aşağıda belirtilen şekilde yapıldı:

- 1.Toplanan kanlardan *Ficoll-hystopaque* ile dansite gradient yöntemiyle lenfositler izole edildi.
- 2.Hücrelere 25 ml'lik kültür şişelerine (Nunc, Danimarka) 5ml hücre çözeltisi ve bir mitojen olan PHA 5 ml eklenerek (+37°C,%5 CO²) hücreler uyarıldı.
- 3.72 saat sonunda hücreler PBS ile 2 defa 10 dakika 1750 rpm'de yıkandı.
- 4.Hücre pelletinin üzerine 1000 ul soğuk PBS eklenerek 10000 rpm'de çevrildi ve elde edilen pellet protein lizatı hazırlanana kadar -80°C'de saklandı.

Hücre kültürü sırasında kullanılan kültür ortamında kullanılan malzemeler:

75 ml RPMI-1640 (*Roswell Park Memorial Institute*)- Biological Industries Kibbutz Beit Haemek, İsrail

20 ml (%20) FCS (*Heat inactivated Fetal calf serum*)- Biochrom AG, Leononen str. 2-6 12247 Berlin

2 ml (%2) HEPES buffer -Biological Industries Kibbutz Beit Haemek, İsrail

1 ml (%1) *penicillin streptomycin* -Biological Industries Kibbutz Beit Haemek, İsrail

2 ml L-Glutamin -Biochrom AG, Leononen str. 2-6 12247 Berlin

3.4.2 Protein Elde Edilmesi

Hücre kültürü gruplarından alınan örnekler *medium* eklenerek 10000 rpm de santrifüj edildikten sonra süpernatant aspire edildi ve soğutulmuş PBS ile yıkandı. Üzerine örnek tamponu eklenerek (50 mM Tris-HCl, pH 7,9, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1 mM PMSF, 1 mM DTT, 5 µg/mL Aprotinin, 5 µg/mL Leupeptin, 5 µg/mL Pepstatin A) hücre ekstraktları hazırlandı. Protein örnekleri 10-40 µL'de 10-40 µg olacak

şekilde hazırlanarak 95 °C’de 2–4 dakika (veya 100 °C’de 1 dakika) inkübe edildi ve örneklerden denatüre protein elde edildi.

3.4.3 Western Blot Analizi

Yürütme ve Transfer: Denatüre edilen protein örnekleri jel üzerindeki kuyucuklara yüklenerek, elektroforez yöntemiyle moleküler ağırlıklarına göre bantlar halinde ayrıştırıldı ve sonrasında PVDF (Thermo Scientific, USA) membran üzerine aktarıldı.

LRBA Proteinin İşaretlenmesi ve Boyanması: Jele %5 süt tozu içeren PBST içerisinde 1 saat blokaj yapıldı, birincil antikor LRBA antikor (Sigma) eklendikten ve yıkandıktan sonra, ikincil antikor AntiRabbit Sekonder Antikor (Cell Signaling) eklendi ve PBST (PBS+Tween 20) ile yıkandı. Kemiluminesan görüntüleme için west femto kiti (Thermo scientific) ile işaretlendi.

Görüntüleme ve Analiz: Görüntüleme sistemi ile bantlar görüntülendi ve analiz edildi. (Kodak Gel Logic 1500, Eastman Kodak Company, Kanada)

3.5. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Sağlıklı kontroller ve hastalar arasındaki biyokimyasal parametre değerindeki farklar; Mann Whitney-u testi, SNP dağılım sonuçları ise Fisher’s Exact ve Ki-Kare testleri ile değerlendirildi.

4. BULGULAR

4.1 Biyokimyasal Bulgular

ALPS tanı kriterlerine göre klinik olarak muhtemel ALPS tanısı alan hastaların hepsinde Sanger yöntemi ile germline *FAS*, *FASL* ve *CASP8* çalışıldı (3) . 25 hastadan 22'sinde ALPS hastalarının tanısında yardımcı kriter olarak kullanılan serum IL-18, IL-10, sFASL, VitB12 düzeyleri değerlendirildi. Periferik kan VitB12, DNT yüzdeleri, lenfosit alt grupları, Ig düzeyleri, total lenfosit ve nötrofil sayıları hastaların laboratuvar kayıtlarından alındı. Serum IL-10 ve sFAS-L düzeyleri bir hasta hariç hepsinde normal sınırlar içerisindeydi.

4.2. DNT Hücre Değerleri

DNT hücre yüzdeleri 1 hasta (test yapıldığı dönemde steroid alıyordu) hariç diğerlerinde yüksek bulundu. DNT sayıları %2 ile %13 arasında olup ortanca değeri %3 olarak belirlendi (Tablo 4.12).

4.3 Serum İnterlökin 10 (IL-10) Düzeyleri

Muhtemel ALPS'u düşünülen 22 hastada ve 16 sağlıklı kontrolde *Instant ELISA* yöntemi ve Luminex yöntemi ile serum IL-10 düzeyleri değerlendirildi. *ELISA* yöntemiyle değerlendirmede; IL-10 düzeyleri bir hasta (134 pg/ml) hariç, literatürde sağlıklı kontrol değerleri olarak belirtilen 20 pg/ml'nin altında bulunmuştur. Hastalarda elde edilen median değer 3 iken kontrollerde median değeri 2 olarak bulunmuştur. Hasta ve sağlıklı kontroller arasında istatistiksel farklılık bulunmadı (Mann Whitney-u Testi: $z = -1,899$ ve $p = 0,058$).

Luminex yöntemi ile değerlendirmede ise IL-10 düzeyleri 2 hasta hariç (385 pg/ml ve 30 pg/ml) tümünde literatürde sağlıklı kontrol değerleri olarak belirtilen 20 pg/ml'nin altında bulunmuştur. Çalışılan sağlıklı kontrollerin değerleri ise <2.67 pg/ml olarak bulunmuştur.

4.4 Serum IL–18 Düzeyleri

Muhtemel ALPS’u düşünölen 22 hastada *Instant ELISA* yöntemi ile serum IL–18 düzeyleri değeriendirildi. IL–18 düzeyi 22 hastanın 5’inde literatürde cut-off değeri olarak belirtilen 1500 pg/ml’nin üzerinde olduğu belirlendi. Hastaların median değeri 585 olarak bulunmuştur.

4.5 Soluble Fas Ligand (sFas-L) Düzeyleri

Muhtemel ALPS’u düşünölen 22 hasta ve 16 sağılıklı kontrolde *Platinum ELISA* yöntemi ile sFas-L düzeyleri çalışıldı. sFas-L düzeyleri kontrollerin tümünde literatürde normal düzeyler için cut-off değeri olarak belirtilen 200 pg/ml’nin altında iken, hastaların yalnızca birisinde (% 4,3) bu değerin üzerinde (3517 pg/ml) bulundu.

4.6 Vitamin B12 (Vit B12) Bulguları

25 Hastamızdan 24’ünün Vit B12 düzeyleri belirlenmiştir. 24 hastanın 2’sinde Vit B12 düzeyi literatürde cut-off değeri olarak belirtilen 1500 ng/L’nin üzerinde olduğu görölmüştür (Tablo 4.12).

4.7. İmmunoglobulin Düzeyleri

25 hastamızın takipleri süresince belirlenen immünoglobulin (Ig) değerilerinin düzeyi ve değışimi tablo 4.7’de gösterilmiştir.

Tablo.4.7 Hastaların Ig Düzeyleri ve Takip Sırasındaki Seyri

Tablo 4.7. Hastalarımızın Ig Düzeyleri ve Takip Sırasındaki Seyri		
Hasta No	Ig Düzeyleri (mg/dl)	Takip Sırasındaki Seyri
1	A:7 G:897 M:47 (7 yaş)	IgG (680-980) ve IgM (27-76) değişken, IgA düşük
2	A:56 G:1120 M:150 (9 ay)	IgG, IgM ve IgA normal, son 2 yılda giderek düşmüş
3	A:55 G:6340 M:100 (11 yaş)	IgG yüksek, IgM ve IgA normal ve yüksek
4	A:80 G:500 M:37 (11 yaş)	IgG(500-1570), IgM (50-81)değişken, IgA normal
5	A:79 G:671 M:27 (10 yaş)	IgG ve IgA düşük (değişken), IgM düşük
6	A:84 G:2690 M:189 (10 yaş)	IgG değişken(590-3400), IgM normal , IgA hafif düşük-normal (54-91)
7	A:88 G:1210 M:65 (14 yaş)	IgG, IgA normal , IgM değişken,hafif düşük
8	A:247G:1760 M:296 (10 yaş)	IgG, IgM ve IgA yüksek
9	A: 53 G:677 M:82 (8 yaş)	IgG(540-1640), IgM(54-125) değişken ve IgA düşük(25-51)
10	A:23 G:1020 M:116 (4 yaş)	IgG ve IgM normal, IgA düşük
11	A:45 G:523 M:43 (11 yaş)	IgG düşük, IgM(43-116) ve IgA (20-65) değişken,hafif orta derecede düşük
12	A:64 G:2090 M:42 (8 yaş)	IgG yüksek, IgM hafif düşük, IgA normal
13	A:25 G:530 M:135 (5 yaş)	IgG giderek düşmüş (319-900), IgM (32-189)ve IgA(19-57) değişken
14	A:134 G:2360 M:368 (10 yaş)	IgG ve IgM yüksek, IgA normal
15	A:63 G:739 M:40 (25 yaş)	IgG hafif düşük, IgA ve IgM düşük
16	A:77 G:1090 M:109 (11 yaş)	IgG , IgA , IgM normal
17	A:198G:1290 M::153 (6 yaş)	IgG , IgA , IgM normal
18	A:753 G:3390 M:120 (33yaş)	IgG ve IgA yüksek, IgM normal
19	A:43 G:970 M:46 (16 yaş)	IgG normal, IgM giderek düşmüş , IgA(46-69) hafif düşük
20	A:79 G:890 M:4400 (22 yaş)	IgG ve IgA giderek düşmüş, IgM normal/sonra yüksek
21	A:93 G:2510 M:350 (6 yaş)	IgG ve IgM yüksek, IgA normal
22	A:109 G:560 M:84 (10 yaş)	IgG düşük , IgM(50-477) ve IgA (40-109) değişken
23	A:85G:1620 M:51 (18yaş)	IgM hafif düşük, IgG ve IgA normal
24	A:146G:1610 M:65 (44 ay)	IgG yüksek, IgM ve IgA normal
25	A:23 G:1250 M:16 (4,5 yaş)	IgG yüksek, IgM düşük, IgA hafif düşük

4.8 DNA Dizileme Yöntemi ile *FAS* Geni Mutasyon Taraması

Muhtemel ALPS'u düşünülen 25 bireyde *FAS* geninde DNA dizilime yöntemi ile mutasyon araştırıldı. Hiçbir ekzonda mutasyon saptanmadı. 7. ekzon hariç, diğer 8 ekzonda bir varyasyon saptanmadı. 7. ekzonda ise rs2234978; C>T tespit edildi. 90 sağlıklı kontrolde C/C alleli % 73 (66 kişi), C/T alleli % 25 (22 kişi) ve T/T alleli % 2 (2 kişi) iken, hastalarda C/C alleli %8 (n=2), C/T alleli %4 (n=1) ve T/T alleli %88 (n=22) bulundu (Tablo 4.8).

