TÜSEB

TÜRKİYE SAĞLIK ENSTİTÜLERİ BAŞKANLIĞI

Mikobakteriyel Enfeksiyona Mendeliyen Yatkınlığın Genetik Etiyolojisi ve İlgili Gen Varyantlarının İmmünopatogenezdeki Rollerinin Belirlenmesi

PROJE SONUÇ RAPORU

Program Kodu:
2022-ACİL-09 (9. Dönem) / A Grubu

Proje No: 28202

Proje Yürütücüsü: Aslı Karacan Konrat

Araştırmacılar:

Ayşe Evrim Bayrak

Güven Toksoy

Ayça Dilruba Aslanger

Gözde Yeşil Sayın

Esra Yücel

ÖNSÖZ

Bu çalışma, "Mikobakteriyel Enfeksiyona Mendeliyen Yatkınlığın Genetik Etiyolojisi ve İlgili Gen Varyantlarının İmmünopatogenezdeki Rollerinin Belirlenmesi" başlıklı ve 2022-ACİL-09 kodlu araştırma projesi kapsamında yürütülmüş olup, Türkiye Sağlık Enstitüleri Başkanlığı (TÜSEB) tarafından desteklenmiştir. Çalışma kapsamında, MSMD ön tanısı alan olgularda genetik, immünolojik ve transkriptomik analizler bütüncül olarak değerlendirilmiş ve hastalıkla ilişkili varyantların belirlenmesine yönelik ileri düzey moleküler incelemeler gerçekleştirilmiştir.

Proje süresince proje ekibinin hazırladığı yayınlar:

• Yayın bulunmamaktadır.

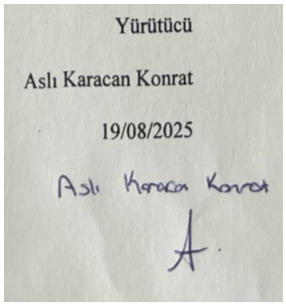
Proje süresince proje ekibinin sunduğu bildiriler:

• European Human Genetics Conference 2025, Milan, İtaly **Aslı Karacan**, Ayşe Süleyman, Nevin Hatipoglu, Esra Yücel, Ayca Kiykim, Mehmet Akif Yücesoy, Emine Manolya Kara, Sevgi Aslan Tuncay, Sevliya Öcal Demir, Elif Gulderoglu Ayca Aslanger, Müge Sayitoglu, Sinem Firtina, Evrim Komurcu-Bayrak. Type I interferon response in MSMD patients: evaluation of IFN signature score as a biomarker. Poster.

• The 14th Balkan Congress of Human Genetics and 9th Rare Disease SEE Meeting, Skopje, Macedonia **Aslı Karacan,** Ayça Dilruba Aslanger, Güven Toksoy, Zehra Oya Uyguner, Evrim Komurcu-Bayrak. Evaluation of the Role of Variants in *JAK1* and *STAT1* Genes Associated with Mendelian Susceptibility to Mycobacterial Infection in Neuroinflammation-Related Neurological Diseases. BJMG 2023, 26 (2023 Supplement**).** Poster Sunumu.

• 15. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi, Muğla, Turkey **Karacan A**, Akbaş, S, Yücel E, Aslanger AD Yeşil Sayın G, Toksoy G, Uyguner Z O. *Mikobakteriyel Enfeksiyona Mendeliyen Yatkınlıkla İlişkili Gen Varyantlarının Primer İmmün Yetmezlik Altgruplarında Analizi* . 2022 (pp.171-172). Sözlü Bildiri.

- **Proje kapsamında desteklenen bursiyer bulunmamaktadır.**



İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ i

ÖZET 5

ABSTRACT 6

1. GİRİŞ 7

2. LİTERATÜR ÖZETİ 8

3. GEREÇ VE YÖNTEM 10

3.1. Kullanılan Cihazlar ve Laboratuvar Gereçleri 10
3.2. Kullanılan Kimyasallar, Tampon ve Çözeltiler, Ticari Kitler 11
3.3. İstatistiksel Analizler 13
3.4. Çalışma Grubunun Oluşturulması 13
3.5. Genomik DNA ve RNA İzolasyonu 13
3.5.1. Genomik DNA İzolasyonu 14
3.5.2. RNA İzolasyonu 14
3.6. Komplementer DNA (cDNA) Analizi 16
3.7. Tüm Ekzom Dizileme (TED) 17
3.8. Biyoninformatik Analiz 18
3.8.1. MSMD ve PİY İlişkili Gen Panel Listelerinin Oluşturulması, Varyant Analizi ve Filtrasyon Kriterleri 18
3.9. TED Analizi Sonucu Belirlenen Varyantların Sanger Dizileme Yöntemi ile Doğrulanması 21
3.9.1. Primer Tasarımı 21
3.9.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) 23
3.9.3. Agaroz Jel Elektroforez Yöntemi ile PZR Ürünlerinin Kontrolü 23
3.9.4. PZR Ürünlerinin Saflaştırılması 23
3.9.5. Sanger Dizileme 24
3.10. Klinik Yorumlama 26
3.11. cDNA Sanger Dizileme 26
3.12. Gerçek Zamanlı PZR(RT-qPZR) Yöntemi ile Tip 1 İnterferon İmza Testi 26

4. BULGULAR 27

4.1. Olguların Klinik Verilerinin Değerlendirilmesi 27
4.2. Olguların MSMD Klinik Alt Tiplerine Göre Sınıflandırılması 28
4.3. Olguların TED Analiz Sonuçları 29
4.4. Olguların İmza Testi Sonuçları 31

5. TARTIŞMA/SONUÇ 34

5.1. Öneriler 36

Referanslar 37

Şekiller

Şekil 0-1: *STAT1*, *PRKR*, *IFI27*, *IFI44*, *IFI44L*, *IFIT1* ve *RSAD*2 gen ekspresyon düzeylerinin MSMD olguları (n=18) ve sağlıklı kontrollerde (n=20) karşılaştırılması**Tablolar**

Tablo 0-1: Çalışmada kullanılmış olan cihazların ve laboratuvar gereçlerinin isimleri ve kullanım alanlarının listesi

Tablo 0-2: Çalışmada kullanılan kimyasalların, tampon ve çözeltilerin, ticari kitlerin ve malzemelerin isimleri ve kullanım yerlerinin listesi

Tablo 0-3: *Twist Comprehensive Exome kitinin içeriğinin listesi.

Tablo 0-4: Varyant konfirmasyonu için yapılan PZR'da kullanılan primer çiftleri

Tablo 0-5: PZR amplifikasyonu sırasında kullanılan termal döngü programı

Tablo 0-6: Dizi PZR çalışması için kullanılan bileşenler ve içerikleri

Tablo 0-7: ABI3500 Kapiller elektroforez işlemi için belirlenen voltaj ve süreleri

Tablo 0-1: Tüm olguların MSMD klinik alt tiplerine göre sınıflandırılması ve klinik/immünolojik bulguları

Tablo 0-2: Tüm olgulara ait TED analizi sonuçları özet tablosu

ÖZET

Doğuştan gelen bağışıklık sistemindeki kalıtsal bozukluklar, erken çocukluk döneminde ciddi enfeksiyonlara neden olabilen primer immün yetmezlik tablolarını oluşturur. Mikobakteriyel Enfeksiyonlara Mendelyen Yatkınlık (MSMD), çevresel mikobakteriler veya zayıflatılmış BCG aşısına karşı gelişen enfeksiyonlarla karakterize edilen nadir bir immün yetmezlik grubudur. En sık olarak *IFN-γ* ve *IL-12* sinyal yolaklarını etkileyen genetik varyantlarla ilişkili olsa da MSMD genetik ve klinik açıdan oldukça değişkendir. Bu çalışmada, klinik olarak MSMD ile uyumlu bulgular gösteren ve İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Polikliniği'ne yönlendirilmiş 20 olgu, moleküler düzeyde değerlendirilmiştir. Tüm ekzom dizileme (TED) ile yapılan analizler in siliko varyant filtreleme ve aile segregasyon çalışmalarıyla desteklenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, iki olguda bilinen MSMD genlerinde klinik önemi belirsiz ya da patojenik varyantlar tespit edilmiştir. Dokuz olguda, immün disregülasyon, otofaji, DNA onarımı ve metabolik yollarla ilişkili genlerde toplam 13 aday varyant belirlenmiştir. Geriye kalan yedi olguda anlamlı genetik değişiklik saptanamamış, iki olguda ise segregasyon sonrası varyantlar dışlanmıştır. En sık gözlenen klinik tablo lenfadenit olup, olguların yarısından fazlasında izlenmiştir. Bu veriler, MSMD'nin tanısal yaklaşımında TED analizinin önemini ortaya koyarken, daha ileri çok katmanlı genomik yaklaşımlara olan gereksinimi de vurgulamaktadır.

Anahtar kelimeler: Bağışıklık sistemi, tüberküloz, MSMD, PİY, TED

ABSTRACT

Inherited defects in the innate immune system can lead to primary immunodeficiencies (PIDs), which are often associated with severe infections in early childhood. Mendelian Susceptibility to Mycobacterial Disease (MSMD) is a rare subgroup of PID characterized by increased vulnerability to infections caused by environmental mycobacteria or the attenuated Bacillus Calmette–Guérin (BCG) vaccine strain. Although MSMD is commonly linked to genetic variants affecting the IFN-γ and IL-12 signaling pathways, both the clinical and genetic spectra of the disease are highly heterogeneous. In this study, 20 patients with a clinical suspicion of MSMD who were referred to the Medical Genetics Clinic at Istanbul Faculty of Medicine were systematically evaluated at the molecular level. Whole exome sequencing (WES) was performed, and the findings were analyzed through in silico filtering and family-based segregation studies. Among these cases, three patients were found to carry variants of uncertain significance (VUS) or pathogenic variants in known MSMD-related genes. In nine additional cases, a total of 13 candidate variants were identified in genes associated with immune dysregulation, autophagy, DNA repair, and metabolic pathways. No significant genetic alterations were detected in seven cases, while in two others, prioritized variants were later excluded based on segregation results. The most frequently observed clinical feature was lymphadenitis, present in over half of the cohort. These findings emphasize the utility of WES in uncovering the genetic basis of MSMD and highlight the need for integrative genomic approaches to improve diagnostic accuracy and guide personalized care.

Keywords: BCG, Immune system, MSMD, PID, WES

1. GİRİŞ

Bağışıklık sistemi, doğuştan ve kazanılmıl bileşenlerden oluşan, patojenlere karşı vücudu koruyan çok katmanlı bir savunma ağıdır [1]. Bu sistemin herhangi bir düzeyindeki kalıtsal bozukluklar, primer immün yetmezlikler (PİY) olarak tanımlanan hastalık grubuna neden olur ve enfeksiyonlara yatkınlık, otoimmünite ve malignite riskleri ile karakterizedir [2]. PİY'ler arasında yer alan Mikobakteriyel Enfeksiyonlara Mendelyen Yatkınlık (MSMD) sendromu, özellikle canlı zayıflatılmış Mycobacterium bovis BCG aşısı ve çevresel mikobakterilere karşı kontrolsüz enfeksiyon gelişimi ile tanımlanır [3]. MSMD olgularında çoğunlukla IFN-γ/IL-12 yolaklarında yer alan genetik defektler saptanmakla birlikte, hastaların yaklaşık %50'sinde tanımlanabilir bir genetik neden belirlenememektedir [3-5]. Bu durum, monogenik nedenlerin ötesinde poligenik katkılar ve genetik modifiye ediciler gibi alternatif mekanizmaların da rol oynayabileceğini düşündürmektedir [6]. Yeni nesil dizileme (YND) teknolojileri, bu tür kompleks immün bozukluklarda hem yeni aday genlerin ortaya konması hem de tanısal doğruluğun artırılması açısından kritik öneme sahiptir [7]. Bu çalışma, İstanbul Tıp Fakültesi'nde MSMD ön tanısı almış veya klinik olarak MSMD düşünülen 20 olgunun klinik, immünolojik ve genetik düzeyde çok yönlü değerlendirilmesini amaçlamaktadır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

Bağışıklık sistemi, konak organizmanın patojenlere karşı bütünlüğünü koruyan, doğuştan ve kazanılmış olmak üzere iki ana bileşenden oluşan çok katmanlı bir savunma ağıdır. Doğuştan gelen bağışıklık; hızlı yanıt kapasitesine sahip fagositik hücreler (makrofajlar, nötrofiller), doğal öldürücü (NK) hücreler, dendritik hücreler ve kompleman sistemi gibi hücre ve molekülleri içerir. Buna karşılık, adaptif bağışıklık sistemi; antijen özgüllüğü kazanmış B ve T lenfositler aracılığıyla hedefe yönelik, uzun süreli ve immünolojik hafıza sağlayan bir yanıt üretir [1].

İmmün sistemin bu iki bileşeninden herhangi birinde meydana gelen kalıtsal kusurlar, primer immün yetmezlikler (PİY) olarak adlandırılan hastalık grubuna yol açar. Bu hastalıklar, enfeksiyonlara karşı artmış duyarlılık, otoimmünite, malignite ve immün regülasyon bozukluklarıyla karakterizedir. Uluslararası İmmünoloji Dernekleri Birliği'nin (IUIS) 2024 yılı sınıflamasına göre, 504 farklı gendeki mutasyonlarla ilişkili toplam 555 PİY hastalığı ve 17 fenokopi tanımlanmış; bu listeye son güncellemede 63 yeni monogenik bozukluk ve 2 yeni fenokopi eklenmiştir [2].

