



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**LRBA ve CTLA4 EKSİKLİĞİ OLGULARINDA ABATACEPT
MOLEKÜLÜNÜN İMMÜNOLOJİK ETKİLERİ**

MEHMET CİHANGİR ÇATAK
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
PROF. DR. SAFA BARIŞ
ALERJİ-İMMÜNOLOJİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

İSTANBUL- 2023



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**LRBA ve CTLA4 EKSİKLİĞİ OLGULARINDA ABATACEPT
MOLEKÜLÜNÜN İMMÜNOLOJİK ETKİLERİ**

MEHMET CİHANGİR ÇATAK
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
PROF. DR. SAFA BARIŞ
ALERJİ-İMMÜNOLOJİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

İSTANBUL- 2023

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışması ile elde edilmemiş bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Öğrenci Adı ve Soyadı

İmzası

TEŞEKKÜR

Öncelikle yüksek lisans eğitimim boyunca bana her şeyi sabırla öğreten, maddi-manevi desteğini esirgemeyen, hayatımda yeni başlangıçlar yapmama vesile olan ve daima daha iyisini yapabileceğime teşvik ederek beni daha ileriye taşıyan sevgili hocam Prof. Dr. Safa Barış'a,

Marmara Üniversitesi Çocuk Alerji ve İmmünoloji Bilim Dalı'ndaki yüksek lisans eğitimim boyunca değerli bilgi ve tecrübelerini paylaşan değerli hocalarım Prof. Dr. Ahmet Oğuzhan Özen, Prof. Dr. Elif Karakoç Aydın ve Prof. Dr. Tunç Akkoç'a,

Her ne olursa olsun yardımını esirgemeyen kıymetli arkadaşım Alper Bulutoğlu'na,

Bu süreçte hastaların klinik bilgilerini ve örneklerini toparlamama yardımcı olan ve her konuda fikir alışverişinde bulunabildiğim kıymetli ablam Uzm. Dr. Royala Babayeva ve değerli kardeşim Int. Dr. İbrahim Serhat Karakuş'a,

Laboratuvarda sabır ve bilgileriyle bana destek alan kıymetli Yasemin Can, Gamze Akgün ve Dilek Başer'e,

Klinik ekipte bulunan ve desteklerini esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Sevgi Bilgiç Eltan, Uzm. Dr. Asena Pınar Sefer, Uzm. Dr. Ezgi Yalçın Güngören ve Uzm. Dr. Melek Yorgun Altubaş'a

Beni her koşulda mesafe tanımaksızın her konuda destekleyen canım aileme,

Tanıştığımız ilk andan itibaren zekâsı, yardımseverliği ve sabrı ile her konuda ve her şartta maddi manevi hiçbir yardımını esirgemeyen sevgisini hep kalbimde hissettiğim birlikte her türlü zorluklara göğüs gerdiğimiz hem hayat hem çalışma arkadaşım olan ve bu yolda birlikte yürümenin güvenini veren kıymetli eşim Feyza Bayram Çatak'a

Bu yolda bana yardımcı olan herkese,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez TÜBİTAK 318S202'nolu projesi ve Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi araştırma üniversiteleri destek programı ADT-2022-10661'nolu projesi ile desteklendi.

İÇİNDEKİLER

KISALTMALAR LİSTESİ	i
ŞEKİL LİSTESİ	iv
TABLO LİSTESİ	vi
1. ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ ve AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	6
4.1. Primer İmmün Yetmezlikler	6
4.2. İmmün Disregülasyon Hastalıkları	6
4.3. CD28 ve CTLA-4 yoluğı	7
4.4. LRBA ve CTLA-4 eksikliğı	10
5. GEREÇ ve YÖNTEM	12
5.1. Gereçler	12
5.1.1. Kimyasallar	12
5.1.2. Cihazlar	12
5.1.3. Tamponlar ve Çözeltiler	12
5.1.4. Hücre Kültür Ortamları	12
5.1.5. Antikorlar	12
5.2. Yöntemler	13
5.2.1. Klinik Bulguların Değıerlendirilmesi	16
5.2.2. Ayrıntılı Lenfosit Alt Gruplarının Değıerlendirilmesi	16
5.2.3. Dolaşımdaki T Foliküler Yardımcı Hücrelerin (CT _{FH}) Belirlenmesi	17
5.2.4. Periferik Kan Mononükleer Hücrelerinin İzolasyonu ve Treg Hücrelerinin Belirlenmesi ...	17
5.2.5. cT _{FH} ve Treg Hücrelerinin Alt Tiplerinin Belirlenmesi	17
5.2.6. Hücre İçi Sitokin (IL-4, IL-17A, IL-10 ve IFN-γ) Seviyelerinin Tespit Edilmesi	18
5.2.7. T Hücrelerinde CD28 İfadesinin Belirlenmesi	18
5.2.8. İstatiksel Değıerlendirme	18
6. BULGULAR	19
6.1. LRBA ve CTLA4 Eksikliğı Hastalarının Demografik ve Klinik Özellikleri	19
6.2. LRBA ve CTLA4 Eksikliğinde İmmün Fenotipleme Bulguları	22
6.3. Abatacept, Naif T Hücre Havuzunda Restorasyon ile Timik Çıktıyı Artırarak Hastaların T Hücre Yanıtlarını Tersine Çevirir	24

6.4. Abatacept Her İki Hastalıkta Da Artan cT _{FH} Hücrelerinin Azalmasına Yol Açar	26
6.5. Abatacept Tedavisi Her İki Hastalıkta Treg Hücrelerinin Oranlarını Baskılar	27
6.6. Her İki Hastalıkta Da Artan TH1 ve Azalan TH17 Yanıtı Tedavi Sonrasında Kontrol Altına Alındı	31
6.7. Abatacept Hastaların CD4+ T Hücrelerindeki Sitokin Üretimi Azaltır	35
6.8. Abatacept Tedavisi Öncesindeki T Hücrelerindeki CD28 Düşüklüğü Ağırlıklı Olarak CTLA4 Eksikliği Hastalarında Gözlemlendi.	36
7. TARTIŞMA ve SONUÇ	39
8. KAYNAKLAR	46
9. ÖZGEÇMİŞ	52
10. BİLİMSEL FAALİYETLER	53
11. EKLER	55

KISALTMALAR LİSTESİ

AP1	:	Activator protein 1
BEACH	:	beige and Chediak-Higashi
CDR3	:	complementary determining region 3
<i>CTLA4</i> ^{+/-}	:	CTLA4 Eksikliği
CM	:	CTLA4 mutant
CTLA-4	:	Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
DMSO	:	Dimetil sülfoksit
NK	:	Doğal öldürücü
İEİ	:	Doğuştan gelen bağışıklık kusurları
cT _{FH}	:	Dolaşımdaki T foliküler yardımcı T hücre
E	:	Erkek
FBS	:	Fetal Bovine Serum
LOF	:	Fonksiyon kaybı
GOF	:	Fonksiyon kazanımı
FOXP3	:	forkhead box P3
PI3K	:	Fosfoinositid-3 Kinaz
GRB2	:	Growth factor receptor-bound protein 2
IKB	:	İkappaB kinase
ITAM	:	Immunoreceptor tyrosine-based activation motif
IPEX	:	İmmün disregülasyon, poliendokrinopati, enteropati, X'e bağlı geçen
Ig	:	immünoglobulin
IFN- γ	:	İnterferon gama
K	:	Kadın
KİT	:	Kemik İliği Transplantasyonu
KK	:	Kısmi Kontrol

KD	:	Kronik diarrhea
LP	:	Lenfoproliferasyon
LAT	:	Linker for activation of T cells
LRBA	:	Lipopolysaccharide (LPS)-responsive and beige-like anchor protein
<i>LRBA</i> ^{-/-}	:	LRBA Eksikliği
LM	:	LRBA mutant
MFI	:	Mean fluorescence intensity
MAPK	:	Mitogen-activated protein kinase
MS	:	Multipl Skleroz
ns	:	Non-significant
NFKB	:	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NFAT	:	Nuclear factor of activated T-cells
ALPS	:	Otoimmün lenfoproliferatif sendrom
PKMH	;	Periferik Kan Mononükleer Hücre
PMA	:	Phorbol-12-myristate-13-acetate
PBS	:	Phosphate Buffered Saline
PIP2	:	Phosphatidylinositol biphosphate
PLC γ 1	:	Phospholipase C gamma1
PDK1	:	PIP3-dependent kinase
PİY	:	Primer İmmün Yetmezlik
PKB	:	Protein kinase B
PKC	:	Protein kinase C
SK	:	Sağlıklı Kontrol
SBY	:	Semptom Başlangıç Yaşı
SSYE	:	Sık Solunum Yolu Enfeksiyonu
SLE	:	sistemik lupus eritematozus

sCD25	:	Soluble CD25
SD	:	Standart Sapma
T _{FR}	:	T foliküler regülatör hücre
T _{FH}	:	T foliküler yardımcı hücre
T _H	:	T helper
Treg	:	T regülatör hücre
TK	:	Tam Kontrol
TCR	:	T-cell receptor
t-SNE	:	t-distributed stochastic neighbor embedding
AIRE	:	The autoimmune regulator
TNF- α	:	Tümör nekroz faktörü alfa
CVID	:	Yaygın Değişken İmmün Yetmezlik
YK	:	Yetersiz Kontrol

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa Numarası

- Şekil 1.** LRBA ve CTLA4 hastalarının klinik ve laboratuvar parametrelerini içeren akış şeması..... 15
- Şekil 2.** **A)** LRBA proteininin yapısı ve hastalarda görülen mutasyonlar. **B)** CTLA4 proteininin yapısı ve hastalarda görülen mutasyonlar..... 21
- Şekil 3.** LRBA ve CTLA4 eksikliği hastalarının tedavi öncesi detaylı immünolojik parametrelerinin ısı haritası..... 23
- Şekil 4.** **A)** LRBA (n: 10) ve CTLA4 (n: 8) eksikliği hastalarının (n: 10); timik öncü hücreleri, $CD4^+CD45RA^+CCR7^+$ naive T hücreleri ve $CD4^+CD45RA^-CCR7^-$ efektör T hücrelerinin tedavi öncesi ve tedavi sonrasındaki istatistiksel karşılaştırmaları. **B)** LRBA (n: 10) ve CTLA4 (n: 6) eksikliği hastalarının hafıza Treg ve Teff hücrelerinin sağlıklı kontrollerle istatistiksel karşılaştırması **C)** LRBA eksikliği (n: 8) hastalarının tedavi öncesi ve sonrasındaki hafıza Treg ve Teff hücrelerinin istatistiksel karşılaştırılması **D)** Hastaların ve sağlıklı kontrollerin $CD4^+$ T-hücresi alt kümelerinin temsili t-dağılımlı stokastik komşu yerleştirme (t-SNE) görselleştirmesi **E)** Hastaların ve sağlıklı kontrolün timik öncü hücrelerinin temsili t-dağılımlı stokastik komşu yerleştirme (t-SNE) görselleştirmesi..... 25
- Şekil 5.** **A)** Abatacept tedavisi öncesi LRBA (n: 21) ve CTLA-4 (n: 14) eksikliği hastalarıyla yaş uyumlu sağlıklı kontrollerin (n: 32) cTFH yüzdeleri. **B)** Abatacept öncesi hastaların cTFH hücrelerinde PD-1 ifadesi. **C)** LRBA (n:18) ve CTLA4 (n:10) eksikliği olan hastalarda abatacept öncesi ve sonrası cTFH yüzdeleri. **D)** Hastaların ve yaş uyumlu sağlıklı kontrol cTFH'sinin temsili t-dağıtılmış stokastik komşu yerleştirme (t-SNE) görselleştirmesi... 26
- Şekil 6.** **A)** Hastaların ve sağlıklı kontrollerin $CD4^+FOXP3^+CD25^+CTLA4^+$ Treg hücrelerinin Temsili t-dağıtılmış stokastik komşu yerleştirme (t-SNE) z-kanalı görselleştirmesi. Yüksek ekspresyon (kapılanmış alan), $CD3^+CD4^+$ T hücreleri içindeki FOXP3, CD25 ve CTLA4 seviyelerini gösterir. **B)** LRBA eksikliği (n: 7) hastalarının abatacept tedavisi öncesinde ve sonrasında ve yaşa uygun sağlıklı kontrollerde (n: 33) $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ Treg hücrelerinin yüzdeleri ve $CD4^+FOXP3^+$ Treg hücrelerindeki FOXP3, CD25 ve CTLA4 ifadesi **C)** CTLA-4 eksikliği (n: 8) hastalarının abatacept tedavisi öncesinde ve sonrasında ve yaşa uygun sağlıklı kontrollerde (n: 33) $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ Treg hücrelerinin yüzdeleri ve $CD4^+FOXP3^+$ Treg hücrelerindeki FOXP3, CD25 ve CTLA4 ifadesi..... 28
- Şekil 7.** **A)** Hastaların ve sağlıklı kontrollerin T_{FR} hücrelerinin kontur grafiği **B)** LRBA (n: 10), CTLA-4 (n: 6) eksikliği hastalarının abatacept tedavisi öncesinde yaşa uygun sağlıklı kontrollerle $CD4^+CD25^{yük}CD127^{düş}$ Treg ve T_{FR} hücrelerinin yüzdeleri. **C)** LRBA eksikliği (n:8) hastalarının abatacept tedavi öncesi ve sonrasındaki $CD4^+CD25^{yük}CD127^{düş}$ Treg ve T_{FR} hücrelerinin yüzdeleri..... 30

- Şekil 8.** A) Hastaların ve sağlıklı kontrollerin T_{FH} hücrelerinin alt tiplerinin kontur grafiği B) LRBA (n: 10), CTLA-4 (n: 6) eksikliği hastalarının abatacept tedavisi öncesinde yaşa uygun sağlıklı kontrollerle T_{FH1} , T_{FH2} ve T_{FH17} hücrelerinin yüzdeleri. C) LRBA eksikliği (n:8) hastalarının abatacept öncesi ve sonrasındaki T_{FH1} , T_{FH2} ve T_{FH17} hücrelerinin yüzdeleri..... 31
- Şekil 9.** A) Hastaların ve sağlıklı kontrollerin kontrollerle CXCR5⁺ hafıza T_H hücrelerinin alt tiplerinin kontur grafiği B) LRBA (n: 10), CTLA-4 (n: 6) eksikliği hastalarının abatacept tedavisi öncesinde yaşa uygun sağlıklı kontrollerle CXCR5⁺ hafıza T_H1 , T_H2 ve T_H17 hücrelerinin yüzdeleri. C) LRBA eksikliği (n:8) hastalarının abatacept öncesi ve sonrasındaki CXCR5⁺ hafıza T_H1 , T_H2 ve T_H17 hücrelerinin yüzdeleri..... 32
- Şekil 10.** A) Hastaların ve sağlıklı kontrollerin hafıza Treg hücrelerinin alt tiplerinin kontur grafiği B) LRBA (n: 10), CTLA-4 (n: 6) eksikliği hastalarının abatacept tedavisi öncesinde yaşa uygun sağlıklı kontrollerle hafıza T_H1 , T_H2 ve T_H17 -Treg hücrelerinin yüzdeleri. C) LRBA eksikliği (n:8) hastalarının abatacept öncesi ve sonrasındaki hafıza T_H1 , T_H2 ve T_H17 -Treg hücrelerinin yüzdeleri..... 34
- Şekil 11.** A) LRBA eksikliği hastalarının (n: 7) (abatacept tedavisi öncesinde ve sonrasında) ve yaş uyumlu sağlıklı kontrollerin (n: 24) $CD3^+CD4^+CD45RO^+$ hücrelerindeki IL-4, IL-10, IL-17A ve IFN- γ yüzdeleri. B) CTLA-4 eksikliği hastalarının (n:7) (abatacept tedavisi öncesinde ve sonrasında) ve yaş uyumlu sağlıklı kontrollerin (n:24) $CD3^+CD4^+CD45RO^+$ hücrelerindeki IL-4, IL-10, IL-17A ve IFN- γ yüzdeleri. C) Hastaların $CD3^+CD4^+CD45RO^+$ hücrelerindeki IL-4, IL-10, IL-17A ve IFN- γ pozitif hücrelerin kontör grafiği..... 35
- Şekil 12.** A) Hastaların ve sağlıklı kontrollerin $CD4^+CD28^+$, $CD4^+CD28^-$ hücreleri (üst panel) ile $CD8^+CD28^+$, $CD8^+CD28^-$ hücrelerinin (alt panel) kontur grafiği B) LRBA (n: 13), CTLA-4 (n: 8) eksikliği hastalarının abatacept tedavisi öncesinde yaşa uygun sağlıklı kontrollerle $CD4^+CD28^+$, $CD8^+CD28^+$ hücrelerinin yüzdeleri ve $CD4^+$ T ve $CD8^+$ T hücrelerindeki CD28 MFI değerleri. C) LRBA eksikliği (n:9) hastalarının abatacept öncesi ve sonrasındaki $CD4^+CD28^+$, $CD8^+CD28^+$ hücrelerinin yüzdeleri ve $CD4^+$ T ve $CD8^+$ T hücrelerindeki CD28 MFI değerleri..... 37

TABLO LİSTESİ

Sayfa Numarası

Tablo 1.	Yazılım ve bilgisayar programlarının listesi ve tezdeki kullanım amaçları ...	13
Tablo 2.	LRBA eksikliği hastalarında demografik özellikler, klinik bulgular ve mutasyonlar.....	20
Tablo 3.	CTLA-4 eksikliği hastalarında demografik özellikler, klinik bulgular ve mutasyonlar	20

1. ÖZET

Tezin başlığı : LRBA ve CTLA4 eksikliği olgularında abatacept molekülünün immünolojik etkileri

Öğrencinin Adı Soyadı : Mehmet Cihangir Çatak

Danışmanın Adı Soyadı : Prof. Dr. Safa Barış

Programın Adı : Alerji-İmmünoloji Yüksek Lisans Programı

Giriş ve Amaç: : Lipopolysaccharide-responsive beige like anchor protein (LRBA) ve cytotoxic T lymphocyte antigen 4 (CTLA-4) eksiklikleri immün disregülasyonla seyreden Primer İmmün Yetmezlikler (PİY) grubu hastalıklarındandır. CTLA4-Ig analogu (abatacept) bu hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Bu çalışmada LRBA ve CTLA4 eksikliği hastalarında abatacept molekülünün etkilerinin immünolojik yöntemlerle ortaya konulması hedeflendi.

Yöntem: Çok merkezli ve ileriye dönük tasarımıyla Marmara Üniversitesi Çocuk Alerji ve İmmünoloji Bilim Dalı'nda değerlendirilmek üzere LRBA (n:21) ve CTLA4 (n:14) eksikliği olguları ile yaş uyumlu sağlıklı kontroller (n:40) çalışmaya dahil edildi. Abatacept tedavisi öncesi ve sonrasındaki klinik ve laboratuvar bulgular değerlendirildi. Lenfosit alt grupları, T foliküler hücre (TFH) ve alt tipleri, sitokin yanıtları, regülatuar (Treg) T hücre oranları ve alt tipleri, CD25, FOXP3, CTLA4 ve CD28 protein ifadeleri akan hücre ölçerinde analiz edildi.

Bulgular: CTLA4 eksikliği olgularının tanı yaşları ve tanıda gecikme süreleri LRBA eksikliğine göre anlamlı olarak daha yüksek idi (sırasıyla $p=0,01$, $p=0,02$). Tedavi öncesi semptomlar abatacept ile kontrol altına alındı. Abatacept ile timik çıkışlı naif T hücreleri artarken, hafıza T hücrelerinin anlamlı olarak azaldığı görüldü. Tedavi ile cTFH ve Treg hücreleri azalırken, sitokin yanıtlarında düşme saptandı. Ayrıca hastaların TFH ve Treg hücrelerindeki artan T_H1 yanıtı azalırken, azalan T_H17 yanıtı ise artış gösterdi. Tedaviyle birlikte LRBA eksikliği olgularının T hücrelerindeki CD28 ifadesinde de artış saptandı.

Sonuç: Bu çalışmada abataceptin LRBA ve CTLA-4 eksikliklerindeki etkileri incelenmiştir. İlacın ciddi yan etkilerinin görülmemesi bu tedavinin LRBA ve CTLA4 eksikliğinde immün baskılamamanın yanı sıra olumlu yönde immün iyileşme yaptığını göstermektedir. Çalışma sonucunda elde edilen birtakım biyobelirteçlerin hem hastalığın daha kolay tanınmasını hem de klinik yanıtların ortaya konulmasında önemli olacağını düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: LRBA, CTLA4, abatacept, Treg, TFH

2. SUMMARY

Title of Thesis: Immunological effects of abatacept molecule in LRBA and CTLA4 deficiency cases

Student Name, Surname: Mehmet Cihangir Çatak

Supervisor Name : Prof. Dr. Safa Barış

Program Name : Allergy-Immunology MSc Program

Background and Aim: Lipopolysaccharide-responsive beige-like anchor protein (LRBA) and cytotoxic T lymphocyte antigen 4 (CTLA-4) deficiencies are among the Primary Immunodeficiencies with immune dysregulation. CTLA4-Ig analog (abatacept) has been used to control the symptoms of the patients. We aimed to elucidate the effect of abatacept via immunological studies.

Method: Our prospective, multicenter study included LRBA (n:21) and CTLA-4 (n:14) deficiency cases and healthy controls (n:40) to be evaluated in Marmara University, Department of Pediatric Allergy and Immunology. The clinical and molecular findings of patients with LRBA and CTLA4 deficiencies before and after targeted abatacept therapy were investigated. Lymphocyte subgroups, T follicular cell (TFH) and its subtypes, regulatory (Treg) T cell and its subtypes, CD25, FOXP3, CTLA4, and CD28 protein expressions were analyzed by flow cytometer.

Results: The age of diagnosis and delay time in diagnosis were high in CTLA4 deficiency when compared to LRBA deficiency ($p=0.01$, $p=0.02$ respectively). Abatacept controlled clinical symptoms. Abatacept reversed T cell compartment towards naive, while memory cells were decreased. On treatment, cTFH, Treg cells, and cytokine responses were decreased. In addition, Skewed TH1 and decreased TH17 responses of Treg and TFH cells were reversed by decreased TH1 and increased TH17 responses after the abatacept treatment. Along with the treatment, CD28 expression was increased in the T cells of patients with LRBA deficiency.

Conclusions: Our study revealed the levels and effects of immunological changes with abatacept. The safe long-term usage of targeted therapy is proving the restorative effects of abatacept in LRBA and CTLA4 deficiencies. Furthermore, the described biomarkers in this study could be helpful for early diagnosis and treatment.

Keywords: LRBA, CTLA4, abatacept, Treg, TFH

3. GİRİŞ ve AMAÇ

PİY grubu hastalıklar bağışıklık elemanlarından biri ya da birden fazlasında görülen hasarların sonucunda meydana gelmektedir. Genetik temelli gelişen bu nadir hastalıklar on farklı grup altına toplanmış olup literatürde bugüne kadar 485 adet PİY tanımlanmıştır (Tangye ve ark., 2022b). İmmün disregülasyon hastalıkları, PİY'in geniş bir alt grubudur ve bağışıklık sistemindeki denetim mekanizmasının bozulması ile ortaya çıkmaktadır. Genellikle hastalar yaşamın erken döneminde sık tekrarlayan enfeksiyonlar, otoimmünite, kronik inflamasyon ve/veya malignite gibi klinik bulgulara kliniğe başvurmaktadırlar (Tangye ve ark., 2022b). İmmün disregülasyon ile seyreden PİY hastalıklarında otoimmünite sıklıkla gözlenen bir bulgudur. Otoimmüniteden sorumlu olan başlıca mekanizmalar; regülatör T (Treg) hücrelerinde görülen kalitatif ve kantitatif bozukluklar, apoptoz mekanizmasında görülen bozukluklar, T hücrelerinin gelişimi sırasında immün tolerans mekanizmalarının yetersiz olması, otoreaktif B hücrelerinin kemik iliği veya çevre dokular tarafından yok edilememesi ve ortamda çoğalarak dokulara zarar vermesi olarak sınıflanabilir (Cunningham-Rundles, 2011; Saifi & Wsocki, 2015). Literatürde bahsedilen bu bozuk mekanizmalarla ilişkilendirilmiş 50'nin üzerinde immün yetmezlik tanımlanmıştır (Tangye ve ark., 2022b).

Otozomal çekinik kalıtım gösteren Lipopolysaccharide-responsive beige-like anchor protein (LRBA) eksikliği ile otozomal dominant kalıtım gösteren Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 (CTLA4) eksikliği sırasıyla 2012 ve 2014 yıllarında tanımlanmıştır (Kuehn ve ark., 2014; Lo ve ark., 2015; Lopez-Herrera ve ark., 2012). Fork-head box P3⁺ (FOXP3) Treg hücre yüzeyinde bulunan CTLA-4 bir negatif immün kontrol noktasıdır ve T hücre aktivasyonu ile yüzeye çıkmaktadır. Yüzeyde bulunan CTLA4, CD28 ile yarışarak CD80/86 reseptörlerine bağlanır T hücre uyarımını baskılar (Kennedy ve ark., 2022; Qureshi ve ark., 2011). LRBA sitozolik bir proteindir ve veziküler trafik, sinyal iletimi ve apoptoziste etkilidir (Lopez-Herrera ve ark., 2012). LRBA proteininin BEACH domaini ile CTLA-4'ün YVKM motifi bağlanarak CTLA4 proteininin sitozolde lizozomal yıkımı engellenir ve CTLA-4 proteini bu sayede tekrar hücre içi dolaşıma katılarak plazma zarında ifade edilir (Lo ve ark., 2015). Sonuç olarak, *LRBA* ve *CTLA4* genlerinde görülen mutasyonlar CTLA-4 proteininin hücre yüzeyinde sunulmasını engellemektedir.

LRBA ve CTLA4 eksikliğinde görülen başlıca klinik bulgular; lenfoproliferasyon, solunum yolu enfeksiyonları, enteropati, sitopeni, otoimmünite ve/veya kanser oluşumu olarak sıralanabilir (Kuehn ve ark., 2014; Lopez-Herrera ve ark., 2012). Klinik semptomlar açısından bakıldığında LRBA eksikliği genellikle CTLA4 eksikliğine göre daha ciddi seyir göstermektedir (Catak ve ark., 2022; Jamee ve ark., 2021). Bu genetik mutasyonların sonucunda; Treg hücrelerinde azalma, efektör T hücrelerinin kontrolsüz farklılaşmasına bağlı olarak naif hücrelerde azalma ve hafıza hücrelerinde artış, bellek B hücrelerinin uyarımında görevli T foliküler yardımcı (T_{FH}) hücrelerinin artış, soluble CD25 (sCD25) düzeylerinde artış saptanmaktadır (Catak ve ark., 2022; Charbonnier ve ark., 2015). Daha önce yapmış olduğumuz önemli çalışmalarda her iki hastalıkta biyobelirteç olarak sCD25 ve T_{FH} hücrelerinin hastalık aktivitesini göstermedeki rollerini ortaya koymuştuk. Özellikle tedaviye dirençli olguların daha erken yakalanabilmesi açısından bu biyobelirteçler önemli olup, bu hastalarda abatacept ilacının dozunun arttırılmasını ve kemik iliği nakli gibi başka tedavilerin devreye sokulmasını gündeme getirmektedir (Alroqi ve ark., 2018; Charbonnier ve ark., 2015; Kiykim ve ark., 2019).