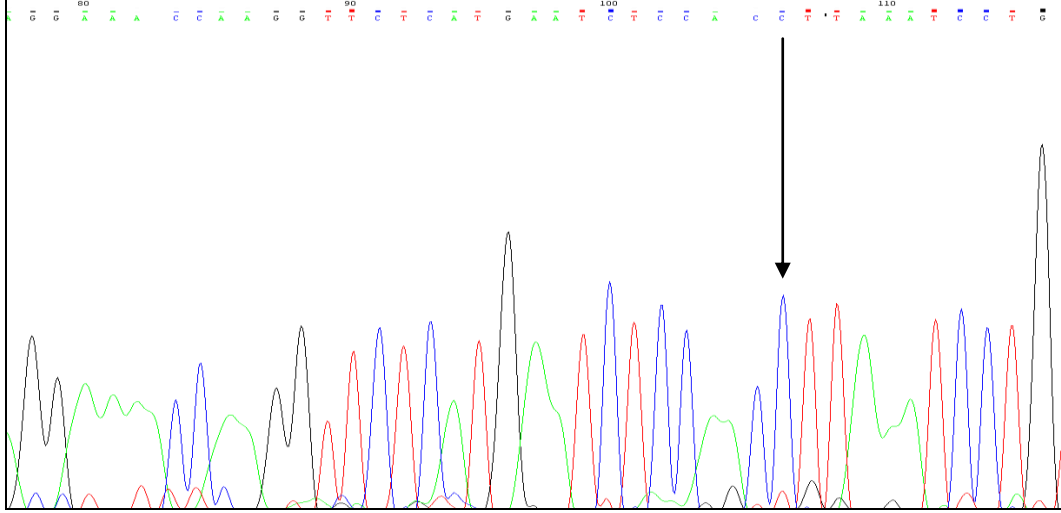
Tablo 4.8 *FAS* rs2234978 SNP Sonuçları

Hasta Numaraları	SNP rs2234978*
1	T/T
2	T/T
3	T/T
4	T/T
5	C/T
6	T/T
7	T/T
8	T/T
9	T/T
10	T/T
11	T/T
12	C/C
13	T/T
14	T/T
15	T/T
16	T/T
17	T/T
18	T/T
19	T/T
20	T/T
21	T/T
22	T/T
23	T/T
24	C/C
25	T/T

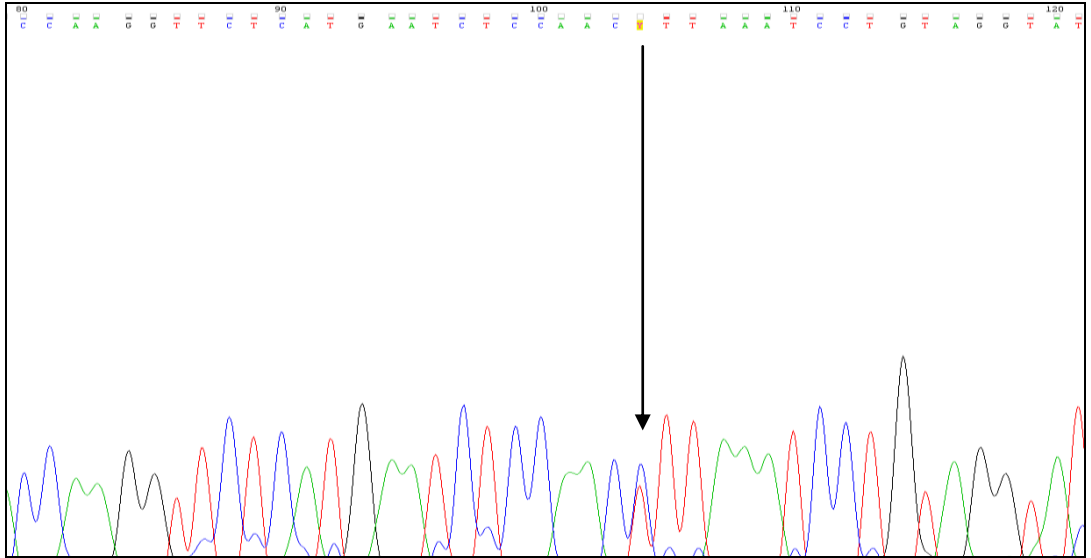
*Sağlıklı kontrollerdeki allel sıklıkları %73 C/C (66 kişi), %25 C/T (22 kişi), % 2 T/T (2 kişi)Hasta ve kontrol grubu arasında SNP dağılımı bakımından istatistiksel olarak önemli düzeyde fark bulundu. (Fisher's Exact Ki-Kare Testi p=0.001). Farklılığa T/T allelinin hastalarda daha fazla görülmesi sebep olmaktadır. Diğer allellerde benzer dağılımlar mevcuttur.

4.8 FAS Gen SNP rs2234978 (C>T) Dizi Analizi Kontrol, Heterozigot ve Homozigot Hasta Örnekleri

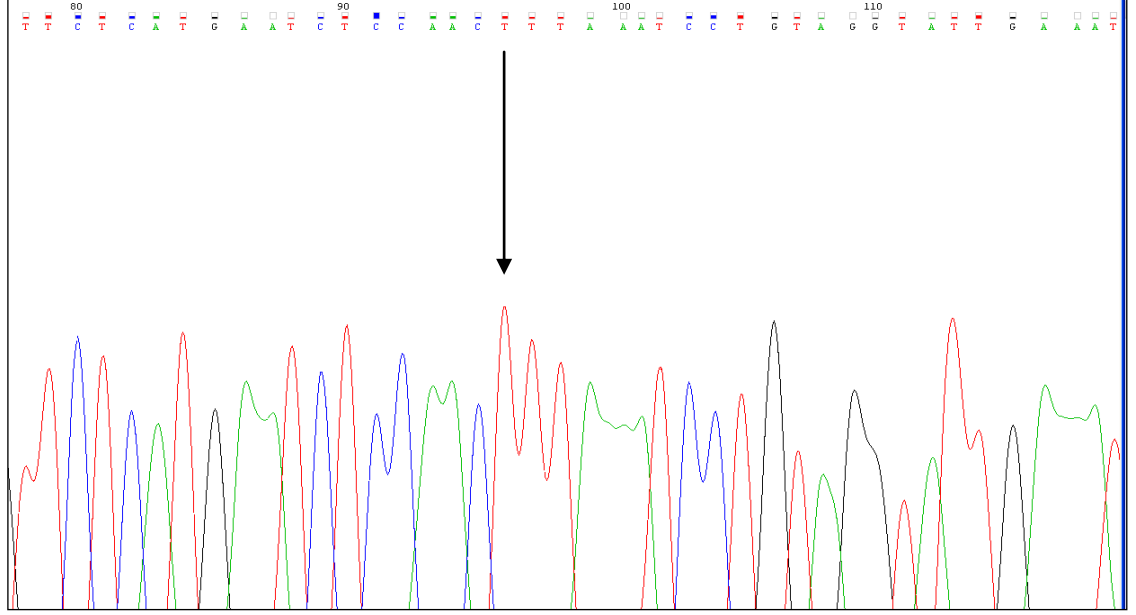
A) Kontrol (C/C)



B) SNP rs2234978 Minör Allel heterozigot T (C/T)



C) SNP rs2234978 Minör Allel Homozigot T



4.9 DNA Dizilime Yöntemi ile *FAS Ligand* Gen Mutasyon Taraması

Muhtemel ALPS'u düşünülen 25 hastada *FASL* geninde DNA dizilime yöntemi ile mutasyon araştırıldı. Hastaların hiç birisinde mutasyon veya varyasyon saptanmadı.

4.10 DNA dizilime Yöntemi ile *CASPASE 8 (CASP)* Gen Taraması

Muhtemel ALPS'u düşünülen 25 hastada *CASP8* geni DNA dizilime yöntemi ile tarandı. Mutasyon bulunamadı ancak *CASP8* 8.ekzonda SNP rs1045487;G>A alleli hastalarımızın beşinde mevcuttu. 100 sağlıklı kontrolde G/G alleli %98 (98 kişi), G/A alleli %2 (2 kişi) olarak tespit edilirken, A/A alleli tespit edilmemiştir. Hastalarda G/G alleli %80 (20 hasta) ve G/A alleli %20 (5 hasta) olarak tespit edilirken, A/A alleli tespit edilmemiştir (Tablo 4.10). Hasta ve kontrol grubu arasında SNP dağılımı bakımından istatistiksel olarak fark bulundu. (Fisher's Exact Ki-Kare Testi $p=0.004$). Diğer allellerde benzer dağılımlar mevcuttur. Diğer 8 ekzonda varyasyon saptanmamıştır.

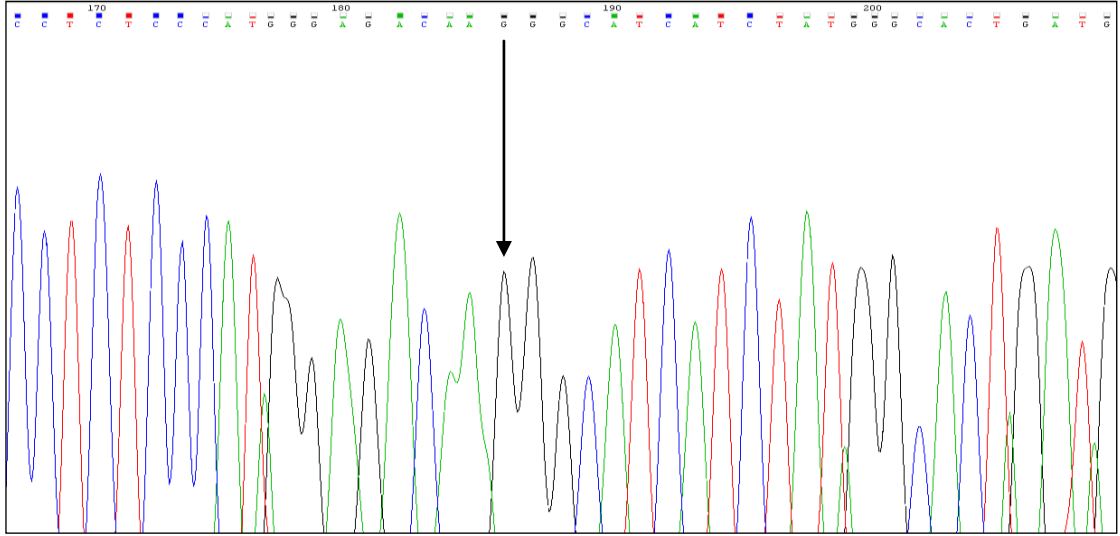
Tablo 4.10 *CASP8* rs1045487 SNP Sonuçları

Hasta Numaraları	SNP rs1045487*
1	G/A
2	G/G
3	G/G
4	G/G
5	G/A
6	G/G
7	G/G
8	G/G
9	G/A
10	G/A
11	G/G
12	G/G
13	G/G
14	G/G
15	G/G
16	G/G
17	G/A
18	G/G
19	G/G
20	G/G
21	G/G
22	G/G
23	G/G
24	G/G
25	G/G

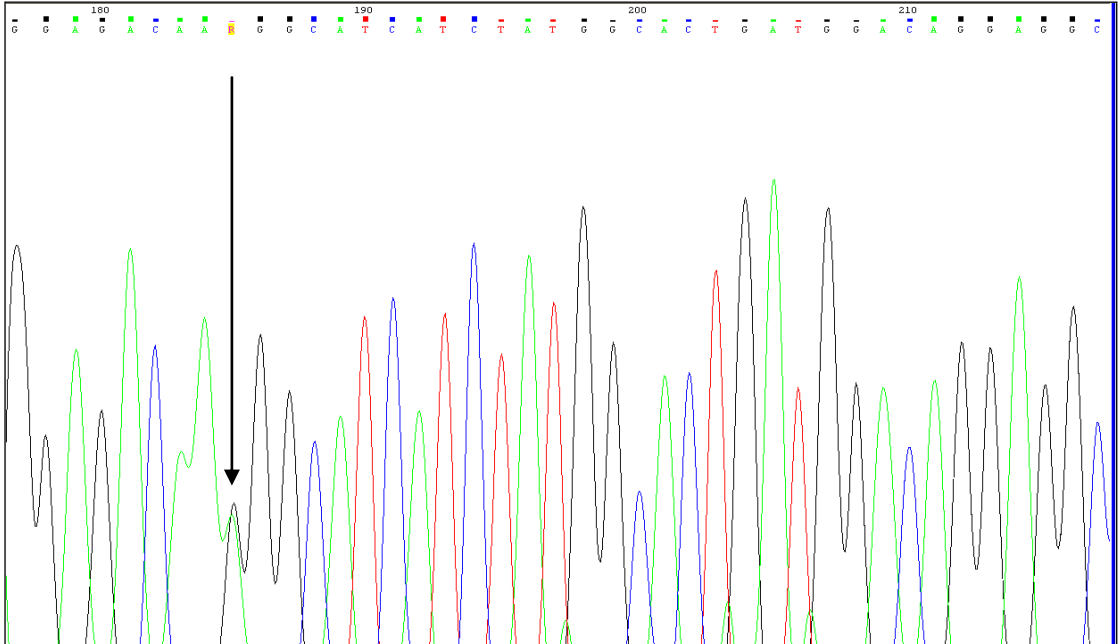
* Sağlıklı kontrollerdeki allel sıklıkları G/G %98 (98 kişi), G/A %2 (2 kişi), A/A (0)

4.10 CASP8 Gen SNP rs1045487 (G>A). Dizi Analizi Kontrol ve Heterozigot Hasta Örneği

A) Kontrol (G/G)