PİY'ler arasında klinik açıdan dikkat çeken ancak nadir görülen bir alt grup, Mikobakteriyel Enfeksiyonlara Mendelyen Yatkınlık (Mendelian Susceptibility to Mycobacterial Disease – MSMD) sendromudur. 1996 yılında keşfedildiğinden beri, MSMD dünya çapında 50'den fazla ülkede bildirilmiştir ve yaygınlığı yaklaşık 1/50.000 kişidir [3]. MSMD; canlı zayıflatılmış *Mycobacterium bovis* BCG aşısı ve çevresel mikobakteriler gibi zayıf virülanslı mikobakterilere karşı kontrolsüz enfeksiyon gelişimi ile karakterizedir. Çoğu bireyde rutin immünolojik testler normal bulunurken, MSMD hastalarında özellikle makrofaj içi patojenlere karşı bağışıklık yetersizliği belirginleşir [3]. Klinik spektrumunda yalnızca mikobakteriler değil; *Salmonella* türleri, *Candida* gibi mukokutanöz mantarlar, nadiren parazitler ve bazı virüslerin yol açtığı enfeksiyonlar da yer alabilir [4,5]. Ağır seyreden olgularda makrofaj aktivasyon sendromu (MAS) ve vaskülit gibi hiperinflamatuar komplikasyonlar gelişebilir [4]. MSMD genellikle çocukluk çağında başlasa da erişkin yaşta da tanı alabilen, lokalize lenfadenitten dissemine BCG enfeksiyonuna, akciğer tüberkülozundan kemik, deri, karaciğer gibi farklı organ tutulumlarına kadar geniş bir klinik yelpazede seyreden bir hastalık grubudur [4,5]. MSMD hastaları izole ve sendromik olmak üzere iki sınıfta incelenmektedir. İzole MSMD, 1996 yılında moleküler düzeyde tanımlanan ve yalnızca belirli bir veya birkaç enfeksiyon etkenine karşı seçici yatkınlık gösteren ilk Mendelyen geçiş gösteren enfeksiyon olarak kabul edilir. İzole MSMD hastaları, MSMD'nin klasik tanımına uyan gruptur. Buna karşılık, sendromik MSMD

daha yakın dönemde tanımlanmış olup, mikobakteriyal enfeksiyonların, başka yaygın bir hastalık veya enfeksiyon (örneğin, tip I interferonopati) ile görülmesi durumudur [4].

MSMD'nin temel immünopatogenezi, IFN-γ ve IL-12 sinyal yolaklarında yer alan genlerin işlev kaybına dayanır. MSMD hastalarında genetik heterojenite oldukça fazladır. MSMD, X'e bağlı resesif (XR), otozomal dominant (AD) veya otozomal resesif (AR) kalıtım özellikleri göstermekle birlikte, 1996 yılında patogenenizinin aydınlatılmasından günümüze kadar geçen sürede 18 farklı gende mutasyon tespit edilmiştir. Bunlardan 16 tanesi otozomlar üzerinde bulunan: interlökin-12 beta alt birim**i (***IL12B*), interlökin-12 reseptörü beta-1 (*IL12RB1*), interlökin-12 reseptörü beta-2 (*IL12RB2*), interlökin-23 reseptörü (*IL23R*), Interferon-gama reseptörü 1 (*IFNGR1*), interferon-gama reseptörü 2 (*IFNGR2*), sinyal iletici ve transkripsiyon aktivatörü 1 (*STAT1*), interferon düzenleyici faktör 8 (*IRF8*), interferon düzenleyici faktör 1 (*IRF1*), sinyal peptit peptidaz benzeri 2A (*SPPL2A*), tirozin protein kinaz 2 (*TYK2*), interferon tarafından uyarılan gen 15 (*ISG15*), RAR ilişkili orfan reseptör C (*RORC*), janus kinaz 1(*JAK1*), T-box transkripsiyon faktörü 21 (*TBX21*), interferon-gama (*IFNG*); 2 tanesi X kromozomu üzerinde bulunan: Sitokrom B-245 beta zinciri, NADPH oksidaz alt birimi (*CYBB*) ve malign T-hücre amplifiye dizisi 1 (*MCTS1*) genleridir [6]. Bu genetik nedenler olguların yaklaşık %50'sini açıklamaktadır [3]. Diğer olguların etyolojisi ise henüz bilinmemekte olup, modifiye edici gen etkileri, poligenik katkılar ve gen ekspresyon farklılıkları gibi mekanizmalar üzerinde durulmaktadır [3].

MSMD gibi klinik ve genetik açıdan heterojen seyreden PİY alt gruplarında, tanı sürecinde yalnızca klasik immünolojik testler yeterli olmamakta, yeni nesil dizileme (Yeni Nesil Dizileme, YND) teknolojileri tanısal sürecin ayrılmaz bir parçası haline gelmektedir. Panel gen dizileme, tüm ekzom dizileme (TED) ve RNA dizileme (RNA-seq) gibi NGS tabanlı yaklaşımlar hem nedensel varyantların belirlenmesinde hem de yeni aday genlerin ortaya çıkarılmasında önemli katkılar sağlamaktadır [7].

Bu proje, MSMD ön tanısı almış veya klinik olarak MSMD düşünülen olgularda genetik etiyolojiyi aydınlatmak amacıyla, İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Polikliniği'ne yönlendirilen 20 olgunun klinik, immünolojik ve genetik verilerinin bütüncül şekilde analizini kapsamaktadır. Çalışmada, tüm ekzom dizileme (TED) verileri aracılığıyla varyantların saptanması, in siliko analizlerle fonksiyonel etkilerinin değerlendirilmesi, segregasyon analizleriyle kalıtım modelinin belirlenmesi ve varyantların klinik korelasyonunun kurulması amaçlanmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu proje desteği ile doktora tez çalışmasındaki seçilmiş 20 MSMD olgusunun TED analizi gerçekleştirilmiştir. Çalışmadaki diğer Sanger dizileme ile aile segregasyonları ve gen ekspresyon analizleri için İstanbul Üniversitesi BAP'dan destek alınarak bütünleştirilmiş bir araştırma yürütülmüştür.

3.1. Kullanılan Cihazlar ve Laboratuvar Gereçleri

Bu çalışmada kullanılan cihazları ve laboratuvar ekipmanlarına ilişkin bilgiler, işlevsel kullanım alanlarına göre gruplandırılmış ve ilgili marka-modelleriyle birlikte tablo hâlinde sunulmuştur. Tablo 3-1'de, her cihazın hangi deneysel işlem aşamasında kullanıldığı belirtilmiş; ilgili sistemlerin marka ve modelleri detaylandırılarak çalışma ortamının teknik altyapısı açıklanmıştır.

Tablo 3-1: Çalışmada kullanılmış olan cihazların ve laboratuvar gereçlerinin isimleri ve kullanım alanlarının listesi

Cihaz ve Laboratuvar Gereçlerinin Kullanım Alanı	Cihaz Adı ve Marka
Steril Çalışma Alanı	Steril Kabin
Santrifüj Cihazları	Eppendorf Centrifuge 5415 R, Beckman Coulter AllegraTM X-22 Centrifuge, Beckman Coulter Microfuge® 16 Centrifuge
Ölçüm ve Sıvı Transfer Sistemleri	Dijital Hassas Terazi, Otomatik Pipet Seti
DNA ve RNA İzolasyonu	Qiagen-EZ 1 Advanced XL (Tam Otomatik DNA İzolasyon Cihazı)
Karıştırma ve Homojenizasyon	Vorteks (BioCote), Manyetik Karıştırıcı
Spektrofotometre Cihazı	Thermo Scientific NanoDrop 2000C
Isıtma ve Depolama	Mikrodalga Fırın, Buzdolabı (Samsung), -20°C Derin Dondurucular (Uğur), -80°C Derin Dondurucu (Haier Biomedical)
PCR ve Termal Döngü Sistemleri	Isıtmalı Kapaklı Termal Döngü Cihazı
Elektroforez ve Görüntüleme Sistemleri	Dijital Elektroforez Cihazı (Agilent Technologies® Bioanalyzer), Agaroz Jel Elektroforez Sistemi (Thermo Electron Corporation EC250-90), Agaroz Jel Görüntüleme Sistemi
Dizileme Sistemleri	Illumina® NovaSeq 6000 ™
Kapiler Elektroforez Sistemi	ABI3500 (Otomatik Sekiz Kapilerli Elektroforez Sistemi; Applied Biosystem)
Sterilizasyon ve	Otoklav, UPS

Güç Kaynakları	
Örnek ve Çözelti Saklama, Hazırlama Malzemeleri	5-10 cc EDTA'lı Tüp, 50mL'lik Falcon Tüpler, Eppendorf Tüpleri, 96 k-Kuyucuklu Plak, Beher
TED Analiz Cihazı	NanoDrop 2000 spektrofotometresi (Thermo Fisher, #ND-2000) ve Qubit3 florometresi (Thermo Fisher, #Q33216), 2100 Bioanalyzer (Agilent, #G2939BA), Illumina NovaSeq 6000 (Gen Era Diagnostik A.Ş)

3.2. Kullanılan Kimyasallar, Tampon ve Çözeltiler, Ticari Kitler

Bu çalışmada kullanılan kimyasallar, tampon çözeltiler, ticari kitler ve laboratuvar malzemeleri; uygulama alanlarına göre sınıflandırılarak tablo hâlinde sunulmuştur. Tablo 3-2'de her bir maddenin kimyasal adı ve hangi deneysel işlemde kullanıldığı bilgisi yer almaktadır.

Tablo 3-2: **Çalışmada kullanılan kimyasalların, tampon ve çözeltilerin, ticari kitlerin ve malzemelerin isimleri ve kullanım yerlerinin listesi**

Kimyasal Adı	Kullanım Yeri
Çözelti Hazırlamada Kullanılan Kimyasallar	
0.5 M EDTA (Multicell)	Çözelti Hazırlama
1 M Tris (Multicell)	Çözelti Hazırlama
Potasyum Bikarbonat (Merck)	Çözelti Hazırlama
Amonyum Klorür (Merck)	Çözelti Hazırlama
DNA İzolasyonunda Kullanılan Kimyasallar	
%80'lik Etanol	DNA İzolasyonu
Qiagen-EZ 1&2 Blood Kit	DNA İzolasyonu
RNA İzolasyonunda Kullanılan Kimyasallar	
%75'lik Etanol (Sigma)	RNA İzolasyonu
DEPC (Dietil Pirokarbonat) (Sigma)	RNA İzolasyonu
%100'lük İzopropanol (Sigma)	RNA İzolasyonu
Phosphate Buffer Saline (PBS) Tablet (İnvitrogen)	RNA İzolasyonu
Kloroform (Merck)	RNA İzolasyonu
Trizol (Qiagen)	RNA İzolasyonu
Amonyum klorür (NH_4Cl)	RNA İzolasyonu
Potasyum bikarbonat ($KHCO_3$)	RNA İzolasyonu
Jel Hazırlama ve Elektroforez İçin Kullanılan Kimyasallar	
Agaroz (PRONA)	Jel Hazırlama
Agaroz Jel	Jel Elektroforez
1x TBE Tamponu	Jel Elektroforez
Yükleme Boyası	Jel Elektroforez

Marker	Jel Elektroforez
PZR ve Sanger Dizileme Çalışmalarında Kullanılan Kimyasallar	
Hedef Bölgelerin Amplifikasyonu İçin Tasarlanmış Primerler	PZR
PZR Ana Karışımı (VitaTaq® HS PCR Kit) 10X PCR Buffer 1X dNTP Mix (10 mM each) Primer 1 (10 µM) Primer 2 (10 µM) VitaTaq® HS DNA Polymerase (2 U/µL)	PZR
Dimetilsülfoksit (DMSO- Biomatik Coorporation)	PZR
Merdiven Markörü (Sigma-Aldrich)	PZR
Ekzonükleaz-1 (Thermo Scientific)	PZR
Rapid Alkalin Fosfataz (Roche)	PZR
Dizi PZR Reaksiyonu Karışımı	Sanger Dizileme
Komplementer DNA (cDNA) Sentezi	
BIORAD iScript ™ cDNA Sentez Kiti 5X iScript Reaction Mix iScript Reverse Transcriptase	cDNA Sentezi
Gerçek Zamanlı PZR (qRT-PZR)	
SYBR™ Green Universal Master Mix (ThermoFisher SCINTIFIC)	Gerçek Zamanlı PZR (qRT-PZR)
Diğer Kimyasal Maddeler	
125 mM EDTA	Çeşitli Laboratuvar Kullanımları
Pürifikasyon Mix	Sanger Dizileme
3 M Sodyum Asetat	Çeşitli Laboratuvar Kullanımları
%2'lik Glikojen Solüsyonu	Çeşitli Laboratuvar Kullanımları
%100 ve %70 Etanol	Çeşitli Laboratuvar Kullanımları
HiDi Formamid (Yüksek Deiyonize Formamid)	Çeşitli Laboratuvar Kullanımları
Distile Su	Genel Laboratuvar Kullanımı
MLPA Çalışmalarında Kullanılan Kimyasal	
SALSA MLPA Probemix P454 CGD	
Tüm Ekzom Dizileme	
Twist Comprehensive Exome Kiti (Twist Bioscience)*	

Tablo 3-3'te bu çalışmada kullanılan **Twist Comprehensive Exome Kit**'ine ait reaktifler, kit bileşenlerine göre gruplandırılarak tablo hâlinde sunulmuştur. Tabloda, kitin tüm bileşenleri olan hibridizasyon reaktifleri, yıkama tamponları, kütüphane amplifikasyon karışımı, prob panelleri, bağlanma ve saflaştırma boncukları ile engelleyici solüsyonlar ayrı başlıklar altında listelenmiştir.