CTLA4 ve LRBA eksikliği olgularında kemik iliği transplantasyonu sunulan tedavi yöntemlerinden biridir. Ancak transplantasyon sırasında gelişebilen yan etkiler ve çoğu hastada tam hastalık kontrolü yüksek kimerizm oranlarına ihtiyaç duyulması nedeniyle nakil tedavisinin primer değil, daha ağır olgularda uygulanması yönünde bir eğilim söz konusudur (Seidel ve ark., 2018; Tesch ve ark., 2020). Şu an için benimsenen en iyi tedavi seçeneği olarak bu hastalarda immünglobulin yerine koyma tedavisi ve gerekli olan olgularda hedeflenmiş tedavi olan abatacept'in kullanılmasıdır (Lo ve ark., 2015). Türkiye'de yaptığımız çok merkezli bir çalışmada nakil olan ve olmayan hasta grupları arasında sağ kalım açısından anlamlı bir fark bulunmamıştır (Catak ve ark., 2022).

Abatacept molekülü ilk olarak romatoid artrit tedavisinde kullanıma başlanan bir CTLA-4 füzyon molekülüdür (Pombo-Suarez & Gomez-Reino, 2019). Bu tedavi ile antijen sunucu hücre yüzeyinde ifade edilen CD80/86 molekülü bağlanarak CD28'in bu proteinlere bağlanması engellemekte ve T hücre aktivasyonunu baskılamaktadır (Esensten ve ark., 2016; Korhonen & Moilanen, 2009). CTLA-4 analogu olan bu molekülün *in vitro* çalışmaları sonucunda immünolojik bulgulara ilerlemeler kaydedilmiştir. İlaç, LRBA ve CTLA-4 eksikliği hastalarında kullanıldığında klinik bulgulara oldukça etkili iyileşme oranları görülmektedir. LRBA hastalarında özellikle lenfoproliferasyon ve kronik ishal bulgularında iyileşme gözlenmektedir (Kiykim ve ark., 2019). CTLA-4 eksikliği hastalarında ise enteropati,

trombositopeni, lenfoproliferasyon, interstisyel akciğer hastalığı ve optik nöritte iyileşme gözlenmiştir (Schwab ve ark., 2018).

Abatacept tedavisinin etki mekanizmasıyla ilgili olarak daha önceleri romatoid artrit olgularında yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (Cutolo & Nadler, 2013). Abatacept T hücrelerinde CD28 sinyali modülasyonu yaparak T hücre aktivasyonunu azaltabilmektedir, öte yandan abatacept efektör fonksiyon gösteren CD28 negatif T hücre popülasyonlarını azaltmakta böylece hastalık aktivitesini kontrol altına aldığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Scarsi ve ark., 2011). Öte yandan, B hücreler üzerinde CD80/CD86 ifadesini azaltarak bu hücrelerin aktivitesini ve antikor üretme kapasitelerini arttırabilmektedir (Kanbe ve ark., 2013; Vogt ve ark., 2009). Karmaşık etki mekanizması olan abatacept molekülünün CTLA4 eksikliği ile giden kalıtsal immün yetmezlik hastalıklarında yerine koyma tedavisi ile immün sistem üzerinde nasıl etki oluşturduğunu gösteren bir çalışma bulunmamaktadır.

LRBA ve CTLA-4 eksikliğinde klinik ve immünolojik bulgular benzerlik gösterse de moleküler ve genetik düzeyde her iki hastalık arasında farklılıklar vardır. Abatacept tedavisi bu hastalarda oldukça etkilidir. Ancak etki mekanizması ve hastaların ne düzeyde yanıt gösterecekleri ve tedavi ile oluşan immünolojik değişiklikler bilinmemektedir. Bu çalışmada abatacept tedavisi alan hastalarda tedavi öncesi ve sonrası klinik ve immünolojik değişikliklerin incelenmesi hedeflenmiştir. Böylece abatacept molekülünün etki mekanizmasının tam olarak ortaya konulması amaçlanmıştır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Primer İmmün Yetmezlikler

PİY bağışıklık sisteminin gelişimsel ve/veya fonksiyonel bozukluklarını tanımlayan geniş bir hastalık grubudur. Son zamanlarda doğuştan gelen bağışıklık kusurları (IEI) olarak da tanımlanan bu grupta bugüne kadar 485 farklı hastalık tanımlanmıştır (Tangye ve ark., 2022a). Hastaların klinik özellikleri genel olarak; otoimmünite, enfeksiyonlara yatkınlık, oto-inflamatuar hastalıklar, kemik iliği anomalileri, alerjiler ve kanser olarak raporlanmıştır.

PİY hastalıkları genel olarak monogenik olmakla beraber poligenik olan formları da bulunmaktadır. Genlerde görülen mutasyonlar genin ifadesini azaltarak veya fonksiyon kazanımı (GOF) mutasyonlarında ise artırarak hastalığa neden olmaktadır (Bousfiha ve ark., 2020). Hastalığın seyri mutasyonlar ve kalıtım paternlerine bağlı olarak değişebilmektedir. Monoalelik varyantlarda genel olarak; haplo yetmezlik, negatif dominans ve GOF görülür. Bialelik varyantlarda ise; otozomal çekinik, fonksiyon kaybı (LOF), GOF ve neomorfik fonksiyonlar görülmektedir (Tangye ve ark., 2020). IgA eksikliği dışında bulunan PİY grubundaki hastalıklar genel olarak çok nadir görülmektedir. Genel prevalansı oldukça düşük olmakla birlikte akraba evliliklerinin yüksek oranda olduğu ülkelerde yüksek prevalans görülmektedir.

4.2. İmmün Disregülasyon Hastalıkları

İmmün disregülasyon hastalıkları; otoimmünite, oto-inflamasyon, alerji ve lenfoproliferasyon ile karakterize olan bir PİY alt grubudur. Literatürde immün disregülasyon ile ilgili 50'den fazla gen tanımlanmıştır (Tangye ve ark., 2022a).

Otoreaktif T hücrelerin baskılanması immün homeostazı için oldukça önemlidir. Santral ve periferdeki otoimmünite baskılama mekanizmasından farklı genler sorumludur. Santral tolerans, The autoimmune regulator (AIRE) transkripsiyon faktörü tarafından sağlanmaktadır. Bu protein olgun medullar timik epitel hücreler tarafından eksprese edilir ve otreaktif T hücre klonlarının ortadan kaldırılmasında etkilidirler (Notarangelo, 2010). Bu gende görülen mutasyonlar protein ifadesinde bozulmalara ve sonuç olarak otozomal resesif kalıtım paternine sahip otoimmün poliendokrinopati-candidiasis-ektodermal distrofi sendromuna neden

olmaktadır. Hastalarda hipoparatiroidizm ve adrenal yetmezlik görülmektedir (Conteduca ve ark., 2018).

Periferdeki self-tolerans Treg hücreleri tarafından sağlanmaktadır. Treg hücreleri self antijenlere karşı bağışıklık yanıtının oluşmasını baskılayarak otoimmüniteyi engellemektedir. Treg hücreleri timüste ya da periferde üretilmektedir. Timüste Treg üretimi, FOXP3 transkripsiyon faktörü tarafından düzenlenmektedir. FOXP3 genindeki mutasyonlar immün disregülasyon, poliendokrinopati, enteropati, X'e bağlı geçen (IPEX) sendromuna neden olmaktadır (Moraes-Vasconcelos ve ark., 2008). X kromozomuna bağlı resesif kalıtım paterni gösteren bu hastaların tamamı erkek bireylerden oluşmaktadır. Hastalık hızlı ve ciddi ilerlemekle birlikte kemik iliği transplantasyonu (KİT) sayesinde hastaların kliniklerinde iyileşme gözlenmiştir. Rao ve ark., 4 İPEX hastası ile yaptıkları KİT sonrasında hastaların klinik ve immünolojik bulgularında iyileşme rapor etmişlerdir (Rao ve ark., 2007).

IL-2, özellikle T hücre aktivasyonları sonucunda salgılanarak immün homeostazında önemli bir rol oynayan ve Treg hücrelerindeki FOXP3 ekspresyonunu indükleyen bir sitokindir. IL-2R reseptörünün α zincirini kodlayan IL-2RA geninde görülen mutasyonlar İPEX benzeri kliniğe neden olmaktadır (Caudy ve ark., 2007).

Periferdeki oto reaktif lenfositlerin hücre ölümlerinin gerçekleşmesi otoimmünitenin önlenmesindeki önemli mekanizmalardan biridir. Aktive olmuş lenfositlerden salgılanan Fas ligandı ile Fas (CD95) etkileşime girdiğinde caspase proteinleri aktif hale gelerek hücre ölümüne neden olmaktadır (Rieux-Laucat, 2006). Fas geninde meydana gelen mutasyonlar otoimmün lenfoproliferatif sendrom (ALPS) hastalığının en yaygın nedenlerinden biridir. Ancak ALPS genetiği henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Fas mutasyonları ALPS hastalarında B lenfoma gibi malignitelere neden olmaktadır (Rieux-Laucat ve ark., 2003).

4.3. CD28 ve CTLA-4 Yolağı

T hücrelerin aktivasyonu T cell receptor (TCR) ve komşuluğunda bulunan CD3 ve ζ proteinleri tarafından sağlanmaktadır. İlk olarak sinyal TCR tarafından tanınmakta ve CD3 proteinlerinin γ , δ ve ϵ zincirleri ile ζ proteininin sitozolik kısmında bulunan Immunoreceptor Tyrosine-Based Activation Motif (ITAM) bölgeleri Src kinazları tarafından fosforile olmaktadır. Ardından fosforile olan bölgelere ZAP-70 proteini bağlanıp ardından Linker for activation of T cells (LAT) gibi adaptör proteinleri fosforile etmektedir. LAT fosforilasyonunun ardından

phospholipase C gamma1 (PLC γ 1) ve Growth factor receptor-bound protein 2 (GRB2) proteinleri fosforile edilmekte ve Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NFKB), Nuclear factor of activated T-cells (NFAT) ve Mitogen-activated protein kinase (MAPK) yolları uyarılmaktadır. Sitozolde inaktif halde bulunan IkappaB kinase (IKB), Protein kinase C (PKC) aracılığıyla fosforile edildikten sonra NFKB proteininden ayrılarak aktif forma dönüşmesine neden olmaktadır. Böylelikle nükleusa giren aktif NFKB aşağı yöndeki genlerin ekspresyonuna neden olmaktadır. Sitoplazmik NFAT fosforile halde bulunmaktadır ve nükleusa geçişi inhibe edilmektedir. Calcineurin proteini tarafından defosforile edilen NFAT nükleusa geçerek genlerin ifadesini sağlamaktadır. MAPK yolağında ise fosforile olan ELK ve JUN proteinleri nükleusa geçerek Activator protein 1 (AP1) formunu oluşturmakta ve IL-2 gibi genlerin eksprese edilmesini sağlamaktadır. T hücre aktivasyonunda önemli olan diğer bir molekül ise Fosfoinositid-3 Kinaz (PI3K) aktivasyonudur. PI3K hücre zarının sitozolik kısmında bulunan phosphatidylinositol biphosphate (PIP2) molekülünü fosforile ederek PIP3 molekülüne dönüştürmektedir. PIP3-dependent kinase (PDK1) giderek PIP3 molükülünü tanımakta ardından Akt veya protein kinase B (PKB) proteinini fosforile ederek hücrenin hayatta kalmasında rol oynamaktadır. Böylece T hücre aktivasyonunda etkili yollar uyarılmakta ve aşağı yöndeki transkripsiyon faktörlerinin (NFKB, NFAT, AP1 vb.) nükleusa girerek çeşitli genlerin ekspresyonu sağlanmaktadır (Ward, 1996).

T hücre uyarımında sinyal 1 ve sinyal 2 bulunmaktadır. Sinyal 1 antijenin MHC tarafından TCR kompleksine sunulması sonucu primer olarak gerçekleşir. Sinyal 2 ise ‘tehlike sinyali’ olarak adlandırılır ve kostimülatör moleküller tarafından sağlanır. Bu sinyaller yanıtların daha hızlı ve güçlü şekilde oluşturulmasını sağlamaktadır (Mueller ve ark., 1989).

B7-1 (CD80) ve B7-2 (CD86) dentritik hücreler gibi antijen sunucu hücrelerin yüzeyinde bulunur ve T hücrelerin yüzeyindeki CD28 ve CTLA-4 (CD152) reseptörlerine bağlanırlar. CD80 ve CD86 3. kromozomun q kolunda ifade edilirler. Bu iki ligand immünolojik olarak büyük oranda benzerlik gösterebilir de sekans homolojileri %25 kadardır (Kennedy ve ark., 2022). CD80 proteininin CD28/CTLA-4 proteinlerine karşı aviditesi CD86 molekülünden daha kuvvetlidir. CTLA-4 proteini ligandları ile etkileşime girdiğinde trans-endositoz işlemi yaparak ligandları internalize eder ve endozoma ardından da lizozoma göndererek parçalanmalarını sağlar. CD86 molekülü internalize olduktan sonra CTLA-4 molekülünden ayrılarak tekrardan hücre yüzeyinde sunulmasını sağlar. CD80 molekülü ise CTLA-4 molekülünden ayrılmaz ve ubiquitinasyona uğramasına neden olur (Kennedy ve ark., 2022).

CD86 proteini sürekli olarak T hücre yüzeyinde sunulur. Sinyallere karşı erken yanıt oluşturulmasını sağlar ve inflamasyon durumunda hücre yüzeyindeki CD86 ifadesi artış göstermektedir. CD80 ise daha çok T hücre yanıtlarının şeklini belirlemede rol oynamaktadır(Sansom ve ark., 2003).

CD28 molekülünün hücre yüzeyinde bulunan kısmı immünoglobulin (Ig) V domainine benzemektedir ve Ig süper ailesine ait bir proteindir. Moleküler ağırlığı 23 kDa olan CD28 proteini 202 amino asitten oluşmaktadır. T hücreleri için sağladığı kostimülatör sinyal 41 amino asit uzunluğunda olan sitoplazmik kısmı tarafından sağlanmaktadır (June ve ark., 1994). CD28 molekülü ile yapılan çalışmalarda T hücre proliferasyonunu arttırdığı ve sitokin üretimini indüklediği bulunmuştur. CD28 molekülünün ligandları ile etkileşiminin monovalent Fab fragmanları aracılığıyla bloke edilmesinin T hücre proliferasyonunu inhibe ettiği bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda CD28 interaksiyonunun IL2 üretimi başta olmak üzere çeşitli sitokinlerin üretiminde etkili olduğunu bulmuştur (Thompson ve ark., 1989). Bu veriler CD28 modülasyonunun T hücre sitokin profilini değiştirerek terapötik bir yaklaşım olabileceğini göstermektedir.

CD28 proteini, CD4⁺ T hücrelerin %95'inin yüzeyinde ifade edilirken CD8⁺ T hücrelerinin ise %50'sinde ifade edilir. Yapılan çalışmalarda CD28-CD4⁺ ve CD28-CD8⁺ T hücrelerinin yüzdelерinin yaşlanma, inflamasyon ve enfeksiyon ile artış gösterdiği tespit edilmiştir (Ford ve ark., 2014).

CTLA-4 proteini immünoglobülin süper ailesine aittir ve türler arasında korunmuş bir moleküldür. 2. kromozomda ifade edilir ve 20 kDa moleküler ağırlığındadır. Disülfat bağları ile bağlanmış homodimerik yapıda olan bu protein 4 ekzondan oluşmaktadır. Ekzon 1 lider peptiti, ekzon 2 ligand bağlanması bölgesini, ekzon 3 transmembran bölgesini, ekzon 4 ise sitoplazmik kısmı kodlamaktadır. CTLA-4 proteini alternatif kırılma aracılığıyla 4 farklı formda bulunmaktadır. Tam uzunluktaki form (f1CTLA-4) tüm ekzonları içerirken soluble formda (sCTLA-4) ekzon 3 bulunmaz. 1/4 CTLA-4 formunda 1 ve 4. ekzonlar bulunur. Ligand bağımsız formda (liCTLA-4) ise Ig V domainini kodlayan ekzon 2 bulunmamaktadır (Hosseini ve ark., 2020). sCTLA-4 resting T hücrelerde sunulmakta ve Treg hücrelerinin immün regülasyonunda rol oynamaktadır. sCTLA-4 formunda görülen polimorfizmler otoimmün hastalıklar, sistemik lupus eritematozus (SLE), tip 1 diyabet ve tiroit hastalıklarının gelişiminde rol oynamaktadır. 1/4 CTLA-4 formunun yüksek oranda eksprese edilmesi otoimmün

hastalıkların gelişimine neden olmaktadır (Liu ve ark., 2012). CTLA-4 genel olarak hücre içinde sunulmakla birlikte aktivasyonun 2. gününde CD4⁺Foxp3⁺ Treg hücrelerindeki ekspresyonu en üst seviyeye ulaşmaktadır. CTLA-4 ekspresyonunda NFAT, Foxp3 gibi transkripsiyon faktörleri rol oynamaktadır (Gibson ve ark., 2007; Zheng ve ark., 2007).

CD28 aktivatör etki gösterirken CTLA-4 T hücrelerinin baskılanmasını sağlayarak regülatör bir etki göstermesine neden olur. Bu nedenle bu iki molekülün dengede sentezlenmesi immün sistemin homeostazı için önemlidir. CD28 ve CTLA-4 2. kromozom üzerindeki yakın bölgelerde ifade edilirler ve evrimsel olarak aynı orijinden geldikleri düşünülmektedir (Harper ve ark., 1991). Hücre zarında monomerik ya da homodimerik halde bulunabilirler. CD28 ve CTLA-4 proteinlerinin B7-1 ve B7-2 ligandlarına bağlanma bölgeleri büyük oranda benzerlik göstermekte olup her iki protein de complementary determining region 3 (CDR3) bölgelerinde Met-Tyr-Pro-Pro-Tyr motifi içermektedir (June ve ark., 1994). CTLA-4 proteini CD28 proteinine göre B7-1 ve B7-2 ligandlarına karşı daha yüksek avidite göstermektedir.

4.4. LRBA ve CTLA-4 Eksikliği

LRBA proteini 4. kromozomun q kolunda ifade edilen 319 kDa moleküler ağırlığında bulunan büyük bir proteindir. LRBA domainleri arasında en çok çalışılan BEACH domain (beige and Chediak-Higashi)'in özellikleri henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. LRBA proteininde ayrıca; PH, WD40, ConA-like, DUF1088, VHS domainleri bulunmaktadır (Habibi ve ark., 2019). LRBA, CTLA-4 proteininin endozom ile hücre yüzeyi arasındaki dönüşümünde rol oynamaktadır. Bu nedenle LRBA eksikliğinde CTLA-4 proteinin hücre içinde ve hücre dışındaki ifadesi önemli ölçüde düşmektedir (Lo ve ark., 2015). Otofaji, zarar görmüş organellerin veya mikroorganizmaların lizozomal yıkıma uğramasını ifade eden bir terimdir. Bu mekanizmadan ilk olarak otofagozom meydana gelir, ardından erken ve geç endozomlar ile otofagozomlar birleşerek amfizomları oluştururlar. Bu şekilde olgunlaşan otofagozomlar lizozomlar ile birleşirler ve lizozomal proteazlar ile hidrolitik enzimleri içeren otofagolizozomları meydana getirirler (Ryder ve ark., 2014). Yapılan çalışmalarda LRBA eksikliği olgularında otofajinin düştüğü bulunmuştur.

LRBA eksikliği otozomal çekinik kalıtım paterni gösteren bir PİD hastalığıdır. Hastalığın kliniğinin ortaya çıkması için homozigot veya birleşik heterozigot mutasyon görülmelidir. Hastalar CTLA-4 eksikliği benzeri klinik özellikler göstermektedir. Hastaların LRBA protein ifadesi yapılan akan hücre ölçer sitometrisi ve western blot ölçümlerinde sağlıklı kontrollere

oranla kaybolmuştur. LRBA proteini CTLA-4 dönüşümünde önemli olduğundan hastalarda ayrıca CTLA-4 protein ifadesinde azalma meydana gelmektedir (Lo ve ark., 2015).

CTLA-4 eksikliği otozomal dominant kalıtım paterni gösteren bir immün disregülasyon hastalığıdır ve 2014 senesinde tanımlanmıştır (Schubert ve ark., 2014). Heterozigot mutasyonu olan hastalar homozigot olanlara oranla daha hafif klinik göstermektedir. Hastalarda hipogamaglobulinemi, tekrarlayan solunum yolu enfeksiyonları, otoimmün bulgular ve lenfoproliferasyon görülmektedir. Mutasyon taşıyan bireylerde ayrıca inflamatuvar barsak hastalığı ve romatoid hastalıklar da klinik olarak ortaya çıkmaktadır. Hastalığın tedavisinde genellikle T ve B hücrelerini baskılayıcı mekanizmalar kullanılmaktadır (Hosseini ve ark., 2020).

CTLA-4 Ig olarak da bilinen abatacept soluble bir fizyon proteinidir ve ilk olarak romatoid artiritin tedavisinde kullanılmıştır (Pombo-Suarez & Gomez-Reino, 2019). Abatacept CTLA-4 proteininin hücre dışı kısmı ve IgG1 molekülünün Fc kısmında oluşur. CTLA-4 Ig, antijen sunucu hücrelerin yüzeyinde bulunan CD80/86 moleküllerine bağlanarak CD28 molekülünün bağlanmasını engellemektedir (Esensten ve ark., 2016). T hücre aktivasyonunu baskılandığı bu tedavide ayrıca IL-2, tümör nekroz faktörü alfa (TNF- α) ve interferon gama (IFN- γ) sitokinlerinde azalma görülmüştür (Davis ve ark., 2008). Abatacept CTLA-4 ve LRBA eksikliği hastalarında kullanıldığında hastalarda klinik iyileşme gözlenmiştir (Catak ve ark., 2022; Kiykim ve ark., 2019; Verma ve ark., 2017).

5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1. Gereçler

5.1.1. Kimyasallar

Tezde kullanılan tüm kimyasallar Ek 1’de listelenmiştir.

5.1.2. Cihazlar

Tezde kullanılan tüm cihazlar Ek 2’de listelenmiştir.

5.1.3. Tamponlar ve Çözeltiler

Boyama Tampon Çözeltisi: %0,5 Fetal Bovine Serum (FBS) içeren 1X Phosphate Buffer Saline (PBS)’ den oluşmaktadır. Periferik Kan Mononükleer hücre (PKMH)’lerin immünofloresan boyaması bu tamponun içinde gerçekleştirilir.

Lysing Çözeltisi:

5.1.4 Hücre Kültür Ortamları

Tam RPMI: %10 FBS, %1 L-Glutamine ve %1 Penisilin-streptomisin içeren RPMI 1640’tan oluşmaktadır. PKMH’ler bu besiyerinin içerisinde kültür edilirler.

Dondurma Ortamı: %10 Dimetil sülfoksit (DMSO) içeren FBS’den oluşmaktadır. PKMH’ler bu ortamın içinde dondurulurlar.

5.1.5. Antikorlar

Tezde kullanılan tüm antikorlar Ek 3’te listelenmiştir.

5.1.6. Yazılımlar ve Bilgisayar Uygulamaları

Tablo 1’ de tezde kullanılan yazılım ve bilgisayar uygulamaları sıralanmıştır.

Tablo 1: Yazılım ve bilgisayar programlarının listesi ve tezdeki kullanım amaçları.

Yazılımlar ve Bilgisayar Uygulamaları	Şirket	Uygulama Alanı
Kaluza Analysis	Beckman Coulter	Akan hücre ölçer verilerinin analiz edilmesi
FlowJo	BD Biosciences	Akan hücre ölçer verilerinin analiz edilmesi
Cytobank	Beckman Coulter	Akan hücre ölçer verilerinin analiz edilmesi ve görselleştirilmesi

5.2. Yöntemler

Çalışmaya Marmara Üniversitesi Pendik Eğitim ve Araştırma hastanesi Pediatrik Alerji ve İmmünoloji polikliniği ve Türkiye'nin farklı İmmünoloji merkezlerinde takip edilen genetik tanısı bilinen ve yeni tedavi başlanacak LRBA ve CTLA4 eksikliği hastaları dahil edildi. Sık tekrarlayan kronik solunum yolu enfeksiyonlarının, otoimmün bulguların (sitopeniler, tiroidit, hepatit, enteropati) ve lenfoproliferasyonun baskın olduğu immün disregülasyon ile seyreden LRBA (n:21) ve CTLA4 (n:14) geninde mutasyona sahip olan hastalar ileriye yönelik olarak ilgili merkezlerde izlenerek aynı protokol çerçevesinde izleme alındı. Olguların klinik ve laboratuvar parametreleri tedavi öncesi ve sonrasında değerlendirildi (**Şekil 1**). Çalışmaya dahil edilen ve biyolojik örnek almaya elverişli olan olgulardan bilgilendirme yapılarak yazılı onamları alındı. Bu çalışma 09.2022.273 protokol kodu ile Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından onaylandı ve TÜBİTAK 318S202'nolu projesi ve Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi araştırma üniversiteleri destek programı ADT-2022-10661'nolu projesi ile desteklendi. Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan alınan 11.02.2022 tarih ve 09.2022.273 numaralı etik kurul belgesi **Ek4**'te sunulmuştur. Çalışma sırasında yapılan değerlendirmelerden aşağıda ayrıntılı olarak bahsedilmiştir.

Hastaların dahil edilme ve dışlanma kriterleri aşağıda sıralanmıştır.