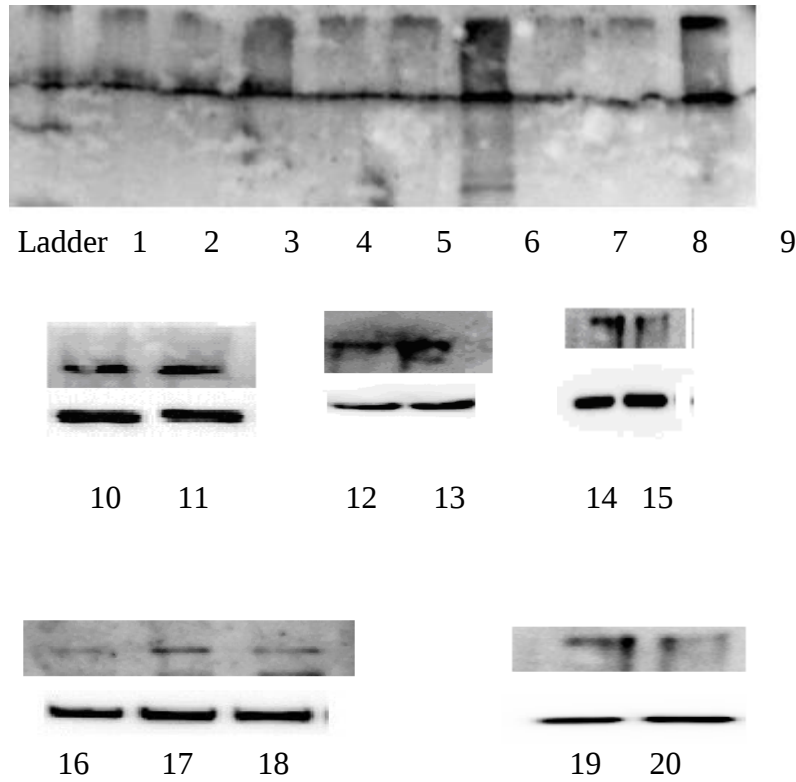
B) SNP rs1045487 Minör Allel Heterozigot A (G/A)



4.11 Western Blot Yöntemi ile LRBA Protein Varlığının Araştırılması

Muhtemel ALPS'u düşünülen 25 hastanın 20'sinde LRBA protein varlığı lenfosit hücre kültürünü takiben western blot yöntemi ile çalışıldı. Çalışılan hastaların hepsinde LRBA proteinini mevcuttu. Şekil 4.11'de hastaların sonuçları gösterilmiştir.

Şekil. 4.11 LRBA Protein Sonuçları



Tablo 4.12 Hastaların Biyokimya ve Sekans Analiz Sonuçları

Hasta No	IL-18 Düzeyi (pg/ml)	IL-10 Düzeyi (pg/ml)	sFASL Düzeyi (pg/ml)	Vitamin B12 (ng/L) >1500	DNT (%)	SNP *	SNP **
1	2400	6.0	32	633	2	T/T	G/A
2	2200	10	70	489	3	T/T	G/G
3	1900	4.0	34	677	3	T/T	G/G
4	19	2.0	35	401	3	T/T	G/G
5	900	3.0	33	>1200	4	C/T	G/A
6	310	3.0	36	363	7	T/T	G/G
7	160	2.0	56	364	3	T/T	G/G
8	2.0	3.0	153	462	3	T/T	G/G
9	8.8	3.0	71	604	6	T/T	G/A
10	56	9.0	71	992	10	T/T	G/A
11	210	2.0	36	319	6	T/T	G/G
12	87	134	3517	>2000	13	C/C	G/G
13	ND	ND	ND	885	5	T/T	G/G
14	1500	3.0	58	-	8	T/T	G/G
15	1100	2.0	34	585	2	T/T	G/G
16	1050	6.0	36	873	3	T/T	G/G
17	145	3.0	86	334	5	T/T	G/A
18	550	2.0	36	201	2	T/T	G/G
19	700	2.0	39	336	5	T/T	G/G
20	650	2.0	39	266	4	T/T	G/G
21	620	2.0	17	726	11	T/T	G/G
22	2850	12	33	1461	10	T/T	G/G
23	19	12	65	290	3	T/T	G/G
24	ND	ND	ND	1161	1	C/C	G/G
25	ND	ND	ND	718	2	T/T	G/G

* rs2234978 ** rs1045487

ND: Test Edilmedi

5. TARTIŞMA

Bu çalışma 2009-2013 yılları arasında Hacettepe Üniversitesi Pediatrik İmmünoloji Bilim Dalında izlenen ‘muhtemel’ ALPS tanısı alan 25 hastada yapılmıştır. Hastalarda ALPS tanısı için gerekli kriterleri oluşturan, 6 aydan uzun süren, malign veya enfeksiyöz olmayan lenfadenopati ve/veya splenomegali ve DNT hücre sayılarının yüksekliği ve sekonder aksesuar kriterlerden özellikle otoimmün sitopeni mevcuttu.

Muhtemel ALPS tanısı alan hastaların kesin tanı alan hastalar gibi izlenmesi ve tedavi edilmesi gerekmekte, kesin tanı için genetik test veya apoptozis testi yapılması önerilmektedir (3) . Primer aksesuar kriterlerden apoptozis testi hastalarımızın bir kısmında ve ancak bir kez yapılabilmiş, tanı için önerilen iki farklı günde veya iki farklı test ile gösterilmesi mümkün olmamıştır. Ayrıca kullandığımız , çalışmamızın yapıldığı dönemde en sık kullanılan apoptozis testi, standardize edilmesi güç bir test olup; sonuçların fikir verebilmekle birlikte hücre ölüm yüzde değerlerini her zaman kesin sayılarla vermek mümkün değildir. Bunun yanında sFas defekti olan hastalarda apoptozis testi normal bulunabilmektedir.

Hastalarımızda Oliveria ve arkadaşlarının(3) kesin tanı için önerdiği algoritm’de belirtildiği şekilde ve hastalığa yol açtığı bilinen *FAS*, *FASL*, *CASP8* genlerinde sekans analizi yapılmış ve ikincil aksesuar tanı kriterleri olan biyobelirteçler (sFAS-L,IL-10,IL-18 ve VitB12) çalışılmıştır. Hastaların hiç birisinde bu genlerde mutasyon saptanmamış, buna karşılık *FAS* ve *CASP8* geninde bazı SNP’ler belirlenmiştir. *CASP8* geni 8. ekzonda saptanan rs1045487; K337K G>A minör A allel ve *FAS* geni 7. ekzonda saptanan (rs2234978; Thr214Thr C>T) minör T allel SNP sıklığı, hastalarda kontrollere göre anlamlı olarak yüksek bulunduğu saptanmıştır (sırasıyla; p=0.004, p=0.001). *FAS* rs2234978 ’in hastalığa yatkınlığa yol açabileceğine işaret etmektedir. Bu yatkınlığın doğrudan bu varyasyon ile mi ilgili, yoksa hastalığa yol açan diğer genlerle bağlantı aracılığı ile mi ortaya çıktığını söylemek mümkün olamamıştır. Bilindiği gibi SNP’ler kendi başlarına hastalık oluşturmamaktadır, ancak bazı hastalıklara yatkınlığın oluşmasında rol oynayabilirler. Tek gen hastalıklarında hastalıktan sorumlu olan genin yanında diğer

genlerde bulunan SNP'ler hastalığın gelişmesine katkıda bulunabilir . Birçok SNP sessizdir (silent), gen fonksiyonu veya fenotip üzerinde belirlenen bir etkileri yoktur. Promoter bölgede bulunan varyasyonlar, transkripsiyon faktör bağlanma bölgesini veya diğer regülatör bölgeleri değiştirerek genin ekspresyonunu kalitatif veya kantitatif olarak etkileyebilmektedir (147) . Polimorfizmler posttranskripsiyonel modifikasyon ile, gen veya protein ekspresyonunu değiştirerek de etkili olabilir. Hastalarımızda bu SNP'lerin hastalığa yatkınlık yaratması diğer genlerle bağlantı aracılığı ile de ortaya çıkabilir.

Mutant farelerde ve insanlarda yapılan çalışmalar Fas'ın immün sistemde önemli rolü olduğunu göstermektedir. Fas otoimmünite ve tümör gelişmesinde gardiyan rolü oynamaktadır. Birçok çalışma FAS genindeki SNP'lerin otoimmün hastalıklara ve kansere yatkınlık ile ilişkili olduğunu göstermiştir (148-149) .

Otoimmün özelliklerle seyreden Sistemik Lupus Eritromatozus (SLE)'nin etiyoloji ve patogenetik mekanizmaları henüz bilinmemektedir. Apoptozdaki disfonksiyonun bu hastalığın gelişmesinde rolü olduğu düşünülmektedir. Çeşitli toplumlarda (Çin, Japonya, Avusturya, İran, Kore ve Almanya popülasyonlarında) yapılan çalışmalarda FAS gen polimorfizmlerinin SLE yatkınlık ile asosiyasyon gösterdiği, özellikle Fas geninin promotor bölgesinde bulunan -670A/G ve -1377G/A polimorfizmlerinin SLE riski ile ilişki gösterdiği bildirilmiştir (150) . Fas geninin promotor bölgesinde bulunan SNP'lerin multiple sklerozis (MS) (151) ile birlikteliği de gösterilmiştir. SLE'li hastalarda yapılan bir diğer çalışmada, bizim hastalarımızda kontrollara göre önemli düzeyde yüksek olduğunu saptadığımız rs2234978 SNP varlığı ile trombositopeni arasında ilişki bulunduğu gösterilmiştir (147) SLE'da lenfositlerde Fas ekspresyonunun arttığı bildirilmektedir (152) . Lenfositlerde Fas ekspresyonunun artışı ve apoptozun immün sistemin otoantijenlerle karşılaşmasının artmasına ve böylece otoimmün hastalıklara yol açabileceği ileri sürülmüştür (153) . Bunun yanında SLE ve kanser gelişme riskinde rol oynadığı bildirilen FAS gen promotor bölgesinde rol alan -670 A/G ve -1377G/A polimorfizmlerinin FAS gen ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir (154) . *FAS* ve *FASL*'in SLE fenotipinden ziyade SLE subfenotiplerine katkıda bulunduğu; hayvan SLE modellerinde yapılan çalışmalarda da *FAS* veya *FASL* mutasyonlarının SLE'ye yol açmak için yeterli

olmadığı ancak otoimmüniteye katkı yaptığı belirtilmiştir (147). Apoptozis disfonksiyonunun SLE, RA (Romatoid Artrit), SSc (Sistemik skleroz) gibi çeşitli otoimmün hastalıkların patogeneğinde de rol aldığına işaret eden çalışmalar mevcuttur (155) .

F.Basolo ve arkadaşları (156) , papiller tiroid karsinomu (PTC) ile *FAS* geninde SNP rs2234978 arasında belirgin bir ilişki olduğunu ancak diğer tiroid patolojilerinde bu ilişkinin saptanmadığını göstermişlerdir. Neoplazisi olan hastalarda tümör dokusunda görülen SNP, etkilenmemiş diğer tiroid lobu ve periferik kan hücrelerinde de gösterilmiştir. Böylece bu polimorfizminin germ-line kökenli olduğu belirlenmiştir. Bu SNP aminoasit düzeyinde sessiz olmakla birlikte Fas'ın ekspresyonunu etkileyerek veya PTC patogeneğinde rolü olan diğer genetik bozukluklarla ilişkisi aracılığı ile bu etkiyi gösterebilir. PTC'de, Fas ekspresyonu önemli düzeyde artmıştır ancak bu özellik Graves hastalığı, tiroid adenomu ve folliküler karsinomada da mevcuttur. Farklı tiroid hastalıklarında görülen Fas ekspresyonundaki artıştan sorumlu faktörler bilinmemektedir (156) .

Kronik lenfositik tiroidit ve tiroid lenfoması olan hastalarda *FAS* aracılı apoptotik yolak bozukluğunun görülme sıklığı da yüksek bulunmuştur. Somatik Fas mutasyonları; tiroid, burun ve cildin primer lenfomaları, mesane kanseri, malign melanoma, squamoz hücreli Ca, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri ve servikal Ca gibi durumlarda belirlenmiştir (157) . rs2234978 polimorfizmi marjinal bölge B hücre lenfoması olan hastalarda da gösterilmiştir. Çalışmalar rs 2234978 polimorfizminin küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde prognozu da etkilediğini göstermiştir. Böylece çeşitli çalışmalar kanser ve otoimmün hastalıklara yatkınlık ile *FAS* genindeki SNP'lerin ilişkili olduğunu göstermiştir (147), (158), (159), (160-162),

Bradford J. ve arkadaşlarının akut akciğer hasarında (ALI) yaptıkları çalışmada hipoksik solunum yetmezliği bulunmayan kontrollerle, ALI bulunan hastalar karşılaştırıldığında rs2234978 varyasyonunun ALI için yüksek risk faktörü olduğu belirlenmiştir (163) . ALI hassasiyetine yol açan rs2234978'i de içeren haplotiplerin LPS ile uyarılan periferik kan lökositlerinde *FAS* mRNA ekspresyonunu arttırdığı da gösterilmiştir (163) .

rs2234978 polimorfizminin MiRNA (Mir561) için yeni bir bağlanma bölgesi oluşturduğu belirlenmiştir (164) . Mikro RNA'lar (miRNA) protein kodlamayan, 18–24 nükleotid uzunluğunda, küçük RNA molekülleridir. Hedef genleri baskılayarak gelişim, farklılaşma, çoğalma, hücre ölümü gibi süreçlerde rol oynarlar. miRNA'lar hedef genlerin ekspresyonunu azaltarak protein sentezinin düzenlenmesine katılırlar. Çalışmadaki hastalarda da kontrollere göre yüksek sıklıkta saptadığımız SNP etkisini Fas ekspresyon düzeyini değiştirerek gösterebileceği düşünülebilir.