Tablo 3-3: *Twist Comprehensive Exome kitinin içeriğinin listesi.

Twist Hibridizasyon Reaktifleri (Kutu 1)	Hibridizasyon Karışımı, Hibridizasyon Güçlendirici, Amplifikasyon Primerleri, Bağlanma Tamponu

Twist Yıkama Tamponları (Kutu 2)	Yıkama Tamponu 1, Yıkama Tamponu 2
Equinox Kütüphane Amplifikasyon Karışımı (Kutu 3)	Equinox Kütüphane Amplifikasyon Karışımı (2x)
Twist Prob Panelleri (Sipariş ile temin edilmiştir)	Twist Sabit Panel (örneğin, Twist İnsan Çekirdek Ekzom Paneli), Twist Özelleştirilmiş Panel, İkincil Twist Prob Panel (Opsiyonel)
Twist Evrensel Engelleyiciler	Evrensel Engelleyiciler, Engelleyici Çözeltisi
Twist Bağlanma ve Saflaştırma Boncukları	Streptavidin Bağlanma Boncukları, DNA Saflaştırma Boncukları
Twist Kurutma Boncukları	Streptavidin Bağlanma Boncukları, DNA Saflaştırma Boncukları

3.3. İstatistiksel Analizler

Çalışmada elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirmesi IBM SPSS Statistics for Windows, Version 30.0 (IBM Corp., Armonk, NY) yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kategorik değişkenlerin karşılaştırılmasında Ki-kare (χ^2) testi, sayısal değişkenlerin ikili grup karşılaştırmasında student-t testi, ikiden fazla grup arasındaki farkların analizinde ise tek yönlü varyans analizi (ANOVA) uygulanmıştır. Anlamlılık düzeyi tüm analizlerde $p<0,05$ olarak kabul edilmiştir.

3.4. Çalışma Grubunun Oluşturulması

Bu proje için; İstanbul Tıp Fakültesi Çocuk Alerji ve İmmünoloji Polikliniği'ne ve Tıbbi Genetik Polikliniği'ne başvuran, yaygın BCG enfeksiyonu, çevresel mikobakteriler ile enfeksiyon, tekrarlayan salmonella enfeksiyonu, atipik mikobakterilerin neden olduğu osteomiyelit, sık enfeksiyon, normal immünolojik test sonucu (imünoglobulin, lenfosit alt grupları ve kronik granülamatöz testlerinin normal olması) öyküsü olan ve Tıbbi Genetik Anabilim Dalı tarafından yapılan immün yetmezlik gen paneli ile MSMD tanısı almış (daha önce genetik tanısı olan ve klinik olarak MSMD düşünülen) ek olarak klinik olarak MSMD ön tanılı olup gen-paneli testinde patojenik varyant tespit edilemeyen (n=20) hasta ve araştırmaya için uygun aile bireylerinin katılımı ile çalışma grubunu oluşturulmuştur.

3.5. Genomik DNA ve RNA İzolasyonu

3.5.1. Genomik DNA İzolasyonu

Çalışmaya dahil edilen 20 indeks olgu ve aile bireylerinden (n=46) alınan EDTA'lı kan örneklerinden DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzolasyon işlemleri, tam otomatik sistem olan Qiagen EZ1 Advanced XL cihazı kullanılarak, Qiagen EZ1&2 DNA Blood Kiti aracılığıyla, üretici firmanın protokolüne uygun şekilde yürütülmüştür. İşleme başlamadan önce, kan örnekleri oda sıcaklığına getirilmiş ve homojenizasyon sağlamak amacıyla birkaç kez yavaşça alt üst edilerek karıştırılmıştır. Hasta sayısına uygun olarak örnek tüpleri ve elüsyon tüpleri hazırlanmış; kimlik bilgileri etiketlenerek cihaza yerleştirilmiştir. Her bir tüpe 350 µL kan örneği, 1000 µL'lik filtreli pipet ucu kullanılarak aktarılmış; ayrıca %80'lik soğuk etanol çözeltisi, her bir izolasyon için toplam 1800 µL olacak şekilde iki aşamada (900 µL + 900 µL) hazırlanarak etanol tüplerine eklenmiştir. İzolasyon sırasında cihaz yönergelerine uygun olarak sırasıyla tip tepsisi, kartuşlar, tek kullanımlık filtre uçları ve elüsyon tüpleri ilgili bölmelere yerleştirilmiş; mıknatıslı solüsyon içeren kitler hafifçe çalkalanarak cihaz tepsisine konulmuştur. Cihaz çalıştırıldıktan sonra "daha sonra başlat" seçeneği etkinleştirilmiş ve "350 µL kan" protokolü seçilerek işleme devam edilmiştir. İzolasyon hacmi 200 µL olarak onaylanmış ve "saf etanol yıkama" adımı işaretlenerek işlem başlatılmıştır. Yaklaşık 20 dakika süren izolasyon işlemi tamamlandıktan sonra, elüsyon tüpleri cihazdan alınmış, kapakları kapatılarak –20 °C derin dondurucuda uygun koşullarda saklanmıştır. Kullanılmış kartuşlar, uçlar ve diğer sarf malzemeleri, biyolojik atık yönetmeliğine uygun biçimde imha edilmiş; cihazın iç yüzeyi temizlenerek ultraviyole ışıkla sterilizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.5.2. RNA İzolasyonu

Çalışmaya dahil edilen 20 indeks olgu ve aile bireylerinden (n=46) EDTA'lı tüplere alınan periferik kan örneklerinden RNA izolasyonu aşamasını gerçekleştirmek için öncelikle işlem sırasında kullanılacak çözeltiler hazırlanmıştır.

DEPC'li Su Hazırlanması

RNA izolasyonu ve RNA'ya dayalı analizlerde RNaz enzimlerinin kontaminasyonunu önlemek amacıyla dietilpirokarbonat (DEPC) ile muamele edilmiş su kullanılmıştır. Bu amaçla, ultra saf su (dH_2O) içerisine son hacmin %0.1'i oranında DEPC eklenmiş ve manyetik karıştırıcı yardımıyla homojen bir çözelti elde edilmiştir. Hazırlanan karışım oda sıcaklığında 12 saat bekletildikten sonra, ortamda kalan DEPC kalıntılarını uzaklaştırmak amacıyla 120 °C'de 15 dakika boyunca

otoklavlanarak sterilizasyon sağlanmıştır. Steril hale getirilen DEPC'li su, kontaminasyondan korunması amacıyla steril kaplarda saklanmıştır.

10X Gey's Tamponu (155 mM NH4Cl, 10 mM KHCO3) Hazırlanması

10X Gey's Tampon çözeltisi hazırlanırken, 82.91 gram amonyum klorür (NH_4Cl) ve 10.01 gram potasyum bikarbonat ($KHCO_3$) tartılarak bir beher içine alınmıştır. Üzerine 1 litre DEPC ile işlem görmüş su eklenmiş ve çözelti manyetik karıştırıcı kullanılarak tamamen çözülünceye kadar karıştırılmıştır. Tampon çözeltisi, otoklavlanarak sterilize edilmiş ve oda sıcaklığında saklanmak üzere uygun koşullarda muhafaza edilmiştir.

1X Gey's Tamponu Hazırlanması

Kullanıma hazır 1X Gey's tamponu elde etmek için, önceden hazırlanmış olan 10X stok çözeltiden 100 mL alınarak, DEPC ile işlem görmüş su ile toplam hacim 1 litreye tamamlanmıştır. Elde edilen çözelti oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

1X PBS Solüsyonu Hazırlanması

1X PBS çözeltisi, 100 mL saf su içerisine bir adet PBS tableti eklenerek hazırlanmıştır. Tablet, tamamen çözülene kadar çözelti karıştırılmış ve oda sıcaklığında saklanmıştır.

Kandan Total RNA İzolasyonu

Birinci Aşama: Gey's Tamponu Kullanılarak Hücre Ayrımı

EDTA'lı tüplerde saklanan tam kan örnekleri, alındıktan sonraki ilk dört saat içerisinde işleme alınmıştır. Her bir örnekten 5–7,5 mL kan, 50 mL'lik Falcon tüplerine aktarılmış ve hacmin iki katı kadar %1 Gey's tamponu ilave edilmiştir. Tüpler iyice karıştırıldıktan sonra +4 °C'de 20 dk bekletilmiştir. Ardından 1500 rpm'de, oda sıcaklığında 10 dakika santrifüj uygulanarak süpernatant dikkatlice uzaklaştırılmıştır. Elde edilen pelet üzerine, başlangıçtaki kan hacmi kadar tekrar 1X Gey's tamponu eklenmiş ve çözünme sağlanmıştır. İşlem, aynı santrifüj koşulları altında tekrarlanmış ve ikinci kez süpernatant dökülerek pellet korunmuştur. Son olarak pelet üzerine 1 mL PBS tamponu eklenmiş ve 1500 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra elde edilen

lökosit fraksiyonu, 800 µL soğuk Trizol ile buz üzerinde homojenize edilmiş ve –80 °C'de bir sonraki aşamaya kadar saklanmıştır.

İkinci Aşama: Trizol Yöntemi ile RNA İzolasyonu

Trizol ile ön işlemden geçirilmiş ve –80 °C'de saklanmış olan lökosit örnekleri, buz üzerinde çözündürülerek RNA izolasyonuna hazır hâle getirilmiştir. Her tüpe 160 µL soğuk kloroform ilave edilmiş, 15 saniye süreyle vortekslenmiş ve oda sıcaklığında 3 dakika bekletilmiştir. Faz ayrımı sağlamak için örnekler 12.000 g'de, +4 °C'de 20 dk santrifüj edilmiştir. Üst faz dikkatlice 1.5 mL'lik yeni mikrosantrifüj tüplerine aktarılmış, eşit hacimde önceden soğutulmuş %100 izopropanol eklenmiştir. Karışımlar çalkalanarak –20 °C'de bir gece inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün, 12.000 g'de +4 °C'de 10 dk santrifüj uygulanmış, süpernatant uzaklaştırılarak RNA peleti elde edilmiştir. Pelet üzerine %75'lik soğuk etanol (DEPC ile hazırlanmış) eklenmiş ve hafifçe alt üst edilerek karıştırılmıştır. 9000 g'de +4 °C'de 5 dk santrifüj edilen örneklerin üst fazı uzaklaştırılmış, tüpler ters çevrilerek filtre kâğıdı üzerinde kurutulmuştur. Kurutulan pellet, 50 µL RNaz içermeyen su ile çözdürülmüş ve buz üzerinde 20–25 dakika bekletildikten sonra –80 °C'de saklanmıştır.

DNA ve RNA Örneklerinin Saflığı ve Konsantrasyon Ölçümü

Elde edilen DNA ve RNA örneklerinin niceliksel ve niteliksel analizleri, Thermo Scientific NanoDrop 2000C spektrofotometresi ile gerçekleştirilmiştir. Ölçümlerde 260/280 ve 260/230 absorbans oranları dikkate alınmıştır. 260/280 oranı, protein kontaminasyonuna işaret ederken; DNA için ideal aralık 1.8–2.0, RNA için ise 1.6–2.0 olarak değerlendirilmiştir. 260/230 oranı, olası kimyasal kalıntılara duyarlıdır ve benzer şekilde 1.8–2.2 aralığında olması beklenmiştir. Bu oranların dışında kalan değerler, örneklerde kontaminasyon varlığına işaret edecek şekilde yorumlanmıştır.

3.6. Komplementer DNA (cDNA) Analizi

–80 °C'de saklanan total RNA örnekleri, cDNA sentezi için BIORAD iScript™ cDNA Sentez Kiti kullanılarak işleme alınmıştır. Sentez aşamaları ve kullanılan karışım bileşenleri Tablo 3.4'te sunulmaktadır. RNA örnekleri dondurucudan çıkarıldıktan sonra buz üzerinde çözdürülmüş ve konsantrasyonları NanoDrop spektrofotometresi ile ölçülmüştür. Her bir örnek, 1000 ng/µL olacak şekilde seyreltilmiş ve uygun miktarda nükleazsız su ilave edilerek toplam hacim 15 µL'ye

tamamlanmıştır. İkinci aşamada, her tüpe 5 µL hacminde ters transkriptaz enzimi ve reaksiyon miksi içeren hazırlık karışımı eklenmiş ve pipetleme yapılarak örnekler homojen hâle getirilmiştir. Hazırlanan karışımlar, termal döngü cihazında sırasıyla 25 °C'de 5 dk, 42 °C'de 30 dk, 85 °C'de 5 dk süreyle inkübe edilmiş; ardından 4 °C'de beklemeye alınarak reaksiyon tamamlanmıştır. Elde edilen cDNA'lar, –20 °C'de uygun koşullarda saklanmıştır.