Dahil Olma:

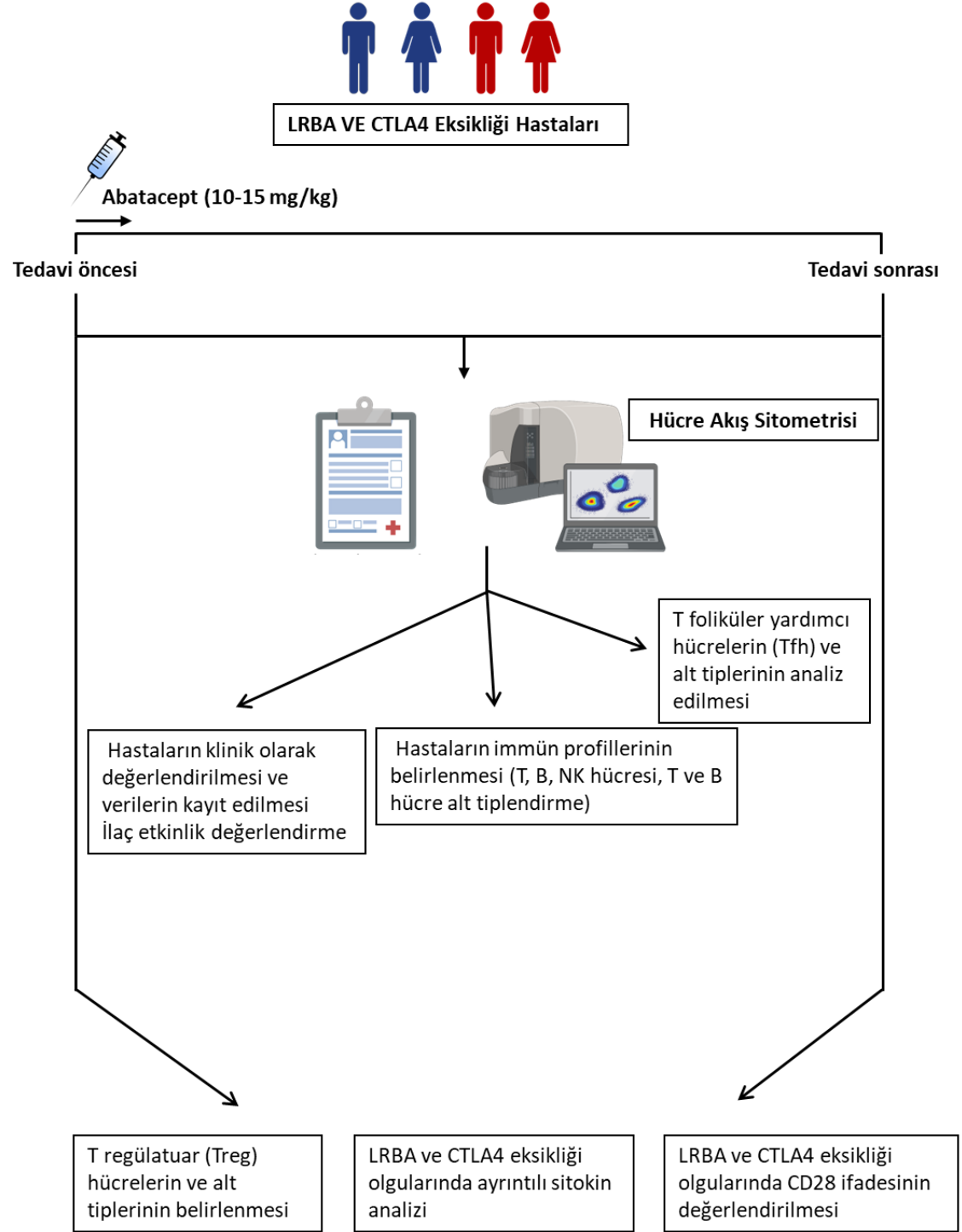
- 1-Primer immün yetmezlikler içerisinde yer alan LRBA ve CTLA4 eksikliği genetik olarak kanıtlanmış olan olgulardan çalışmaya katılmaya onam vermiş hastalar
- 2-Sağlıklı kontrollerden çalışma için onam vermiş olanlar

Hariç Tutulma:

- 1-Yukarıdaki tanımın dışında kalan diğer primer immün yetmezlikler
- 2-LRBA ve CTLA4 eksikliği olduğu halde çalışma için onam vermemiş olanlar

Çıkarılma:

- 1-Çalışma süresince kontrollerine gelmeyen hastalar
- 2-Çalışma sırasında onamlarını geri çeken hastalar
- 3-Çalışma süresi içerisinde ağır hastalık geçirme (kanser benzeri) durumundaki hastalar.



Şekil 1. LRBA ve CTLA4 hastalarının klinik ve laboratuvar parametrelerini içeren akış şeması

5.2.1. Klinik bulguların değerlendirilmesi:

İleriye yönelik izleme alınan hastaların tedavi öncesi ve sonrasındaki klinik ve fizik muayene bilgileri değerlendirildi. Hastaların tümüne abatacept ilaç etkinlik formu uygulandı. Bu formda ilaç başlama endikasyonu, doz ve gerek görüldüğü durumlarda ilaç doz değişiklikleri ve nedenleri sorgulandı. Ayrıca tedavi öncesi olan semptomların ayrıntılı olarak sınıflanması ve tedavi ile bu semptomların nasıl değiştiği aynı formda değerlendirildi. Buna göre tedaviye yanıt tam kontrol (TK), kısmi kontrol (KK) veya yetersiz kontrol (YK) olarak kategorize edilerek sınıflandırıldı.

5.2.2. Ayrıntılı Lenfosit Alt Gruplarının Belirlenmesi:

Lenfosit alt gruplarının tespit edilmesi için sırasıyla şu monoklonal antikorlar (mAb'ler) kullanıldı: Fluorescein isothiocyanate (FITC) CD3 (UCHT1, BC, FRA), Allophycocyanin (APC)-Alexa Fluor 700 (APC-A700) CD4 (13B8.2, BC), Krome Orange (KO) CD45 (J33, BC), Alexa Fluor 750 (APC-A750) CD45RA (2H4DH11LDB9, BC), Phycoerythrin (PE) CD197 (CCR7) (G043H7, BC), Pycoerythrin-Cyanin 7 (PC7) CD8 (SFC121Thy2D3, BC), APC-A700 CD14 (RMO52, BC), PE CD16 (3G8, BC), Pycoerythrin-Cyanin 5.5 (PC5.5) CD56 (N901, BC), APC-A750 CD19 (J3-119, BC), PB CD20 (B9E9, BC), PB CD21 (BL13, BC), PB CD31 (5.6E, BC), PC5.5 CD38 (LS198-4-3 BC), Phycoerythrin-Texas Red-x (ECD) CD45RO (UCHL1, BC), ve FITC IgD (IA6-2, BC). Lenfosit alt küme analizi için 100 uL tam kan, karanlıkta oda sıcaklığında 20 dakika boyunca yüzey belirteçlerine karşı mAb'ler ile inkübe edildi. Daha sonra hücreler akan hücre ölçerde okutulmadan, kırmızı kan hücreleri lizat solüsyonuyla (VersaLyse, Beckman Coulter, FR) parçalandı. Kırmızı kan hücreleri parçalandıktan sonra hücreler PBS ile yıkanarak Navios EX akan hücre ölçerde (Beckman Coulter) okutuldu ve veriler FlowJo™ (Single Cell Analysis Software v10 – 10.6.2), Kaluza Analysis Software (Version 2.1) ve Cytobank (Version 9.1) uygulamalarıyla analiz edildi. Periferik T hücreleri aşağıdaki gibi alt popülasyonlara bölünmüştür: CD4⁺ saf T hücreleri (CD4⁺ CD45RA⁺ CCR7⁺), merkezi bellek CD4⁺ T hücreleri (CD4⁺ CD45RA⁻ CCR7⁺), efektör bellek CD4⁺ T hücreleri (CD4⁺ CD45RA⁻ CCR7⁻), terminal olarak farklılaştırılmış efektör bellek CD4⁺ T hücreleri (TEMRA, CD4⁺ CD45RA⁺ CCR7⁻), CD8⁺ saf T hücreleri (CD8⁺ CD45RA⁺ CCR7⁺), merkezi bellek CD8⁺ T hücreleri (CD8⁺ CD45RA⁻ CCR7⁺), efektör bellek CD8⁺ T hücreleri (CD8⁺ CD45RA⁻ CCR7⁻) ve TEMRA CD8⁺ T hücreleri (CD8⁺ CD45RA⁺ CCR7⁻). Periferik B hücreleri dört farklı popülasyonda sınıflandırıldı: saf olgun B hücreleri

(CD19⁺ CD27⁻ IgD⁺), CD21^{düşük}CD38^{düşük} B hücreleri, sınıf geçişli olmayan bellek B hücreleri (CD19⁺ CD27⁺ IgD⁺) ve sınıf geçişli bellek B hücreleri (CD19⁺ CD27⁺ IgD⁻).

5.2.3. Dolaşımdaki T Foliküler Yardımcı Hücrelerin (cT_{FH}) Belirlenmesi:

cT_{FH} hücrelerinin tespit edilmesi için sırasıyla şu mAb'ler kullanıldı: CD4 FITC, CD279 (PD-1) PE (Beckman Coulter, FR) ve CD185 (CXCR5) APC (Biolegend, UK). 100'er µl tam kan örneği yüzey belirteçlerine karşı mAb'ler ile 20 dakika inkübe edildi. Daha sonra kırmızı kan hücreleri lizat solüsyonuyla (VersaLyse, Beckman Coulter, FR) parçalandı ve hücreler PBS ile yıkanarak Navios EX akan hücre ölçerde (Beckman Coulter) okutuldu ve veriler FlowJo™ (Single Cell Analysis Software v10 – 10.6.2), Kaluza Analysis Software (Version 2.1) ve Cytobank (Version 9.1) uygulamalarıyla analiz edildi.

5.2.4 Periferik Kan Mononükleer Hücrelerinin İzolasyonu ve Treg Hücrelerinin Belirlenmesi

Periferik kan, DPBS ile 1:1 oranda seyreltildi, Ficoll solüsyonu (Sigma-Aldrich, UK) üzerine yayıldı ve 850 g'de 25 dakika santrifüj edildi. Santrifüj işleminin ardından PKMH'ler- buffy coat toplandı ve iki kez DPBS içinde yıkandı. Treg hücrelerinin belirlenmesi için 1x10⁶ PKMH boyama tampon çözeltisi (PBS, %0,5 FBS) içinde çözüldü. Ardından PKMH'ler CD3 FITC (BC, FR), CD4 A700 (BC, FR), CD25 PC5 (BC, FR) ve CD45RO ECD (BC, FR) mAb'leriyle karanlıkta 20 dakika boyunca inkübe edildi ve bu şekilde hücre yüzeyi boyama işlemi gerçekleştirildi. Fiksasyon ve permeabilizasyondan sonra (Perfix-nc kit, Beckman Coulter, FR), hücreler 60 dakika boyunca oda sıcaklığında FOXP3 AF647 (BC, FR) ve CD152 (CTLA-4) PE (BC, FR) mAb'leriyle inkübe edilip hücre içi boyama işlemi gerçekleştirildi. Hasta numuneleri, iki bağımsız sağlıklı kontrol numunesi ile eş zamanlı olarak analiz edildi. Tüm boyanmış hücreler Navios EX akan hücre ölçerde (Beckman Coulter, FR) okutuldu ve veriler FlowJo™ (Single Cell Analysis Software v10 – 10.6.2), Kaluza Analysis Software (Version 2.1) ve Cytobank (Version 9.1) uygulamalarıyla analiz edildi.

5.2.5. cT_{FH} ve Treg Hücrelerinin Alt Tiplerinin Belirlenmesi

Hem sağlıklı kontrollerden hem de hastalardan alınan toplam PKMH'ler, PB CD4 (RPA-T4, Biolegend), FITC CD45RA (HI100, Biolegend), PC5.5 CD25 (B1.49.9, BC), APC-A750 CD127 (R34.34, BC) PE CD183 (CXCR3) (G025H7, Biolegend), APC CD185 (CXCR5) (J252D4, BC), PC7 CD196 (CCR6) (B-R35, BC) antikorlarıyla karanlıkta oda sıcaklığında 20

dakika inkübe edildi. Tüm boyanmış hücreler Navios EX akan hücre ölçerde (Beckman Coulter, FR) okutuldu ve veriler FlowJo™ (Single Cell Analysis Software v10 – 10.6.2), Kaluza Analysis Software (Version 2.1) ve Cytobank (Version 9.1) uygulamalarıyla analiz edildi. Kapılama stratejisi **EK5**’ te sunulmuştur.

5.2.6. Hücre İçi Sitokin (IL-4, IL-17A, IL-10 ve IFN- γ) Seviyelerinin Tespit Edilmesi:

Hücre içi IL-4, IL-17A, IL-10 ve IFN- γ tespiti için PKMH süspansiyonları (1×10^6 hücre), protein taşıma inhibitörü içeren monensin, Phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) (50 ng/ml), iyonominin (1 μ g/ml) ile 6 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyondan sonra hücrelere fiksasyon ve permeabilizasyon işlemi (Perfix-nc kit, Beckman Coulter, FR) gerçekleştirildi. Fikse ve permeabilize edilen hücreler CD3 A750, CD4 APC, CD45RO ECD, IL-4 PC7, IL-17A PB, IL-10 PE ve IFN- γ FITC ile 45 dakika boyunca karanlıkta oda sıcaklığında inkübe edilip hücre içi boyama işlemi gerçekleştirildi. Tüm boyanmış hücreler Navios EX akan hücre ölçerde (Beckman Coulter, FR) okutuldu ve veriler FlowJo™ (Single Cell Analysis Software v10 – 10.6.2) ve Kaluza Analysis Software (Version 2.1) uygulamalarıyla analiz edildi.

5.2.7 T Hücrelerinde CD28 İfadesinin Belirlenmesi:

Hem sağlıklı kontrollerden hem de hastalardan izole edilen PKMH’ler (5×10^5 hücre) boyama tampon çözeltisi içinde çözüldü. Ardından CD3 FITC (BC, FR), CD4 A700 (BC, FR), CD8 PC7 (BC, FR) ve CD28 ECD (BC, FR) antikorlarıyla karanlıkta oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edildi. 20 dakikanın ardından hücreleri boyama tampon çözeltisiyle iki kere yıkanıp çözülerek Navios EX akan hücre ölçerde (Beckman Coulter, FR) okutuldu ve veriler FlowJo™ (Single Cell Analysis Software v10 – 10.6.2) ve Kaluza Analysis Software (Version 2.1) uygulamalarıyla analiz edildi.

5.2.8. İstatiksel Değerlendirmeler:

Veriler, belirtildiği gibi ortalama $\pm$ standart sapma (SD) veya min-maks ile medyan olarak sunuldu. Normal dağılımı belirlemek için Kolmogorov-Smirnov dağılım testi yapılmıştır. Kategorik değerlerin karşılaştırılmasında ki-kare testi kullanıldı. Sürekli değerler için hasta ve kontrol grupları arasında karşılaştırma, belirtildiği gibi 1-way ANOVA with Tukey post-test veya Kruskal-Wallis with Dunn’s post-test ile yapıldı. Grup içi karşılaştırmalar için paired t testi kullanıldı. Farklılıklar, $p < 0.05$ değerinde anlamlı kabul edildi. İstatistiksel analiz, GraphPad Prism 9 (GraphPad Software Inc, San Diego, Calif) kullanılarak yapıldı.

6. BULGULAR

6.1. LRBA ve CTLA4 Eksikliği Hastalarının Demografik ve Klinik Özellikleri

Çalışmaya 21 LRBA ve 14 CTLA4 eksikliği hastası dahil edildi. Çalışmaya dahil edilen hastaların demografik özellikleri ve ana klinik bulguları **Tablo 2 ve 3**'de gösterilmiştir.

LRBA eksikliği 21 hastadan 12'si (%57,0) erkek, 9'u (%43,0) kız idi. Hastaların ortalama yaşı 13 (min-maks:2-41) yıldır. Ortalama semptom başlangıç yaşı $63,4 \pm 76,4$ ay iken, tanı yaşı 142 ± 108 olarak gözlemlendi. Tanıda gecikme süresi ise $78,5 \pm 78,9$ ay olarak tespit edildi. Üç aile dışında 18 (%86,0) ailede akrabalık vardı. LRBA eksikliği hastaları ilk klinik bulgularına göre değerlendirildiğinde; 11 (%52,0) hastada yaygın değişken immün yetmezlik (CVID), 5 (%24,0) hastada otoimmün lenfoproliferatif sendrom (ALPS), 5 (%24,0) hastada ise poliendokrinopati, enteropati, X'e bağlı benzeri (IPEX-benzeri) olarak değerlendirildi. Çalışmanın sonunda takip süresi $43,7 \pm 46$ ay olup hastaların tümü yaşamakta idi. Hastaların 20'sine (%95,0) hedeflenmiş abatacept tedavisi verildi. Hastaların abatacept tedavisine aylık 10-15 mg/kg idame doz ile ortalama süre 12,5 ay (min-maks: 2-75) olarak gözlemlendi. Abatacept tedavisine 15 (%75,0) hasta tam yanıtlıyken, 5 (%25,0) hastada kısmi yanıt gözlemlendi. Kısmi yanıtlı hastaların 2 (%40,0)'sine kemik iliği transplantasyonu (KİT) yapıldı.

CTLA-4 eksikliği 14 hastadan 7'si (%50,0) erkek, 7'si (%50,0) kız idi. Hastaların ortalama yaşı 29 (min-maks:5-47) yıldır. Ortalama semptom başlangıç yaşı $119 \pm 99,1$ ay iken, tanı yaşı 291 ± 167 ay olarak gözlemlendi ve bu değer LRBA eksikliği hastalarından anlamlı olarak yüksekti ($p=0,01$). Tanıda gecikme süresi ise $175,0 \pm 128,0$ ay olarak tespit edildi ve bu değer de LRBA eksikliği olgularındaki değerden anlamlı olarak yüksekti ($p=0,02$). 4 ailede (%29,0) akrabalık varken 10 (%71,0) ailede akrabalık yoktu. CTLA-4 eksikliği hastaları ilk klinik bulgularına göre değerlendirildiğinde; 12 (%86,0) hasta yaygın değişken immün yetmezlik (CVID) ve 2 (%14,0) hasta otoimmün lenfoproliferatif sendrom (ALPS) olarak değerlendirildi. Çalışmanın sonunda takip süresi $52,9 \pm 43,4$ ay olup 14 (%100,0) hasta yaşamını sürdürmektedir. Hastaların 10'una (%71,0) hedeflenmiş abatacept tedavisi başlanmıştır. Hastaların abatacept tedavisini alma ortalama süresi 28,5 ay (min-maks: 7-37) olarak saptandı. Abatacept tedavisine 9 (%90,0) hasta tam yanıtlıyken, 1 (%10,0) hastada kısmi yanıt gözlemlendi.

Her iki hastalıkta görülen mutasyonların şematik gösterimi **Şekil 2**'de sunuldu. LRBA eksikliğinde mutasyonlar genellikle proteinin birçok yerinde görülmekte ve nonsense

özelliğinde iken, CTLA4 eksikliğinde mutasyonların çok hücre dışı domaininde yerleştiği görüldü.

Tablo 2. LRBA eksikliği hastalarında demografik özellikler, klinik bulgular ve mutasyonlar.

Hasta	Aile	Yaş (y)/Cinsiyet	Akrabalık	SBY (ay)	Fenotip	Klinik Tanı	Mutasyon	Sağkalım
LM1	A1	7 / K	Var	8	SSYE, İD	IPEX-like	c.5172-2A>G, intron 30, homozigot	Yaşıyor
LM2	A2	23 / E	Yok	66	SSYE, KD, İD, LP	ALPS	c.1963C>T, p.R655*, homozigot	Yaşıyor
LM3	A3	17 / K	Var	24	SSYE, İD, LP	ALPS	c.3396-3397delAC, p.D1132Yfs*15, homozigot	Yaşıyor
LM4	A4	20 / K	Var	60	SSYE, KD, İD	CVID	c.6372del, p.F2135Lfs*29, homozigot	Yaşıyor
LM5	A4	24 / K	Var	2	SSYE, KD, İD, LP	IPEX-like	c.6372del, p.F2135Lfs*29, homozigot	Yaşıyor
LM6	A5	13 / E	Var	100	SSYE, İD	CVID	Exon 3-4 delesyonu, homozigot	Yaşıyor
LM7	A6	9 / E	Var	72	SSYE, İD, LP	CVID	c.767+5_767+8delGTAT c.7943C>G, p.S2659*, birleşik heterozigot	Yaşıyor
LM8	A7	3 / E	Yok	5	İD	IPEX-like	c.3396-3397del, p.N1132fs, homozigot	Yaşıyor
LM9	A8	9 / E	Var	36	İD, LP	ALPS	c.5047C>T, p.R1683*, homozigot	Yaşıyor
LM10	A9	8 / K	Var	36	İD	IPEX-like	c.3185_3194del, p.S1062fs, homozigot	Yaşıyor
LM11	A10	10 / K	Var	4	SSYE, KD, İD, LP	IPEX-like	c.2130dup, p.M711Yfs*6, homozigot	Yaşıyor
LM12	A10	4 / E	Var	7	SSYE, İD, LP	CVID	c.2130dup, p.M711Yfs*6, homozigot	Yaşıyor
LM13	A11	24 / K	Var	204	İD, LP	ALPS	c.675G>A, p.W225*, homozigot	Yaşıyor
LM14	A12	2 / K	Var	5	KD, İD	CVID	c.8147_8148del, p.L2722Hfs*16, homozigot	Yaşıyor
LM15	A13	24 / E	Var	12	SSYE, KD, İD	CVID	c.4333C>T, p.R1445*, homozigot	Yaşıyor
LM16	A13	22 / K	Var	96	SSYE, KD, İD	CVID	c.4333C>T, p.R1445*, homozigot	Yaşıyor
LM17	A14	20 / K	Var	0	SSYE, KD, İD, LP	CVID	c.1986del (p.K663Sfs*3)	Yaşıyor
LM18	A15	10 / K	Var	112	SSYE, İD, LP	CVID	Exon 18 delesyonu, homozigot	Yaşıyor
LM19	A16	41 / E	Yok	252	SSYE, KD, İD, LP	CVID	c.1963C>T, p.R655* c.3156del, p.D1053Tfs*2, birleşik heterozigot	Yaşıyor
LM20	A17	6 / K	Var	9	SSYE, İD, LP	ALPS	Exon 3-4 delesyonu, homozigot	Yaşıyor
LM21	A18	24 / K	Var	216	SSYE, KD, İD, LP	CVID	c.4321C>T, p.R1441W, homozigot	Yaşıyor

Kısaltmalar: ALPS: Autoimmune lymphoproliferative syndrome; LM: LRBA-mutant; CVID: Common variable immunodeficiency; E: Erkek; İD: İmmün-disregülasyon; K, Kadın; KD: Kronik diarreya; LP: Lenfoproliferasyon; SBY: Semptom başlangıç yaşı; SSYE: Sık solunum yolu enfeksiyonu.

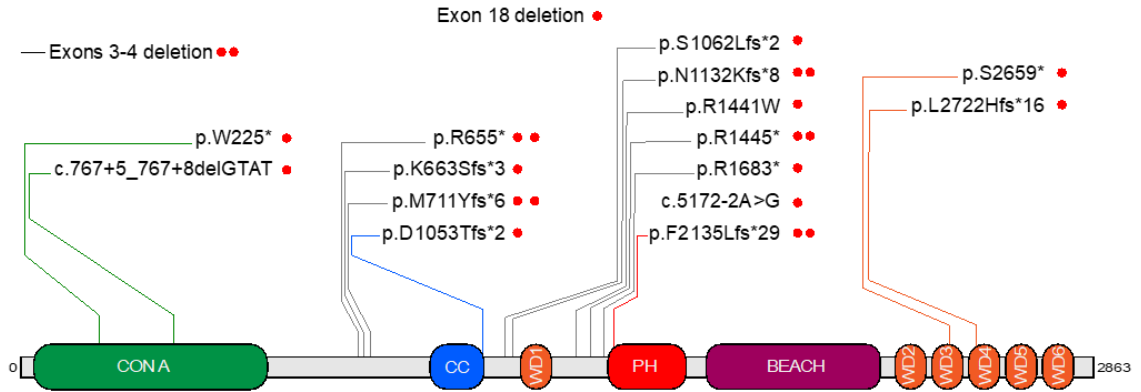
Tablo 3. CTLA4 eksikliği hastalarında demografik özellikler, klinik bulgular ve mutasyonlar.