Bu polimorfizmin miRNA aracılığı ile genin posttranskripsiyonel kontrolü üzerindeki etkisini, *FAS* gen veya protein ekspresyonuna etkilerini, bu etkinin zamanlama ve doku spesifisitesini ve bu etkilerin bu fenotipin oluşmasında rolü olup olmadığının araştırılması gerekmektedir.

FAS heterozigot gen mutasyonları her zaman klinik bulguya yol açmamaktadır. *FAS* mutasyonlarının penetransı değişken olup ailede sıklıkla aynı genetik değişikliği taşıdığı halde klinik fenotip göstermeyen veya çok hafif fenotipi bulunan bireyler bulunmakta, bu da hastalık için ek bir genetik mutasyon ve/veya çevresel uyaran şeklinde ikinci bir “hit” gerektiğini düşündürmektedir (165) . 2006 yılında Clementi R. ve arkadaşları perforin ve *FAS* geninde mutasyon tanımladıkları hastanın DALD/ALPS-*FAS* tanısı aldığını, *FAS* veya *perforin* mutasyonu taşıyan anne ve babanın ise sağlıklı olduğunu göstermişlerdir (103) . Buna benzer şekilde M.F. Campagnoli (81) ve arkadaşları *FAS* mutasyonu ve *CASP10* Y446C birlikteliğinin ALPS fenotipine yol açtığını ancak tek başına aynı *FAS* mutasyonu olan annenin sağlıklı olduğunu göstermişlerdir. Diğer bir yayında ise bir hasta ve kardeşinde *FAS* geninde heterozigot c.761T>G, p.Val254Gly missense mutasyonu ile birlikte SNP rs2234978'in ağır klinik fenotipe yol açtığını hastanın SNP'i taşıyan annesinin sağlıklı olduğu p.Val254Gly heterozigot mutasyonu taşıyan babanın 31 yaşına kadar asemptomatik olup bu yaşta cilt döküntüleri geliştiği ve “*pitriyazis lichenoides et varoliformis acuta*” (PLEVA) tanısı konulduğu bildirilmiştir (166). Babada DNT %14 olmasına rağmen Anneksin V ve 7-AAD testleri ile apoptoz defektinin saptanmadığı belirtilmiştir. Son yıllardaki bulgular hem çevresel faktörlerin hem de birlikte bulunan başka genetik bölgelerdeki değişimlerin ALPS kliniğine yol

açabileceğini göstermiştir. Babanın 31 yaşına kadar etkilenmemesi ve annedeki SNP'in de iyi huylu olması, bu hasta ve kardeşinin ağır fenotipine yol açan başka faktörlerin olabileceğini düşündürmektedir. M.Arıco ve arkadaşlarının (167) 2013 yılında yaptıkları çalışmada ALPS/FAS, ALPS-U ve DALD hastalarında, UNC13D geninde sırasıyla hastaların %29, %21 ve %15'inde 6 farklı varyasyon saptanmıştır.

Magerus-Chatinet ve arkadaşları bazı ailelerde hastalığın penetransının multipl *FAS* mutasyonları ile açıklanabileceğini belirlemişlerdir. Bu araştırmacılar heterozigot *FAS* mutasyonu taşıyan ve ikinci *FAS* allelinde somatik değişiklik gelişen 7 hasta belirlemişlerdir. Bu hastaların yalnızca bir germline mutasyon taşıyan bireylerinin normal olduğu gösterilmiştir (4). *FAS* genindeki multipl anomaliler bazı ailelerdeki değişken penetransı açıklayabilir ancak hastalarda diğer genlerde de edinilmiş mutasyonlar bulunabilir. Bizim hastalarımızda da ALPS'den sorumlu olduğu bilinen genlerde mutasyon bulunmamış olmakla birlikte *FAS* genindeki SNP ile birlikte başka genlerde bulunan mutasyonlar ALPS fenotipine yol açmış olabilir. Hastalarımızın 5'inde (%20) *CASP8* rs1045487 (G>A) A minör alleli heterozigot olarak bulunmuş bu allelin kontrollere göre önemli düzeyde yüksek olduğu saptanmıştır. Bu hastalardan; 4 hastada homozigot, bir hastada heterozigot olmak üzere 5 hastada birlikte *FAS* rs2234978 minör allel T bulunmuştur. Ancak her iki polimorfizmi bir arada taşıyan hastalar ve taşımayanlar arasında klinik ve laboratuvar özellikleri yönünden fark mevcut değildir. *CASP8* eksikliği ALPS ile ilgili hastalıkların nadir görülen bir formudur, bugüne kadar aynı aileden 2 kardeş ve bu aileye uzaktan akraba olan diğer 2 kişide olmak üzere toplam 4 hastada bildirilmiştir (168-169). Bu hastalarda ek olarak tekrarlayan viral ve bakteriyel enfeksiyonlara yatkınlık bulunmaktadır (78). Apoptotik yolaktaki bozuklukların kanserin gelişmesi ve prognozunu etkilediği bildirilmektedir (173). *CASP8* geninde özellikle promotor bölgede bulunan SNP'lerin kolorektal, gastrik, akciğer, barsak ve göğüs kanser risk ve prognozuyla ilişki gösterdiğine ait çalışmalar ve *CASP8* intron 2'de bulunan SNP'in multipl sclerosis (MS)'e yatkınlık yarattığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır (175). Hastalarımızda kontrollere göre sıklığını yüksek bulduğumuz rs1045487; IgA nefropatisi, kolorektal kanserlerde ve küçük hücreli akciğer kanserinde araştırılmış ancak sıklığı kontrollerden farklı bulunmamıştır (170-172).

Literatürde ALPS ile birlikte *CASP8* polimorfizmlerinin değerlendirildiği bir çalışmaya rastlamadık.

Hastalarımızın bir kısmında hipogammaglobulinemi bulunması, bazı hastalarda da izlemde immünglobulinlerde ilerleyici düşüklük gelişmesi nedeniyle CVID tanısı da dikkate alınmıştır. Hipergammaglobulinemi ALPS hastalarının bir özelliği olmakla birlikte bazılarında hipogammaglobulinemi bulunmaktadır. CVID immunoglobulin ve antikor yapımında bozukluk ve tekrarlayan bakteriyel enfeksiyonlarla giden bir grupta hastalık olarak tarif edilmekte ve malign hastalıkların görülme sıklığının da yüksek olduğu belirtilmektedir. ESID/PAGID CVID tanı kriterlerine göre bizim hastalarımızın bir kısmı “*probable*” (olası) CVID tanımına da uymaktadır. CVID ALPS’e benzer şekilde lenfadenopati ve otoimmün hastalıklarla ortaya çıkabilir. Otoimmün sitopeniler CVID’de en sık görülen otoimmün belirtilerdir, sıklık sırası ile trombositopeni, anemi veya nötropeni şeklinde ortaya çıkabilir ve hastaların %4-20’sinde bulunabileceği bildirilmiştir (126), (176) , (177) . CVID ile ilgili çalışmaların bazılarında ciddi enfeksiyon, tanı kriterleri arasındadır. Enfeksiyonun olması immün yetmezlik varlığına işaret ettiği için tanı kriteri olarak alınması önerilmektedir. Ancak, serum Ig’leri düşük olan bu hastaların çoğunluğunda tekrarlayan, sıradışı, inatçı veya ağır enfeksiyonlar bulunmaktaysa da hastaların yaklaşık %10’unda enfeksiyonun bulunmadığı belirtilmektedir.

Hastalarımızın 8’i (bu hastalarda Ig’ler yüksek veya normaldi) hariç serum IgG, IgM ve IgA’da tek izotip veya çeşitli izotip kombinasyonları şeklinde değişiklikler saptanmıştır (Tablo 4.7). Ancak bu değişikliklerin çoğunluğu bu izotiplerde hafif düşüklük ve normal düzeyler arasında değişen değişiklikler olup; takip sırasında birçok kez (IVIG tedavisi almamalarına rağmen) normal sınırlarda da bulunmuş olup, ilerleyici veya sabit düşüklük şeklinde değildir (178) . Hastalarımızın 7’sinde yalnızca IgA ve/veya IgM’de hafif ve değişken düşüklük, 5’inde IgA ve IgM ile birlikte IgG’de hafif ve değişken düşüklük, 5’inde ilerleyici düşüklük mevcuttu. Hastaların aşılarla ve bazı viral ajanlara antikor cevapları (kızamık, suçiçeği, HBs, HAV, HSV, EBV gibi ve bazı hastalarda çalışılabilen konjuge olmayan pnömokok aşı cevapları) bakılan antijen sayısının en az yarısına karşı pozitif bulundu. Bu özellikler ile hastaların beşinde “*probable*” , diğerlerinde

“possible” CVID düşünülebilir (170) . Çalışmaya alındıktan sonra immünglobulin değerleri giderek düşen ve ESID/PAGID kriterlerine göre “probable” CVID tanısı konulabilen 3 hasta mevcuttur.

CVID tanımına uygun özellikleri ve sekonder otoimmün sitopenisi olan her hastanın ALPS yönünden araştırılması ve ALPS için spesifik testlerin yapılmasının (DNT analizi, apoptozis testi, genetik test) gerekli olduğu belirtilmektedir (76) . Zira yapılan çalışmalarda ALPS tanısı alan 90 hastanın 73’ünde IgG düzeylerine bakılmış, 71’inde IgG yüksek, iki hastada progressif IgG düşüklüğü bulunmuştur. Bu hastalar immünosupresyon almayan hastalardır. IgM düzeyi 73 hastanın 35’inde normal, 38’inde düşük bulunmuştur. Tanı anında hastaların yarısında IgM düşüklüğü olup, diğerlerinde takipte düştüğü belirtilmiştir. IgG düzeyleri ALPS-FAS hastalarının %56’sında yüksek, %11’inde düşük bulunmuş, ALPS fenotip hastalarının ise %27’sinde düşük bulunmuştur (76) . Bir çalışmada 66 ALPS’li hastanın yalnızca 5’inde hipogamaglobulinemi bulunduğu bildirilmiştir (179) . M.F.Campagnoli ve arkadaşlarının çalışmasında DALD tanısı alan hastaların çoğunda hipogammaglobulinemi bulunmaktadır (81) . Campagnoli ve arkadaşlarının (81) moleküler, klinik, immünolojik özellikleri ve uzun süreli takip sonuçlarını sunduğu 31 hastanın dördünde Fas gen mutasyonu, birinde aynı zamanda Casp10 polimorfizmi bulunmuştur. Dört hasta ALPS-U, 23 hasta DALD tanısı almıştır. Yedi hastada ALPS tanısından sonra kalıcı hipogamaglobulinemi geliştiği, başlangıçta 2 hastada IgA eksikliği dışında Ig düzeylerinin normal olduğu, ALPS-FAS olan hastalarda hipogamaglobulinemi gelişmediği bildirilmiştir (81) .

Çalışma sonuçları CVID yanında, Evans Sendromu (ES) ile ALPS arasında da belirgin immünolojik ve klinik yönden ortak özellikler bulunduğunu göstermektedir. ES iki veya daha fazla otoimmün sitopeni varlığı ile karakterizedir. Bizim hastalarımızın büyük çoğunluğunda bir, 2 hastamızda da birden fazla otoimmün sitopeni bulunmaktadır. ES tanısı almış olan 12 hastanın değerlendirildiği bir çalışmada, hastaların yarısında ALPS’nun karakteristik özellikleri olan DNT hücrelerinde artış ve defektif Fas apoptozisi saptanmıştır (180) . Daha büyük bir hasta gurubunda yapılan bir diğer çalışmada 45 vakanın 21’inde ALPS tanı kriterlerinin bulunduğu saptanmıştır (181) . Bu çalışmada ES, ALPS ve CVID

arasındaki ilişki değerlendirilmiştir. Vaka sayısı az olmakla birlikte ES'lu 7 hastanın 5'inde CVID'de görülen şekilde hipogamaglobulinemi geliştiği gösterilmiştir. Daha büyük bir hasta grubunda 68 ES'li hastanın yalnızca 4'ünde CVID ile ortak özellikler bulunmuştur (182) .