3.7. Tüm Ekzom Dizileme (TED)

MSMD hastalık grubunda klinikle ilişkili olarak doğru genetik ve tedaviye ulaşılabilmesine, hastanın yaşam standartlarının yükseltilmesine imkan sağlayabilmesi açısından bu proje ile MSMD'li vakalarda (n=20), genetik etiyolojinin aydınlatılmasına katkı sağlayacak gen varyantlarını belirlemek için TED yaklaşımı ile in siliko ve/veya in vitro fonksiyon analizleri sonrasında klinik önemi olabilecek gen varyantlarının karakterize edilmesi ve hastalık ilişkisinin araştırılması planlanmıştır. Tüm ekzom dizileme (TED), yaklaşık 21.000 genin protein kodlama bölgeleri olan ekzonlar ve intron bağlantı dizilerinin yakalanmasını ("capturing") ve dizilenmesini içeren ve MSMD gibi genetik heterojenitesi olan hastalık gruplarında kullanılan bir yöntemdir. Bu projede yeni nesil dizileme tabanlı TED analizi için "Twist Bioscience Human Core Exome kiti" kullanılarak kütüphane hazırlığı yapılmıştır. Kütüphane hazırlık sürecinde sırasıyla, fragmentasyon, index/barkod dizilerinin eklenmesi, amplifikasyon, ekzonik bölgelerin zenginleştirilmesi ve pürifikasyon işlemleri gerçekleştirilmiştir. Çalışma kapsamında üretici firmanın kit yönergeleri takip edilmiş, Illumina NextSeq 2000 yeni nesil dizileme platformunda dizileme işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu basamakta örnek başı 40 milyon çift yönlü (paired-end) 2x150 bp 'lık okuma elde edilmiştir. Örnek başı veri çıktısı 8 Gb ile ekzon boyu ortalama ~100x okuma derinliğindedir. Okuma işlemi sonrasında, elde edilen verilerin kalite kontrolü FASTQC programı (www.bioinformatics.babraham.ac.uk) aracılığıyla yapılmıştır. Dizileme sürecinde, Fastq okuma verilerindeki düşük kalitedeki baz okumaları, sonraki analiz basamaklarında sapmalara neden olmaması için, okumalardan kırpılmıştır. Kalite filtreleri ve kırpma işlemleri için Trimmomatic uygulaması (http://www.usadellab.org/cms/?page=trimmomatic) kullanılmıştır. Elde edilen diziler BWA mem programı ile referans genoma hizalanmıştır. Hizalama sonrasında, kalite kontrol verilerine göre filtreleme işlemleri Samtools programı ile gerçekleştirilmiştir. Analiz kapsamında realignment ile in/del bölgelerindeki hizalama düzeltmelerinin yapılması, DNA dizilerinin kalite skor değerlerinin tekrar kalibre edilmesi, düzenlenmiş dizilerdeki varyasyonlar için parametre optimizasyonlarının yapılması, elde edilen varyasyon listesi için anotasyon işlemi tamamlanması, varyasyon listeleri

“strand bias” durumuna göre üst limit (%20) alınarak filtrelenmesi, tespit edilen varyasyon yüzdesine göre güvenilir olmayan (<%80) varyasyonların elenmesi gerçekleştirilmiştir. Bu süreç içindeki varyant çekim işlemlerinde GATK; varyant anotasyon işlemlerinde ise Variant Effect Predictor programı kullanılmıştır.

3.8. Biyoinformatik Analiz

Dizileme sonrası biyoinformatik analiz sürecinde, ham okuma verilerinin kalite değerlendirmesi FASTQC yazılımı ile gerçekleştirilmiştir. Ham verilerdeki düşük kalitedeki baz okuma bölgeleri ile olası adaptör veya indeks kaynaklı kontaminasyonlar, ileri analizlerde hatalı sonuçlara yol açmaması için Trimmomatic (v0.39) aracı kullanılarak temizlenmiştir. Kalite kırpma işlemini takiben, elde edilen yüksek kaliteli okuma dizileri BWA mem algoritması aracılığıyla referans insan genom dizisi (GRCh37) ile hizalanmıştır. Bu hizalama işleminin ardından, Samtools yazılımı kullanılarak hizalanmış veriler kalite kontrol ölçütlerine göre filtrelenmiştir. Analizin devamında, varyant belirleme sürecinin doğruluğunu artırmak adına birkaç adım uygulanmıştır. İlk olarak, yer değiştirme ve silinme (in/del) bölgelerindeki hizalama hataları realignment işlemi ile düzeltilmiştir. Ardından, baz kalitelerini daha güvenilir hâle getirmek amacıyla kalite skoru rekalibrasyonu yapılmıştır. Bu adımları, varyant tespiti öncesi parametre optimizasyonları ve filtreleme işlemleri takip etmiştir. Özellikle, varyant listeleri strand bias etkisi dikkate alınarak %20 üst sınırla değerlendirilmiş ve güvenilirliği %80'in altında kalan varyantlar analiz dışı bırakılmıştır. Varyant çağırma işlemleri GATK (Genome Analysis Toolkit) aracılığıyla yürütülmüş, elde edilen varyantların fonksiyonel etkileri Variant Effect Predictor (VEP) programı yardımıyla anotasyonlanmıştır. Paralel olarak, aynı analiz basamakları Sophia DDM yazılımı üzerinden de gerçekleştirilmiş ve bu platformda hizalama, varyant tespiti ve anotasyon işlemleri birlikte yürütülmüştür. Ayrıca, Sophia DDM üzerinden kopya sayısı değişikliklerini (CNV) analiz etmeye yönelik ek modüller kullanılarak delesyon ve duplikasyonlar değerlendirilmiş, varyant fraksiyonu <%20’den az olan varyantlar dışlanarak klinik olarak anlamlı varyasyonlar belirlenmiştir.

3.8.1. MSMD ve PİY İlişkili Gen Panel Listelerinin Oluşturulması, Varyant Analizi ve Filtrasyon Kriterleri

TED ile saptanan varyantların değerlendirilmesi için MSMD ve PİY ilişkili gen panel listesi

oluştururken Sophia DDM alt yapısı, *Human Phenotype Ontology* (HPO) veritabanı, *Online Mendelian Inheritance in Man* (*OMIM*) veritabanı, Orphanet internet sitesi, KEGG Patway internet sitesi ve literatür taraması yapılarak bu çalışma kapsamında oluşturulmuştur. Biyoinformatik analiz sürecinde, öncelikle MSMD'ye özgü genler içeren MSMD Gen Paneli (25 gen) değerlendirilmiş, ardından klinik bulgularla ilişkili olabilecek daha geniş kapsamlı paneller sırasıyla analiz edilmiştir. Bu paneller şunlardır:

Osteomiyelit, BCGitis, BCGosis Gen Paneli (61 gen)

Literatür Taraması ile Elde Edilen Gen Paneli (74 gen)

KEGG Tüberküloz Yolağı Genleri Paneli (82 gen)

Mikobakteri İlişkili Hastalık Genleri Paneli (98 gen)

Doğuştan Bağışıklık Defektleri Gen Paneli (269 gen)

İmmün Defektler Gen Paneli (272 gen)

İmmünolojik Anomaliler Gen Paneli (2030 gen)

Bu artan sıralama, genetik varyant analizinde önce MSMD ile doğrudan ilişkili, ardından fenotipik genişlemeyle bağlantılı ve son olarak immünoloji genelini kapsayan gen kümelerinin tarandığını yansıtmaktadır. Bu yapı, varyantların önceliklendirilmesinde hedefe yönelik, ancak gerektiğinde genişletilmiş bir yaklaşım benimsenmesini sağlamıştır.

Her bir indeksin TED verileri, MSMD ve PİY ilişkili gen panelleri oluşturulduktan sonra Sophia DDM v4.4.6.0 yazılımı kullanılarak gen panellerindeki varyantlar belirli filtrasyon kriterleri oluşturularak analiz edilmiştir. Yaygın tek nükleotid varyantlarının (SNV) filtrelenmesi amacıyla, gnomAD ve Sophia DDM v4.4.6.0 yazılımı in-house minör allel frekansı (MAF) ≤ 0.01 olarak belirlenmiştir. Varyant analizinde değerlendirilen diğer parametreler arasında varyant tipi (sinonim, yanlış anlamlı, anlamsız, çerçeve kayması vb.), varyant lokalizasyonu (ekzon, intron, intron kırpılma bölgesi, UTR vb.) ve varyant fraksiyonu (VF) yer almaktadır. Bu parametreler kullanılarak varyantların kodlama bölgelerindeki etkilerini değerlendirmek için bu bölgeler açısından filtreleme

yapılmış ve sadece **"**nonsense, inframe, frameshift, missense" ve "splice site" değişiklikleri analiz kapsamına alınmıştır. Okuma derinliği 10x'in altında olan varyantlar değerlendirme dışı tutulmuştur. Saptanan varyantların ham okuma kalitesi, Integrative Genomics Viewer (IGV) aracılığıyla incelenmiştir. Klinik olarak anlamlı varyantların belirlenmesi amacıyla ClinVar patojenite sınıflandırması dikkate alınmıştır. Patojenik**,** klinik önemi belirsiz (VUS) ve diğer potansiyel etkili varyantlar değerlendirmeye alınmış, American College of Medical Genetics and Genomics sınıflandırmasına göre **'**benin' ve 'benin benzeri**'** olarak sınıflandırılan varyantlar çalışma dışı bırakılmıştır. Analiz sonucunda saptanan varyantların protein ve kırpılma bölgelerine etkisi, ekspresyon paternleri ve evrimsel korunmuşluk gibi faktörler ışığında yorumlanmıştır. Sophia DDM v4.4.6.0 yazılımının klinik ve biyolojik olarak anlamlı bulduğu 'retained' varyant kategorisinde yer alan varyantlar ve SNP'ler seçilmiştir. Bu değerlendirme sürecinde PolyPhen2, SIFT, MutationTaster, AlphaMissense, BayesDel, GERP, CADD ve DANN *in siliko* tahmin algoritmalarından yararlanılmıştır. Varyant bilgilerinin doğrulanması ve yorumlanması amacıyla; OMIM (https://www.omim.org), HGMD (https://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php), HPO (https://hpo.jax.org/app/), Ensembl (https://www.ensembl.org), GeneCards (https://www.genecards.org), Human Protein Atlas (HPA) (https://www.proteinatlas.org), KEGG (https://www.genome.jp/kegg), ClinVar (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar), Franklin by Genoox (https://franklin.genoox.com), VarSome (https://varsome.com) ve UCSC Genome Browser (https://genome.ucsc.edu) gibi uluslararası güvenilir veri tabanları kullanılmıştır. Ayrıca, varyantların protein yapısı üzerindeki etkilerinin analizinde SWISS-MODEL (https://swissmodel.expasy.org), Missense3D (http://missense3d.bc.ic.ac.uk) ve genin korunmuş yapısının analizinde UCSC Genome Browser on Human (GRCh38/hg38) (https://genome.ucsc.edu) araçlarından yararlanılmıştır.

Genomik adlandırma için hg19/GRCh37 referans genomu kullanılmış ve Human Genome Variation Society (HGVS) kuralları esas alınmıştır. Varyantların klinik etkilerinin sınıflandırılması, 2015 yılında Amerikan Tıbbi Genetik Koleji (American College of Medical Genetics-ACMG) ve Moleküler Patoloji Derneği (Association for Molecular Pathology-AMP) tarafından geliştirilen dizi varyantlarının yorumlanmasına yönelik standartlar ve kılavuzla doğrultusunda yapılmıştır. Bu kılavuz, varyantların patojenlik düzeylerini belirlemek için kullanılan standart bir yöntem sunmakta ve her varyant için gerekli parametrelerin dikkate alınmasını sağlamaktadır [1]. Varyant filtreleme kriterleri uygulandıktan sonra elde edilen aday varyantlar fonksiyonel ve klinik ilişkilendirme

analizlerine tabi tutulmuştur. Varyant filtereleme akışında ilk olarak, gen panelleri oluşturulmuş ve Sophia DDM v4.4.6.0 yazılımı ile analiz edilmiştir. Filtrasyon kriterlerine göre minör allel frekansı (MAF) <0.01 olan yaygın varyantlar hariç tutulmuştur. Varyantlar, türlerine, lokalizasyonlarına ve fraksiyonlarına göre analiz edilmiş, okuma derinliği 10X'in altındaki varyantlar dışarıda bırakılmıştır. İnceleme ve değerlendirme süreci, çeşitli *in siliko* tahmin araçları ve veri tabanları kullanılarak yapılmış, klinik olarak anlamlı varyantlar ClinVar ve ACMG kriterlerine göre sınıflandırılmıştır.

3.9. TED Analizi Sonucu Belirlenen Varyantların Sanger Dizileme Yöntemi ile Doğrulanması

Seçilen varyantların Sanger dizileme ile doğrulanması, aile segregasyon ve RNA çalışmaları IUBAP /TDK-2023-39951 Nolu İstanbul Üniversitesi BAP doktora tez projesi desteği ile Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Moleküler Genetik Laboratuvarında yapılmıştır.