Hasta	Aile	Yaş (y)/Cinsiyet	Akrabalık	SBY (ay)	Fenotip	Klinik Tanı	Mutasyon	Sağkalım
CM1	A1	43 / E	Yok	144	SSYE, İD, LP	ALPS	c.436G>A, p.G146R, heterozigot	Yaşıyor
CM2	A2	11 / E	Yok	6	KD, İD, LP	CVID	c.515C>A, p.S172*, heterozigot	Yaşıyor
CM3	A3	11 / E	Yok	1	SSYE, KD, İD	CVID	Exon 1-4 delesyonu, heterozigot	Yaşıyor
CM4	A4	16 / K	Var	152	SSYE, KD, İD, LP	ALPS	c.294del, p.D99Mfs*14, heterozigot	Yaşıyor
CM5	A4	44 / K	Var	120	SSYE, İD	CVID	c.294del, p.D99Mfs*14, heterozigot	Yaşıyor
CM6	A5	5 / K	Yok	2	SSYE, KD, İD, LP	CVID	c.326G>A p.G109E, heterozigot	Yaşıyor
CM7	A6	28 / E	Yok	132	SSYE, KD, İD, LP	CVID	c.223C>T, p.R75W, heterozigot	Yaşıyor
CM8	A7	20 / K	Yok	36	SSYE, İD, LP	CVID	c.405C>A, p.Y135*, heterozigot	Yaşıyor
CM9	A8	22 / K	Yok	84	SSYE, İD, LP	CVID	c.529dupT, p.Y177Lfs*, heterozigot	Yaşıyor
CM10	A9	39 / E	Yok	84	SSYE, KD, İD, LP	CVID	c.436G>A, p.G146R, heterozigot	Yaşıyor
CM11	A10	30 / E	Yok	120	ID, LP	CVID	c.495_496delinsAT, p.W165*, heterozigot	Yaşıyor
CM12	A11	37 / K	Var	300	SSYE, LP	CVID	c.399del, p.M134Cfs*, heterozigot	Yaşıyor
CM13	A12	45 / K	Var	156	SSYE, KD, İD	CVID	c.326G>A, p.G109E, heterozigot	Yaşıyor
CM14	A13	47 / E	Yok	324	SSYE, KD, İD	CVID	c.208C>T, p.R70W, heterozigot	Yaşıyor

Kısaltmalar: ALPS: Autoimmune lymphoproliferative syndrome; CM: CTLA-4-mutant; CVID: Common variable immunodeficiency; E: Erkek; İD: İmmün-disregülasyon; K, Kadın; KD: Kronik diarreya; LP: Lenfoproliferasyon; SBY: Semptom başlangıç yaşı; SSYE: Sık solunum yolu enfeksiyonu

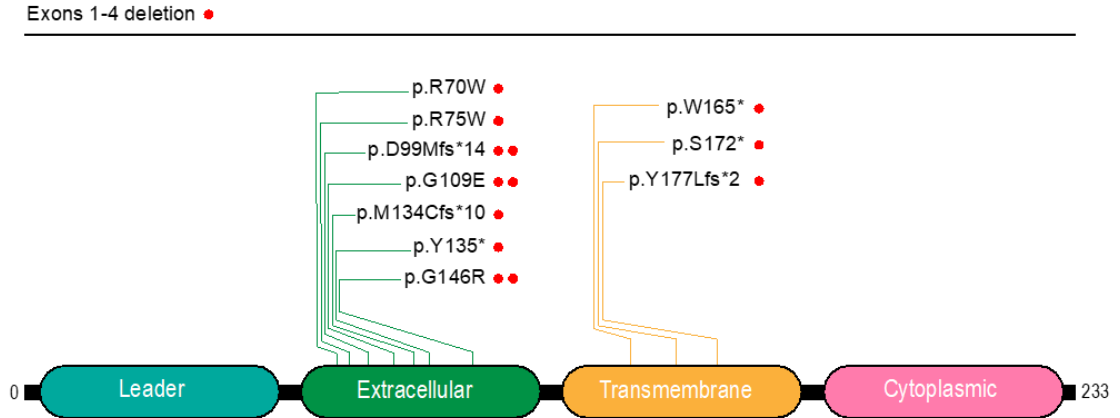
(A)

LRBA protein domainleri



(B)

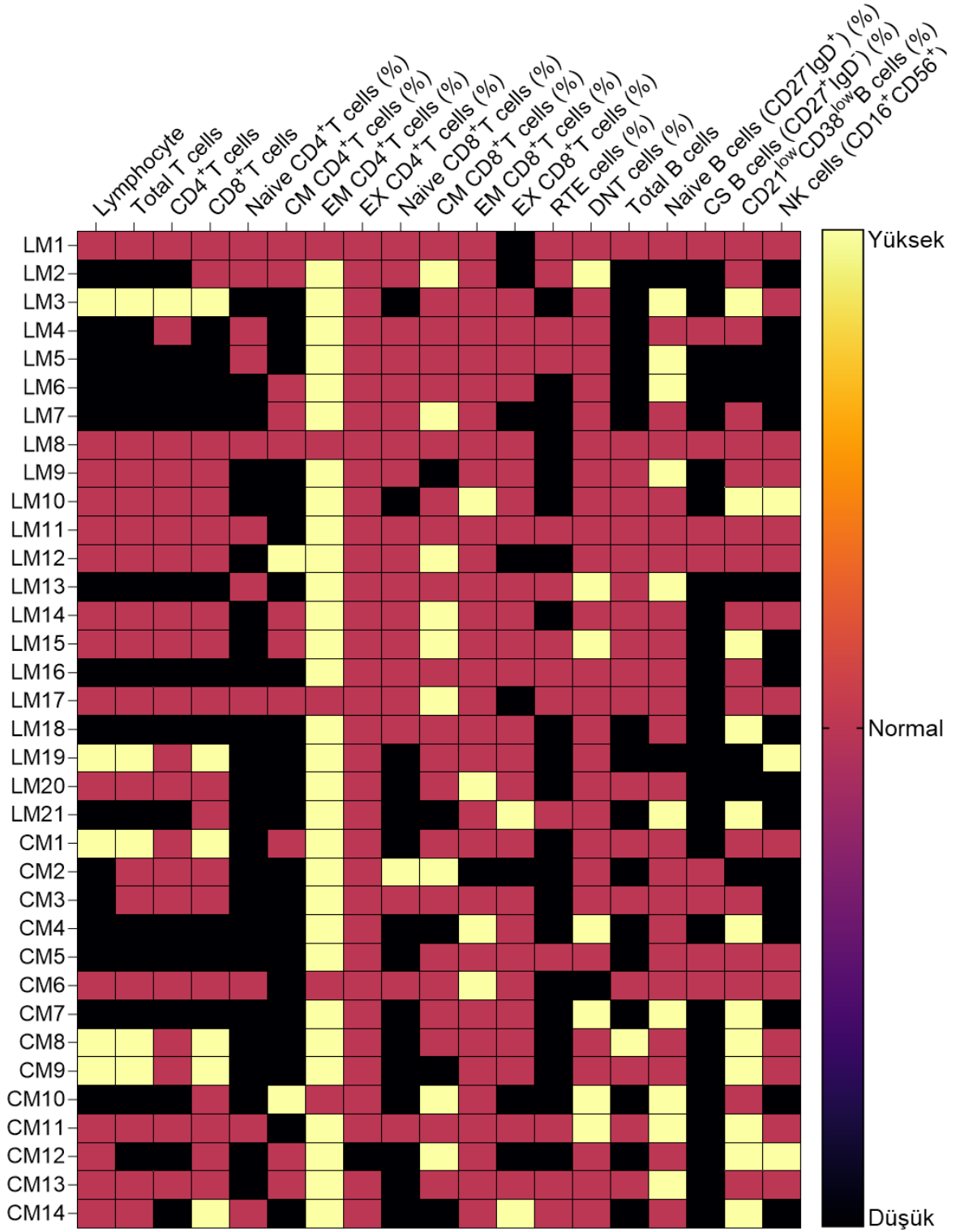
CTLA-4 protein domainleri



Şekil 2. A) LRBA proteininin yapısı ve hastalarda görülen mutasyonlar. **B)** CTLA4 proteininin yapısı ve hastalarda görülen mutasyonlar.

6.2. LRBA ve CTLA4 Eksikliğinde İmmün Fenotipleme Bulguları

Çalışmamızda tanı sırasında T, B, doğal öldürücü (NK), T hücresi ve B hücresi alt tiplerini içeren kapsamlı akış sitometrik analizi yapıldı ve iki hastalık arasında görülen bulgular karşılaştırıldı (Şekil 4). 9 (%42,9) LRBA eksikliği hastasının CD3⁺ T hücrelerinde azalma gözlenirken, 10 (%47,6) hastada normal, 2 (%9,5) hastada ise artmış bir değer vardı. CTLA4 eksikliğinde ise 6 (%42,9) hastanın değerinde azalma gözlenirken, 5 (%35,7) hastanın değeri normal, 3 (%21,4) hastada ise artmış bir değer vardı. Tanı sırasında T, B, doğal öldürücü (NK), T hücresi ve B hücresi alt tiplerini içeren kapsamlı akış sitometrik analizi yapıldı ve iki hastalık arasında karşılaştırıldı (Şekil 3). Her iki hastalıkta total B hücrelerinde, sınıf çevrimi yapmış hafıza B hücrelerinde ve NK hücrelerinde yaş uyumlu sağlıklı kontrole göre yapılan değerlendirmede düşüklük bulundu. Ayrıca CTLA-4 eksikliği olgularında LRBA eksikliği olgularına kıyasla anlamlı olarak daha düşük naif CD8⁺ T hücreleri (CD8⁺CD45RA⁺CCR7⁺) gözlemlendi (p= 0,0005).



Şekil 3: LRBA ve CTLA4 eksikliği hastalarının tedavi öncesi detaylı immünolojik parametrelerinin ısı haritası. Mutlak sayılar toplam CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ T, B ve NK hücreleri için değerlendirilirken, diğerleri yüzdeye dayalıydı. Isı haritası, belirtilen parametreler için yaşa göre sağlıklı referans değerlerine göre hastaların hücre oranını yüksek, düşük veya normal değerler olarak gösterir. LM: LRBA eksikliği, CM: CTLA4 eksikliği.

6.3. Abatacept, Naif T Hücre Havuzunda Restorasyon ile Timik Çıktıyı Artırarak Hastaların T Hücre Yanıtlarını Tersine Çevirir

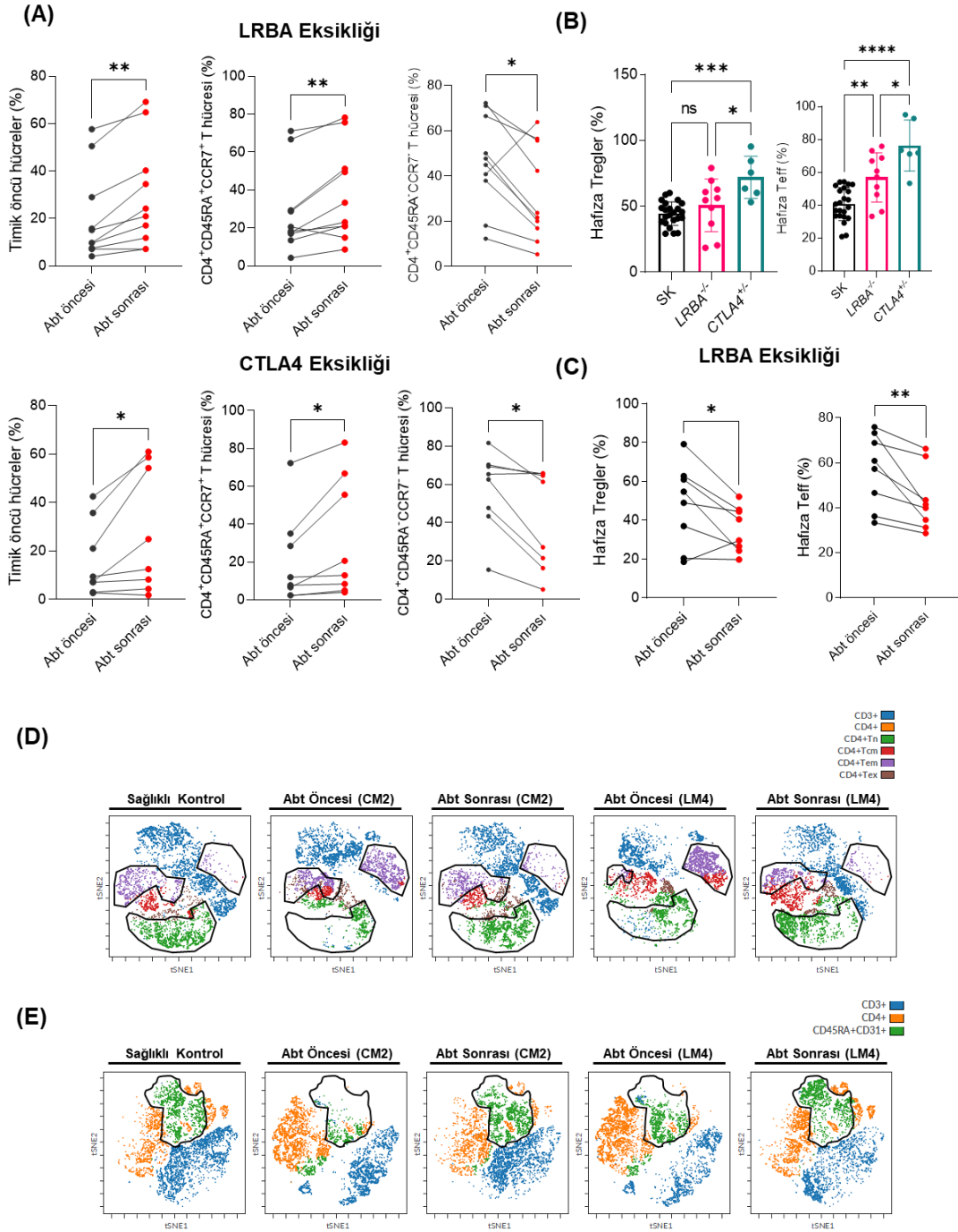
Tedavi öncesinde LRBA ve CTLA-4 eksikliği hastalarının naif CD4⁺ hücrelerinde düşüklük, hafıza CD4⁺ hücrelerinde ise artış gözlemlendi. Abatacept tedavisi sonrası ise naif CD4⁺ ile hafıza CD4⁺ hücrelerinin yanıtları tersine çevrildi. Timik öncü T hücreler tedavi sonrasında her iki hastalıkta da yükseldi (LRBA eks. için p=0,010, CTLA4 eks. için p=0,030) (**Şekil 4A**). Tedavi sonrası naif CD4⁺ hücreleri de hem LRBA eksikliği hem de CTLA4 eksikliği hastalarında anlamlı olarak artış gösterdi (LRBA eks. için p=0,03, CTLA4 eks. için p=0,03) (**Şekil 4A**). Hafıza CD4⁺ hücreleri incelendiğinde ise efektör hafıza hücreleri her iki hastalık grubunda da tedavi sonrasında anlamlı olarak düşüş gösterdi (LRBA eks. için p=0,03, CTLA4 eks. için p=0,01) (**Şekil 4A**). Hücrelerin dağılım şekilleri, fenotipik olarak benzer hücrelerin bir küme oluşturduğu 2 boyutlu bir görselleştirme sağlayan, yüksek boyutlu verileri (t-distributed stochastic neighbor embedding (t-SNE)) yönetmek için geliştirilen görselleştirme araçlarıyla da değerlendirildi. Analiz, LRBA ve CTLA4 eksikliğinde tedaviyle birlikte timik öncül hücrelerle birlikte naif hücrelerin artışı ve hafıza hücrelerinin düşüşünü açıkça ortaya koydu (**Şekil 4D, E**).

T efektör (CD4⁺CD25^{düş}CD127^{yük}) ve Treg (CD4⁺CD25^{yük}CD127^{düş}) hücrelerinin naif ve hafıza dönüşümleri de tedavi öncesi ve tedavi sonrasında değerlendirildi.

Tedavi öncesinde her iki hastalık grubunda da sağlıklı kontrollere kıyasla naif T efektör hücreleri daha düşük olarak gözlemlendi (LRBA eks. için p= 0,0037; CTLA4 eks. için p < 0,0001). Ayrıca CTLA4 eksikliği hastaları LRBA eksikliği hastalarına göre de daha az naif T efektör hücrelerine sahipti (p= 0.01). Naif T efektör hücrelerin düşük olmasının sonucunda hafıza T efektör hücreler de her iki hastalık grubunda da sağlıklı kontrollere kıyasla anlamlı olarak yüksek bulundu (LRBA eks. için p= 0,0035; CTLA4 eks. için p < 0,0001). Ayrıca CTLA4 eksikliği hastaları LRBA eksikliği hastalarına kıyasla anlamlı olarak daha yüksek hafıza T efektör hücrelerine sahipti (p=0.01) (**Şekil 4B**). Tedavi sonrasında ise LRBA eksikliği hastalarında naif T efektör hücreler anlamlı olarak artış gösterirken hafıza hücreleri ise anlamlı olarak düşüş gösterdi (p= 0,005, p= 0,009 sırasıyla) (**Şekil 4C**).

Tedavi öncesinde CTLA4 eksikliği hastalarında sağlıklı kontrollere ve LRBA eksikliği hastalarına kıyasla naif Treg hücreleri daha düşük olarak gözlemlendi (p= 0,0002, p= 0,01 sırasıyla). Fakat LRBA eksikliği hastalarının naif Treg hücrelerinde ise sağlıklı kontrollere

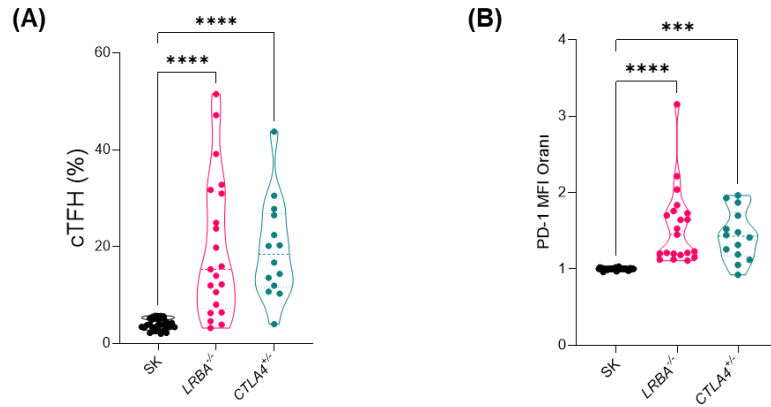
kıyasla anlamlı bir fark gözlemlenmedi ($p= 0.42$). Naif Treg hücrelerin düşük olmasının sonucunda hafıza T efektör hücreler de CTLA4 eksikliği hastaların da sağlıklı kontrollere ve LRBA eksikliği hastalarına kıyasla anlamlı olarak yüksek bulundu ($p= 0,0002$, $p= 0,01$ sırasıyla) (Şekil 4B). Bununla birlikte LRBA eksikliği hastaları ile sağlıklı kontrollerin hafıza Treg hücreleri arasında anlamlı bir fark gözlemlenmedi ($p=0.43$). Tedavi sonrasında ise LRBA eksikliği hastalarında naif Treg hücreler anlamlı olarak artış gösterirken hafıza hücreleriye anlamlı olarak düşüş gösterdi ($p=0,03$, $p=0,040$ sırasıyla) (Şekil 4C)

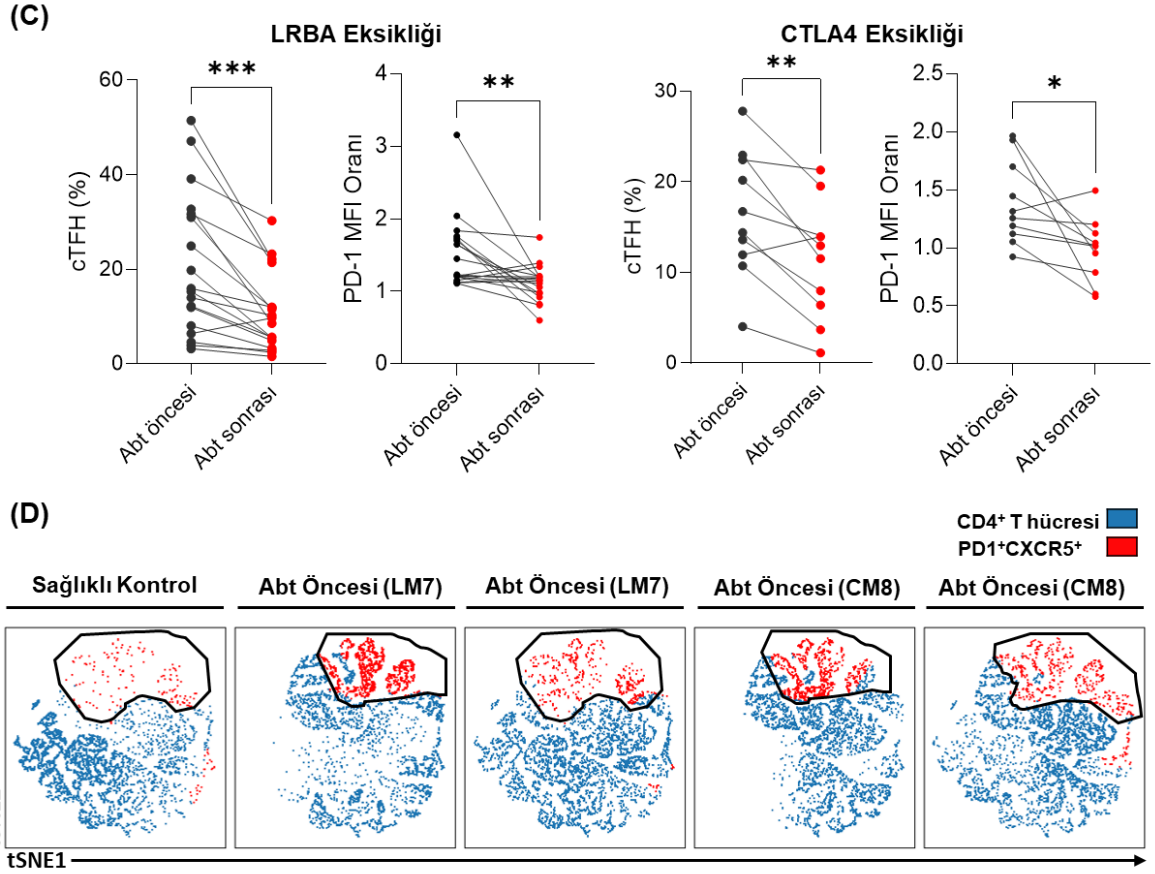


Şekil 4: **A)** LRBA (n: 10) ve CTLA4 (n: 8) eksikliği hastalarının; timik öncü hücreleri, $CD4^+CD45RA^+CCR7^+$ naive T hücreleri ve $CD4^+CD45RA^-CCR7^-$ efektör T hücrelerinin tedavi öncesi ve tedavi sonrasındaki istatistiksel karşılaştırmaları. **B)** LRBA (n: 10) ve CTLA4 (n: 6) eksikliği hastalarının hafıza Treg ve Teff hücrelerinin sağlıklı kontrollerle istatistiksel karşılaştırması **C)** LRBA eksikliği (n: 8) hastalarının tedavi öncesi ve sonrasındaki hafıza Treg ve Teff hücrelerinin istatistiksel karşılaştırılması **D)** Hastaların ve sağlıklı kontrollerin $CD4^+$ T-hücresi alt kümelerinin temsili t-dağılımlı stokastik komşu yerleştirme (t-SNE) görselleştirmesi **E)** Hastaların ve sağlıklı kontrolün timik öncü hücrelerinin temsili t-dağılımlı stokastik komşu yerleştirme (t-SNE) görselleştirmesi. Naif $CD4^+$ T hücreleri ($CD4^+$ Tn, $CD45RA^+CCR7^+$), merkezi bellek $CD4^+$ T hücreleri ($CD4^+$ Tcm, $CD45RA^-CCR7^+$), $CD4^+$ efektör bellek T hücreleri ($CD4^+$ Tem, $CD45RA^-CCR7^-$), $CD4^+$ terminal olarak farklılaşmış efektör bellek T hücreleri ($CD4^+$ Tex, $CD45RA^+CCR7^-$). Görsel üzerinde ilgili parametreler kapılanarak gösterilmiştir. ****p<0,0001, ***p<0,001**p<0,01, *p<0,05, 1-way ANOVA with Tukey post-test ve paired 2-tailed test.

6.4. Abatacept Her İki Hastalıkta Da Artan cT_{FH} Hücrelerinin Azalmasına Yol Açar

CTLA4 proteini, cT_{FH} hücrelerini kontrol etmek için önemli olduğundan(Alroqi ve ark., 2018), her iki hastalıkta da cT_{FH} sıklığını değerlendirdik. Sağlıklı kontrollere kıyasla LRBA ve CTLA4 eksikliği hastalarının cT_{FH} hücrelerinin başlangıç yüzdesi daha yüksek bulundu (sırasıyla p<0,0001; p=0,0009) (**Şekil 5A**). Ayrıca, hastaların cT_{FH} hücreleri sırasıyla, sağlıklı kontrollere kıyasla artmış programlanmış hücre ölümü-1 (PD-1) ekspresyonu ile daha fazla aktivasyon sergilemekteydi (sırasıyla p <0,0001; p <0,0001) (**Şekil 5B**). Abatacept tedavisinin hastaların cT_{FH} hücreleri değerlendirildi. Her iki hastalıkta da cT_{FH} hücre yüzdesinde anlamlı olarak düşüş görüldü (LRBA eks. için p= 0,0002; CTLA4 eks. için p= 0,002). cT_{FH} hücre yüzdesinin azalmasıyla birlikte PD-1 ekspresyonu da her iki hastalıkta anlamlı olarak düşüş gösterdi (LRBA eks. için p= 0,005; CTLA4 eks. için p= 0,02) ((**Şekil 5C, D**). Semptomların azalmasıyla birlikte T_{FH} değerlerinin azalması bu hücre popülasyonun hastalık seyrini değerlendirmede önemli olduğunu ortaya koymaktadır.