Rensing-Ehl ve ark.(5) hipogamaglobulinemik ALPS (ALPS-IgG low) ile örtüşen klinik özellikleri (lenfoproliferasyon+ otoimmün sitopeni ve >%1 DNT hücreleri) olan CVID'li hastaların ayırımında biyobelirteçlerin kullanılabileceğini belirtmişlerdir. Solubl FAS Ligand, IL10, ve Vit B12'nin ALPS'de spesifik olarak yükseldiği ve FAS mutasyon varlığı için öngörü değerinin yüksek olduğu gösterilmiştir. Böylece bu belirteçler ALPS düşünülen hastaların tanısında önerilen algoritmanın bir parçası olmuştur. Bu algoritma lenfoproliferasyon ve yüksek DNT bulunan tüm hastalarda germline FAS sekans analizi yapılmasını, sFAS mutasyon analizinin ise biyobelirteç profiline dayanarak yapılmasını önermektedir.

Hastalarımızda yeniden gözden geçirilen tanı kriterlerinde tanıda büyük ölçüde yardımcı olduğu belirtilen, son yıllarda FAS ve sFAS defekti yönünden pozitif ve negatif öngörü değerinin yüksek olduğu belirlenen ve sekonder aksesuar kriterler arasında bulunan biyobelirteç (sFASL, IL-10, vitamin B12, IL-18) düzeyleri değerlendirilmiştir. Serum IL-18 düzeyi 22 hastanın 5'inde bu hastalar için cut-off değeri olarak verilen 1500 pg/ml'nin üzerinde, serum IL-10 düzeyi 22 hastanın yalnızca birisinde, Vit.B12 düzeyi 24 hastanın 3'ünde tanı kriterlerinde belirtilen 1500 ng/L'nin üzerinde ve serum sFAS-L düzeyi 22 hastadan birisinde 200pg/ml'nin üzerinde bulunmuştur. Böylece 25 hastadan 7'sinde DNT yüksekliğine ek olarak 1 veya daha fazla ikincil kriter pozitif olarak bulunmuştur. Hastalarımızın yalnızca birisinde (hasta 12) 3 biyobelirteç (sFasL, IL-10 ve Vit B12 düzeyi) , bir hastada IL-18 ve Vit B12 düzeyi birlikte, diğer 5 hastada ise IL-18 veya VitB12 düzeyleri tek başına yüksek bulunmuştur. Bu biyobelirteçlerin özellikle sFasL ve Vit B12 yüksekliğinin birlikte bulunuşunun FAS defektini düşündüren önemli bir özellik olduğu belirtilmektedir (5) . Çeşitli çalışmalarda IgG düşük ALPS'li (ALPS IgG low) hastalarda bu 3 biyobelirteç düzeyinin önemli derecede yüksek olduğu (IL-10, sFASL, Vit B12), CVID'li hastaların değerlerinin ise normal olduğu bulunmuştur

(179) . Rezaei ve arkadaşları (183) ise İran’da yaptıkları çalışmada CVID tanısı alan 24 hastada IL-10 düzeylerini önemli düzeyde yüksek bulmuşlardır.

Çalışmalar somatik *FAS* mutasyonu olan hastaların germline *FAS* mutasyonu olan hastalara klinik özellikleri ve biyobelirteç düzeyleri yönünden benzediğini göstermiştir. Biyobelirteç profili *FAS* veya *sFAS* defekti ile uyumlu ancak her iki gende de germline *FAS* mutasyonu bulunmayan hastamızda (hasta 12) DNT hücrelerinden elde edilen DNA’dan *sFAS* dizi analizi yapıldı, mutasyon tespit edilmedi. Bu hastada apoptozis yolağında diğer bir molekülde defekt olabileceği düşünüldü. Ancak derin intronik mutasyon veya büyük delesyonlar ekarte edilmemiştir.

Muhtemel ALPS tanısı ile izlenen hastalarımız, çeşitli özellikleri ile Evans Sendromu, ALPS-U, Caminha ve arkadaşlarının ALPS fenotipi olarak tarif ettiği antite (184) (otoimmünite ile birlikte veya olmaksızın lenfoproliferasyon ve yüksek DNT bulunan hastalar), DALD ve CVID ile örtüşen özellikler göstermektedir. Adı geçen bu hastalıklarda hastaların birçoğunda altta yatan moleküler defektler henüz saptanamamıştır.

Bizim de muhtemel ALPS tanısı ile izlediğimiz hastalarımızın hiç birisinde ALPS’ye yol açtığı bilinen genlerden *FAS* ve *FASL* genlerinde mutasyon ve ALPS ile ilgili hastalığa yol açan *CASP8* geninde mutasyon bulunmamıştır. Buna karşılık hastalarımızda *FAS* SNP rs2234978 (homozigot minör T allel) ve *CASP8* rs1045487 (heterozigot minör A allel) sıklığı kontrollere göre önemli düzeyde yüksek bulundu (sırasıyla $p=0.001$ ve $p=0.004$) . Biyobelirteç profili *FAS* gen defektini düşündüren ancak germline mutasyonu bulunmayan bir hastada DNT hücrelerden elde edilen DNA örneğinde de *FAS* geninde mutasyon tespit edilmedi. Sonuçlarımız *FAS* ve *CASP8* geninde saptadığımız polimorfizmlerin ALPS fenotipinin gelişmesine hassasiyete katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir. Bu polimorfizmlerin etkisi ile ilgili olası mekanizmalarının belirlenmesi için gen ekspresyonu ve fonksiyonel çalışmaların yapılması; ve hastalığa yol açabilecek henüz bilinmeyen muhtemel gen defektlerinin tüm ekzom veya tüm genom analiz yöntemleri ile araştırılması gerektiği sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Lenardo, M., Chan, K.M., Hornung, F., McFarland, H., Siegel, R., Wang, J. ve diğeri. (1999) Mature T lymphocyte apoptosis--immune regulation in a dynamic and unpredictable antigenic environment. *Annu Rev Immunol*, 17, 221-253.
2. Su, H.C., Lenardo, M.J. (2008) Genetic defects of apoptosis and primary immunodeficiency. *Immunol Allergy Clin North Am*, 28 (2), 329-351, ix.
3. Oliveira, J.B., Bleesing, J.J., Dianzani, U., Fleisher, T.A., Jaffe, E.S., Lenardo, M.J. ve diğeri. (2010) Revised diagnostic criteria and classification for the autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS): report from the 2009 NIH International Workshop. *Blood*, 116 (14), e35-40.
4. Magerus-Chatinet, A., Stolzenberg, M.C., Lanzarotti, N., Neven, B., Daussey, C., Picard, C. ve diğeri. (2013) Autoimmune lymphoproliferative syndrome caused by a homozygous null FAS ligand (FASLG) mutation. *J Allergy Clin Immunol*, 131 (2), 486-490.
5. Rensing-Ehl, A., Janda, A., Lorenz, M.R., Gladstone, B.P., Fuchs, I., Abinun, M. ve diğeri. (2013) Sequential decisions on FAS sequencing guided by biomarkers in patients with lymphoproliferation and autoimmune cytopenia. *Haematologica*, 98 (12), 1948-1955.
6. Rich, R.R. (2013). *Clinical Immunology*, Chapter 13, (4 bs.): Elsevier Saunders.
7. Gupta, S., Louis, A.G. (2013) Tolerance and autoimmunity in primary immunodeficiency disease: a comprehensive review. *Clin Rev Allergy Immunol*, 45 (2), 162-169.
8. Horvitz, H.R. (2003) Nobel lecture. Worms, life and death. *Biosci Rep*, 23 (5-6), 239-303.
9. Clarke, P.G. (1990) Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat Embryol (Berl)*, 181 (3), 195-213.

10. Kerr, J.F., Wyllie, A.H., Currie, A.R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 26 (4), 239-257.
11. Saraste, A., Pulkki, K. (2000) Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc Res*, 45 (3), 528-537.
12. Yuan, J., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H.M., Horvitz, H.R. (1993) The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell*, 75 (4), 641-652.
13. Kalkmakoff ve Ward, (2003) The process of Apoptosis, University of Otago, Dunedin, New Zealand (**Courtesy of University of Leicester, web-site <http://www.le.ac.uk/cc>**)
14. Renehan, A.G., Bach, S.P., Potten, C.S. (2001) The relevance of apoptosis for cellular homeostasis and tumorigenesis in the intestine. *Can J Gastroenterol*, 15 (3), 166-176.
15. Nijhawan, D., Honarpour, N., Wang, X. (2000) Apoptosis in neural development and disease. *Annu Rev Neurosci*, 23, 73-87.
16. Opferman, J.T., Korsmeyer, S.J. (2003) Apoptosis in the development and maintenance of the immune system. *Nat Immunol*, 4 (5), 410-415.
17. Hengartner, M.O. (2000) The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 407 (6805), 770-776.
18. Bortner, C.D., Oldenburg, N.B., Cidlowski, J.A. (1995) The role of DNA fragmentation in apoptosis. *Trends Cell Biol*, 5 (1), 21-26.
19. Bratton, D.L., Fadok, V.A., Richter, D.A., Kailey, J.M., Guthrie, L.A., Henson, P.M. (1997) Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase. *J Biol Chem*, 272 (42), 26159-26165.
20. Arur, S., Uche, U.E., Rezaul, K., Fong, M., Scranton, V., Cowan, A.E. ve diğ erleri. (2003) Annexin I is an endogenous ligand that mediates apoptotic cell engulfment. *Dev Cell*, 4 (4), 587-598.

21. Gardai, S.J., McPhillips, K.A., Frasch, S.C., Janssen, W.J., Starefeldt, A., Murphy-Ullrich, J.E. ve diğeri. (2005) Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte. *Cell*, 123 (2), 321-334.
22. Thornberry, N.A., Lazebnik, Y. (1998) Caspases: enemies within. *Science*, 281 (5381), 1312-1316.
23. Salvesen, G.S., Dixit, V.M. (1999) Caspase activation: the induced-proximity model. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96 (20), 10964-10967.
24. Duriez, P.J., Shah, G.M. (1997) Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: a sensitive parameter to study cell death. *Biochem Cell Biol*, 75 (4), 337-349.
25. Orth, K., Chinnaiyan, A.M., Garg, M., Froelich, C.J., Dixit, V.M. (1996) The CED-3/ICE-like protease Mch2 is activated during apoptosis and cleaves the death substrate lamin A. *J Biol Chem*, 271 (28), 16443-16446.
26. Mashima, T., Naito, M., Fujita, N., Noguchi, K., Tsuruo, T. (1995) Identification of actin as a substrate of ICE and an ICE-like protease and involvement of an ICE-like protease but not ICE in VP-16-induced U937 apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*, 217 (3), 1185-1192.
27. Slee, E.A., Harte, M.T., Kluck, R.M., Wolf, B.B., Casiano, C.A., Newmeyer, D.D. ve diğeri. (1999) Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J Cell Biol*, 144 (2), 281-292.
28. Adrain, C., Martin, S.J. (2001) The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas. *Trends Biochem Sci*, 26 (6), 390-397.
29. Stennicke, H.R., Ryan, C.A., Salvesen, G.S. (2002) Reprieve from execution: the molecular basis of caspase inhibition. *Trends Biochem Sci*, 27 (2), 94-101.
30. Danial, N.N., Korsmeyer, S.J. (2004) Cell death: critical control points. *Cell*, 116 (2), 205-219.
31. Wong, R.S. (2011) Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J Exp Clin Cancer Res*, 30, 87.