3.9.1. Primer Tasarımı

TED analizi sonucu elde edilen varyantlar, 20 MSMD hastasının fenotipi ve klinik bulgularına uygun olarak analiz edilmiş ve bu değerlendirmeler sonucu seçilen varyantların Sanger dizi analizi ile doğrulaması ve segregasyon çalışmaları yapılmıştır. Her aday varyant için, Sanger dizilemenin ilk aşaması olan PZR reaksiyonu ile amplifikasyonu için genin özelliklerine göre özel ileri ve geri primerler tasarlanmıştır. Bu primerler, varyantların yer aldığı konumları kapsayacak şekilde, HGMD ve NCBI veri tabanındaki kanonik transkriptin 'NM' kodları kullanılarak Ensembl veri tabanındaki gen dizileri kullanılarak tasarlanmıştır. Primerler tasralanırken bağlanma sıcaklıklarına, dizilerin uzunluklarına, GC içeriklerine, oluşturdukları dimer yapılarına dikkat edilmiştir. Primerlerin tasarımında, uzunluklarının 18-24 nükleotid arasında olması, nükleotid dağılımlarının A-T ve C-G arasında dengeli bir şekilde olması, ayrıca primer çiftlerinin bağlanma sıcaklıklarının birbirine yakın olmasına özen gösterilmiştir. Ayrıca, tasarlanan primerlerin, dizinin tekrarlanan bölgelerinde yer almaması ve oligonükleotidlerin, polimorfizm içeriyorsa, toplumda %1'in altında bir sıklığa sahip olması gerektiği göz önünde bulundurulmuştur. Primerler tasarlanırken *in siliko* PZR analizi için UCSC Genome Browser, Integrated DNA Technologies (IDT) ve NIH Primer-BLAST araçları kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan primer çiftlerine ilişkin bilgiler Tablo 3-4'te yer almaktadır.

Tablo 3-4: **Varyant konfirmasyonu için yapılan PZR'da kullanılan primer çiftleri**

Gen Sembolü	NM Kodu	Bölge	Primer İleri/Geri (F/R)	Fragman Boyutu (bç)
CYBA	NM_000101.4	Ekzon 6	5'- CAGACTTGAGCCTGTCCCA- 3' 5'- TTATTGCAGGTGGGTGCAC- 3'	373
DNAAF4	NM_130810.4	Ekzon 8	5'-GACAGGCTGGTATATGTGAAA-3' 5'- CACCAGTTCCTTGTCCATTA- 3'	501
CIITA	NM_000246.4	Ekzon 8	5'- TCTCTGTGCCAACTGCTC- 3' 5'- CTTGGTCATGCACCCAG- 3'	534
KCNQ1	NM_000218.2	Ekzon 7	5'- GCTCATCAGAGTGGTGGGT - 3' 5'- GAACGTAAGTGGGTCTGCTCA - 3'	298
STAT1	NM_007315.4	Ekzon 16	5'- CCCTTGCCGTAACTTCAGA-3' 5'-TTGTCTAGCTTTCTGGACCATAA-3'	466
TNFRSF13B	NM_012452.3	Ekzon 3	5'-GGTCAAACCCAGAGTTCCT-3' 5'-GTTCTAGGCCTGGCATCA-3'	387
TNFRSF13B	NM_012452.3	Ekzon 4	5'- GGATTGCTTGAGCCTAATGA-3' 5'- CCTCTCCACCTAGAAGCAGG-3'	357
XIAP	NM_001167.4	Ekzon 2	5'- ACAGGCCATCTGAGACACA-3' 5'- CTGGCATACTTGGGAAGCT-3'	535
TNFAIP3	NM_001270508.2	Ekzon 7	5'-CTTCATCACAGGCCTGCA-3' 5'-CCTGACAGTTCTGCCTGACT-3'	1176
PLCG2	NM_002661.5	Ekzon 27	5'- GGGCAAGAGTCCACAGTGAT-3' 5'- CAGCCTTCGGTCCTCTCAT- 3'	580
CHEK2	NM_007194.4	Ekzon 3	5'-CCATTTGTTAAACTCATTGGTA-3' 5'- GTTTCAGACTTTGAATAGCAGA-3'	415
IKZF3	NM_012481.5	Ekzon 7	5'- CAGGCAAGAATCTGAGCA- 3' 5'- GAAAGGCCTTGTGTAGCAA-3'	346
MYL2	NM_000432.4	Ekzon 4	5'- CGCTTCCAGTCATTTGGT- 3' 5'- GATTACAGGCATCAGCCAC- 3'	459
ATG4D	*NM_032885.6*	Ekzon 4-5 Ekzon 3-6/7	DNA Primerleri 5'- TGTCAGGGTCAGCCTCTC - 3' 5'- GTGCAGTCCTGAGAAACGT - 3' mRNA Primerleri 5'- GACTTTGTGTCCCGCCTGT- 3' 5'- GCAACGCAGGAGTTCCTTC - 3'	371 639
CHD1	NM_001270.4	Ekzon 26	5'- GTCTACCACATTGTCCTGGTT-3' 5'- GACCTTACCTCCCAGACAGA- 3'	532
IKBKG	*NM_001099857.5*	Ekzon 6 Ekzon4-6/7	DNA Primerleri 5'-CCAGG CTGTGATGCGA-3' 5'-CCTGCTGACACTCCTGAGA-3' mRNA Primerleri 5'- AGCCCAGGTGACGTCCT- 3' 5'- AGCTGCATTCCTCGCTTC- 3'	394 351
IL12RB1	*NM_005535*	Ekzon 5	5'- TAGCTGGGACCTGCAAGT- 3' 5'- AACCACCTCAGGGGCTAG - 3'	404
G6PD	NM_001360016.2	Ekzon 6	5'- GAAGGTGTTGAGCCAGAGG- 3' 5'- GGGTCACCCTTGTCTGAGTT- 3'	442
JAK1	NM_002227.4	Ekzon 6	5'- GATTCGTCTCGTTGCTGTG - 3' 5'- GGAGAGCAAAGGTCAGCCAA- 3'	384
NFKB2	NM_001322934.2	Ekzon 17	5'- GCCTGACTTTGAGGGTGAG- 3' 5'- AGCGAGAGTTGACACCACAG- 3'	455

3.9.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

PZR reaksiyonları VitaTaq® HS PCR Kit kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu reaksiyonlar için, Sanger dizileme konfirmasyonu yapılacak olan hasta ve aile bireylerine ait şablon DNA, her biri 10 mM olan dNTP karışımı, her biri 10 µM ileri ve geri primerler, %0-10 DMSO (Biomatik Coorporation), 2 U/µL oranında VitaTaq® HS DNA Polimeraz, nükleaz içermeyen distile su (dH_2O) toplam hacim 25 µL olacak şekilde nükleaz içermeyen PZR tüplerinde homojen bir karışım elde etmek için nazikçe karıştırılmıştır. Herbir PZR çalışmasında kontaminasyon varlığını elemek için, şablon DNA içermeyen negatif kontrol tüpü hazırlanmıştır. Hazırlanan karışım, kısa süreli santrifüj edilmiş ve PZR amplifikasyonu için Tablo 3-5'te yer alan termal döngü programı kullanılarak termal döngü cihazında amplifiye edilmiştir. Bu program, başlangıç denatürasyonu ile başlamakta, ardından belirli sayıda döngü içeren denatürasyon, bağlanma ve uzama adımları takip etmektedir. Son olarak, final uzaması gerçekleştirilerek reaksiyon tamamlanmakta ve bekleme sıcaklığında tutulmaktadır.

Tablo 3-5: **PZR amplifikasyonu sırasında kullanılan termal döngü programı**

Adım	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süre
Başlangıç Denatürasyonu	1	94°C	5 dakika
Denatürasyon	30-35	94°C	30 saniye
Bağlanma	30-35	Tm – 5°C	30 saniye
Uzama	30-35	72°C	1 dakika / kb
Final Uzaması	1	72°C	5 dakika
Bekleme	1	4°C	Sonsuz

3.9.3. Agaroz Jel Elektroforez Yöntemi ile PZR Ürünlerinin Kontrolü

Agaroz jel elektroforezi, PZR ile amplifiye edilen gen bölgelerinin doğruluğunu ve kontaminasyon var ise bu durumu tespit etmek amacıyla gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, 5 µl PZR ürünü, 2 µl Gel Red boyası ile karıştırılarak kuyucuklara yüklenmiştir. DNA fragmentlerinin boyutlarının belirlenmesi için 50 baz çiftlik lider DNA merdiveni referans olarak kullanılmıştır. Elektroforez, %1,2'lik agaroz jelde, 1X TBE tamponu içerisinde, 160 Volt gerilim uygulanarak 30 dakika boyunca yürütülmüştür. İşlem tamamlandıktan sonra, DNA bantları UV görüntüleme cihazı kullanılarak, ultraviyole ışık altında görüntülenmiştir.

3.9.4. PZR Ürünlerinin Saflaştırılması

PZR ürünleri, Sanger dizileme gerçekleştirilmeden önce, agaroz jel elektroferezinde amplifiye olmaları kontrol edildikten sonra enzimatik bir saflaştırma yöntemi uygulanmıştır. Enzimatik karışım 0,5 µl Ekzonükleaz-I (Lot:00716871-Thermo Scientific) ve 1 µl Rapid Alkalin Fosfataz (04898141001-Roche) enzimleri kullanılmıştır. Saflaştırma işlemi, termal döngü cihazında gerçekleştirilmiş ve ilk olarak 37°C'de 30 dakika inkübasyon yapılmış, ardından 85°C'de 15 dakika boyunca enzim inaktivasyonu sağlanmıştır. Elde edilen saf PZR ürünleri, sonraki analizler için +4°C'de saklanmıştır.

3.9.5. Sanger Dizileme

Sanger Dizileme PZR Aşaması

Sanger dizileme PZR için Tablo 3-6'da yer alan bileşenler kullanılmıştır. Hazırlanan karışım, her bir kuyucuğa bir örnek gelecek şekilde 96 kuyucuklu plakaya dağıtılmıştır. Reaksiyon Tablo 3-6'da yer alan PZR döngü koşullarına uygun olarak termal döngü cihazında gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon, toplam 25 döngüden oluşmaktadır. İlk olarak 96°C'de 1 dakika inkübasyon yapılmıştır. Her döngü üç aşamadan oluşmaktadır: 96°C'de 10 saniye denatürasyon, 50°C'de 5 saniye primer bağlanma ve 60°C'de 4 dakika uzama aşamaları uygulanmıştır. Döngüler tamamlandıktan sonra reaksiyon, 4°C'de bekletilerek bir sonraki saflaştırma adımı için saklanmıştır. Reaksiyon sırasında sıcaklık değişimleri, 1°C/saniye hızında gerçekleştirilmiştir. Daha kısa DNA şablonları için uzatma süresi optimize edilerek kısaltılabilir.

Tablo 3-6: **Dizi PZR çalışması için kullanılan bileşenler ve içerikleri**

Bileşen	İçerik	Kullanım Amacı
5X BigDye Tampon Solüsyonu	BigDye tamponu	Reaksiyon için tampon görevi sağlamada kullanılmıştır.
ddNTP	Dideoksinükleotit trifosfatlar	Reaksiyon sırasında zincir sonlandırma için kullanılmıştır.
BigDye v3.1	AmpliTaq Gold™DNA polimeraz	DNA amplifikasyonu ve dizileme için kullanılmıştır.
Primer	İleri ve geri yönlü primer	Hedef bölgenin çoğaltılması için kullanılmıştır.
Saflaştırılmış PZR Ürünü	Önceki PZR reaksiyonundan elde edilen saflaştırılmış PZR	Dizileme için şablon DNA olarak kullanılmıştır.
dH_2O	Distile su	Hacmin tamamlanması için kullanılmıştır.
Toplam Hacim	10 µl	Toplam reaksiyon hacmi

Dizi PZR Ürünlerinin Saflaştırılması

Dizi PZR'ı sonrası elde edilen ürünlerin saflaştırılması için her kuyucuğa 1'er µl 125 mM EDTA,

%2 glikojen ve 3M sodyum asetat eklenmiştir. Sonrasında her bir kuyucuğun üzerine 25 µl %100 etanol ilave edilmiştir. Plak, koruyucu yapışkan bant ile kapatılarak oda sıcaklığında 15 dakika bekletilmiştir. Ardından, 3810 rpm'de 60 dakika santrifüjleme işlemi yapılmıştır. Plaktaki koruyucu yapışkan bant açıldıktan sonra, plak ters çevrilerek 1100 rpm'de 30 saniye kısa santrifüj edilmiştir. Bu işlemin ardından her kuyucuğa 20 µl olacak şekilde %70 etanol eklenmiş, plak koruyucu yapışkan bant ile kapatılarak 3460 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Koruyucu bant açıldıktan sonra, plak ters çevrilerek 1170 rpm'de 60 saniye süresince kısa santrifüj yapılmıştır. Daha sonra, her kuyucuğa 10 µl HiDi formamid eklenmiştir. Son olarak, örnekler 95°C'de 5 dakika denatüre edilmiş, ardından 2 dakika soğuk blokta bekletilmiştir. Tüm bu saflaştırma işlemlerinin ardında plak, ABI3500 (Applied Biosystem) cihazına dizileme yapılmak üzere yerleştirilmiştir.