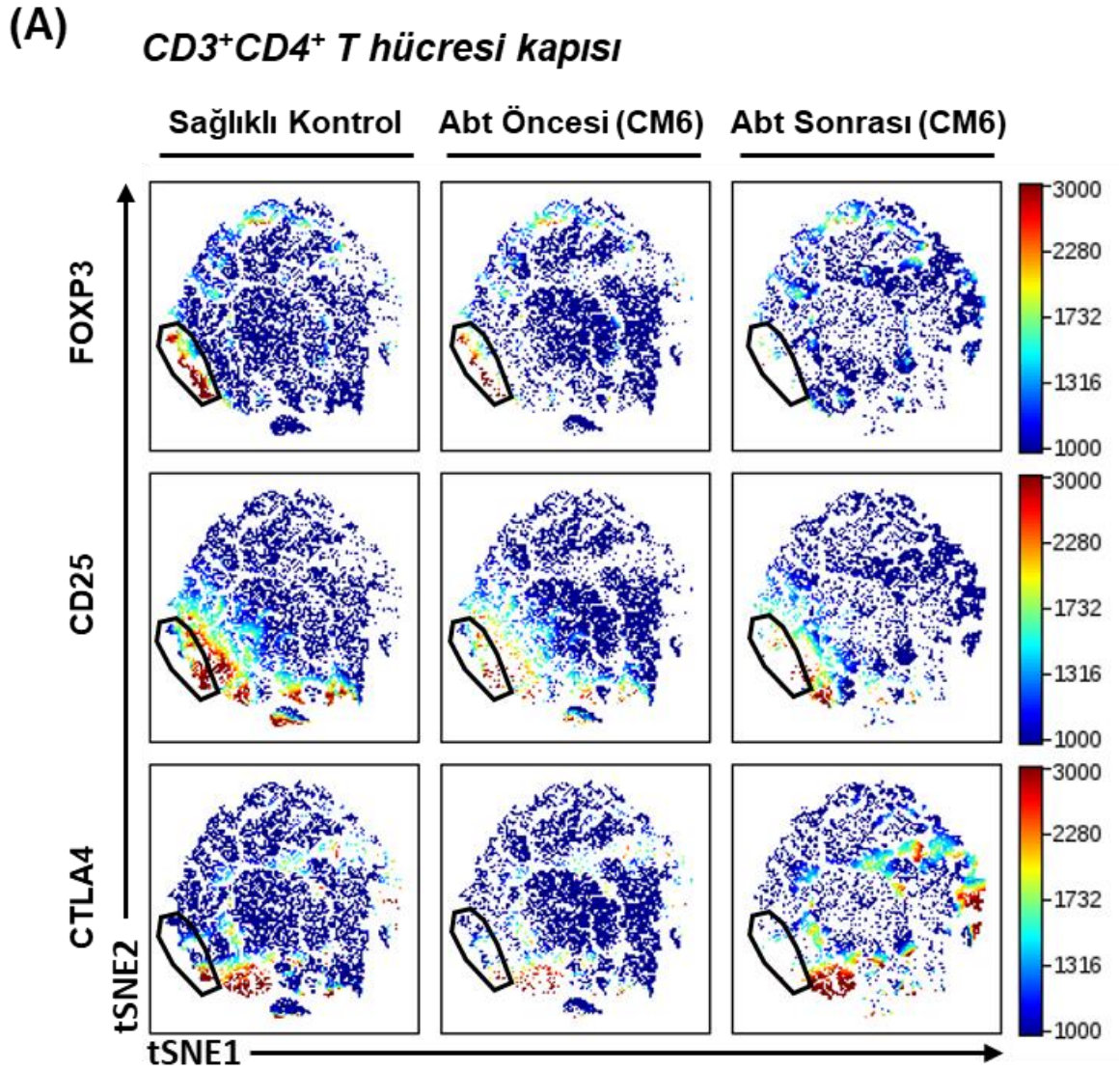


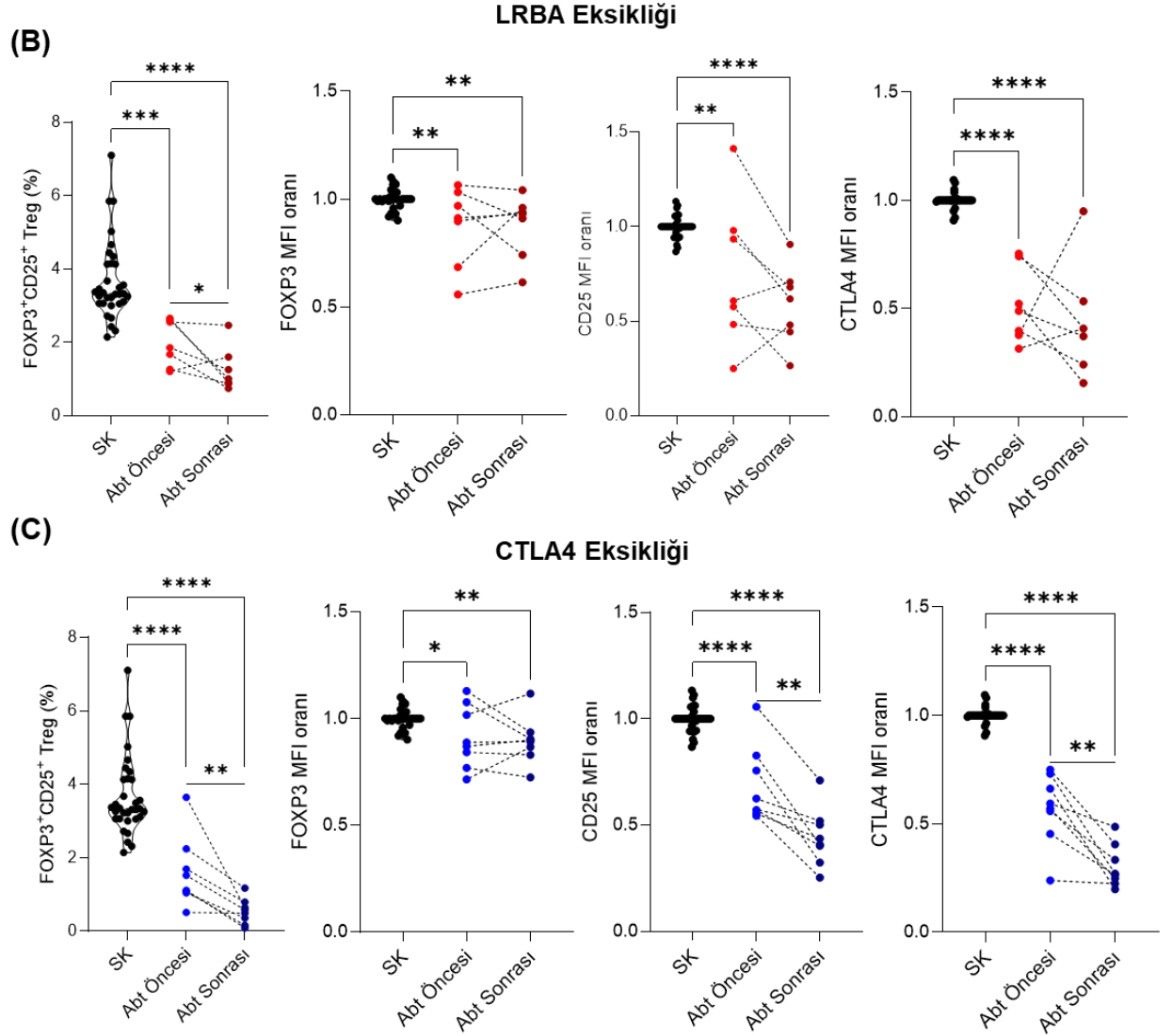
Şekil 5. A) Abatacept tedavisi öncesi LRBA (n: 21) ve CTLA-4 (n: 14) eksikliği hastalarıyla yaş uyumlu sağlıklı kontrollerin (n: 32) cTFH yüzdeleri. **B)** Abatacept öncesi hastaların cTFH hücrelerinde PD-1 ifadesi. **C)** LRBA (n:18) ve CTLA4 (n:10) eksikliği olan hastalarda abatacept öncesi ve sonrası cTFH yüzdeleri. **D)** Hastaların ve yaş uyumlu sağlıklı kontrol cTFH'sinin temsili t-dağıtılmış stokastik komşu yerleştirme (t-SNE) görselleştirilmesi. cTFH: Dolaşımdaki T foliküler yardımcı hücre, PD-1: Programmed cell death protein 1, SK: Sağlıklı Kontrol, LRBA^{-/-}: LRBA eksikliği, CTLA4^{+/-}: CTLA4 eksikliği, MFI: Mean fluorescence intensity (Ortalama Floresan Yoğunluğu). Görsel üzerinde ilgili parametreler kapılanarak gösterilmiştir. ****p<0.0001, ***p<0.001, **p<0.01, *p<0.05. 1-way ANOVA with Tukey post-test ve paired 2-tailed test.

6.5 Abatacept Tedavisi Her İki Hastalıkta Treg Hücrelerinin Oranlarını Baskılar

Abatacept tedavisinin öncesinde ve sonrasında hastalarda ve sağlıklı kontrollerde CD3⁺ CD4⁺ T hücrelerinde kapılanarak CD25⁺ FOXP3⁺ Treg hücrelerinin yüzdesi değerlendirildi. Tedavi öncesinde, sağlıklı kontrollere kıyaslandığında LRBA ve CTLA4 eksikliği hastalarında CD25⁺ FOXP3⁺ Treg hücreleri anlamlı olarak düşük saptandı (LRBA eksikliği için p= 0,0012; CTLA4 eksikliği için p <0,0001) ve tedaviyle birlikte CD25⁺ FOXP3⁺ Treg hücrelerinin daha da düştüğü tespit edildi (LRBA eksikliği için p<0,0001; CTLA4 eksikliği için p <0,0001). LRBA ve CTLA4 eksikliği hastalarının CD25⁺ FOXP3⁺ Treg hücreleri tedavi öncesi ve sonrası kıyaslandığında tedavi sonrasında anlamlı olarak düşüş gözlemlendi (LRBA eksikliği için p<0,03; CTLA4 eksikliği için p <0,009). Ek olarak tedavi öncesi ve sonrasında olguların CD4⁺FOXP3⁺ Treg hücrelerindeki FOXP3, CD25 ve CTLA-4 ifadeleri değerlendirildi. LRBA

eksikliği olgularında hem tedavi öncesi hem de tedavi sonrasında bu proteinlerin ifadesi sağlıklı kontrollere göre düşük saptandı (sırasıyla, FOXP3: $p=0,007$; $p=0,009$, CD25: $p=0,002$; $p<0,0001$, CTLA-4: $p<0,0001$; $p<0,0001$). Protein ifadeleri tedavi öncesi ve sonrası karıştırıldığı zaman anlamlı bir fark gözlemlenmedi. CTLA4 eksikliği olguları incelendiğinde de LRBA eksikliğine olgularındakine benzer olarak hem tedavi öncesinde hem de tedavi sonrasında sağlıklı kontrollerle kıyaslandığında FOXP3, CD25 ve CTLA-4 ifadeleri anlamlı olarak düşük tespit edildi (sırasıyla, FOXP3: $p=0,02$; $p=0,006$, CD25: $p<0,0001$; $p<0,0001$, CTLA-4: $p<0,0001$; $p<0,0001$). Tedavi öncesi ve sonrasındaki protein ifadeleri değerlendirildiğinde tedavi sonrasındaki CD25 ve CTLA-4 ifadeleri tedavi öncesine kıyasla anlamlı olarak düşük bulundu (sırasıyla $p=0,002$, $p=0,002$) (Şekil 6A-C).

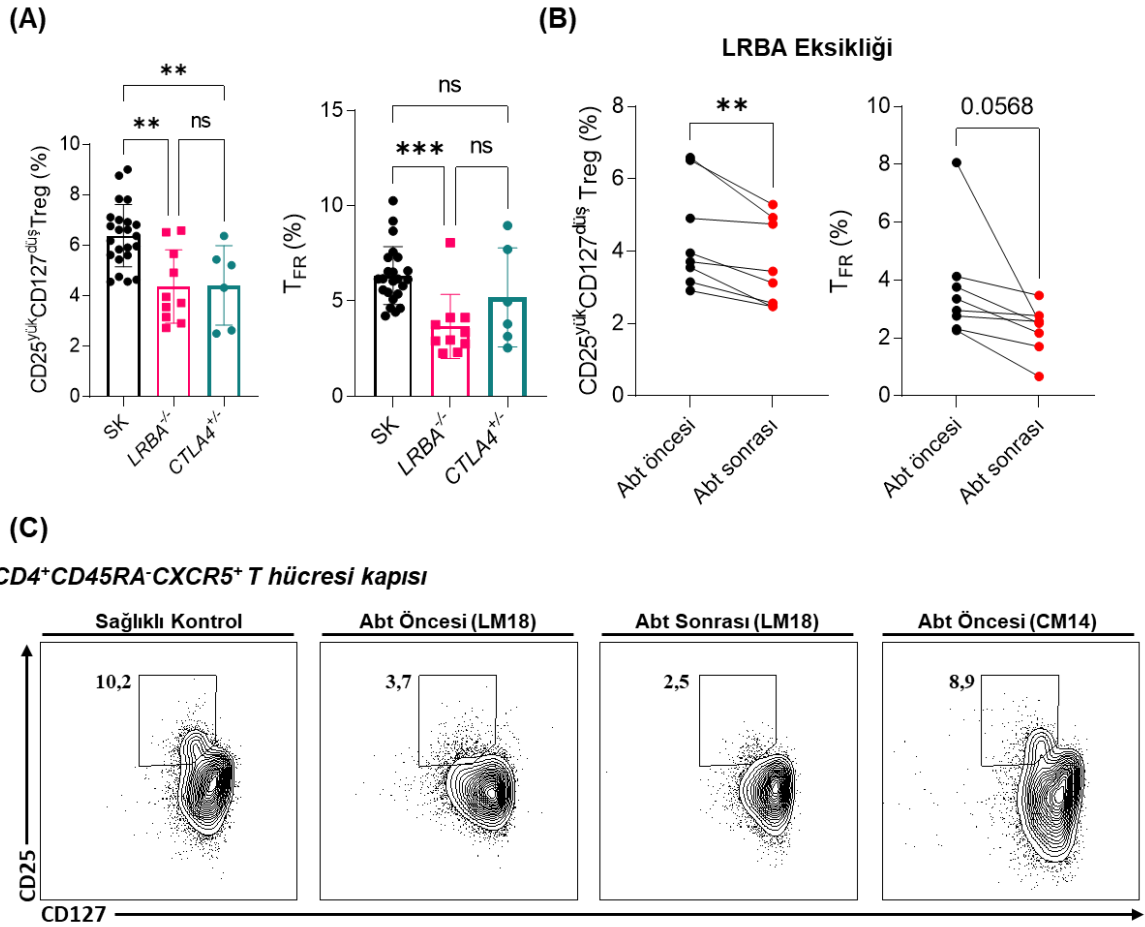




Şekil 6: A) Hastaların ve sağlıklı kontrollerin CD4⁺FOXP3⁺CD25⁺CTLA4⁺ Treg hücrelerinin Temsili t-dağıtılmış stokastik komşu yerleştirme (t-SNE) z-kanalı görselleştirilmesi. Yüksek ekspresyon (kapılanmış alan), CD3⁺ CD4⁺ T hücreleri içindeki FOXP3, CD25 ve CTLA4 seviyelerini gösterir. **B)** LRBA eksikliği (n: 7) hastalarının abatacept tedavisi öncesinde ve sonrasında ve yaşa uygun sağlıklı kontrollerde (n: 33) CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ Treg hücrelerinin yüzdeleri ve CD4⁺FOXP3⁺ Treg hücrelerindeki FOXP3, CD25 ve CTLA4 ifadesi **C)** CTLA-4 eksikliği (n: 8) hastalarının abatacept tedavisi öncesinde ve sonrasında ve yaşa uygun sağlıklı kontrollerde (n: 33) CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ Treg hücrelerinin yüzdeleri ve CD4⁺FOXP3⁺ Treg hücrelerindeki FOXP3, CD25 ve CTLA4 ifadesi. SK: Sağlıklı Kontrol, *LRBA*^{-/-}: LRBA eksikliği, *CTLA4*^{+/-}: CTLA4 eksikliği, MFI: Mean fluorescence intensity (Ortalama Floresan Yoğunluğu). Görsel üzerinde ilgili parametreler kapılanarak gösterilmiştir. ****p<0,0001, ***p<0,001 **p<0,01, *p<0,05. 1-way ANOVA with Tukey post-test ve paired 2-tailed t-test.

Ayrıca tedavi öncesinde ve sonrasında hastalarda ve sağlıklı kontrollerde CD4⁺ T hücrelerinde kapılanarak CD25^{yük} CD127^{düş} Treg hücrelerinin yüzdesi ve CD4⁺CXCR5⁺CD45RA⁻ hücrelerinden kapılanarak CD25^{yük} CD127^{düş} T foliküler regülatuar (T_{FR}) hücreler değerlendirildi. Tedavi öncesinde, sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında her iki hastalıkta da CD25^{yük} CD127^{düş} Treg hücreleri anlamlı olarak düşük saptandı (LRBA eksikliği için p= 0.001;

CTLA4 eksikliği için $p=0,008$). Tedavi sonrasında ise LRBA eksikliği hastalarının $CD25^{yük}$ $CD127^{düş}$ Treg hücrelerinde anlamlı bir düşüş gözlemlendi ($p=0,0036$) (Şekil 7A, B). T_{FR} hücreler değerlendirildiğinde de LRBA eksikliği hastalarında sağlıklı kontrollere kıyasla anlamlı olarak daha düşük değerlendirildi ($p=0,0003$). CTLA4 eksikliği hastalarındaysa sağlıklı kontrollere kıyasla anlamlı bir fark mevcut değildi ($p=0,36$). Tedavi sonrasındaysa T_{FR} hücreleri LRBA eksikliği hastalarında her ne kadar düşüş trendinde olsalarda anlamlı bir fark gözlemlenmedi ($p=0,056$) (Şekil 7A-C).



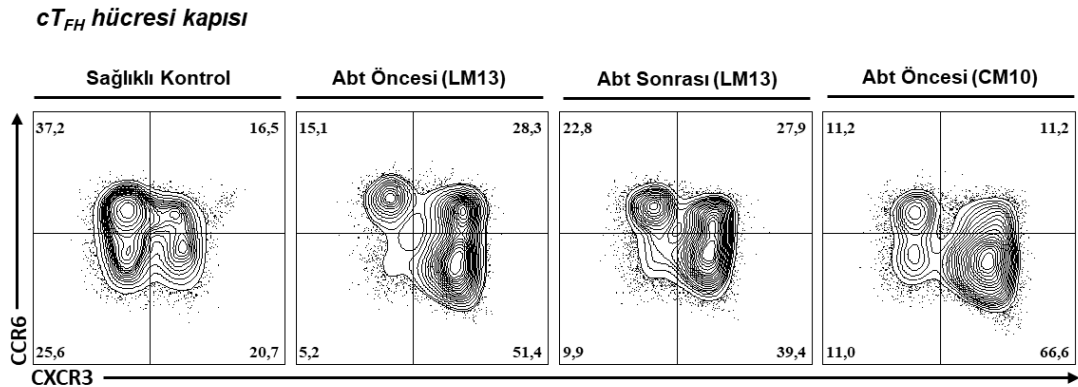
Şekil 7: A) Hastaların ve sağlıklı kontrollerin T_{FR} hücrelerinin kontur grafiği B) LRBA (n: 10), CTLA-4 (n: 6) eksikliği hastalarının abatacept tedavisi öncesinde yaşa uygun sağlıklı kontrollerle $CD4^{+}CD25^{yük}CD127^{düş}$ Treg ve T_{FR} hücrelerinin yüzdeleri. C) LRBA eksikliği (n:8) hastalarının abatacept tedavi öncesi ve sonrasındaki $CD4^{+}CD25^{yük}CD127^{düş}$ Treg ve T_{FR} hücrelerinin yüzdeleri. LRBA^{-/-}: LRBA eksikliği, CTLA4^{+/-}: CTLA4 eksikliği, SK: Sağlıklı kontrol **** $p < 0.0001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$. 1-way ANOVA with Tukey post-test ve paired 2-tailed t-test.

6.6. Her İki Hastalıkta Da Artan T_H1 ve Azalan T_H17 Yanıtı Tedavi Sonrasında Kontrol Altına Alındı

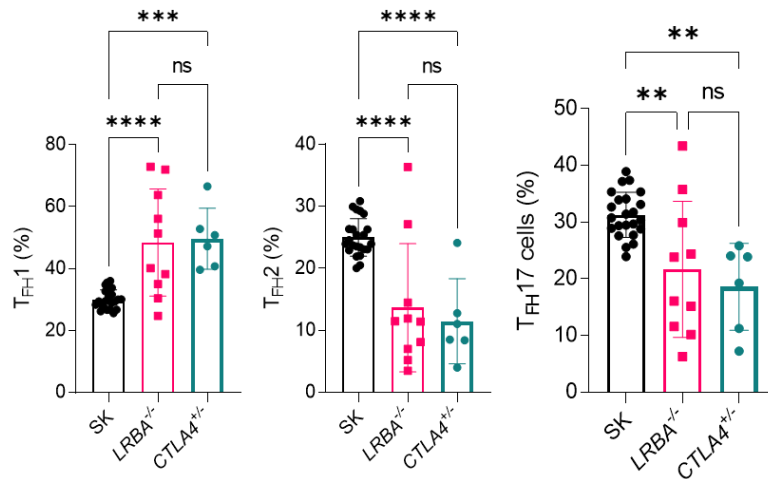
Abatacept tedavisinin öncesinde ve sonrasında her iki hastalık grubunda T foliküler yardımcı düzenleyici hücreler (cT_{FH} , $CD4+CXCR5+CD45RA^-$), cT_{FH} olmayan bellek T-yardımcı hücreler ($CD4+CXCR5-CD45RA^-$) ve bellek Treg ($CD25^{yük}CD127^{düş}CD45RA^-$) hücreler dahil olmak üzere dolaşımdaki T yardımcı hücre alt tiplerinin T_H1 ($CXCR3^+CCR6^-$), T_H2 ($CXCR3^-CCR6^-$) ve T_H17 ($CXCR3^-CCR6^+$) yanıtlarını araştırdık.

cT_{FH} hücreleri incelendiğinde her iki hastalıkta da tedavi öncesinde artan T_H1 , azalan T_H2 ve T_H17 yanıtı gözlemlendi. (LRBA eks. için $p < 0,0001$, $p < 0,0001$, $p = 0,0039$; CTLA4 eks. için $p = 0,0003$, $p < 0,0001$, $p = 0,0016$ sırasıyla). Tedavi sonrasında ise LRBA eksikliği hastalarındaki artmış T_H1 yanıtı anlamlı olarak azalırken, azalmış T_H17 ise anlamlı olarak yükseldi (sırasıyla: $p = 0,0002$, $p = 0,0003$). T_H2 yanıtındaysa herhangi bir anlamlı farklılık gözlemlenmedi (Şekil 8A-C).

(A)

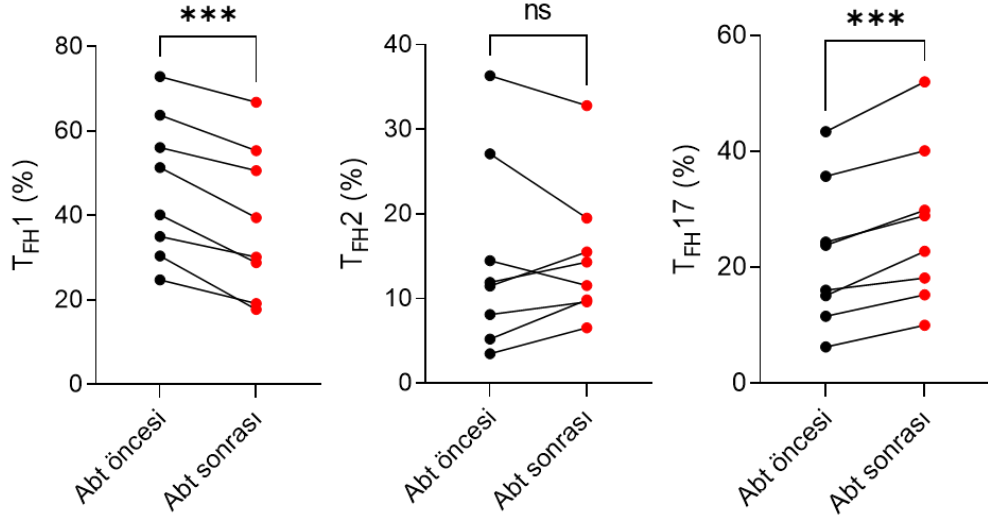


(B)



(C)

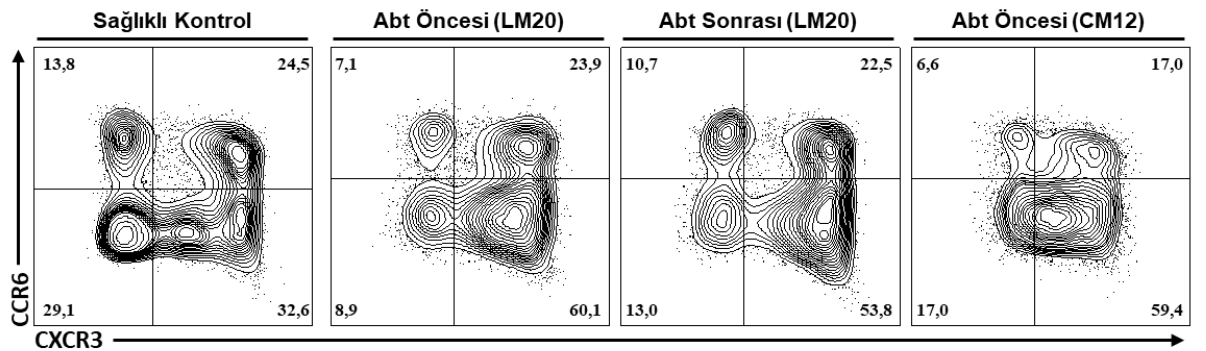
LRBA Eksikliği

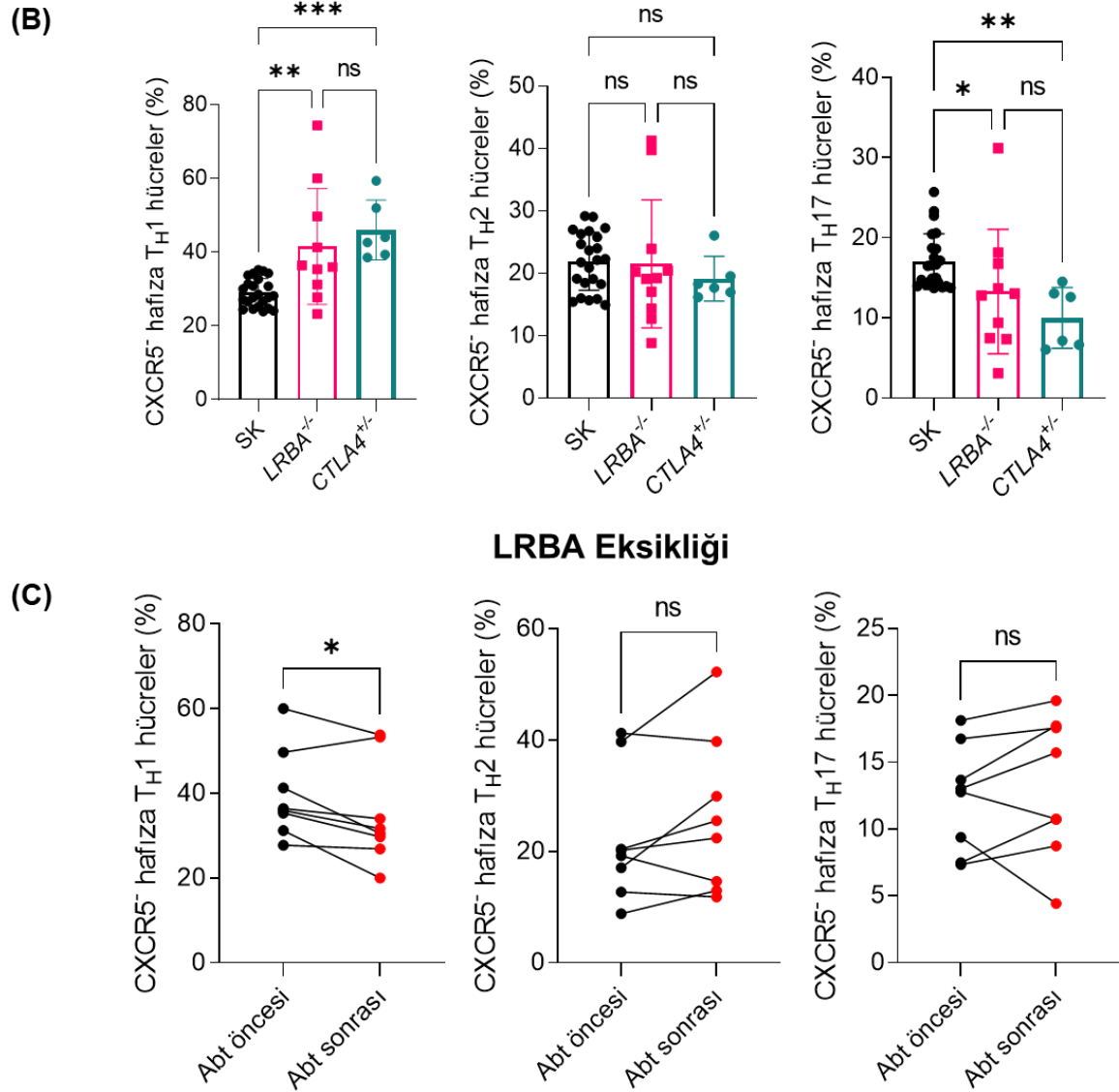


Şekil 8: A) Hastaların ve sağlıklı kontrollerin T_{FH} hücrelerinin alt tiplerinin kontur grafiği **B)** LRBA (n: 10), CTLA-4 (n: 6) eksikliği hastalarının abatacept tedavisi öncesinde yaşa uygun sağlıklı kontrollerle T_{FH1} , T_{FH2} ve T_{FH17} hücrelerinin yüzdeleri. **C)** LRBA eksikliği (n:8) hastalarının abatacept öncesi ve sonrasındaki T_{FH1} , T_{FH2} ve T_{FH17} hücrelerinin yüzdeleri. *LRBA^{-/-}*: LRBA eksikliği, *CTLA4^{+/-}*: CTLA4 eksikliği, SK: Sağlıklı kontrol, ns: non-significant, ****p<0.0001, **p<.01. 1-way ANOVA with Tukey post-test ve paired 2-tailed t-test.

cTFH olmayan bellek T-yardımcı hücreleri değerlendirildiğinde sağlıklı kontrollerle kıyaslandığı zaman her iki hastalık grubunda T_{H1} yanıtlarında artış T_{H17} yanıtlarında ise azalış gözlemlendi (LRBA eks. için p= 0,002, p= 0,04; CTLA4 eks. için p= 0,0006, p= 0,0026 sırasıyla). T_{H2} yanıtlarında ise sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığı zaman herhangi bir anlamlı fark gözlemlenmedi. Abatacept tedavisiyle birlikte artan T_{H1} yanıtında anlamlı bir düşüş gözlemlendi fakat T_{H2} ve T_{H17} yanıtlarında ise anlamlı bir değişiklik gözlemlenmedi (p= 0,03 sırasıyla) (Şekil 9A-C).