32. Yan, N., Shi, Y. (2003) Histone H1.2 as a trigger for apoptosis. *Nat Struct Biol*, 10 (12), 983-985.
33. Bidere, N., Su, H.C., Lenardo, M.J. (2006) Genetic disorders of programmed cell death in the immune system. *Annu Rev Immunol*, 24, 321-352.
34. Ashkenazi, A., Dixit, V.M. (1998) Death receptors: signaling and modulation. *Science*, 281 (5381), 1305-1308.
35. Kantari, C., Walczak, H. (2011) Caspase-8 and bid: caught in the act between death receptors and mitochondria. *Biochim Biophys Acta*, 1813 (4), 558-563.
36. Wilson, N.S., Dixit, V., Ashkenazi, A. (2009) Death receptor signal transducers: nodes of coordination in immune signaling networks. *Nat Immunol*, 10 (4), 348-355.
37. Hotchkiss, R.S., Strasser, A., McDunn, J.E., Swanson, P.E. (2009) Cell death. *N Engl J Med*, 361 (16), 1570-1583.
38. Duprez, L., Wirawan, E., Vanden Berghe, T., Vandenabeele, P. (2009) Major cell death pathways at a glance. *Microbes Infect*, 11 (13), 1050-1062.
39. Wyllie, A.H. (2010) "Where, O death, is thy sting?" A brief review of apoptosis biology. *Mol Neurobiol*, 42 (1), 4-9.
40. Niemela, J.E., Lu, L., Fleisher, T.A., Davis, J., Caminha, I., Natter, M. ve diğ erleri. (2011) Somatic KRAS mutations associated with a human nonmalignant syndrome of autoimmunity and abnormal leukocyte homeostasis. *Blood*, 117 (10), 2883-2886.
41. Takagi, M., Shinoda, K., Piao, J., Mitsuiki, N., Takagi, M., Matsuda, K. ve diğ erleri. (2011) Autoimmune lymphoproliferative syndrome-like disease with somatic KRAS mutation. *Blood*, 117 (10), 2887-2890.
42. Oliveira, J.B., Bidere, N., Niemela, J.E., Zheng, L., Sakai, K., Nix, C.P. ve diğ erleri. (2007) NRAS mutation causes a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104 (21), 8953-8958.
43. Podrabsky, J.E., Krumschnabel, G. (2010) Cell death beyond worms, flies and humans: Unusual model systems for cell death research. *Apoptosis*, 15 (3), 243-248.

44. Toivola, D.M., Strnad, P., Habtezion, A., Omary, M.B. (2010) Intermediate filaments take the heat as stress proteins. *Trends Cell Biol*, 20 (2), 79-91.
45. Carmona-Gutierrez, D., Eisenberg, T., Buttner, S., Meisinger, C., Kroemer, G., Madeo, F. (2010) Apoptosis in yeast: triggers, pathways, subroutines. *Cell Death Differ*, 17 (5), 763-773.
46. Feuerstein, G.Z., Young, P.R. (2000) Apoptosis in cardiac diseases: stress- and mitogen-activated signaling pathways. *Cardiovasc Res*, 45 (3), 560-569.
47. Brunelle, J.K., Letai, A. (2009) Control of mitochondrial apoptosis by the Bcl-2 family. *J Cell Sci*, 122 (Pt 4), 437-441.
48. Pourova, J., Kottova, M., Voprsalova, M., Pour, M. (2010) Reactive oxygen and nitrogen species in normal physiological processes. *Acta Physiol (Oxf)*, 198 (1), 15-35.
49. Gutteridge, J.M., Halliwell, B. (2000) Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Ann N Y Acad Sci*, 899, 136-147.
50. Thorpe, G.W., Fong, C.S., Alic, N., Higgins, V.J., Dawes, I.W. (2004) Cells have distinct mechanisms to maintain protection against different reactive oxygen species: oxidative-stress-response genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101 (17), 6564-6569.
51. Cowart, L.A. (2009) Sphingolipids: players in the pathology of metabolic disease. *Trends Endocrinol Metab*, 20 (1), 34-42.
52. Deveraux, Q.L., Reed, J.C. (1999) IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes Dev*, 13 (3), 239-252.
53. Budihardjo, I., Oliver, H., Lutter, M., Luo, X., Wang, X. (1999) Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 15, 269-290.
54. Rigou, P., Piddubnyak, V., Faye, A., Rain, J.C., Michel, L., Calvo, F. ve diğ erleri. (2009) The antiapoptotic protein AAC-11 interacts with and regulates Acinus-mediated DNA fragmentation. *EMBO J*, 28 (11), 1576-1588.
55. Elmore, S. (2007) Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*, 35 (4), 495-516.

56. Fan, Z., Beresford, P.J., Oh, D.Y., Zhang, D., Lieberman, J. (2003) Tumor suppressor NM23-H1 is a granzyme A-activated DNase during CTL-mediated apoptosis, and the nucleosome assembly protein SET is its inhibitor. *Cell*, 112 (5), 659-672.
57. Lieberman, J., Fan, Z. (2003) Nuclear war: the granzyme A-bomb. *Curr Opin Immunol*, 15 (5), 553-559.
58. Shintani, T., Klionsky, D.J. (2004) Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science*, 306 (5698), 990-995.
59. Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A.M., Klionsky, D.J. (2008) Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*, 451 (7182), 1069-1075.
60. Yang, Z., Klionsky, D.J. (2010) Eaten alive: a history of macroautophagy. *Nat Cell Biol*, 12 (9), 814-822.
61. Gozuacik, D., Kimchi, A. (2007) Autophagy and cell death. *Curr Top Dev Biol*, 78, 217-245.
62. Mehrpour, M., Esclatine, A., Beau, I., Codogno, P. (2010) Overview of macroautophagy regulation in mammalian cells. *Cell Res*, 20 (7), 748-762.
63. Xie, Z., Klionsky, D.J. (2007) Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat Cell Biol*, 9 (10), 1102-1109.
64. Levine, B., Sinha, S., Kroemer, G. (2008) Bcl-2 family members: dual regulators of apoptosis and autophagy. *Autophagy*, 4 (5), 600-606.
65. <http://www.tanpaku.org/autophagy/>
66. Hitomi, J., Christofferson, D.E., Ng, A., Yao, J., Degterev, A., Xavier, R.J. ve diğ erleri. (2008) Identification of a molecular signaling network that regulates a cellular necrotic cell death pathway. *Cell*, 135 (7), 1311-1323.
67. Golstein, P., Kroemer, G. (2007) Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem Sci*, 32 (1), 37-43.
68. Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E.S., Baehrecke, E.H. ve diğ erleri. (2009) Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ*, 16 (1), 3-11.

69. Holler, N., Zaru, R., Micheau, O., Thome, M., Attinger, A., Valitutti, S. ve diğeri. (2000) Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nat Immunol*, 1 (6), 489-495.
70. Broker, L.E., Krutz, F.A., Giaccone, G. (2005) Cell death independent of caspases: a review. *Clin Cancer Res*, 11 (9), 3155-3162.
71. Canale, V.C., Smith, C.H. (1967) Chronic lymphadenopathy simulating malignant lymphoma. *J Pediatr*, 70 (6), 891-899.
72. Rao V.K and Straus S.E. (2006). Causes and consequences of the autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Hematology*, 11(1), 15-23.
73. Rao, L.M., Shahidi, N.T., Opitz, J.M. (1974) Hereditary splenomegaly with hypersplenism. *Clin Genet*, 5 (5), 379-386.
74. Sneller, M.C., Wang, J., Dale, J.K., Strober, W., Middleton, L.A., Choi, Y. ve diğeri. (1997) Clinical, immunologic, and genetic features of an autoimmune lymphoproliferative syndrome associated with abnormal lymphocyte apoptosis. *Blood*, 89 (4), 1341-1348.
75. Teachey, D.T. (2011) Autoimmune lymphoproliferative syndrome: new approaches to diagnosis and management. *Clin Adv Hematol Oncol*, 9 (3), 233-235.
76. Neven, B., Magerus-Chatinet, A., Florkin, B., Gobert, D., Lambotte, O., De Somer, L. ve diğeri. (2011) A survey of 90 patients with autoimmune lymphoproliferative syndrome related to TNFRSF6 mutation. *Blood*, 118 (18), 4798-4807.
77. Straus, S.E., Jaffe, E.S., Puck, J.M., Dale, J.K., Elkon, K.B., Rosen-Wolff, A. ve diğeri. (2001) The development of lymphomas in families with autoimmune lymphoproliferative syndrome with germline Fas mutations and defective lymphocyte apoptosis. *Blood*, 98 (1), 194-200.
78. Teachey, D.T., Seif, A.E., Grupp, S.A. (2010) Advances in the management and understanding of autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS). *Br J Haematol*, 148 (2), 205-216.

79. Deutsch, M., Tsopanou, E., Dourakis, S.P. (2004) The autoimmune lymphoproliferative syndrome (Canale-Smith) in adulthood. *Clin Rheumatol*, 23 (1), 43-44.
80. Straus, S.E., Sneller, M., Lenardo, M.J., Puck, J.M., Strober, W. (1999) An inherited disorder of lymphocyte apoptosis: the autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Ann Intern Med*, 130 (7), 591-601.
81. Campagnoli, M.F., Garbarini, L., Quarello, P., Garelli, E., Carando, A., Baravalle, V. ve diğeri. (2006) The broad spectrum of autoimmune lymphoproliferative disease: molecular bases, clinical features and long-term follow-up in 31 patients. *Haematologica*, 91 (4), 538-541.
82. Lim, M.S., Straus, S.E., Dale, J.K., Fleisher, T.A., Stetler-Stevenson, M., Strober, W. ve diğeri. (1998) Pathological findings in human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Am J Pathol*, 153 (5), 1541-1550.
83. Rieux-Laucat, F., Le Deist, F., Hivroz, C., Roberts, I.A., Debatin, K.M., Fischer, A. ve diğeri. (1995) Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity. *Science*, 268 (5215), 1347-1349.
84. Sleight, B.J., Prasad, V.S., DeLaat, C., Steele, P., Ballard, E., Arcenci, R.J. ve diğeri. (1998) Correction of autoimmune lymphoproliferative syndrome by bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*, 22 (4), 375-380.
85. Bleesing, J.J., Straus, S.E., Fleisher, T.A. (2000) Autoimmune lymphoproliferative syndrome. A human disorder of abnormal lymphocyte survival. *Pediatr Clin North Am*, 47 (6), 1291-1310.
86. Vaishnaw, A.K., Toubi, E., Ohsako, S., Drappa, J., Buys, S., Estrada, J. ve diğeri. (1999) The spectrum of apoptotic defects and clinical manifestations, including systemic lupus erythematosus, in humans with CD95 (Fas/APO-1) mutations. *Arthritis Rheum*, 42 (9), 1833-1842.
87. Bader-Meunier, B., Rieux-Laucat, F., Croisille, L., Yvart, J., Mielot, F., Dommergues, J.P. ve diğeri. (2000) Dyserythropoiesis associated with a fas-deficient condition in childhood. *Br J Haematol*, 108 (2), 300-304.

88. Kasahara, Y., Wada, T., Niida, Y., Yachie, A., Seki, H., Ishida, Y. ve diğ erleri. (1998) Novel Fas (CD95/APO-1) mutations in infants with a lymphoproliferative disorder. *Int Immunol*, 10 (2), 195-202.
89. Le Deist, F., Emile, J.F., Rieux-Laucat, F., Benkerrou, M., Roberts, I., Brousse, N. ve diğ erleri. (1996) Clinical, immunological, and pathological consequences of Fas-deficient conditions. *Lancet*, 348 (9029), 719-723.
90. Sneller, M.C., Dale, J.K., Straus, S.E. (2003) Autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Curr Opin Rheumatol*, 15 (4), 417-421.
91. Siegel, R.M., Frederiksen, J.K., Zacharias, D.A., Chan, F.K., Johnson, M., Lynch, D. ve diğ erleri. (2000) Fas preassociation required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations. *Science*, 288 (5475), 2354-2357.
92. Chan, F.K., Chun, H.J., Zheng, L., Siegel, R.M., Bui, K.L., Lenardo, M.J. (2000) A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. *Science*, 288 (5475), 2351-2354.
93. Martin, D.A., Zheng, L., Siegel, R.M., Huang, B., Fisher, G.H., Wang, J. ve diğ erleri. (1999) Defective CD95/APO-1/Fas signal complex formation in the human autoimmune lymphoproliferative syndrome, type Ia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96 (8), 4552-4557.
94. Singh, R., Pradhan, V., Patwardhan, M., Ghosh, K. (2009) APO-1/Fas gene: Structural and functional characteristics in systemic lupus erythematosus and other autoimmune diseases. *Indian J Hum Genet*, 15 (3), 98-102.
95. Brookes, A.J. (1999) The essence of SNPs. *Gene*, 234 (2), 177-186.
96. Dianzani, U., Bragardo, M., DiFranco, D., Alliaudi, C., Scagni, P., Buonfiglio, D. ve diğ erleri. (1997) Deficiency of the Fas apoptosis pathway without Fas gene mutations in pediatric patients with autoimmunity/lymphoproliferation. *Blood*, 89 (8), 2871-2879.
97. Wu, J., Wilson, J., He, J., Xiang, L., Schur, P.H., Mountz, J.D. (1996) Fas ligand mutation in a patient with systemic lupus erythematosus and lymphoproliferative disease. *J Clin Invest*, 98 (5), 1107-1113.