ABI3500 (Applied Biosystem) Elektroforez Cihazında Dizileme İşlemi Süreci

Saflaştırılan ürünlerin dizilenmesi, *Applied Biosystem* marka ABI3500 otomatik sekiz kapillerli elektroforez cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Plak, cihaz içerisine yerleştirilmiş ve yürütme işlemi başlatılmıştır. Bu süreçte, daha önce kalibrasyonu yapılmış olan Dyeset adlı dizileme boya seti kullanılmıştır. Yürütme parametreleri Tablo 3-7'de gösterilmiştir. Belirlenen bu koşullar altında elektroforez işlemi tamamlanmıştır.

Tablo 3-7: ABI3500 Kapiller elektroforez işlemi için belirlenen voltaj ve süreleri

İşlem	Değer (*kV: Kilovolt)
Ön yürütme	15 kV* / 180 saniye
Yürütme	13,4 kV / 2.520 saniye
İnjeksiyon	1,6 kV / 8 saniye
Veri gecikme süresi	250 saniye

Sanger Dizileme Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Kapiler elektroforez ile elde edilen ham dizileme verileri, ABI Sequencing Analysis v5.4 ve SeqScape v3.0 yazılımları kullanılarak analiz edilmiştir. Analiz öncesinde, SeqScape programına ilgili referans gen dizisi tanıtılmış ve hedef transkriptin ekzonik ile intronik bölgeleri programa entegre edilmiştir. Bu işlemin ardından, analiz edilecek genomik bölgeye ait dizi bilgisi fasta formatında sisteme yüklenmiştir. Elde edilen dizileme çıktılarının değerlendirilmesi sırasında, genetik varyasyonların güvenilirliğini artırmak amacıyla bir dizi kalite kontrol parametresi dikkate alınmıştır. Bu parametreler arasında hedef gen bölgesinin doğru konumlandırılması, kullanılan

primerin yönü, dizilen toplam baz sayısı, saflaştırma basamağının etkinliği, elde edilen piklerin yüksekliği ve netliği ile arka plan sinyal kirliliği yer almaktadır. Dizileme sonrası beklenen sonuçlar elde edilmediği durumlarda, dizileme protokolü PZR aşamasından itibaren veya yeterli örnek mevcutsa saflaştırma aşamasından itibaren tekrarlanmıştır. Son olarak, elde edilen dizileme verileri, TED verileri ile değerlendirilmiştir.

3.10. Klinik Yorumlama

İncelen olgularda tespit edilen varyantların Sanger dizileme ile konfirme edilerek aile segregasyonlarının incelenmesi, varyantın klinik ile ilişkilendirilmesine amacıyla gerçekleştirilmiştir. Olgulara ait bulgular ve mevcut veri bankalarında veriler ile literatürdeki bilgilerin detaylı olarak incelenmesi ile varyant yorumlaması yapılmıştır.

3.11. cDNA Sanger Dizileme

Çalışmada, varyant doğrulama amacıyla örneklerden total RNA, ticari bir kit protokolü (TRIzol® Reagent, Invitrogen) kullanılarak izole edilmiştir. RNA kalitesi NanoDrop spektrofotometresi ile değerlendirildikten sonra, uygun saflıkta olan örneklerden revers transkripsiyon yöntemi ile cDNA sentezlenmiştir (SuperScript™ IV, Thermo Fisher Scientific). Elde edilen cDNA'lar üzerinden hedef gen bölgeleri PCR ile çoğaltılmış, ürünler agaroz jel elektroforezi ile kontrol edilerek saflaştırılmıştır. Dizileme analizleri, klasik Sanger yöntemi kullanılarak BigDye™ Terminator kiti ile hazırlanmış ve ABI 3130xl Genetic Analyzer cihazı ile gerçekleştirilmiştir.

3.12. Gerçek Zamanlı PZR(RT-qPZR) Yöntemi ile Tip 1 İnterferon İmza Testi

Bu çalışma kapsamında ek olarak, tüm olguların lökosit kaynaklı total RNA örneklerinde gen ekspresyon analizi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, çalışmaya dahil edilen 20 indeks olgunun 18'i ve 20 sağlıklı kontrol bireyine ait total RNA örneklerinden sentezlenen cDNA'lar kullanılarak, tip I interferon (IFN) yolaklarında görev alan *STAT1*, *PRKR*, *IFI27*, *IFI44*, *IFI44L*, *IFIT1* ve *RSAD2* genlerinin ekspresyon düzeyleri, SYBR-Green tabanlı kantitatif gerçek zamanlı PCR (RT-qPCR) yöntemi ile ölçülmüştür. Gen ekspresyon düzeylerinin normalize edilmesinde β-aktin (*ACTB*) referans geni kullanılmıştır. Her bir hedef genin ifadesi, *ACTB* ekspresyonuna göre normalize edilmiş ve sonuçlar z-skoru hesaplaması ile değerlendirilmiştir. Ayrıca, hasta ve kontrol grupları arasındaki farklar log2 kat değişim (log2FC) yöntemiyle karşılaştırılmış; $|\log2FC| \geq 1$ olan değişimler biyolojik

olarak anlamlı kabul edilmiştir. Ekspresyon düzeyleri ayrıca z-skorlarına göre kategorize edilmiştir: $z \geq +3$ "çok yüksek", +2 ile +3 arası "yüksek", -2 ile -3 arası "düşük" ve $z \leq -3$ "çok düşük" olarak tanımlanmıştır.

Gerçek zamanlı PCR (RT-qPCR) analizleri, Thermo Fisher Scientific firmasına ait SYBR™ Green PCR Master Mix kullanılarak, üretici firmanın önerdiği standart protokole uygun şekilde gerçekleştirilmiştir. Her bir reaksiyonun toplam hacmi 10 µL olacak şekilde hazırlanmış; reaksiyon karışımı 5 µL SYBR™ Green PCR Master Mix (2X), 0.75 µL ileri primer, 0.75 µL geri primer, 2 µL cDNA ve 1.5 µL DNase/RNase-free su içerecek şekilde oluşturulmuştur. PCR döngü protokolü; 95 °C'de 10 dakika süren başlangıç denatürasyonunu takiben, 40 döngü boyunca 95 °C'de 15 saniye denatürasyon ve 60 °C'de 1 dakika bağlanma/uzama adımlarını içermektedir. Tüm örnekler duplikat olarak çalışılmış ve ortalama Ct değerleri alınarak değerlendirme yapılmıştır. Gen ekspresyon düzeyleri, β-aktin (ACTB) referans geni kullanılarak normalize edilmiş; karşılaştırmalı analizlerde ΔΔCt (delta delta Ct) yöntemi uygulanmıştır. Buna göre, her hedef genin ekspresyonu önce referans gene göre normalize edilmiş (ΔCt), ardından hasta ve kontrol grubu arasındaki fark (ΔΔCt) hesaplanarak 2^-ΔΔCt yöntemiyle bağıl gen ekspresyon düzeyi elde edilmiştir. Tüm floresan sinyal ölçümleri ve amplifikasyon analizleri LightCycler 480 Multiwell Plate cihazında gerçekleştirilmiştir.

4. BULGULAR

Bu proje kapsamında, İstanbul Tıbbi Genetik Polikliniğine yönlendirilerek klinik olarak değerlendirilen 20 indeks olguda TED analizi gerçekleştirilmiştir. 20 olguya ait klinik, demografik, laboratuvar ve immünolojik verileri karşılaştırmalı olarak incelenmiştir.

4.1. Olguların Klinik Verilerinin Değerlendirilmesi

Çalışmaya dahil edilen 20 indeks olguya ait temel klinik ve demografik özellikler değerlendirilmiştir. Bu kapsamda, her bir olgunun cinsiyeti, tanı anındaki yaşı, enfeksiyonun başlangıç yaşı, ebeveynler arasında akrabalık ilişkisinin varlığı, aile öyküsünde (indeks olgu dışında) tüberküloz veya diğer enfeksiyonlara ait bilgiler, gözlenen klinik bulgular, mikobakteri tespit durumu, ek enfeksiyon varlığı, hastaneye yatış geçmişi ve uygulanan tedavi protokolleri değerlendirilmiştir. Bu veriler, olguların fenotipik çeşitliliğini ve klinik seyir özelliklerini ortaya koymak amacıyla bir arada ele alınmıştır. Bu çalışmada değerlendirilen 20 MSMD ön tanılı olgunun %65'i kız olup, olguların ortalama yaşı 11,76 ± 4,29 yıl, enfeksiyon başlangıç yaşı ise 8,72 ± 6,21 yıl olarak saptanmıştır.

Olguların %50'sinde akraba evliliği, %40'ında ise ailede enfeksiyon öyküsü mevcuttur. Klinik olarak en sık gözlenen enfeksiyöz bulgu lenfadenit (%50), bunu takiben akciğer tüberkülozu ve lenfadenopati (%45) izlemiştir. Mikobakteriyel çoklu organ tutulumu olguların %75'inde, gastrointestinal sistem (GİS) tutulumu ise tüm hastalarda gözlenmiştir. Ayrıca, %30 oranında BCG aşısına bağlı advers reaksiyon geliştiği ve olguların %60'ında en az bir kez hastane yatışı gerektiği belirlenmiştir.İmmünolojik değerlendirmede ise, olguların %30'unda IgG düzeyinin yüksek, %15'inde ise düşük olduğu gözlenmiştir. Benzer değişkenlik IgA düzeylerinde de izlenmiş; bazı olgularda CD4/CD8 oranında dengesizlik ve NK hücre oranlarında artış tespit edilmiştir. BCG aşısına bağlı advers reaksiyon gelişen olgularda yaş, IgG ve IgA düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha düşük olduğu belirlenmiştir ($p<0.05$).

4.2. Olguların MSMD Klinik Alt Tiplerine Göre Sınıflandırılması

Çalışmaya dahil edilen 20 olgunun klinik değerlendirmesi sonucunda, izole MSMD sadece mikobakterilere (özellikle BCG ve NTM) karşı seçici duyarlılıkla karakterize olup, çalışmadaki 20 olgunun 10'nunda (%50; Olgu 1, 2, 3, 7, 9, 13, 14, 16, 18, 19) görülmüştür. Bu hastalarda sıklıkla sınırlı enfeksiyonlar (lenfadenit, BCGitis, osteomiyelit gibi) saptanmıştır. Sendromik MSMD ise mikobakteriyel enfeksiyonların yanı sıra başka sendrom veya hastalıklarla birliktelik gösterir ve çalışmada toplam 10 olguda (%50; Olgu 4, 5, 6, 8, 10, 11, 12, 15, 17, 20) tespit edilmiştir. Sendromik olgular sistemik yayılım, viral enfeksiyonlar (CMV, EBV), otoimmünite (tiroidit, diyabet) ve organ tutulumu (karaciğer, dalak) gibi daha karmaşık klinik tablolar sergilemiştir. Her iki grupta da immünolojik değerlerin genel olarak normal sınırlar içerisinde olması dikkat çekmiştir (Tablo 4-1).

Tablo 0-1: Tüm olguların MSMD klinik alt tiplerine göre sınıflandırılması ve klinik/immünolojik bulguları

Olgu No	MSMD Tipi	Klinik Bulgular	İmmünolojik Değerler
1	İzole	*M. bovis* peritoniti, *M. bovis* üremesi, hiperimmunglobulinemi, sınırlı tutulum	Normal
2	İzole	Osteomiyelit, IgA eksikliği	Normal
3	İzole	Akciğer TBC, *M. tuberculosis* üremesi	Normal
4	Sendromik	Sistemik mikobakteriyel enfeksiyon	Normal
5	Sendromik	Akciğer TBC, sık enfeksiyonlar, CMV enfeksiyonu	Normal

6	Sendromik	Akciğer TBC, miliyer TBC, lenfadenit, peritonit, *M. tuberculosis* üremesi	Normal
7	İzole	Mikobakteriyel lenfadenit	Normal
8	Sendromik	Lenfadenit, osteomiyelit, hepatosplenomegali, EBV enfeksiyonu, eritema nodosum, tiroid bozukluğu, tip 1 diyabet	Normal
9	İzole	Lenfadenit, miliyer TBC, akciğer TBC, M. tuberculosis üremesi	Normal
10	Sendromik	Submandibular lenfadenit, akciğer TBC, splenomegali, otoimmün tiroidit	Normal
11	Sendromik	Tekrarlayan akciğer enfeksiyonları, primer akciğer TBC, DRESS sendromu	Normal
12	Sendromik	Peritonit, GİS TBC, *M. tuberculosis* üremesi, COVID-19, suçiçeği, CMV enfeksiyonu, kardiyomiyopati	Normal
13	İzole	BCGitis, CMV enfeksiyonu, *M. tuberculosis* üremesi	Normal
14	İzole	BCGitis, sınırlı tutulum	Normal
15	Sendromik	Ağır mikobakteriyel enfeksiyon, yaygın LAP, fırsatçı patojen üremesi, karaciğer/dalak tutulumu, , *M. tuberculosis* üremesi	Normal
16	İzole	BCGitis, sistemik yayılım yok	Normal
17	Sendromik	Dissemine TBC (lenfadenit, menenjit), hipogamaglobulinemi, , *M. tuberculosis* üremesi	Normal
18	İzole	Osteomiyelit	Normal
19	İzole	BCGitis, atopik dermatit, çölyak antikoru pozitif, CD4/CD8 hafif düşük, nötropeni, eozinofili, immün yanıt korunmuş	Normal
20	Sendromik	Cilt lezyonları, mastositoz ön tanısı	Normal

4.3. Olguların TED Analiz Sonuçları

Tüm olguların genel TED analizleri sonucuna göre , sadece iki olguda MSMD ile ilişkili bilinen genlerde klinik önemi belirsiz (VUS) veya patojenik varyantlar saptandı. Diğer dokuz olguda, primer immün yetmezlik, otofaji, DNA hasar yanıtı, metabolik hastalıklarla ilişkili genlerde toplam 12 aday varyant bulundu. 7 olguda anlamlı varyant bulunamadı. İki olguda segregasyon sonrası varyantlar klinik olarak ilişkisiz kabul edildi. Bu bulgular Tablo 4-2'de özetlenmiştir.