(A)

CXCR5⁺ hafıza yardımcı T hücresi kapısı



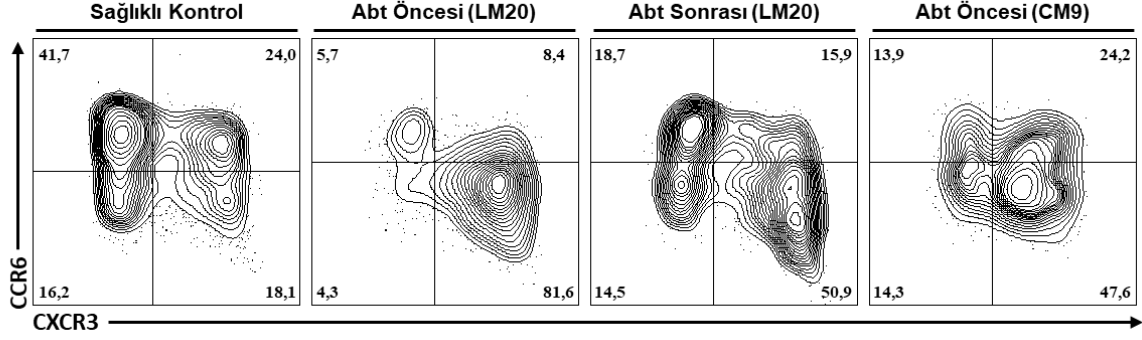
Şekil 9: A) Hastaların ve sağlıklı kontrollerin kontrollerle CXCR5⁺ hafıza T_H hücrelerinin alt tiplerinin kontur grafiği **B)** LRBA (n: 10), CTLA-4 (n: 6) eksikliği hastalarının abatacept tedavisi öncesinde yaşa uygun sağlıklı kontrollerle CXCR5⁺ hafıza T_H1, T_H2 ve T_H17 hücrelerinin yüzdeleri. **C)** LRBA eksikliği (n:8) hastalarının abatacept öncesi ve sonrasındaki CXCR5⁺ hafıza T_H1, T_H2 ve T_H17 hücrelerinin yüzdeleri. LRBA^{-/-}: LRBA eksikliği, CTLA4^{+/-}: CTLA4 eksikliği, SK: Sağlıklı kontrol, ns: non-significant, ***p<0.001, **p<0.01, *p<0.05. 1-way ANOVA with Tukey post-test ve paired 2-tailed t-test.

Bellek Treg hücrelerinde de cT_{FH} hücrelerinin yanıtlarına benzer olarak her iki hastalıkta da sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığı zaman artan T_H1 ve azalan T_H17 yanıtı gözlemlendi (LRBA eks. için p=0,0004, p< 0,0001; CTLA4 eks. için p=0,0009, p=0,0001). Bununla birlikte cT_{FH} hücrelerin fenotiplerinden farklı olarak LRBA eksikliği hastalarında bellek Treg hücreleri sağlıklı kontrollere ve CTLA4 eksikliği hastalarına nazaran anlamlı olarak daha fazla T_H2 fenotipi gösterdi (p= 0,03, p=0,04 sırasıyla). Tedavi sonrasında ise LRBA eksikliği hastalarında

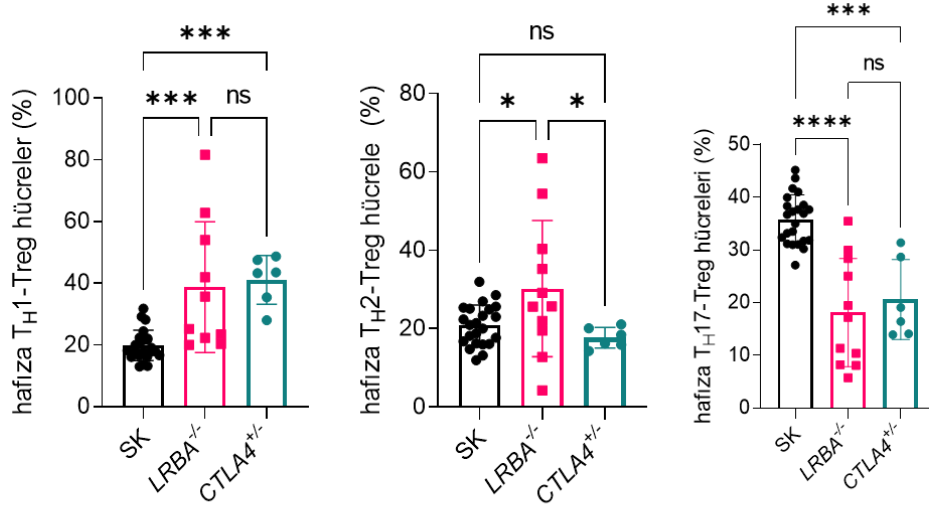
T_H1 yanıtı anlamlı olarak düşüş gösterirken, T_H17 yanıtı ise anlamlı olarak yükseldi ($p= 0,03$, $p= 0,003$ sırasıyla) (Şekil 10A-C).

(A)

Hafıza $CD25^{hi}CD127^{lo}$ Treg hücresi kapısı

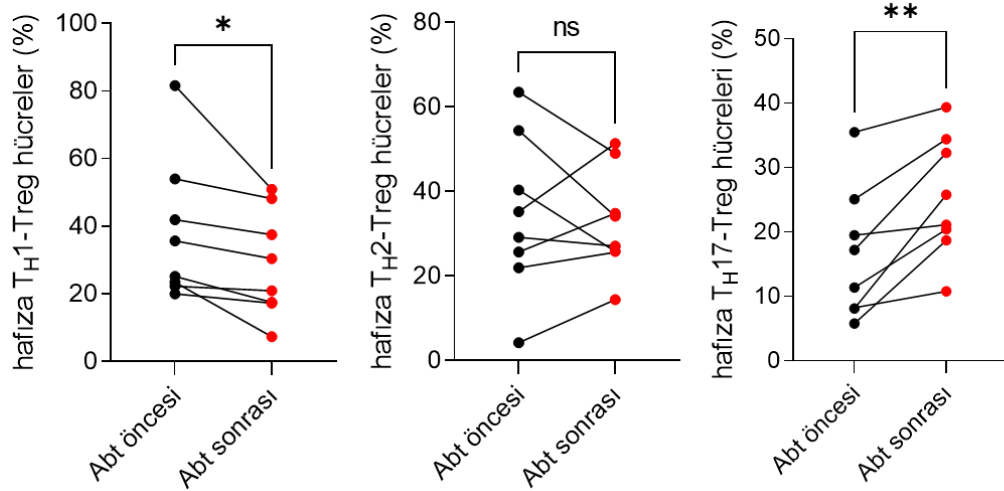


(B)



LRBA Eksikliği

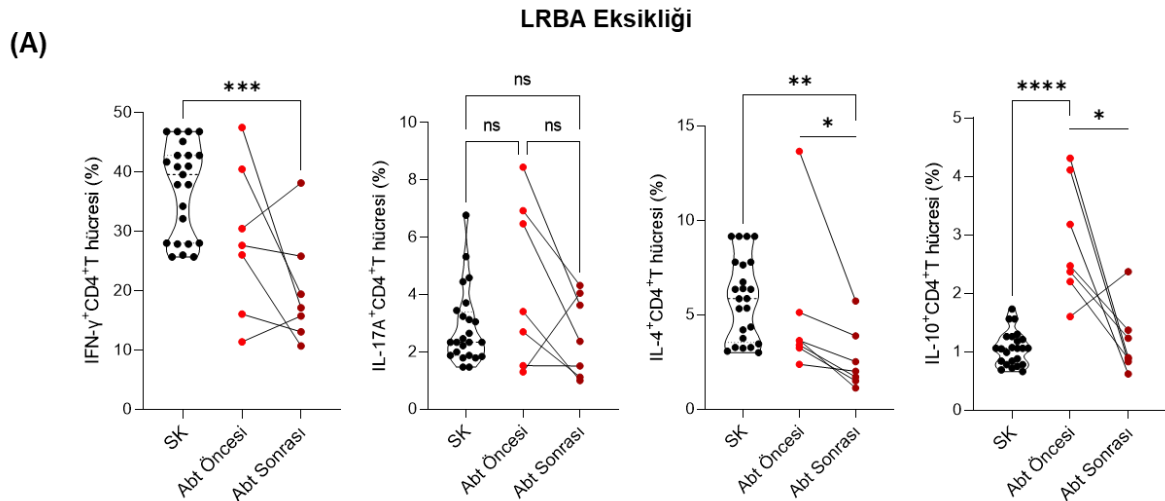
(C)

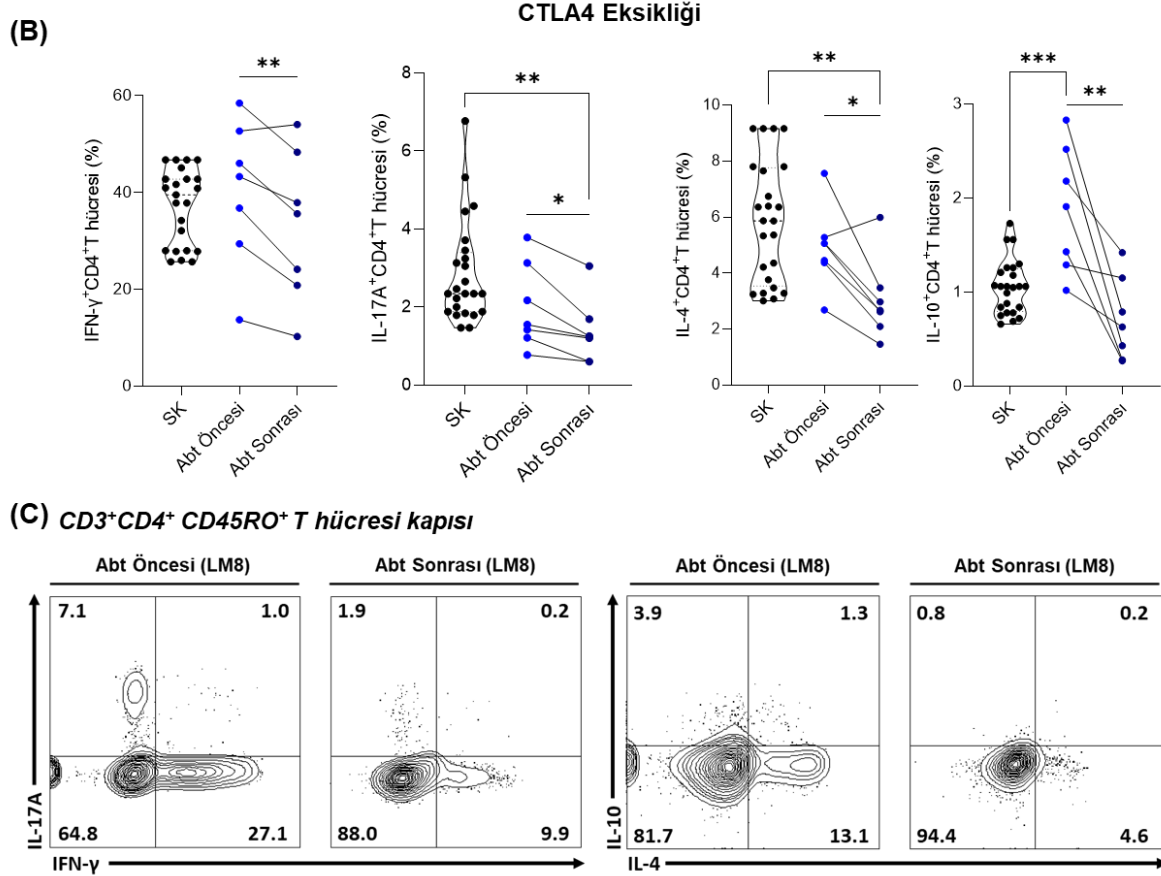


Şekil 10: A) Hastaların ve sağlıklı kontrollerin hafıza Treg hücrelerinin alt tiplerinin kontur grafiği **B)** LRBA (n: 10), CTLA-4 (n: 6) eksikliği hastalarının abatacept tedavisi öncesinde yaşa uygun sağlıklı kontrollerle hafıza T_H1, T_H2 ve T_H17-Treg hücrelerinin yüzdeleri. **C)** LRBA eksikliği (n:8) hastalarının abatacept öncesi ve sonrasındaki hafıza T_H1, T_H2 ve T_H17-Treg hücrelerinin yüzdeleri. *LRBA^{-/-}*: LRBA eksikliği, *CTLA4^{+/-}*: CTLA4 eksikliği, SK: Sağlıklı kontrol, ns: non-significant, ****p<0.0001, ***p<0.001, **p<.01, *p<.05. 1-way ANOVA with Tukey post-test ve paired 2-tailed t-test.

6.7. Abatacept Hastaların CD4⁺ T Hücrelerindeki Sitokin Üretimini Azaltır

Hedeflenmiş abatacept tedavisinin öncesinde ve sonrasında hastalarda ve sağlıklı kontrollerde CD3⁺CD4⁺CD45RO⁺ hücrelerindeki hücre içi Sitokin üretimi değerlendirildi. Tedavi öncesinde IL-4, IL-17A, IFN- γ sitokinlerinin üretiminde her iki hastalıkta sağlıklı kontrollere kıyaslandığında anlamlı bir fark gözlemlenmedi fakat LRBA ve CTLA4 eksikliğinin her ikisinde de tedavi öncesindeki IL-10 oranı sağlıklı kontrollerden yüksek olarak gözlemlendi ((LRBA eksikliği için p<0,0001; CTLA4 eksikliği için p =0,0001). Tedavi sonrasında ise LRBA eksikliğinde IL-4 ve IFN- γ üretimi sağlıklı kontrollere kıyasla daha düşük bulundu (p=0,004; p=0,003). Tedavi sonrasında CTLA4 eksikliğinde ise IL-4 ve IL-17A üretimi sağlıklı kontrollerden daha düşük gözlemlendi (p=0,0056; p=0,0039). LRBA ve CTLA4 eksikliği hastalarının sitokin üretimleri tedavi öncesi ve sonrasında kıyaslandığında her iki hastalık grubunda da IL-4 ve IL-10 üretiminde tedavi öncesine kıyasla anlamlı bir düşüş gözlemlendi (LRBA eksikliği için sırasıyla p=0,015; p=0,021; CTLA4 eksikliği için p=0,013; p=0,007). Tedavi öncesine kıyasla tedavi sonrasındaki IFN- γ ve IL-17A üretimindeki anlamlı düşüş ise sadece CTLA4 eksikliği hastalarında gözlemlendi (**Şekil 11A, B**). Hücre içi sitokin üretiminin değişimini gösteren kontur grafiği **Şekil 11C**'de gösterilmiştir.





Şekil 11: A) LRBA eksikliği hastalarının (n: 7) (abatacept tedavisi öncesinde ve sonrasında) ve yaş uyumlu sağlıklı kontrollerin (n: 24) $CD3^+CD4^+CD45RO^+$ hücrelerindeki IL-4, IL-10, IL-17A ve IFN- γ yüzdeleri. **B)** CTLA-4 eksikliği hastalarının (n:7) (abatacept tedavisi öncesinde ve sonrasında) ve yaş uyumlu sağlıklı kontrollerin (n:24) $CD3^+CD4^+CD45RO^+$ hücrelerindeki IL-4, IL-10, IL-17A ve IFN- γ yüzdeleri. **C)** Hastaların $CD3^+CD4^+CD45RO^+$ hücrelerindeki IL-4, IL-10, IL-17A ve IFN- γ pozitif hücrelerin kontör grafiği. SK: Sağlıklı kontrol. **** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, ns: Non-significant. 1-way ANOVA with Tukey post-test ve paired 2-tailed t-test

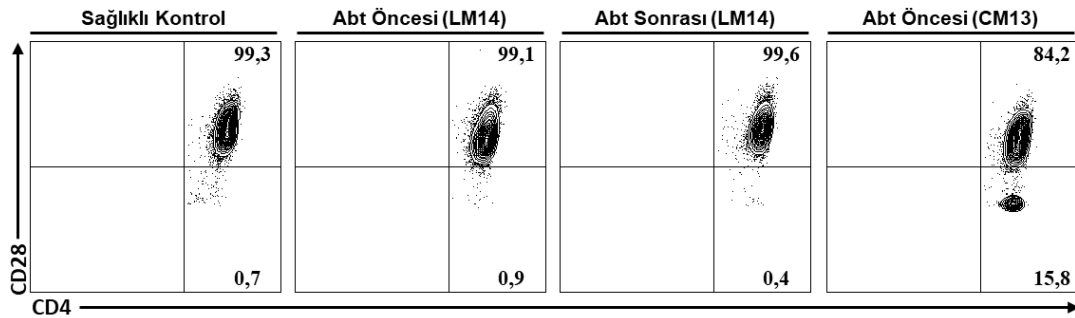
6.8. Abatacept Tedavisi Öncesindeki T Hücrelerindeki CD28 Düşüklüğü Ağırlıklı Olarak CTLA4 Eksikliği Hastalarında Gözlemlendi.

Abatacept tedavisinin öncesinde ve sonrasında $CD4^+$ ve $CD8^+$ T hücrelerindeki CD28 ifadesi değerlendirildi. Tedavi öncesinde CTLA4 eksikliği hastalarında $CD4^+CD28^-$ T hücreleri sağlıklı kontrollere ve LRBA eksikliği hastalarına kıyasla daha yüksek olarak gözlemlendi ($p=0,0013$, $p=0,02$ sırasıyla). LRBA eksikliği hastalarında ise sağlıklı kontrollere kıyasla anlamlı bir fark gözlemlenmedi ($p>0,9999$). CD28'in $CD4^+$ T hücrelerindeki ortalama florasan yoğunluğu (MFI) karşılaştırıldığı zaman ise gruplar arasında herhangi bir anlamlı farklılık saptanmadı. Tedavi öncesi ve sonrasında ise LRBA eksikliği hastalarında $CD4^+CD28^-$ T hücrelerinin yüzdesinde herhangi bir anlamlı farklılık gözlemlenmemesine karşın CD28'in $CD4^+$ T hücrelerindeki MFI değerlerinde ise anlamlı bir artış gözlemlendi ($p=0,020$) (Şekil

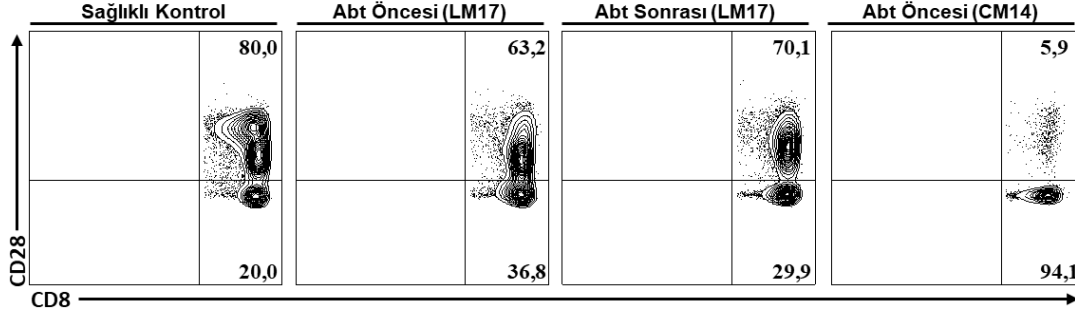
12A-C). CD8⁺ T hücreleri dikkate alındığı zaman hem LRBA hem de CTLA4 eksikliği hastalarında CD8⁺CD28⁻ T hücreleri sağlıklı kontrollere kıyasla daha yüksek bulundu (sırasıyla, p=0,040 ve p<0,0001). CD8⁺ T hücrelerindeki CD28 MFI değerlendirildiğinde de her iki hastalık grubunun CD28 MFI değerleri sağlıklı kontrollere kıyasla daha düşük bulundu (sırasıyla, p=0,02; p<0,0001). Ayrıca CTLA4 eksikliği hastalarının CD8⁺ T hücrelerindeki CD28 MFI değerleri LRBA eksikliğine kıyasla da daha düşük gözlemlendi (p=0,004). Tedavi sonrasında CD8⁺CD28⁻ T hücrelerinin yüzdesi tedavi öncesine kıyasla düşme trendinde olmasına karşın anlamlı bir fark gözlemlenmedi (p=0,080). Fakat CD8⁺ T hücrelerindeki CD28 MFI değerlerinde tedavi öncesine göre anlamlı bir artış gözlemlendi. (p= 0,02) (Şekil 12A-C).

(A)

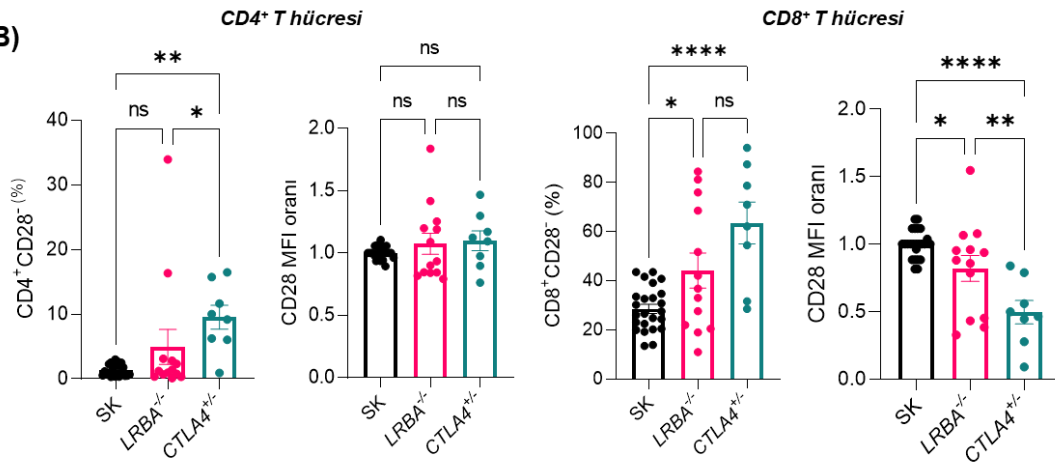
CD3⁺CD4⁺ T hücresi kapısı



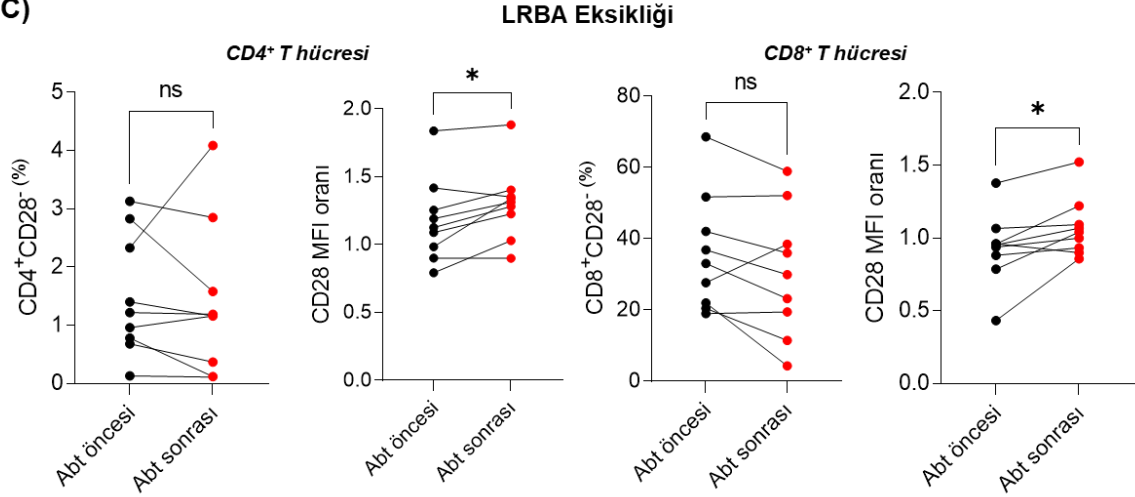
CD3⁺CD8⁺ T hücresi kapısı



(B)



(C)



Şekil 12: A) Hastaların ve sağlıklı kontrollerin CD4⁺CD28⁺, CD4⁺CD28⁻ hücreleri (üst panel) ile CD8⁺CD28⁺, CD8⁺CD28⁻ hücrelerinin (alt panel) kontur grafiği **B)** LRBA (n: 13), CTLA-4 (n: 8) eksikliği hastalarının abatacept tedavisi öncesinde yaşa uygun sağlıklı kontrollerle CD4⁺CD28⁻, CD8⁺CD28⁻ hücrelerinin yüzdeleri ve CD4⁺ T ve CD8⁺ T hücrelerindeki CD28 MFI değerleri. **C)** LRBA eksikliği (n:9) hastalarının abatacept öncesi ve sonrasındaki CD4⁺CD28⁻, CD8⁺CD28⁻ hücrelerinin yüzdeleri ve CD4⁺ T ve CD8⁺ T hücrelerindeki CD28 MFI değerleri. *LRBA^{-/-}*: LRBA eksikliği, *CTLA4^{+/-}*: CTLA4 eksikliği, SK: Sağlıklı Kontrol, *LRBA^{-/-}*: LRBA eksikliği, *CTLA4^{+/-}*: CTLA4 eksikliği, MFI: Mean fluorescence intensity (Ortalama Floresan Yoğunluğu). Görsel üzerinde ilgili parametreler kapılanarak gösterilmiştir. ns: non-significant, ****p<0.0001, ***p<0.001, **p<.01, *p<.05. 1-way ANOVA with Tukey post-test ve paired 2-tailed t-test.

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Çok merkezli ileri yönelik yürütülen bu çalışmada LRBA ve CTLA4 eksikliği olgularının klinik ve immünolojik verileri değerlendirilmiş, hedeflenmiş tedavi olan abatacept molekülünün etkinliği ayrıntılı olarak araştırılmıştır. Abatacept tedavisi hastalık semptomlarını kontrol etmede oldukça başarılı olup, tedavinin uzun dönem takibinde ciddi yan etkisinin olmadığı saptanmıştır. Ayrıca tedavi sonrası hastaların T_{FH} , Treg hücre ve sitokin yanıtlarının baskılanmasının yanında T_{FH} ve Treg hücrelerinin alt tiplerinde anormalliklerin restorasyona uğradığı görülmüştür. Bu durum tedavinin başlangıçta var olan immün aktivasyonu önemli ölçüde baskılandığını göstermektedir.