98. Bi, L.L., Pan, G., Atkinson, T.P., Zheng, L., Dale, J.K., Makris, C. ve diğerleri. (2007) Dominant inhibition of Fas ligand-mediated apoptosis due to a heterozygous mutation associated with autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS) Type Ib. *BMC Med Genet*, 8, 41.
99. Wang, J., Zheng, L., Lobito, A., Chan, F.K., Dale, J., Sneller, M. ve diğerleri. (1999) Inherited human Caspase 10 mutations underlie defective lymphocyte and dendritic cell apoptosis in autoimmune lymphoproliferative syndrome type II. *Cell*, 98 (1), 47-58.
100. Zhu, S., Hsu, A.P., Vacek, M.M., Zheng, L., Schaffer, A.A., Dale, J.K. ve diğerleri. (2006) Genetic alterations in caspase-10 may be causative or protective in autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Hum Genet*, 119 (3), 284-294.
101. Madkaikar, M., Mhatre, S., Gupta, M., Ghosh, K. (2011) Advances in autoimmune lymphoproliferative syndromes. *Eur J Haematol*, 87 (1), 1-9.
102. Miyauchi, J., Asada, M., Sasaki, M., Tsunematsu, Y., Kojima, S., Mizutani, S. (1994) Mutations of the N-ras gene in juvenile chronic myelogenous leukemia. *Blood*, 83 (8), 2248-2254.
103. Clementi, R., Chiocchetti, A., Cappellano, G., Cerutti, E., Ferretti, M., Orilieri, E. ve diğerleri. (2006) Variations of the perforin gene in patients with autoimmunity/lymphoproliferation and defective Fas function. *Blood*, 108 (9), 3079-3084.
104. Boggio, E., Clemente, N., Mondino, A., Cappellano, G., Orilieri, E., Gigliotti, C.L. ve diğerleri. (2014) IL-17 protects T cells from apoptosis and contributes to development of ALPS-like phenotypes. *Blood*, 123 (8), 1178-1186.
105. Purtilo, D.T., Cassel, C.K., Yang, J.P., Harper, R. (1975) X-linked recessive progressive combined variable immunodeficiency (Duncan's disease). *Lancet*, 1 (7913), 935-940.
106. Nichols, K.E., Ma, C.S., Cannons, J.L., Schwartzberg, P.L., Tangye, S.G. (2005) Molecular and cellular pathogenesis of X-linked lymphoproliferative disease. *Immunol Rev*, 203, 180-199.

107. Sayos, J., Wu, C., Morra, M., Wang, N., Zhang, X., Allen, D. ve diğerleri. (1998) The X-linked lymphoproliferative-disease gene product SAP regulates signals induced through the co-receptor SLAM. *Nature*, 395 (6701), 462-469.
108. Moretta, A., Bottino, C., Parolini, S., Moretta, L., Biassoni, R., Notarangelo, L.D. (2001) Cellular and molecular pathogenesis of X-linked lymphoproliferative disease. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 1 (6), 513-517.
109. Rigaud, S., Fondaneche, M.C., Lambert, N., Pasquier, B., Mateo, V., Soulas, P. ve diğerleri. (2006) XIAP deficiency in humans causes an X-linked lymphoproliferative syndrome. *Nature*, 444 (7115), 110-114.
110. Bolze, A., Byun, M., McDonald, D., Morgan, N.V., Abhyankar, A., Premkumar, L. ve diğerleri. (2010) Whole-exome-sequencing-based discovery of human FADD deficiency. *Am J Hum Genet*, 87 (6), 873-881.
111. Guo, B., Su, T.T., Rawlings, D.J. (2004) Protein kinase C family functions in B-cell activation. *Curr Opin Immunol*, 16 (3), 367-373.
112. Savasan, S., Warrier, I., Ravindranath, Y. (1997) The spectrum of Evans' syndrome. *Arch Dis Child*, 77 (3), 245-248.
113. Pui, C.H., Wilimas, J., Wang, W. (1980) Evans syndrome in childhood. *J Pediatr*, 97 (5), 754-758.
114. Pegels, J.G., Helmerhorst, F.M., van Leeuwen, E.F., van de Plas-van Dalen, C., Engelfriet, C.P., von dem Borne, A.E. (1982) The Evans syndrome: characterization of the responsible autoantibodies. *Br J Haematol*, 51 (3), 445-450.
115. Miller, B.A., Schultz Beardsley, D. (1983) Autoimmune pancytopenia of childhood associated with multisystem disease manifestations. *J Pediatr*, 103 (6), 877-881.
116. Teachey, D.T., Manno, C.S., Axsom, K.M., Andrews, T., Choi, J.K., Greenbaum, B.H. ve diğerleri. (2005) Unmasking Evans syndrome: T-cell phenotype and apoptotic response reveal autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS). *Blood*, 105 (6), 2443-2448.

117. Rosai, J., Dorfman, R.F. (1969) Sinus histiocytosis with massive lymphadenopathy. A newly recognized benign clinicopathological entity. *Arch Pathol*, 87 (1), 63-70.
118. Gaitonde, S. (2007) Multifocal, extranodal sinus histiocytosis with massive lymphadenopathy: an overview. *Arch Pathol Lab Med*, 131 (7), 1117-1121.
119. Rosai, J., Dorfman, R.F. (1972) Sinus histiocytosis with massive lymphadenopathy: a pseudolymphomatous benign disorder. Analysis of 34 cases. *Cancer*, 30 (5), 1174-1188.
120. Das, D.K., Gulati, A., Bhatt, N.C., Sethi, G.R. (2001) Sinus histiocytosis with massive lymphadenopathy (Rosai-Dorfman disease): report of two cases with fine-needle aspiration cytology. *Diagn Cytopathol*, 24 (1), 42-45.
121. Maric, I., Pittaluga, S., Dale, J.K., Niemela, J.E., Delsol, G., Diment, J. ve diğ erleri. (2005) Histologic features of sinus histiocytosis with massive lymphadenopathy in patients with autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Am J Surg Pathol*, 29 (7), 903-911.
122. Herrada, J., Cabanillas, F., Rice, L., Manning, J., Pugh, W. (1998) The clinical behavior of localized and multicentric Castleman disease. *Ann Intern Med*, 128 (8), 657-662.
123. M, K. (1972) Lymphadenitis showing focal reticulum cell hyperplasia with nuclear debris and phagocytes. *Acta Hematol Jpn* 35, 379-380.
124. Bosch, X., Guilabert, A. (2006) Kikuchi-Fujimoto disease. *Orphanet J Rare Dis*, 1, 18.
125. Ohshima, K., Shimazaki, K., Kume, T., Suzumiya, J., Kanda, M., Kikuchi, M. (1998) Perforin and Fas pathways of cytotoxic T-cells in histiocytic necrotizing lymphadenitis. *Histopathology*, 33 (5), 471-478.
126. Chapel, H., Lucas, M., Lee, M., Bjorkander, J., Webster, D., Grimbacher, B. ve diğ erleri. (2008) Common variable immunodeficiency disorders: division into distinct clinical phenotypes. *Blood*, 112 (2), 277-286.
127. Conley, M.E., Dobbs, A.K., Farmer, D.M., Kilic, S., Paris, K., Grigoriadou, S. ve diğ erleri. (2009) Primary B cell immunodeficiencies: comparisons and contrasts. *Annu Rev Immunol*, 27, 199-227.

128. Conley, M.E., Notarangelo, L.D., Etzioni, A. (1999) Diagnostic criteria for primary immunodeficiencies. Representing PAGID (Pan-American Group for Immunodeficiency) and ESID (European Society for Immunodeficiencies). *Clin Immunol*, 93 (3), 190-197.
129. Yong, P.F., Salzer, U., Grimbacher, B. (2009) The role of costimulation in antibody deficiencies: ICOS and common variable immunodeficiency. *Immunol Rev*, 229 (1), 101-113.
130. Salzer, U., Chapel, H.M., Webster, A.D., Pan-Hammarstrom, Q., Schmitt-Graeff, A., Schlesier, M. ve diğeri. (2005) Mutations in TNFRSF13B encoding TACI are associated with common variable immunodeficiency in humans. *Nat Genet*, 37 (8), 820-828.
131. van Zelm, M.C., Reisli, I., van der Burg, M., Castano, D., van Noesel, C.J., van Tol, M.J. ve diğeri. (2006) An antibody-deficiency syndrome due to mutations in the CD19 gene. *N Engl J Med*, 354 (18), 1901-1912.
132. Warnatz, K., Salzer, U., Rizzi, M., Fischer, B., Gutenberger, S., Bohm, J. ve diğeri. (2009) B-cell activating factor receptor deficiency is associated with an adult-onset antibody deficiency syndrome in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106 (33), 13945-13950.
133. Kuijpers, T.W., Bende, R.J., Baars, P.A., Grummels, A., Derks, I.A., Dolman, K.M. ve diğeri. (2010) CD20 deficiency in humans results in impaired T cell-independent antibody responses. *J Clin Invest*, 120 (1), 214-222.
134. van Zelm, M.C., Smet, J., Adams, B., Mascart, F., Schandene, L., Janssen, F. ve diğeri. (2010) CD81 gene defect in humans disrupts CD19 complex formation and leads to antibody deficiency. *J Clin Invest*, 120 (4), 1265-1274.
135. Thiel, J., Kimmig, L., Salzer, U., Grudzien, M., Lebrecht, D., Hagen, T. ve diğeri. (2012) Genetic CD21 deficiency is associated with hypogammaglobulinemia. *J Allergy Clin Immunol*, 129 (3), 801-810 e806.

136. Lopez-Herrera, G., Tampella, G., Pan-Hammarstrom, Q., Herholz, P., Trujillo-Vargas, C.M., Phadwal, K. ve diğerleri. (2012) Deleterious mutations in LRBA are associated with a syndrome of immune deficiency and autoimmunity. *Am J Hum Genet*, 90 (6), 986-1001.
137. Bleesing, J.J., Brown, M.R., Novicio, C., Guarraia, D., Dale, J.K., Straus, S.E. ve diğerleri. (2002) A composite picture of TcR alpha/beta(+) CD4 (-)CD8(-) T Cells (alpha/beta-DNTCs) in humans with autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Clin Immunol*, 104 (1), 21-30.
138. Hans D. Ochs, M., Dr.med, C. I. Edvard Smith, PhD, and Jennifer M. Puck, MD. (Nov 2013). *Primary Immunodeficiency Diseases: A Molecular and Genetic Approach* (3 ed.) (3 bs.): Oxford University Press.
139. Fischer, K., Voelkl, S., Heymann, J., Przybylski, G.K., Mondal, K., Laumer, M. ve diğerleri. (2005) Isolation and characterization of human antigen-specific TCR alpha beta+ CD4(-)CD8- double-negative regulatory T cells. *Blood*, 105 (7), 2828-2835.
140. Holzelova, E., Vonarbourg, C., Stolzenberg, M.C., Arkwright, P.D., Selz, F., Prieur, A.M. ve diğerleri. (2004) Autoimmune lymphoproliferative syndrome with somatic Fas mutations. *N Engl J Med*, 351 (14), 1409-1418.
141. Zhang, G., Gurtu, V., Kain, S.R., Yan, G. (1997) Early detection of apoptosis using a fluorescent conjugate of annexin V. *Biotechniques*, 23 (3), 525-531.
142. Overbeeke, R., Steffens-Nakken, H., Vermes, I., Reutelingsperger, C., Haanen, C. (1998) Early features of apoptosis detected by four different flow cytometry assays. *Apoptosis*, 3 (2), 115-121.
143. Gavrieli, Y., Sherman, Y., Ben-Sasson, S.A. (1992) Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol*, 119 (3), 493-501.
144. Rao, V.K., Oliveira, J.B. (2011) How I treat autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Blood*, 118 (22), 5741-5751.