Tablo 0-2: Tüm olgulara ait TED analizi sonuçları özet tablosu

Olgu No	Gen	Varyant	ACMG/AMP	Klinik Kategori
1	*PLCG2*	c.2866C>T, p.Arg956Cys	VUS	PİY

2	*TNFAIP3*	c.1139T>C, p.Leu380Pro	VUS	PİY
3	Aday varyant saptanmamıştır.			
4	Aday varyant saptanmamıştır.			
5	*CYBA*	c.433G>A, p.Gly145Arg	VUS	Dışlandı
	DNAAF4	c.989G>C, p.Arg330Pro	VUS	Dışlandı
6	Aday varyant saptanmamıştır.			
7	Aday varyant saptanmamıştır.			
8	*STAT1*	c.1341C>A, p.Asp447Glu	VUS	MSMD
	XIAP	c.698G>A, p.Arg233Gln	VUS	PİY
	TNFRSF13B	c.452C>T, p.Pro151Leu	VUS	PİY
9	Aday varyant saptanmamıştır.			
10	*CIITA*	c.631C>T, p.Pro211Ser	VUS	PİY
	KCNQ1	c.965C>T, p.Thr322Met	Patojenik	Sekonder Kardiyak
11	*IKZF3*	c.796C>T, p.Arg266*	Patojenik	PİY
12	*MYL2*	c.172C>T , p.Arg58Ter	Muhtemel Patojenik	Aday varyant saptanmamıştır. Sekonder Kardiyak İlişkili Gen
13	*ATG4D*	c.770+1G>C	VUS	Otofaji
14	*CHD1*	c.3500G>C, p.Arg1167Pro	VUS	Nörogelişimsel
15	*IKBKG*	c.894G>T, p.Glu298Asp	Dışlandı	Psödogen/Dışlandı
16	*IL12RB1*	c.523C>T, p.Arg175Trp	Patojenik	MSMD
17	Aday varyant saptanmamıştır.			
18	*G6PD*	c.653C>T, p.Ser188Phe	Muhtemel Patojenik	Metabolik
19	*JAK1*	c.641A>G, p.Asp214Gly	VUS	PİY
	TNFRSF13B	c.204dupA, p.Leu69Thrfs*12	Patojenik	PİY
20	*NFKB2*	c.1864A>G, p.Ser622Gly	VUS	PİY

Bustamante 2020 kaynağına göre MSMD grubunun izole ve sendromik sınıflandırılması baz alınarak klinik çalışmaya dahil edilen 20 olgu klinik değerlendirmesi sonucunda, izole ve sendromik MSMD olarak sınıflandırılarak karşılaştırmalı bir analiz yapılmıştır [3]. İzole MSMD grubu (n=10, %50; Olgu 1, 2, 3, 7, 9, 13, 14, 16, 18, 19), sadece mikobakterilere (özellikle BCG ve NTM) karşı seçici duyarlılık göstermiştir. Bu grupta sıklıkla lenfadenit, BCGitis ve osteomiyelit gibi lokalize

enfeksiyonlar gözlenmiş ve immünolojik parametreler genel olarak normal bulunmuştur. İzole MSMD olgularından Olgu 16'da, *IL12RB1* geninde patojenik varyant saptanması, IL-12/IL-23 reseptör eksikliği ile ilişkili klasik izole MSMD fenotipini desteklemektedir. İzole MSMD klinik tablosunun genetik heterojenitesini ve kompleks doğasını vurgulamaktadır. Geriye kalan 9 olgunun 3'ünde PİY ile ilişkili varyant (Olgu1, Olgu 2, Olgu 19), birinde nörogelişimsel genle ilişkili (Olgu 14), birinde metabolik genle ilişkili varyant (Olgu 18) tespit edilmiştir. 3'ünde ise aday varyant bulunamamıştır (Olgu 3, Olgu 7, Olgu 9). İzole MSMD grubundaki MSMD ilişkili genlerde varyant saptanma oranı %20'dir.

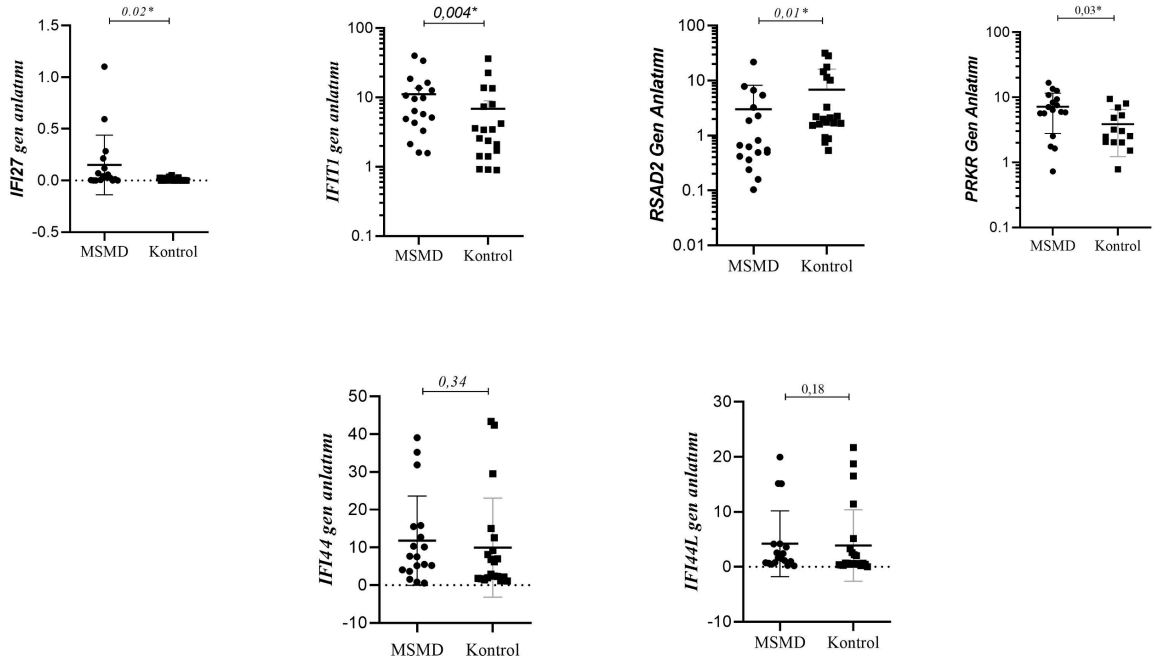
Sendromik MSMD grubu (n=10, %50; Olgu 4, 5, 6, 8, 10, 11, 12, 15, 17, 20), mikobakteriyel enfeksiyonların yanı sıra otoimmün hastalıklar (otoimmün tiroidit, tip 1 diyabet), viral enfeksiyonlar (CMV, EBV) ve organ tutulumu (karaciğer, dalak) gibi ek klinik tablolar ile daha kompleks fenotipler sergilemiştir. Bu grupta, Olgu 8'de saptanan *STAT1* varyantının yanı sıra *XIAP* ve *TNFRSF13B* immün disregülasyon ilişkili varyantların birlikteliği, çoklu varyant etkisinin sendromik MSMD fenotipini açıklamada kritik rol oynayabileceğini göstermektedir. Ayrıca sendromik grupta *CIITA* (Olgu 10), *JAK1* (Olgu 19), *NFKB2* (Olgu 20), *IKZF3* (Olgu 11) immünolojik sinyal yolakları ile ilişkili varyantların belirlenmesi, MSMD fenotiplerinin klasik MSMD genlerinin ötesinde primer immün yetmezlik spektrumundaki diğer genlerle ilişkili olabileceğini göstermektedir. *KCNQ1* ve *MYL2* gibi kardiyak varyantların (Olgu 10 ve 12) sendromik MSMD hastalarının multidisipliner değerlendirilmesi ve izlenmesinin önemini ortaya koymaktadır. Geriye kalan üç olguda (Olgu 4, Olgu 6 ve Olgu 17) aday varyant saptananmış, iki olguda ise aday varyantlar dışlanmıştır (Olgu 5 ve Olgu 15). Bu nedenle Sendromik MSMD grubunda MSMD ilişkili genlerde aday varyant bulunamamıştır.

4.4. Olguların İmza Testi Sonuçları

Bu çalışma kapsamında ek olarak, 20 indeks olgunun 18'inin (ikisinde yeterli RNA örneği eldesi olmadığından) lökositlerinden izole edilen total RNA örneklerinden elde edilen cDNA'lar kullanılarak, tip I interferon (IFN) yolaklarında görev alan *STAT1*, *PRKR*, *IFI27*, *IFI44*, *IFI44L*, *IFIT1* ve *RSAD*2 genlerinin ekspresyon düzeyleri 20 sağlıklı kontrol örneği ile karşılaştırmalı olarak gerçek zamanlı PZR analizi gerçekleştirilmiştir. Hedef yedi genin ekspresyon düzeylerine dayalı tip I interferon (IFN) imza testi olarak adlandırılan bu analizde, her bir genin ekspresyon düzeyi, kontrol

grubunun ortalama değerine göre z-skorları ile değerlendirilmiş ve hasta-kontrol grupları arasındaki farklar log2 kat değişim (log2FC) değerleriyle karşılaştırılmıştır. Bu kapsamda yapılan z-skor ve log2FC hesaplamaları yapılmıştır. Analizler sonucunda $|log2FC| \geq 1$ olan genlerde biyolojik olarak anlamlı düzeyde artış veya azalma saptanmıştır. Ayrıca, z-skoru $\geq +3$ olan genler çok yüksek ekspresyon düzeyi olarak sınıflandırılmıştır.

Analiz sonucunda, olguların %25'inde (n=5) en az bir gende $log2FC \geq 1$ düzeyinde artmış ekspresyon saptanmış ve bu bireylerde biyolojik olarak anlamlı düzeyde IFN tip 1 yanıtı aktivasyonu gözlenmiştir. Bu beş olgunun Tip 1 interferon genleri ekspresyon artışı bireysel olarak değerlendirildiğinde biri (Olgu no 17), yedi genin beşinde; birinde (Olgu 20), dörder gende; diğer ikisi (Olgu 1 ve Olgu 15), üçer gende ve kalan bir olgu (Olgu 11) ise ikişer gende anlamlı düzeyde gen ekspresyon artışı sergilemiştir. Bu olguların üçünde (Olgu 1, Olgu 11 ve Olgu 20) PİY ilişkili genlerde aday varyant belirlenmiş, ikisinde (Olgu 15 ve Olgu 17) kliniklerini açıklayacak aday varyant bulunamamıştır. Beş olguda da sistemik ve ağır seyirli enfeksiyon (menenjit, miliyer tüberküloz, hepatosplenomegali gibi) öyküsü mevcuttur. Gen ifadelerinin istatistiksel analizlerinde ise *IFI27*, *IFIT1 ve PRKR* gen ifadelerinde anlamlı düzeyde artış, *RSAD2* gen ifadesinde ise anlamlı düzeyde azalış olduğu tespit edilmiştir ($p<0.05$) (Şekil 4-1). Gruplar arasında diğer genlerde istatistiksel olarak anlamlı bir değişim saptanmamıştır. MSMD ile ilişkili genler arasında yer alan *STAT1*'in ekspresyon düzeyi, değerlendirilen 18 olgunun 17'sinde referans sınırlar içinde saptanmış, bir olguda artış göstermiştir (Olgu 1). Ayrıca, gen ekspresyonu z-skorları ile olguların demografik/klinik parametreler arasında herhangi bir korelasyon saptanmamıştır. İnterferon gama yolu bozukluğuyla ilişkilendirilen MSMD ön tanılı 18 olgunun altısında IFN imza testi skorunun yüksek çıkması IFN-γ eksikliğinin kompensatuvar olarak IFN-I sistemi üzerinden telafi edilmeye çalışıldığı şeklinde yorumlanmıştır.