Hastaların immünolojik değerlendirmelerinde, her iki hastalıkta da hipogammaglobulinemi yanında önemli oranlarda T, B ve NK lenfopenisi olduğu görüldü. Bu bulgular daha önceki çalışmalar ile uyumlu idi (Alkhairy ve ark., 2016; Gamez-Diaz ve ark., 2016; Kostel Bal ve ark., 2017; Schwab ve ark., 2018). Olguların çoğunda hafıza B hücrelerinde azalma saptandı. Ayrıca bazı olgularında çift negatif CD3 popülasyonu bulundu. Bu bulgu özellikle hastalardaki lenfoproliferasyon ile ilişkili olup, ALPS fenotipi ile başvuran hastalarda ayırıcı tanı açısından önemli bir bulgu olarak karşımıza çıkmaktadır (Kiykim ve ark., 2019). Hastalarda görülen düşük B hücreleri, LRBA eksikliğindeki antikör eksikliğini destekler niteliktedir. Bu hastalarda görülen NK hücre düşüklüğü ise viral enfeksiyonlara olan yatkınlığı göstermektedir. Bulduğumuz bu bulgular hastalarda görülen semptomların nedenini açıklar niteliktedir.

Abatacept tedavisinin bu hastalıklardaki immünolojik etkileri daha önceden ayrıntılı olarak çalışılmadığı için tedavi öncesi ve sonrası değerlendirmeler yapıldı. Daha önceden romatoid artritli olgularda abatacept tedavisinin T ve B hücre yanıtlarını baskıladığı saptanmıştır (Korhonen & Moilanen, 2009).

Çalışmamızda LRBA ve CTLA4 eksikliği olgularında düşük timik öncü hücrelerle birlikte azalan naif yardımcı T hücreler ve artmış efektör hafıza hücreleri gözlemlendi. Bu bulgularımızda daha önceki çalışmalarla uyumlu idi (Charbonnier ve ark., 2015; Schubert ve ark., 2014). Ek olarak her iki hastalık grubunun T efektör ve Treg hücrelerinin de hafıza hücresi yönüne kayış gösterdiğinin tespit ettik. Bu sonuçlar CTLA-4 proteinin ifadesinin eksikliğinden kaynaklı olarak artan CD28 sinyalinin etkisiyle immün aktivasyonun kontrol altına alınamamasının bir sonucu olarak düşünülebilir. Abatacept tedavisi aşırı CD28 sinyalini kontrol altına alarak her iki hastalık grubunda da timik çıktıyı artırarak naif $CD4^+$ T hücre (hem Treg

hem de T efektör hücreler içinde) havuzunun artmasına neden olmuştur. Bulgularımıza benzer olarak tip 1 diyabet hastalarında abatacept tedavisi sonrası kostimülasyonun engellenmesi sonucunda timik öncü hücreler ve naif CD4⁺ T hücrelerde artış efektör hafıza CD4⁺ T hücrelerde ise düşüş gözlemlenmiştir (Eichmann ve ark., 2020). Ayrıca ataklarla seyreden multipl skleroz (MS) hastalarıyla gerçekleştirilen çift kör plasebo kontrollü abatacept çalışmasında hastalara abatacept tedavisi uygulanmasıyla birlikte hafıza Treg hücrelerinin frekansında azalma gözlemlenmiştir (Glatigny ve ark., 2019).

CTLA-4 proteini CD28'in CD80 ve CD86'ya bağlanmasını kontrol ederek T_{FH} hücre farklılaşmasını kontrol eder. CTLA-4 proteinin nakavt edildiği farelerde T_{FH} hücre frekanslarında aşırı bir artış gözlemlenmiştir (Wang ve ark., 2015). Bu sebepten dolayı LRBA ve CTLA-4 eksiliği hastalarında tedavi öncesi ve sonrası cT_{FH} yüzdeleri ve bu hücrelerin aktivasyonunu değerlendirdik. Her iki hastalık grubunda da tedavi öncesinde cT_{FH} hücre frekanslarında artış gözlemlendi ve bu hücreler yüksek PD-1 ifadesi ile daha aktif fenotipeydiler. Bu sonuçlarımız daha önce gerçekleştirdiğimiz çalışmalar ile uyumluydu (Alroqi ve ark., 2018; Catak ve ark., 2022). T hücreleri timik gelişim esnasında otoimmün düzenleyici gibi (AIRE) transkripsiyon faktörlerinin aracılığıyla öz antijenlerine karşı tanıtılır fakat bu B lenfositleri kemik iliğinde çok sayıda özgünlüğe sahip antikor üretebilmek için rastgele V(D)J rekombinasyonu geçirir ve bu olayın sonucunda pek çok otoreaktif antikor üretimi söz konusu olur. Bu otoreaktif antikorların çoğun B hücresi olgunlaşmasında havuzdan çıkarılsa bile olgun naif B hücrelerinin yaklaşık %20'sinin düşük seviyelerde otoreaktivite gösterdiği bildirilmiştir (Wardemann ve ark., 2003). Bu sebeple aşırı T_{FH} hücre frekansları otoantikor üretiminde artışa sebep olarak otoimmüniteye yol açabilmektedir (Alroqi ve ark., 2018; Kawamoto ve ark., 2012; Kim ve ark., 2015; Linterman ve ark., 2009; Sweet ve ark., 2011; Walker, 2022). Ayrıca daha önce gerçekleştirdiğimiz çalışmada LRBA ve CTLA4 eksikliği hastalarındaki kümülatif otoimmünite sayılarıyla T_{FH} frekansları arasında pozitif korelasyon tespit etmiştik (Catak ve ark., 2022). Abatacept tedavisiyle birlikte cT_{FH} frekansları ve bu hücrelerin aktivasyonlarının anlamlı olarak düşüş gözlemlendi. Ayrıca hastaların otoimmün bulguları çoğunlukla kontrol altına alındı. Bu bulgularımız daha önce gerçekleştirdiğimiz çalışmalarla uyumlu olarak gözlemlendi (Alroqi ve ark., 2018). Bu bilgiler ışığında LRBA ve CTLA4 eksikliği hastalarında tedavi süresince T_{FH} frekanslarının izlenmesinin tedavinin etkinliğinin izlenmesi için önemli bir biyobelirteç olduğu ortaya çıkmaktadır. Çalışmamızda T_{FH} hücrelerinin yanı sıra T_{FR} hücrelerini de inceledik. Tedavi

öncesinde LRBA eksikliği olgularında azalmış T_{FR} hücreleri gözlemlenirken, CTLA4 eksikliği hastalarında belirgin bir düşüklük gözlemlenemedi. Literatürde daha önce LRBA eksikliği hastalarıyla yapılan çalışmada T_{FR} hücreler düşük tespit edilmiştir (Charbonnier ve ark., 2015). Sonucumuz literatürle uyum göstermektedir. Literatürde T_{FR} hücre eksikliğinden kaynaklı T_{FH} hücreleri üzerindeki eksik kontrol T_{FH} hücrelerinin B hücrelerini aşırı teşvik etmesi sonucunda otoantikör üretimiyle sonuçlandığı gösterilmiştir (Chung ve ark., 2011; Kinnunen ve ark., 2013; Linterman ve ark., 2011; Sage ve ark., 2013; Wollenberg ve ark., 2011). CTL4 eksikliği hastalarında normal T_{FR} frekansı mevcut olmasına karşın bu hastalardaki bozuk CTLA-4 ifadesi bu hücrelerin görevini yerine getirmesinde eksiklik yaşadığı söylenebilir. Daha önce fare modeli üzerinde yapılan bir çalışmada CTLA-4 nakavt farelerin T_{FR} hücrelerinin artış göstermesine sebep olmasına rağmen T_{FH} hücrelerini kontrol etmekte başarısız olduğu gösterilmiştir (Sage ve ark., 2014). Sonuç olarak olgularımızdaki yetersiz T_{FR} hücre yanıtı artan T_{FH} hücre frekansı ve otoimmünite ile ilişkilendirilebilir.

LRBA ve CTLA4 eksikliği hastalıklarına daha erken tanı koyabilmek için akan hücre ölçerde protein ifadesi ve Treg düzeylerinin ölçülmesi yardımcı olabilmektedir (Charbonnier ve ark., 2015; Kuehn ve ark., 2014). CTLA-4 proteini CD28 proteiniyle rekabet ederek CD80 ve CD86 olan ligandlarına daha yüksek afiniteyle bağlanır ve bunun sonucunda CD80 ve CD86'nın transendositozuyla birlikte T hücre inhibisyonu gerçekleşir (Qureshi ve ark., 2011). Çalışmamızda tedavi öncesinde her iki hastalık grubunun $FOXP3^+CD25^+$ ve $CD25^{yük}CD127^{düş}$ Treg hücre yüzdeleri anlamlı olarak düşük bulundu. Treg hücrelerinin düşük olmasının yanı sıra Treg hücrelerinin kanonikal belirteçleri olan FOXP3, CD25 ve CTLA4 protein ifadeleri de düşük tespit edildi. Bu bulgularımız geçmiş çalışmalarla benzer nitelik taşımaktaydı (Alroqi ve ark., 2018; Catak ve ark., 2022; Charbonnier ve ark., 2015; Gamez-Diaz ve ark., 2016; Hou ve ark., 2017; Kuehn ve ark., 2014; Lo ve ark., 2015; Lopez-Herrera ve ark., 2012). LRBA ve CTLA4 eksikliği hastaları bu sebeple immün tolerans için gerekli Treg hücrelerinin fonksiyonun kaybından dolayı tregopatiler olarak sınıflandırılmaktadır (Cepika ve ark., 2018). Her iki hastalık grubundaki otoimmün bulguların ortaya çıkmasının ana sebebi olarak immün regülasyonu sağlayan Treg hücrelerinin ve CTLA-4 proteinin ifadesinin düşük olması neden olarak gösterilebilir. Abatacept tedavisiyle birlikte $FOXP3^+CD25^+$ ve $CD25^{yük}CD127^{düş}$ Treg hücrelerinin yüzdeleri her iki hastalıkta da düşüş gösterdi. Romatoid artirit ve ataklarla seyreden MS hastalıklarında abatacept tedavisinin etkilerini gösteren çalışmalarda bizim bulgularımıza benzer olarak Treg hücrelerinin yüzdelerinde azalma gözlemlenmiştir (Alvarez-Quiroga ve

ark., 2011; Glatigny ve ark., 2019). Ayrıca abatacept'in T hücreler üzerindeki etkilerinin gösterildiği çalışmalarda da *in vitro* abatacept kullanımıyla Treg hücrelerin baskılandığı gözlemlenmiştir (Gardner ve ark., 2015). Abatacept molekülünün *in vitro* deneylerde B hücreleri üzerindeki CD80 ve CD86 proteinlerinin yüzey ifadelerini azalttığı da gösterilmiştir (Lorenzetti ve ark., 2019). Daha önce yapılan fare çalışmalarında CD28 yolağının timüs kökenli FOXP3 (+) regülatör T hücrelerinin gelişmesi için önemli olduğu ve CD28 taşımayan farelerde FOXP3 ifadesinin olmadığı gösterilmiştir (Tai ve ark., 2005). Çalışmamızda abatacept kullanımıyla Treg hücre frekanslarının azalması abataceptin CD80 ve CD86'ya bağlanarak CD28 sinyal yolağını baskılaması sonucunda gerçekleştiği düşünülmektedir. Treg hücrelerinin yüzdelерinin azalmasına karşın hastaların immün disregülasyonla ilişkin bulguları çoğunlukla kontrol altına alınmıştır.

Çalışmamızda T_{FH} ve Treg frekanslarının yanı sıra bu hücrelerin alt tipleri de (T_{H1}, T_{H2} ve T_{H17}) değerlendirildi. T_{H1} hücreleri virüsler ve belirli bakteriler gibi hücre içi patojenlerle mücadelede, hücresel bağışıklık tepkilerinin desteklenmesini sağlar ve bu hücreler enflamasyonu destekler niteliktedirler (Saravia ve ark., 2019; Skapenko ve ark., 2005). T_{H1} aracılı immün yanıt enflamasyonu destekler nitelikte olduğu için hayvanlarda deneysel olarak gösterilen insülin bağımlı diabetes mellitus ve kolajen kaynaklı artirit gibi birçok organ spesifik otoimmüniteye neden olur (Azar ve ark., 1999; Germann ve ark., 1996). Çalışmamızda, CXCR5⁺ hafıza T hücrelerinin alt tipleri incelendiğinde T_{H1} hücrelerinde artış ve T_{H17} hücrelerinde ise azalma gözlemlendi. Abatacept tedavisiyle birlikte T_{H1} fenotipli hücrelerde azalma görülmesine karşın T_{H17} fenotipli hücrelerde azalma trendi olmasına rağmen anlamlı bir fark gözlemlenmedi. Hastalarda T_{H1} fenotipli CXCR5⁺ hafıza T hücrelerinin artışı kronik enflamasyonla organ spesifik otoimmüniteye yol açmasıyla ilişkilendirilebilir. Abatacept tedavisi öncesi her iki hastalıkta da T_{FH} hücreleri daha fazla T_{H1} fenotipi ve daha az T_{H2} ve T_{H17} fenotipi gösterdiler. Bulgularımız daha önceki çalışmamızla uyumlu idi (Alroqi ve ark., 2018). Yapılan çalışmalarda T_{FH1} hücrelerinin naif B hücrelerinin Ig üretimini teşvik edemediği ve bunun yanı sıra hafıza B hücrelerini de Ig üretmeleri için uyaramadığı gösterilmiştir. T_{FH1} hücrelerinin B hücrelerini Ig üretmek için teşvik edememesinin sebebi ise B hücrelerinin hayatta kalmasını sağlayamamalarından kaynaklanmaktadır (Morita ve ark., 2011). Her iki hasta grubundaki düşük Ig üretim seviyeleri ve sınıf dönüşümü yapmış hafıza B hücrelerinin düşüklüğü hastalarda artmış T_{FH1} hücre frekansıyla açıklanabilir. Sonuçlarımızda abatacept tedavisiyle birlikte ise T_{FH1} hücre yüzdesinin anlamlı olarak düştüğü, T_{FH17} hücre

yüzdesinin ise anlamlı olarak arttığı görüldü. Hafıza Treg hücrelerinin alt tipleri incelendiğinde ise T_{FH} hücreleriyle benzer olarak T_H1 fenotipine kayışla birlikte T_H17 fenotipinde azalma gözlemlendi. Abatacept tedavisiyle birlikte ise T_H1 fenotipli hafıza Treg hücre frekansları azalırken, T_H17 fenotipli hafıza Treg hücreleri frekanslarında artış gözlemlendi. Daha önceki çalışmalarda tip 1 inflamatuvar yanıtlar esnasında Treg hücrelerinin T-bet transkripsiyon faktörünün aktifleşmesiyle CXCR3 ifadesini indükleyerek Treg hücrelerinin T_H1 aracılı inflamatuvar yanıt bölgelerine göçünü sağladığı gösterilmiştir (Koch ve ark., 2009). Literatürde Treg hücrelerinin alt tiplerinin fonksiyonlarıyla ilgili yapılan çalışmalarda ise T_H1 , T_H2 , T_H17 ve T_H22 benzeri karakter gösteren Treg hücrelerinin tümünün başarılı bir şekilde T hücre proliferasyonunu baskıladığı gözlemlenmiştir (Duhon ve ark., 2012). Yine aynı çalışmada T_H1 hücrelerinde daha baskın olmak kaydıyla T_H1 ve T_H17 fenotipli Treg hücrelerinin T_H2 ve T_H22 fenotipli Treg hücrelerine göre daha fazla IL-10 ürettiği de gözlemlenmiştir (Duhon ve ark., 2012). Bu bilgiler hastalarımızda artan T_H1 yanıtına cevap olarak T_H1 fenotipli Treg hücrelerinin artışı destekler niteliktedir. Abatacept tedavisiyle anormal seviyede artış gösteren T_H1 fenotipli hücrelerin yüzdesinde azalmalar meydana gelmesi tedavinin sadece T_{FH} ve Treg hücre frekanslarını baskılamadığı ayrıca bu hücrelerde fenotipik değişikliklere de yol açarak immün restorasyonu sağladığını göstermiş olduk. Ayrıca bu fenotipik değişiklikler CXCR5⁺ hafıza yardımcı T hücreleriyle karşılaştırıldığı zaman T_{FH} ve Treg hücrelerinde daha baskındı. Buradan abataceptin bu hücreler üzerinde daha etkili olduğu çıkarımı yapılabilir.

Çalışmamızda LRBA ve CTLA-4 eksikliği hastalarının abatacept tedavisi öncesi ve sonrasında yardımcı T hücrelerinin sitokin üretimleri de değerlendirildi. Abatacept tedavisi öncesinde her iki hastalıkta da IL-10 üretimi sağlıklı kontrollere kıyasla artış gösterdi. Yukarıda bahsettiğimiz üzere T_H1 benzeri Treg hücrelerinin diğer Treg alt tiplerine göre daha fazla IL-10 ürettiği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Duhon ve ark., 2012). Bu yüzden daha olgularımızda gözükken yüksek IL-10 üretimi T_H1 fenotipli Treg hücrelerinin hastalarımızda aşırı olarak ifade edilmesinden kaynaklanıyor olabilir bunun yanı sıra hastalarımızdaki bozulmuş CTLA-4 ifadesinden kaynaklı olarak bu eksikliği kompanse etmek amacıyla da yüksek IL-10 üretimi gerçekleşmiş olabilir. IL-10 üretimindeki bu artış daha önce LRBA eksikliği olgularının Treg hücrelerinde gösterilmiştir (Charbonnier ve ark., 2015). Ayrıca CTLA-4 proteinin yok edildiği fare modeli çalışmasında da CTLA-4 nakavt farelerde IL-10 üretiminin arttığı gözlemlenmiştir (Paterson ve ark., 2015). Abatacept tedavisiyle birlikte sitokin yanıtlarında baskılanma meydana gelmiştir. Daha önce çeşitli hastalık gruplarında ve hayvan modellerinde abatacept

tedavisinin sitokin üretimini azalttığı gözlemlenmiştir (Davis ve ark., 2008; Gerbaux ve ark., 2023; Maggi ve ark., 2016; Pieper ve ark., 2013; Rochman ve ark., 2015).

CD28 ekspresyonun T hücre yüzeyindeki ifadesi dinamik bir süreç olup, T hücre reseptör aktivasyonu, hücre yaşlanması, CD80/CD86 ile bağlanma ile yüzeydeki ifadesi azalmaktadır (Esensten ve ark., 2016). CTLA4 molekülü CD28'in internalizasyonuna neden olarak hücre yüzeyinde azalmasına neden olmaktadır (Berg & Zavazava, 2008). Dışardan verilen CTLA4-Ig analogunun T hücrelerinde enerji özelliği yarattığı, CD28 gen ifadesini azalttığı ve klinik düzelme ile ilişkili olabileceği saptanmıştır (Rochman ve ark., 2015). LRBA ve CTLA4 eksikliği olgularında CTLA4'un olmaması CD28 yolağını daha baskın hale getirme durumunu akla getirmektedir. Nitekim bu olgularda görülen T hücre aktivasyonundan sorumlu mekanizmalardan biri bu olarak artmış CD28 sinyali düşünülebilir. Bu sebeple LRBA ve CTLA4 eksikliği hastalarında CD28 yüzey ifadesini abatacept tedavisi öncesinde ve sonrasında değerlendirdik. Tedavi öncesinde CTLA4 hastalarının CD4⁺ T hücrelerinde CD28 ifadesi azalmış olarak saptamasına rağmen LRBA eksikliği hastalarında ise normal olarak gözlemlendi. CD8⁺ T hücrelerindeyse her iki hastalık grubunda da azalmış CD28 ifadesi tespit edildi. Literatürde T hücre aktivasyonundan sonra CD28 reseptörünün proteolitik olarak kesilmesiyle birlikte çözünür CD28 konsantrasyonunda artış gözlemlenmiştir (Hakim ve ark., 2020). Olgularımızdaki bozuk CTLA-4 ifadesinden kaynaklı sürekli T hücre aktivasyonu sonucunda CD28'in yüzey ifadesinin azalması bu şekilde açıklanabilir. Ayrıca CD28 ifadesinin yüzeyde azalması hücre yaşlanması ile ilişkilendirilmiştir (Boucher ve ark., 1998). Bu durum olgularımızdaki kronik aktivasyondan dolayı T hücrelerinin yaşlılık belirtileri gösteriyor olmasıyla da açıklanabilir. Tedavi sonrasında ise LRBA eksikliği hastalarında CD28 yüzey ifadesi artış trendeydi. Tedavi sonrasında CD28⁺ hücrelerinin azalması romatoid artrit hastalarında klinik iyileşmeyle ilişkilendirilmiştir (Scarsi ve ark., 2010, 2011). Ayrıca abataceptin *in vitro* etkisini ortaya koyan bir çalışmada abatacept kullanımının CD28 'in yüzey ifadesini artırdığı gözlemlenmiştir (Gardner ve ark., 2015). Tedavi sonrasında olgularımızdaki artan CD28 ifadesi sürekli aktivasyonun engellenmesiyle ve bunun sonucunda klinik iyileşmeyle açıklanabilir.

Sonuç olarak, çalışmamızda elde edilen bulgular LRBA ve CTLA4 eksikliklerinde oluşan klinik ve immünolojik değişiklikleri önemli ölçüde aydınlatacak düzeydedir. Bu sayıdaki hasta popülasyonunda gerçekleştirilen derinlemesine çalışmalar literatürde tanımlanan en geniş serilerden birisidir. Akan hücre ölçerde yapılacak boyamalarla bu hastalığın benzer özellik

gösteren diğer Treg bozukluklarından nasıl ayırt edilebileceği sonuçlarla desteklenmiştir. Çalışmamızda tedavi sırasında verilen CTLA4 analogunun CD28 sinyalini baskıladığı buna paralel olarak T hücrelerinin aktivitesinin, sitokin üretiminin ve Treg hücre yüzdelерinin azaldığı çalışmamızda gösterilmiştir. Oluşan bu immünolojik değışikliklerin düzeyi ve etkileri net olarak ortaya konulabilmiştir. Uzun dönem abatacept kullanan hastalarda ilacın yan etkileri bakımından herhangi bir sorun yaşanmaması bu tedavinin LRBA ve CTLA4 eksikliğinde immün baskılamasından çok immünolojik olarak iyileşme yaptığı sonuçlarımızla ortaya konulmuştur. Elde edilen birtakım biyobelirteçler hem hastalığın daha kolay tanınmasını hem de tedaviye verilen yanıtları değerdendirmede önemli olacağını düşünmekteyiz.

8. KAYNAKLAR

- Alkhairy, O. K., Abolhassani, H., Rezaei, N., Fang, M., Andersen, K. K., Chavoshzadeh, Z., Mohammadzadeh, I., El-Rajab, M. A., Massaad, M., Chou, J., Aghamohammadi, A., Geha, R. S., & Hammarstrom, L. (2016). Spectrum of Phenotypes Associated with Mutations in LRBA. *J Clin Immunol*, 36(1), 33-45. <https://doi.org/10.1007/s10875-015-0224-7>
- Alroqi, F. J., Charbonnier, L. M., Baris, S., Kiykim, A., Chou, J., Platt, C. D., Algassim, A., Keles, S., Al Saud, B. K., Alkuraya, F. S., Jordan, M., Geha, R. S., & Chatila, T. A. (2018). Exaggerated follicular helper T-cell responses in patients with LRBA deficiency caused by failure of CTLA4-mediated regulation. *J Allergy Clin Immunol*, 141(3), 1050-1059 e1010. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.05.022>
- Alvarez-Quiroga, C., Abud-Mendoza, C., Doniz-Padilla, L., Juarez-Reyes, A., Monsivais-Urenda, A., Baranda, L., & Gonzalez-Amaro, R. (2011). CTLA-4-Ig therapy diminishes the frequency but enhances the function of Treg cells in patients with rheumatoid arthritis. *J Clin Immunol*, 31(4), 588-595. <https://doi.org/10.1007/s10875-011-9527-5>
- Azar, S. T., Tamim, H., Beyhum, H. N., Habbal, M. Z., & Almawi, W. Y. (1999). Type I (insulin-dependent) diabetes is a Th1- and Th2-mediated autoimmune disease. *Clin Diagn Lab Immunol*, 6(3), 306-310. <https://doi.org/10.1128/CDLI.6.3.306-310.1999>
- Berg, M., & Zavazava, N. (2008). Regulation of CD28 expression on CD8+ T cells by CTLA-4. *J Leukoc Biol*, 83(4), 853-863. <https://doi.org/10.1189/jlb.0107065>
- Boucher, N., Dufeu-Duchesne, T., Vicaut, E., Farge, D., Effros, R. B., & Schachter, F. (1998). CD28 expression in T cell aging and human longevity. *Exp Gerontol*, 33(3), 267-282. [https://doi.org/10.1016/s0531-5565\(97\)00132-0](https://doi.org/10.1016/s0531-5565(97)00132-0)
- Bousfiha, A., Jeddane, L., Picard, C., Al-Herz, W., Ailal, F., Chatila, T., Cunningham-Rundles, C., Etzioni, A., Franco, J. L., Holland, S. M., Klein, C., Morio, T., Ochs, H. D., Oksenhendler, E., Puck, J., Torgerson, T. R., Casanova, J. L., Sullivan, K. E., & Tangye, S. G. (2020). Human Inborn Errors of Immunity: 2019 Update of the IUIS Phenotypical Classification. *J Clin Immunol*, 40(1), 66-81. <https://doi.org/10.1007/s10875-020-00758-x>
- Catak, M. C., Akcam, B., Bilgic Eltan, S., Babayeva, R., Karakus, I. S., Akgun, G., Baser, D., Bulutoglu, A., Bayram, F., Kasap, N., Kiykim, A., Hancioglu, G., Kokcu Karadag, S.