145. Rao, V.K., Dugan, F., Dale, J.K., Davis, J., Tretler, J., Hurley, J.K. ve diğ erleri. (2005) Use of mycophenolate mofetil for chronic, refractory immune cytopenias in children with autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Br J Haematol*, 129 (4), 534-538.
146. Rao, V.K., Carrasquillo, J.A., Dale, J.K., Bacharach, S.L., Whatley, M., Dugan, F. ve diğ erleri. (2006) Fluorodeoxyglucose positron emission tomography (FDG-PET) for monitoring lymphadenopathy in the autoimmune lymphoproliferative syndrome (ALPS). *Am J Hematol*, 81 (2), 81-85.
147. Nolsoe, R.L., Kelly, J.A., Pociot, F., Moser, K.L., Kristiansen, O.P., Mandrup-Poulsen, T. ve diğ erleri. (2005) Functional promoter haplotypes of the human FAS gene are associated with the phenotype of SLE characterized by thrombocytopenia. *Genes Immun*, 6 (8), 699-706.
148. McCarthy, N. (2014) Tumour microenvironment: losing your SPARC. *Nat Rev Cancer*, 14 (1), 10-11.
149. Price, S., Shaw, P.A., Seitz, A., Joshi, G., Davis, J., Niemela, J.E. ve diğ erleri. (2014) Natural history of autoimmune lymphoproliferative syndrome associated with FAS gene mutations. *Blood*, 123 (13), 1989-1999.
150. Zhang, Z., Xue, H., Gong, W., Wang, M., Yuan, L., Han, S. ve diğ erleri. (2009) FAS promoter polymorphisms and cancer risk: a meta-analysis based on 34 case-control studies. *Carcinogenesis*, 30 (3), 487-493.
151. van Veen, T., Kalkers, N.F., Crusius, J.B., van Winsen, L., Barkhof, F., Jongen, P.J. ve diğ erleri. (2002) The FAS-670 polymorphism influences susceptibility to multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*, 128 (1-2), 95-100.
152. Bijl, M., Horst, G., Limburg, P.C., Kallenberg, C.G. (2001) Fas expression on peripheral blood lymphocytes in systemic lupus erythematosus (SLE): relation to lymphocyte activation and disease activity. *Lupus*, 10 (12), 866-872.
153. Lorenz, H.M., Grunke, M., Hieronymus, T., Herrmann, M., Kuhnelt, A., Manger, B. ve diğ erleri. (1997) In vitro apoptosis and expression of apoptosis-related molecules in lymphocytes from patients with systemic

- lupus erythematosus and other autoimmune diseases. *Arthritis Rheum*, 40 (2), 306-317.
154. Horiuchi, T., Nishizaka, H., Yasunaga, S., Higuchi, M., Tsukamoto, H., Hayashi, K. ve diğerleri. (1999) Association of Fas/APO-1 gene polymorphism with systemic lupus erythematosus in Japanese. *Rheumatology (Oxford)*, 38 (6), 516-520.
 155. Huang, Q.R., Danis, V., Lassere, M., Edmonds, J., Manolios, N. (1999) Evaluation of a new Apo-1/Fas promoter polymorphism in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus patients. *Rheumatology (Oxford)*, 38 (7), 645-651.
 156. Basolo, F., Giannini, R., Faviana, P., Fontanini, G., Patricelli Malizia, A., Ugolini, C. ve diğerleri. (2004) Thyroid papillary carcinoma: preliminary evidence for a germ-line single nucleotide polymorphism in the Fas gene. *J Endocrinol*, 182 (3), 479-484.
 157. Takakuwa, T., Dong, Z., Takayama, H., Matsuzuka, F., Nagata, S., Aozasa, K. (2001) Frequent mutations of Fas gene in thyroid lymphoma. *Cancer Res*, 61 (4), 1382-1385.
 158. Bolstad, A.I., Wargelius, A., Nakken, B., Haga, H.J., Jonsson, R. (2000) Fas and Fas ligand gene polymorphisms in primary Sjogren's syndrome. *J Rheumatol*, 27 (10), 2397-2405.
 159. Bonzheim, I., Geissinger, E., Chuang, W.Y., Roth, S., Strobel, P., Marx, A. ve diğerleri. (2008) Analysis of single nucleotide polymorphisms in the FAS and CTLA-4 genes of peripheral T-cell lymphomas. *J Hematop*, 1 (1), 11-21.
 160. Kanemitsu, S., Ihara, K., Saifddin, A., Otsuka, T., Takeuchi, T., Nagayama, J. ve diğerleri. (2002) A functional polymorphism in fas (CD95/APO-1) gene promoter associated with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol*, 29 (6), 1183-1188.
 161. Kantarci, O.H., Hebrink, D.D., Achenbach, S.J., Atkinson, E.J., de Andrade, M., McMurray, C.T. ve diğerleri. (2004) CD95 polymorphisms are associated with susceptibility to MS in women. A population-based study of CD95 and CD95L in MS. *J Neuroimmunol*, 146 (1-2), 162-170.

162. Geleijns, K., Laman, J.D., van Rijs, W., Tio-Gillen, A.P., Hintzen, R.Q., van Doorn, P.A. ve diğeri. (2005) Fas polymorphisms are associated with the presence of anti-ganglioside antibodies in Guillain-Barre syndrome. *J Neuroimmunol*, 161 (1-2), 183-189.
163. Glavan, B.J., Holden, T.D., Goss, C.H., Black, R.A., Neff, M.J., Nathens, A.B. ve diğeri. (2011) Genetic variation in the FAS gene and associations with acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*, 183 (3), 356-363.
164. Pu, X., Roth, J.A., Hildebrandt, M.A., Ye, Y., Wei, H., Minna, J.D. ve diğeri. (2013) MicroRNA-related genetic variants associated with clinical outcomes in early-stage non-small cell lung cancer patients. *Cancer Res*, 73 (6), 1867-1875.
165. Teachey, D.T. (2012) New advances in the diagnosis and treatment of autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Curr Opin Pediatr*, 24 (1), 1-8.
166. Hansford, J.R., Pal, M., Poplawski, N., Haan, E., Boog, B., Ferrante, A. ve diğeri. (2013) In utero and early postnatal presentation of autoimmune lymphoproliferative syndrome in a family with a novel FAS mutation. *Haematologica*, 98 (4), e38-39.
167. Boggio, E., Arico, M., Melensi, M., Dianzani, I., Ramenghi, U., Dianzani, U. ve diğeri. (2013) Mutation of FAS, XIAP, and UNC13D genes in a patient with a complex lymphoproliferative phenotype. *Pediatrics*, 132 (4), e1052-1058.
168. Chun, H.J., Zheng, L., Ahmad, M., Wang, J., Speirs, C.K., Siegel, R.M. ve diğeri. (2002) Pleiotropic defects in lymphocyte activation caused by caspase-8 mutations lead to human immunodeficiency. *Nature*, 419 (6905), 395-399.
169. Fleisher, T.A., Oliveira, J.B. (2012) Monogenic defects in lymphocyte apoptosis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 12 (6), 609-615.
170. Park, H.J., Kim, J.W., Cho, B.S., Chung, J.H. (2014) Association of BH3 interacting domain death agonist (BID) gene polymorphisms with proteinuria of immunoglobulin A nephropathy. *Scand J Clin Lab Invest*.

171. Qian, J., Qu, H.Q., Yang, L., Yin, M., Wang, Q., Gu, S. ve diğerleri. (2012) Association between CASP8 and CASP10 polymorphisms and toxicity outcomes with platinum-based chemotherapy in Chinese patients with non-small cell lung cancer. *Oncologist*, 17 (12), 1551-1561.
172. Chae, Y.S., Kim, J.G., Sohn, S.K., Lee, S.J., Kang, B.W., Moon, J.H. ve diğerleri. (2011) RIPK1 and CASP7 polymorphism as prognostic markers for survival in patients with colorectal cancer after complete resection. *J Cancer Res Clin Oncol*, 137 (4), 705-713.
173. Gu, D., Du, M., Tang, C., Chu, H., Xu, Z., Huo, X. ve diğerleri. (2014) Functional polymorphisms in apoptosis pathway genes and survival in patients with gastric cancer. *Environ Mol Mutagen*.
174. Zhang, F., Yang, Y., Guo, C., Wang, Y. (2012) CASP8 -652 6N del polymorphism and cancer risk: a meta-analysis of 30 case-control studies in 50,112 subjects. *Mutagenesis*, 27 (5), 559-566.
175. Camina-Tato, M., Fernandez, M., Morcillo-Suarez, C., Navarro, A., Julia, E., Edo, M.C. ve diğerleri. (2010) Genetic association of CASP8 polymorphisms with primary progressive multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*, 222 (1-2), 70-75.
176. Bayry, J., Lacroix-Desmazes, S., Kazatchkine, M.D., Galicier, L., Lepelletier, Y., Webster, D. ve diğerleri. (2004) Common variable immunodeficiency is associated with defective functions of dendritic cells. *Blood*, 104 (8), 2441-2443.
177. Orange, J.S., Glessner, J.T., Resnick, E., Sullivan, K.E., Lucas, M., Ferry, B. ve diğerleri. (2011) Genome-wide association identifies diverse causes of common variable immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol*, 127 (6), 1360-1367 e1366.
178. Ameratunga, R., Woon, S.T., Gillis, D., Koopmans, W., Steele, R. (2013) New diagnostic criteria for common variable immune deficiency (CVID), which may assist with decisions to treat with intravenous or subcutaneous immunoglobulin. *Clin Exp Immunol*, 174 (2), 203-211.

179. Rensing-Ehl, A., Warnatz, K., Fuchs, S., Schlesier, M., Salzer, U., Draeger, R. ve diğerleri. (2010) Clinical and immunological overlap between autoimmune lymphoproliferative syndrome and common variable immunodeficiency. *Clin Immunol*, 137 (3), 357-365.
180. NG SOO-CHIN MRCP, F. (1992) Evans syndrome: a report on 12 patients. *Clinical & Laboratory Haematology*, 14 (3), 189-193.
181. Seif, A.E., Manno, C.S., Sheen, C., Grupp, S.A., Teachey, D.T. (2010) Identifying autoimmune lymphoproliferative syndrome in children with Evans syndrome: a multi-institutional study. *Blood*, 115 (11), 2142-2145.
182. Michel, M., Chanet, V., Dechartres, A., Morin, A.S., Piette, J.C., Cirasino, L. ve diğerleri. (2009) The spectrum of Evans syndrome in adults: new insight into the disease based on the analysis of 68 cases. *Blood*, 114 (15), 3167-3172.
183. Rezaei, N., Aghamohammadi, A., Kardar, G.A., Nourizadeh, M., Pourpak, Z. (2008) T- helper 1 and 2 cytokine assay in patients with common variable immunodeficiency. *J Investig Allergol Clin Immunol*, 18 (6), 449-453.
184. Caminha, I., Fleisher, T.A., Hornung, R.L., Dale, J.K., Niemela, J.E., Price, S. ve diğerleri. (2010) Using biomarkers to predict the presence of FAS mutations in patients with features of the autoimmune lymphoproliferative syndrome. *J Allergy Clin Immunol*, 125 (4), 946-949 e946.

EK-1. Etik Kurul İzni

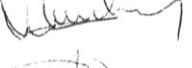
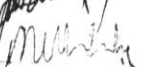
451

19 Nisan 2011

ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

Toplantı Tarihi : 24 MART 2011 PERŞEMBE
 Toplantı No : 2011/3
 Proje No : FON 11/19 (Değerlendirme Tarihi 24.03.2011)
 Karar No : FON 11/19 –23

Üniversitemiz Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Özden Sanal'ın sorumlu araştırmacısı olduğu Uzm. Bio. Çağman Tan, Prof. Dr. İlhan F. Tezcan, Uzm. Bio. Baran Erman, Uzm. Dr. Deniz Çağdaş Ayvaz ve Doç. Dr. Rıza Köksal Özgül ile birlikte çalışacakları FON 11/19 kayıt numaralı ve **"Muhtemel Otoimmün Lenfoproliferatif Sendrom (ALPS) Tanısı Alan Hastaların ve Aile Bireylerinin Apoptoz Testleriyle Taranması ve Bilinen Moleküler Defektler Yönünden İncelenmesi"** başlıklı proje önerisi Komisyonumuzda değerlendirilmiş olup, uygun bulunmuştur.

1. Prof. Dr. Rüştü Onur (Başkan) 
2. Prof. Dr. Murat Yurdakök (Üye) KATILMADI
3. Prof. Dr. İbrahim Haznedaroğlu (Üye) 
4. Prof. Dr. Arzu Topeli İskit (Üye) KATILMADI
5. Prof. Dr. İnci Erdemli (Üye) KATILMADI
6. Prof. Dr. Haydar A. Demirel (Üye) 
7. Prof. Dr. Zafer Çehreli (Üye) 
8. Prof. Dr. Osman Abbasoğlu (Üye) 
9. Prof. Dr. Nurten Akarsu (Üye) 
10. Prof. Dr. Nüket Örnek Büken (Üye) 
11. Prof. Dr. Alev Türker (Üye) 
12. Prof. Dr. Bilgehan Yalçın (Üye) 
13. Prof. Dr. Nilgün Sayinalp (Üye) 
14. Prof. Dr. S. Mehmet Mercanlıgil (Üye) 
15. Doç. Dr. Mutlu Hayran (Üye) 
16. Av. Meltem Onurlu (Üye) 