Şekil 0-1: *STAT1*, *PRKR*, *IFI27*, *IFI44*, *IFI44L*, *IFIT1* ve *RSAD*2 gen ekspresyon düzeylerinin MSMD olguları (n=18) ve sağlıklı kontrollerde (n=20) karşılaştırılmas

5. TARTIŞMA/SONUÇ

Bu proje ile birlikte kurumsal BAP projesi desteği ile, MSMD ön tanısıyla değerlendirilen veya klinik olarak MSMD düşünülen 20 indeks olguda, klinik, immünolojik ve genetik verilerin bütüncül analizine dayalı kapsamlı bir çalışma gerçekleştirilmiştir. Mikobakteriyel enfeksiyonlara artmış duyarlılık, yalnızca klasik MSMD fenotipine özgü olmayabilir; primer immün yetmezlik ilişkili bazı genlerde ya da immün yanıtı dolaylı olarak etkileyen metabolik, otofaji veya DNA hasar yanıtı gibi sistemlerde yer alan genetik değişiklikler de bu duyarlılığa katkı sağlayabilir. Bu varyantların MSMD'ye neden olup olmadığı kesin olmamakla birlikte, genetik yatkınlığın monogenik olmaktan ziyade poligenik ya da modifiye edici faktörler aracılığıyla şekillenebileceği düşünülmektedir.

Öncelikle, olguların yalnızca %10'unda klasik MSMD genleri (*STAT1* ve *IL12RB1*) ile ilişkili patojenik-benzeri ya da klinik önemi belirsiz varyantlar tanımlanmıştır. Bu oran, literatürde MSMD olgularında klasik genetik tanı oranının genellikle %30–50 aralığında bildirildiği önceki çalışmalarla karşılaştırıldığında düşüktür ve çalışmamızın heterojen hasta popülasyonu ile ilişkili olabilir [3].

Öte yandan, olguların yaklaşık yarısında klasik MSMD genleri dışında tanımlanan 13 farklı aday varyantın büyük kısmının *PLCG2*, *XIAP*, *TNFRSF13B*, *JAK1* ve *NFKB2* gibi PİY ile ilişkili genlerde yer alması, MSMD fenotipine yol açan genetik temelin daha karmaşık ve çok genli olabileceğini desteklemektedir. Çalışmamızda, bilinen MSMD genlerinde patojenik varyant tespit edilemeyen olgular bulunmakla birlikte, bağışıklık düzeninde rol oynayan ve literatürde farklı immün yetmezlikler ile ilişkilendirilmiş bazı aday genlerde varyantlar belirlenmiştir. Bu bulgular, MSMD fenotipinin yalnızca bilinen MSMD genleri ile sınırlı kalmayıp, genetik modifiye ediciler veya ilişkili genlerin etkisiyle daha geniş bir spektrum oluşturabileceğini göstermektedir. Genetik modifiye ediciler ve ilişkili genlerin rolüne ek olarak, inflamasyon ve kronik hastalık süreçleriyle bağlantılı genlerde tespit edilen varyantlar da MSMD fenotipinin ve mikobakteriyel enfeksiyonlara yatkınlığın kompleks yapısını anlamada önemli ipuçları sunmaktadır [4]. Genetik tanı süreçlerinde yüksek duyarlılığa sahip olan TED, pek çok nadir varyantı ortaya çıkarmaktadır. Ancak bu varyantların yalnızca saptanması değil, klinik tablo ile ilişkili olup olmadığının değerlendirilmesi büyük önem taşır. TED sonrası tanımlanan varyantlar sıklıkla Sanger dizileme ile teknik doğrulamaya tabi tutulur. Sanger dizileme ile aday varyantın ailede kalıtım modelinin ve klinik ilişkinin belirlenmesi mümkün olabilir. Ancak varyantın net ilişkisini belirleyebilmek için deneysel fonksiyonel çalışmalar, daha geniş klinik olarak değerlendirilmiş ailelerde fenotipik uyum ve popülasyon frekansı gibi çok boyutlu

değerlendirmeler yapılmalıdır [8]. Çalışmamızda, MSMD ön tanılı ancak TED analizinde patojenik varyant saptanamayan yedi olgunun bulunması, mevcut genetik bilgi ve tanı kapasitesinin bu hasta grubunun tamamını açıklamada yetersiz kaldığını göstermektedir. Literatürde de benzer şekilde, MSMD kliniğiyle başvuran olguların yaklaşık yarısında genetik etiyolojinin belirlenemediği bildirilmektedir [3]. Bu durum, MSMD'ye yatkınlıkta henüz tanımlanmamış genetik nedenlerin varlığını düşündürmekte ve genetik tanı oranlarının artırılması için ileri YND teknolojilerine duyulan gereksinimi vurgulamaktadır [9].

İmmünolojik değerlendirmeler, genetik bulguları destekleyen niteliktedir. Özellikle aşıya bağlı advers reaksiyon geçiren bireylerde *IgG* ve *IgA* düzeylerinin anlamlı olarak daha düşük olması hem humoral yanıt eksikliğini hem de potansiyel immün disregülasyonu desteklemektedir. Tip I interferon imza testi sonuçlarında ise *IFI27*, *IFIT1 ve PRKR* gen ifadelerinde anlamlı düzeyde artış, *RSAD2* gen ifadesinde ise anlamlı düzeyde azalış olduğu tespit edilmiştir ($p<0.05$). Bu durum, bazı MSMD olgularında IFN-γ eksikliğinin Tip I IFN üzerinden kompanse edilmeye çalışıldığına dair önceki hipotezlerle uyumludur [10]

Bu çalışmada önemli bulgular elde edilmiş olsa da çeşitli metodolojik sınırlılıklar sonuçların yorumlanmasını etkilemiştir. Fonksiyonel doğrulama çalışmalarının eksikliği, varyantların patojenitesini netleştirmede önemli bir boşluk oluşturmuştur. Sporadik olguların çoğunluğu ve aile bireylerinde segregasyon analizlerinin yapılamaması, kalıtım modellerinin belirlenmesini güçleştirmiştir. Türkiye'nin yüksek tüberküloz yükü, MSMD tanısında sekonder nedenlerin dışlanmasını zorlaştırarak genetik yorumlamaları karmaşıklaştırmıştır. Transkriptom analizlerinin total lökosit RNA'sı üzerinden yapılması, hücre tipi özgüllüğünü azaltmış ve bağışıklık yolaklarının çözümlemesini sınırlamıştır. Gelecekte hücre tipi ayrıştırılmış RNA dizileme, fonksiyonel testler ve prospektif kohort takibi ile tanısal doğruluk artırılabilir. Gelişmekte olan ülkelerde MSMD tanısı; sınırlı laboratuvar altyapısı, düşük klinik farkındalık ve genetik varyantların yorumlanmasındaki zorluklar nedeniyle halen ciddi güçlükler barındırmaktadır. Bu bağlamda, transkriptomik yaklaşımlar, özellikle tanı konulamayan olgularda moleküler patogenezin aydınlatılmasında ve kişiselleştirilmiş tanı stratejilerinin geliştirilmesinde önemli katkılar sağlayabilir.

SONUÇ

Bu çalışma, MSMD ön tanısı ile değerlendirilen bireylerde klasik IFN-γ yolakları dışında kalan genetik mekanizmaların da mikobakteriyel enfeksiyonlara duyarlılıkta rol oynayabileceğini göstermiştir. Tespit edilen nadir varyantlar; primer immün yetmezlik, metabolik, otofaji ve DNA onarım sistemlerine ait genlerle geniş bir spektruma yayılmakta, bu da MSMD'nin olası poligenik ya da modifiye edici genetik etkilerle şekillenebileceğini düşündürmektedir. Transkriptomik düzeyde gözlenen Tip I interferon imzası ve immünolojik profiller, genetik bulgularla birlikte ele alındığında, MSMD benzeri klinik tabloların tanısal sınıflandırılmasında daha bütünleşmiş yaklaşımlara ihtiyaç duyulduğunu ortaya koymaktadır. Fonksiyonel testler, segregasyon analizleri ve hücre tipi özgül transkriptomik yöntemlerle desteklenecek ileri çalışmalar hem patogenezin aydınlatılmasına hem de kişiselleştirilmiş tanı ve izlem stratejilerinin geliştirilmesine katkı sağlayacaktır. Türkiye gibi yüksek TB yükü ve genetik çeşitliliğin bir arada görüldüğü bölgelerde, MSMD'ye dair farkındalık ve tanısal kapasitenin artırılması, erken tanı ve etkili tedavi açısından kritik önemdedir.

5.1. Öneriler

Bu proje, MSMD fenotipinin genetik olarak açıklanmasında yalnızca klasik IFN-γ yolaklarının değil, bağışıklık sistemine dolaylı katkıda bulunan farklı biyolojik mekanizmaların da dikkate alınması gerektiğini ortaya koymuştur. Özellikle primer immün yetmezlik, otofaji, metabolizma ve DNA hasar yanıtı gibi bağışıklık dışı sistemlerle ilişkili genlerde saptanan nadir varyantlar, MSMD'ye yatkınlıkta modifiye edici ya da poligenik katkıların olabileceğini düşündürmektedir. Bu nedenle, genetik tanı sürecinde yalnızca bilinen MSMD genlerine odaklanmak yerine, bağışıklık homeostazı ile ilişkili daha geniş gen yelpazesi araştırılmalıdır.

Özellikle genetik olarak açıklanamayan olgularda, gen ekspresyon profillerinin değerlendirilmesi, Tip I interferon yolaklarına özgü gen ekspresyon profillerinin analiz edilmesi tanıya katkı sunabilecek alternatif bir yaklaşım olarak öne çıkmaktadır. Ancak bu analizlerin daha yüksek çözünürlükte ve hücre tipi özgüllüğü sağlayacak biçimde yapılması, yani total lökosit RNA'sı yerine spesifik immün hücre alt gruplarından elde edilmesi, bağışıklık yolaklarındaki bozuklukları daha doğru şekilde ortaya koyabilir. Genetik tanısı olmayan fakat sistemik enfeksiyonlar geçiren olgularda, bu moleküler profillerin incelenmesi, tanısal süreçleri desteklemenin ötesinde, klinik olarak anlamlı alt grupların belirlenmesine de katkı sağlayabilir.

Ayrıca, saptanan nadir varyantların hastalıkla ilişkisini ortaya koymak için yalnızca in siliko analizlere değil, fonksiyonel doğrulamalara da ihtiyaç vardır. Varyantların hücresel düzeydeki etkilerini belirlemek üzere yapılacak deneysel çalışmalar, bu genetik değişimlerin klinik önemini netleştirecektir. Aynı şekilde, aday varyantların aile bireylerinde segregasyon analiziyle değerlendirilmesi ve popülasyon frekanslarıyla karşılaştırılması da tanısal güvenirliği artıracaktır.

Türkiye gibi yüksek mikobakteriyel hastalık yükü taşıyan ve genetik çeşitliliğin fazla olduğu bölgelerde, genetik yorumlamayı zorlaştıran çevresel ve epidemiyolojik faktörler dikkate alınarak tanı algoritmalarının bölgesel olarak yeniden yapılandırılması gerekmektedir. Bu bağlamda, MSMD benzeri klinik tabloların moleküler düzeyde daha iyi anlaşılması için çok merkezli prospektif kohort çalışmaları, ileri düzey sekanslama teknikleri ve fonksiyonel analizlerle desteklenmiş bütüncül yaklaşımların geliştirilmesi büyük önem taşımaktadır.

Referanslar

[1] Marshall, J.S., et al., *An introduction to immunology and immunopathology.* Allergy Asthma Clin Immunol, 2018. **14**(Suppl 2): p. 49.

[2] Poli, M.C., Aksentijevich, I., Bousfiha, A., Cunningham-Rundles, C., Hambleton, S., Klein, C., Morio, T., Picard, C., Puel, A., Rezaei, N., Seppänen, M. R. J., Somech, R., Su, H. C., Sullivan, K. E., Torgerson, T. R., Meyts, I., Tangye, S. G, *Human inborn errors of immunity: 2024 Update on the classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee.* 2024.

[3] Bustamante, J., *Mendelian susceptibility to mycobacterial disease: recent discoveries.* Hum Genet, 2020. **139**(6-7): p. 993-1000.

[4] Xia, L., et al., *An Updated Review on MSMD Research Globally and A Literature Review on the Molecular Findings, Clinical Manifestations, and Treatment Approaches in China.* Front Immunol, 2022. **13**: p. 926781.

[5] Errami, A., et al., *Mendelian Susceptibility to Mycobacterial Disease (MSMD): Clinical, Immunological, and Genetic Features of 22 Patients from 15 Moroccan Kindreds.* J Clin Immunol, 2023. **43**(4): p. 728-740.

[6] Poli, M.C., et al., *Human inborn errors of immunity: 2024 Update on the classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee.*

[7] Yamashita M, Inoue K, Okano T, Morio T. Inborn errors of immunity—recent advances in research on the pathogenesis. *Inflammation and Regeneration* 2021; **41**(9).

[8] Tang, X., Wang, Z., Wang, J. *et al.* Functions and regulatory mechanisms of resting hematopoietic stem cells: a promising targeted therapeutic strategy. *Stem Cell Res Ther* **14**, 73 (2023).

[9] Scholtz, D., et al., Challenges of Diagnosing Mendelian Susceptibility to Mycobacterial Diseases in South Africa. Int J Mol Sci, 2023. 24(15).

[10] Bastard, P., et al., *Autoantibodies against type I IFNs in patients with life-threatening COVID-19.* Science, 2020. **370**(6515).