- I., Kendir Demirkol, Y., Ozen, S., Cekic, S., Ozcan, D., Edeer Karaca, N., Sasihuseyinoglu, A. S., . . . Baris, S. (2022). Comparing the levels of CTLA-4-dependent biological defects in patients with LRBA deficiency and CTLA-4 insufficiency. *Allergy*, 77(10), 3108-3123. <https://doi.org/10.1111/all.15331>
- Caudy, A. A., Reddy, S. T., Chatila, T., Atkinson, J. P., & Verbsky, J. W. (2007). CD25 deficiency causes an immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked-like syndrome, and defective IL-10 expression from CD4 lymphocytes. *J Allergy Clin Immunol*, 119(2), 482-487. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2006.10.007>
- Cepika, A. M., Sato, Y., Liu, J. M., Uyeda, M. J., Bacchetta, R., & Roncarolo, M. G. (2018). Tregopathies: Monogenic diseases resulting in regulatory T-cell deficiency. *J Allergy Clin Immunol*, 142(6), 1679-1695. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2018.10.026>
- Charbonnier, L. M., Janssen, E., Chou, J., Ohsumi, T. K., Keles, S., Hsu, J. T., Massaad, M. J., Garcia-Lloret, M., Hanna-Wakim, R., Dbaibo, G., Alangari, A. A., Alsultan, A., Al-Zahrani, D., Geha, R. S., & Chatila, T. A. (2015). Regulatory T-cell deficiency and immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked-like disorder caused by loss-of-function mutations in LRBA. *J Allergy Clin Immunol*, 135(1), 217-227. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2014.10.019>
- Chung, Y., Tanaka, S., Chu, F., Nurieva, R. I., Martinez, G. J., Rawal, S., Wang, Y. H., Lim, H., Reynolds, J. M., Zhou, X. H., Fan, H. M., Liu, Z. M., Neelapu, S. S., & Dong, C. (2011). Follicular regulatory T cells expressing Foxp3 and Bcl-6 suppress germinal center reactions. *Nat Med*, 17(8), 983-988. <https://doi.org/10.1038/nm.2426>
- Conteduca, G., Indiveri, F., Filaci, G., & Negrini, S. (2018). Beyond APECED: An update on the role of the autoimmune regulator gene (AIRE) in physiology and disease. *Autoimmun Rev*, 17(4), 325-330. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2017.10.017>
- Cunningham-Rundles, C. (2011). Autoimmunity in primary immune deficiency: taking lessons from our patients. *Clin Exp Immunol*, 164 Suppl 2, 6-11. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2011.04388.x>
- Cutolo, M., & Nadler, S. G. (2013). Advances in CTLA-4-Ig-mediated modulation of inflammatory cell and immune response activation in rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev*, 12(7), 758-767. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2013.01.001>

- Davis, P. M., Nadler, S. G., Stetsko, D. K., & Suchard, S. J. (2008). Abatacept modulates human dendritic cell-stimulated T-cell proliferation and effector function independent of IDO induction. *Clin Immunol*, 126(1), 38-47. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2007.08.019>
- Duhen, T., Duhen, R., Lanzavecchia, A., Sallusto, F., & Campbell, D. J. (2012). Functionally distinct subsets of human FOXP3⁺ Treg cells that phenotypically mirror effector Th cells. *Blood*, 119(19), 4430-4440. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-11-392324>
- Eichmann, M., Baptista, R., Ellis, R. J., Heck, S., Peakman, M., & Beam, C. A. (2020). Costimulation Blockade Disrupts CD4(+) T Cell Memory Pathways and Uncouples Their Link to Decline in beta-Cell Function in Type 1 Diabetes. *J Immunol*, 204(12), 3129-3138. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1901439>
- Esensten, J. H., Helou, Y. A., Chopra, G., Weiss, A., & Bluestone, J. A. (2016). CD28 Costimulation: From Mechanism to Therapy. *Immunity*, 44(5), 973-988. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.04.020>
- Ford, M. L., Adams, A. B., & Pearson, T. C. (2014). Targeting co-stimulatory pathways: transplantation and autoimmunity. *Nat Rev Nephrol*, 10(1), 14-24. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2013.183>
- Gamez-Diaz, L., August, D., Stepensky, P., Revel-Vilk, S., Seidel, M. G., Noriko, M., Morio, T., Worth, A. J. J., Blessing, J., Van de Veerdonk, F., Feuchtinger, T., Kanariou, M., Schmitt-Graeff, A., Jung, S., Seneviratne, S., Burns, S., Belohradsky, B. H., Rezaei, N., Bakhtiar, S., . . . Grimbacher, B. (2016). The extended phenotype of LPS-responsive beige-like anchor protein (LRBA) deficiency. *J Allergy Clin Immunol*, 137(1), 223-230. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.09.025>
- Gardner, D. H., Jeffery, L. E., Soskic, B., Briggs, Z., Hou, T. Z., Raza, K., & Sansom, D. M. (2015). 1,25(OH)2D3 Promotes the Efficacy of CD28 Costimulation Blockade by Abatacept. *J Immunol*, 195(6), 2657-2665. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1500306>
- Gerbaux, M., Roos, E., Willemsen, M., Staels, F., Neumann, J., Bucken, L., Haughton, J., Yshii, L., Dooley, J., Schlenner, S., Humblet-Baron, S., & Liston, A. (2023). CTLA4-Ig Effectively Controls Clinical Deterioration and Immune Condition in a Murine Model of Foxp3 Deficiency. *J Clin Immunol*. <https://doi.org/10.1007/s10875-023-01462-2>

- Germann, T., Hess, H., Szeliga, J., & Rude, E. (1996). Characterization of the adjuvant effect of IL-12 and efficacy of IL-12 inhibitors in type II collagen-induced arthritis. *Ann N Y Acad Sci*, 795, 227-240. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1996.tb52672.x>
- Gibson, H. M., Hedgcock, C. J., Aufiero, B. M., Wilson, A. J., Hafner, M. S., Tsokos, G. C., & Wong, H. K. (2007). Induction of the CTLA-4 gene in human lymphocytes is dependent on NFAT binding the proximal promoter. *J Immunol*, 179(6), 3831-3840. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.6.3831>
- Glatigny, S., Hollbacher, B., Motley, S. J., Tan, C., Hundhausen, C., Buckner, J. H., Smilek, D., Khoury, S. J., Ding, L., Qin, T., Pardo, J., Nepom, G. T., Turka, L. A., Harris, K. M., Campbell, D. J., & Bettelli, E. (2019). Abatacept Targets T Follicular Helper and Regulatory T Cells, Disrupting Molecular Pathways That Regulate Their Proliferation and Maintenance. *J Immunol*, 202(5), 1373-1382. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1801425>
- Habibi, S., Zaki-Dizaji, M., Rafiemanesh, H., Lo, B., Jamee, M., Gamez-Diaz, L., Salami, F., Kamali, A. N., Mohammadi, H., Abolhassani, H., Yazdani, R., Aghamohammadi, A., Anaya, J. M., & Azizi, G. (2019). Clinical, Immunologic, and Molecular Spectrum of Patients with LPS-Responsive Beige-Like Anchor Protein Deficiency: A Systematic Review. *J Allergy Clin Immunol Pract*, 7(7), 2379-2386 e2375. <https://doi.org/10.1016/j.jaip.2019.04.011>
- Hakim, M., Dror, A. F., Alishekevitz, D., Meilin, E., Shilovizky, O., Weber, J. S., Sapir, Y., Shulman, A., & Moshe, T. B. (2020). Abstract 2846A: CD28 shedding is a novel immune-regulatory mechanism found in cancer patients which directly inhibits anti PD-1 effect. *Cancer Research*, 80(16_Supplement), 2846A-2846A.
- Harper, K., Balzano, C., Rouvier, E., Mattei, M. G., Luciani, M. F., & Golstein, P. (1991). CTLA-4 and CD28 activated lymphocyte molecules are closely related in both mouse and human as to sequence, message expression, gene structure, and chromosomal location. *J Immunol*, 147(3), 1037-1044. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1713603>
- Hosseini, A., Gharibi, T., Marofi, F., Babaloo, Z., & Baradaran, B. (2020). CTLA-4: From mechanism to autoimmune therapy. *Int Immunopharmacol*, 80, 106221. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106221>

- Hou, T. Z., Verma, N., Wanders, J., Kennedy, A., Soskic, B., Janman, D., Halliday, N., Rowshanravan, B., Worth, A., Qasim, W., Baxendale, H., Stauss, H., Seneviratne, S., Neth, O., Olbrich, P., Hambleton, S., Arkwright, P. D., Burns, S. O., Walker, L. S., & Sansom, D. M. (2017). Identifying functional defects in patients with immune dysregulation due to LRBA and CTLA-4 mutations. *Blood*, 129(11), 1458-1468. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-10-745174>
- Jamee, M., Hosseinzadeh, S., Sharifinejad, N., Zaki-Dizaji, M., Matloubi, M., Hasani, M., Baris, S., Alsabbagh, M., Lo, B., & Azizi, G. (2021). Comprehensive comparison between 222 CTLA-4 haploinsufficiency and 212 LRBA deficiency patients: a systematic review. *Clin Exp Immunol*, 205(1), 28-43. <https://doi.org/10.1111/cei.13600>
- June, C. H., Bluestone, J. A., Nadler, L. M., & Thompson, C. B. (1994). The B7 and CD28 receptor families. *Immunol Today*, 15(7), 321-331. [https://doi.org/10.1016/0167-5699\(94\)90080-9](https://doi.org/10.1016/0167-5699(94)90080-9)
- Kanbe, K., Chiba, J., & Nakamura, A. (2013). Immunohistological analysis of synovium treated with abatacept in rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int*, 33(7), 1883-1887. <https://doi.org/10.1007/s00296-011-2326-8>
- Kawamoto, S., Tran, T. H., Maruya, M., Suzuki, K., Doi, Y., Tsutsui, Y., Kato, L. M., & Fagarasan, S. (2012). The inhibitory receptor PD-1 regulates IgA selection and bacterial composition in the gut. *Science*, 336(6080), 485-489. <https://doi.org/10.1126/science.1217718>
- Kennedy, A., Waters, E., Rowshanravan, B., Hinze, C., Williams, C., Janman, D., Fox, T. A., Booth, C., Pesenacker, A. M., Halliday, N., Soskic, B., Kaur, S., Qureshi, O. S., Morris, E. C., Ikemizu, S., Paluch, C., Huo, J., Davis, S. J., Boucrot, E., . . . Sansom, D. M. (2022). Differences in CD80 and CD86 transendocytosis reveal CD86 as a key target for CTLA-4 immune regulation. *Nat Immunol*, 23(9), 1365-1378. <https://doi.org/10.1038/s41590-022-01289-w>
- Kim, Y. U., Lim, H., Jung, H. E., Wetsel, R. A., & Chung, Y. (2015). Regulation of autoimmune germinal center reactions in lupus-prone BXD2 mice by follicular helper T cells. *PLoS One*, 10(3), e0120294. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120294>
- Kinnunen, T., Chamberlain, N., Morbach, H., Choi, J., Kim, S., Craft, J., Mayer, L., Cancrini, C., Passerini, L., Bacchetta, R., Ochs, H. D., Torgerson, T. R., & Meffre, E. (2013).

- Accumulation of peripheral autoreactive B cells in the absence of functional human regulatory T cells. *Blood*, 121(9), 1595-1603. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-09-457465>
- Kiykim, A., Ogulur, I., Dursun, E., Charbonnier, L. M., Nain, E., Cekic, S., Dogruel, D., Karaca, N. E., Cogurlu, M. T., Bilir, O. A., Cansever, M., Kapakli, H., Baser, D., Kasap, N., Kutlug, S., Altintas, D. U., Al-Shaibi, A., Agrebi, N., Kara, M., . . . Baris, S. (2019). Abatacept as a Long-Term Targeted Therapy for LRBA Deficiency. *J Allergy Clin Immunol Pract*, 7(8), 2790-2800 e2715. <https://doi.org/10.1016/j.jaip.2019.06.011>
- Koch, M. A., Tucker-Heard, G., Perdue, N. R., Killebrew, J. R., Urdahl, K. B., & Campbell, D. J. (2009). The transcription factor T-bet controls regulatory T cell homeostasis and function during type 1 inflammation. *Nat Immunol*, 10(6), 595-602. <https://doi.org/10.1038/ni.1731>
- Korhonen, R., & Moilanen, E. (2009). Abatacept, a novel CD80/86-CD28 T cell co-stimulation modulator, in the treatment of rheumatoid arthritis. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 104(4), 276-284. <https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2009.00375.x>
- Kostel Bal, S., Haskologlu, S., Serwas, N. K., Islamoglu, C., Aytekin, C., Kendirli, T., Kuloglu, Z., Yavuz, G., Dalgic, B., Siklar, Z., Kansu, A., Ensari, A., Boztug, K., Dogu, F., & Ikinogullari, A. (2017). Multiple Presentations of LRBA Deficiency: a Single-Center Experience. *J Clin Immunol*, 37(8), 790-800. <https://doi.org/10.1007/s10875-017-0446-y>
- Kuehn, H. S., Ouyang, W., Lo, B., Deenick, E. K., Niemela, J. E., Avery, D. T., Schickel, J. N., Tran, D. Q., Stoddard, J., Zhang, Y., Frucht, D. M., Dumitriu, B., Scheinberg, P., Folio, L. R., Frein, C. A., Price, S., Koh, C., Heller, T., Seroogy, C. M., . . . Uzel, G. (2014). Immune dysregulation in human subjects with heterozygous germline mutations in CTLA4. *Science*, 345(6204), 1623-1627. <https://doi.org/10.1126/science.1255904>
- Linterman, M. A., Pierson, W., Lee, S. K., Kallies, A., Kawamoto, S., Rayner, T. F., Srivastava, M., Divekar, D. P., Beaton, L., Hogan, J. J., Fagarasan, S., Liston, A., Smith, K. G., & Vinuesa, C. G. (2011). Foxp3⁺ follicular regulatory T cells control the germinal center response. *Nat Med*, 17(8), 975-982. <https://doi.org/10.1038/nm.2425>
- Linterman, M. A., Rigby, R. J., Wong, R. K., Yu, D., Brink, R., Cannons, J. L., Schwartzberg, P. L., Cook, M. C., Walters, G. D., & Vinuesa, C. G. (2009). Follicular helper T cells

- are required for systemic autoimmunity. *J Exp Med*, 206(3), 561-576.
<https://doi.org/10.1084/jem.20081886>
- Liu, S. M., Sutherland, A. P., Zhang, Z., Rainbow, D. B., Quintana, F. J., Paterson, A. M., Sharpe, A. H., Oukka, M., Wicker, L. S., & Kuchroo, V. K. (2012). Overexpression of the Ctla-4 isoform lacking exons 2 and 3 causes autoimmunity. *J Immunol*, 188(1), 155-162. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102042>
- Lo, B., Zhang, K., Lu, W., Zheng, L., Zhang, Q., Kanellopoulou, C., Zhang, Y., Liu, Z., Fritz, J. M., Marsh, R., Husami, A., Kissell, D., Nortman, S., Chaturvedi, V., Haines, H., Young, L. R., Mo, J., Filipovich, A. H., Bleesing, J. J., . . . Jordan, M. B. (2015). AUTOIMMUNE DISEASE. Patients with LRBA deficiency show CTLA4 loss and immune dysregulation responsive to abatacept therapy. *Science*, 349(6246), 436-440.
<https://doi.org/10.1126/science.aaa1663>
- Lopez-Herrera, G., Tampella, G., Pan-Hammarstrom, Q., Herholz, P., Trujillo-Vargas, C. M., Phadwal, K., Simon, A. K., Moutschen, M., Etzioni, A., Mory, A., Srugo, I., Melamed, D., Hultenby, K., Liu, C., Baronio, M., Vitali, M., Philippet, P., Dideberg, V., Aghamohammadi, A., . . . Grimbacher, B. (2012). Deleterious mutations in LRBA are associated with a syndrome of immune deficiency and autoimmunity. *Am J Hum Genet*, 90(6), 986-1001. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2012.04.015>
- Lorenzetti, R., Janowska, I., Smulski, C. R., Frede, N., Henneberger, N., Walter, L., Schleyer, M. T., Huppe, J. M., Staniek, J., Salzer, U., Venhoff, A., Troilo, A., Voll, R. E., Venhoff, N., Thiel, J., & Rizzi, M. (2019). Abatacept modulates CD80 and CD86 expression and memory formation in human B-cells. *J Autoimmun*, 101, 145-152.
<https://doi.org/10.1016/j.jaut.2019.04.016>
- Maggi, L., Cimaz, R., Capone, M., Santarlaschi, V., Rossi, M. C., Mazzoni, A., Montaini, G., Pagnini, I., Giani, T., Simonini, G., Scaletti, C., Liotta, F., Maggi, E., Annunziato, F., & Cosmi, L. (2016). Immunosuppressive Activity of Abatacept on Circulating T Helper Lymphocytes from Juvenile Idiopathic Arthritis Patients. *Int Arch Allergy Immunol*, 171(1), 45-53. <https://doi.org/10.1159/000450948>
- Moraes-Vasconcelos, D., Costa-Carvalho, B. T., Torgerson, T. R., & Ochs, H. D. (2008). Primary immune deficiency disorders presenting as autoimmune diseases: IPEX and

- APECED. *J Clin Immunol*, 28 Suppl 1, S11-19. <https://doi.org/10.1007/s10875-008-9176-5>
- Morita, R., Schmitt, N., Bentebibel, S. E., Ranganathan, R., Bourdery, L., Zurawski, G., Foucat, E., Dullaers, M., Oh, S., Sabzghabaei, N., Lavecchio, E. M., Punaro, M., Pascual, V., Banchereau, J., & Ueno, H. (2011). Human blood CXCR5(+)CD4(+) T cells are counterparts of T follicular cells and contain specific subsets that differentially support antibody secretion. *Immunity*, 34(1), 108-121. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.12.012>
- Mueller, D. L., Jenkins, M. K., & Schwartz, R. H. (1989). Clonal expansion versus functional clonal inactivation: a costimulatory signalling pathway determines the outcome of T cell antigen receptor occupancy. *Annu Rev Immunol*, 7, 445-480. <https://doi.org/10.1146/annurev.iy.07.040189.002305>
- Notarangelo, L. D. (2010). Primary immunodeficiencies. *J Allergy Clin Immunol*, 125(2 Suppl 2), S182-194. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.07.053>
- Paterson, A. M., Lovitch, S. B., Sage, P. T., Juneja, V. R., Lee, Y., Trombley, J. D., Arancibia-Carcamo, C. V., Sobel, R. A., Rudensky, A. Y., Kuchroo, V. K., Freeman, G. J., & Sharpe, A. H. (2015). Deletion of CTLA-4 on regulatory T cells during adulthood leads to resistance to autoimmunity. *J Exp Med*, 212(10), 1603-1621. <https://doi.org/10.1084/jem.20141030>
- Pieper, J., Herrath, J., Raghavan, S., Muhammad, K., Vollenhoven, R., & Malmstrom, V. (2013). CTLA4-Ig (abatacept) therapy modulates T cell effector functions in autoantibody-positive rheumatoid arthritis patients. *BMC Immunol*, 14, 34. <https://doi.org/10.1186/1471-2172-14-34>
- Pombo-Suarez, M., & Gomez-Reino, J. J. (2019). Abatacept for the treatment of rheumatoid arthritis. *Expert Rev Clin Immunol*, 15(4), 319-326. <https://doi.org/10.1080/1744666X.2019.1579642>
- Qureshi, O. S., Zheng, Y., Nakamura, K., Attridge, K., Manzotti, C., Schmidt, E. M., Baker, J., Jeffery, L. E., Kaur, S., Briggs, Z., Hou, T. Z., Futter, C. E., Anderson, G., Walker, L. S., & Sansom, D. M. (2011). Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4. *Science*, 332(6029), 600-603. <https://doi.org/10.1126/science.1202947>

- Rao, A., Kamani, N., Filipovich, A., Lee, S. M., Davies, S. M., Dalal, J., & Shenoy, S. (2007). Successful bone marrow transplantation for IPEX syndrome after reduced-intensity conditioning. *Blood*, 109(1), 383-385. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-05-025072>
- Rieux-Laucat, F. (2006). Inherited and acquired death receptor defects in human Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome. *Curr Dir Autoimmun*, 9, 18-36. <https://doi.org/10.1159/000090769>
- Rieux-Laucat, F., Le Deist, F., & Fischer, A. (2003). Autoimmune lymphoproliferative syndromes: genetic defects of apoptosis pathways. *Cell Death Differ*, 10(1), 124-133. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401190>
- Rochman, Y., Yukawa, M., Kartashov, A. V., & Barski, A. (2015). Functional characterization of human T cell hyporesponsiveness induced by CTLA4-Ig. *PLoS One*, 10(4), e0122198. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122198>
- Ryter, S. W., Mizumura, K., & Choi, A. M. (2014). The impact of autophagy on cell death modalities. *Int J Cell Biol*, 2014, 502676. <https://doi.org/10.1155/2014/502676>
- Sage, P. T., Francisco, L. M., Carman, C. V., & Sharpe, A. H. (2013). The receptor PD-1 controls follicular regulatory T cells in the lymph nodes and blood. *Nat Immunol*, 14(2), 152-161. <https://doi.org/10.1038/ni.2496>
- Sage, P. T., Paterson, A. M., Lovitch, S. B., & Sharpe, A. H. (2014). The coinhibitory receptor CTLA-4 controls B cell responses by modulating T follicular helper, T follicular regulatory, and T regulatory cells. *Immunity*, 41(6), 1026-1039. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.12.005>
- Saifi, M., & Wysocki, C. A. (2015). Autoimmune Disease in Primary Immunodeficiency: At the Crossroads of Anti-Infective Immunity and Self-Tolerance. *Immunol Allergy Clin North Am*, 35(4), 731-752. <https://doi.org/10.1016/j.iac.2015.07.007>
- Sansom, D. M., Manzotti, C. N., & Zheng, Y. (2003). What's the difference between CD80 and CD86? *Trends Immunol*, 24(6), 314-319. [https://doi.org/10.1016/s1471-4906\(03\)00111-x](https://doi.org/10.1016/s1471-4906(03)00111-x)
- Saravia, J., Chapman, N. M., & Chi, H. (2019). Helper T cell differentiation. *Cell Mol Immunol*, 16(7), 634-643. <https://doi.org/10.1038/s41423-019-0220-6>

- Scarsi, M., Ziglioli, T., & Airo, P. (2010). Decreased circulating CD28-negative T cells in patients with rheumatoid arthritis treated with abatacept are correlated with clinical response. *J Rheumatol*, 37(5), 911-916. <https://doi.org/10.3899/jrheum.091176>
- Scarsi, M., Ziglioli, T., & Airo, P. (2011). Baseline numbers of circulating CD28-negative T cells may predict clinical response to abatacept in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*, 38(10), 2105-2111. <https://doi.org/10.3899/jrheum.110386>
- Schubert, D., Bode, C., Kenefeck, R., Hou, T. Z., Wing, J. B., Kennedy, A., Bulashevskaya, A., Petersen, B. S., Schaffer, A. A., Gruning, B. A., Unger, S., Frede, N., Baumann, U., Witte, T., Schmidt, R. E., Dueckers, G., Niehues, T., Seneviratne, S., Kanariou, M., . . . Grimbacher, B. (2014). Autosomal dominant immune dysregulation syndrome in humans with CTLA4 mutations. *Nat Med*, 20(12), 1410-1416. <https://doi.org/10.1038/nm.3746>
- Schwab, C., Gabrysch, A., Olbrich, P., Patino, V., Warnatz, K., Wolff, D., Hoshino, A., Kobayashi, M., Imai, K., Takagi, M., Dybedal, I., Haddock, J. A., Sansom, D. M., Lucena, J. M., Seidl, M., Schmitt-Graeff, A., Reiser, V., Emmerich, F., Frede, N., . . . Grimbacher, B. (2018). Phenotype, penetrance, and treatment of 133 cytotoxic T-lymphocyte antigen 4-insufficient subjects. *J Allergy Clin Immunol*, 142(6), 1932-1946. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2018.02.055>
- Seidel, M. G., Bohm, K., Dogu, F., Worth, A., Thrasher, A., Florkin, B., Ikinciogullari, A., Peters, A., Bakhtiar, S., Meeths, M., Stepensky, P., Meyts, I., Sharapova, S. O., Gamez-Diaz, L., Hammarstrom, L., Ehl, S., Grimbacher, B., Gennery, A. R., Inborn Errors Working Party of the European Group for, B., & Marrow, T. (2018). Treatment of severe forms of LPS-responsive beige-like anchor protein deficiency with allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *J Allergy Clin Immunol*, 141(2), 770-775 e771. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.04.023>
- Skapenko, A., Leipe, J., Lipsky, P. E., & Schulze-Koops, H. (2005). The role of the T cell in autoimmune inflammation. *Arthritis Res Ther*, 7 Suppl 2(Suppl 2), S4-14. <https://doi.org/10.1186/ar1703>
- Sweet, R. A., Ols, M. L., Cullen, J. L., Milam, A. V., Yagita, H., & Shlomchik, M. J. (2011). Facultative role for T cells in extrafollicular Toll-like receptor-dependent autoreactive

- B-cell responses in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(19), 7932-7937.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1018571108>
- Tai, X., Cowan, M., Feigenbaum, L., & Singer, A. (2005). CD28 costimulation of developing thymocytes induces Foxp3 expression and regulatory T cell differentiation independently of interleukin 2. *Nat Immunol*, 6(2), 152-162.
<https://doi.org/10.1038/ni1160>
- Tangye, S. G., Al-Herz, W., Bousfiha, A., Chatila, T., Cunningham-Rundles, C., Etzioni, A., Franco, J. L., Holland, S. M., Klein, C., Morio, T., Ochs, H. D., Oksenhendler, E., Picard, C., Puck, J., Torgerson, T. R., Casanova, J. L., & Sullivan, K. E. (2020). Human Inborn Errors of Immunity: 2019 Update on the Classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee. *J Clin Immunol*, 40(1), 24-64.
<https://doi.org/10.1007/s10875-019-00737-x>
- Tangye, S. G., Al-Herz, W., Bousfiha, A., Cunningham-Rundles, C., Franco, J. L., Holland, S. M., Klein, C., Morio, T., Oksenhendler, E., Picard, C., Puel, A., Puck, J., Seppanen, M. R. J., Somech, R., Su, H. C., Sullivan, K. E., Torgerson, T. R., & Meyts, I. (2022a). Human Inborn Errors of Immunity: 2022 Update on the Classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee. *J Clin Immunol*, 42(7), 1473-1507. <https://doi.org/10.1007/s10875-022-01289-3>
- Tangye, S. G., Al-Herz, W., Bousfiha, A., Cunningham-Rundles, C., Franco, J. L., Holland, S. M., Klein, C., Morio, T., Oksenhendler, E., Picard, C., Puel, A., Puck, J., Seppanen, M. R. J., Somech, R., Su, H. C., Sullivan, K. E., Torgerson, T. R., & Meyts, I. (2022b). Human Inborn Errors of Immunity: 2022 Update on the Classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee. *J Clin Immunol*.
<https://doi.org/10.1007/s10875-022-01289-3>
- Tesch, V. K., Abolhassani, H., Shadur, B., Zobel, J., Mareika, Y., Sharapova, S., Karakoc-Aydiner, E., Riviere, J. G., Garcia-Prat, M., Moes, N., Haerynck, F., Gonzales-Granado, L. I., Santos Perez, J. L., Mukhina, A., Shcherbina, A., Aghamohammadi, A., Hammarstrom, L., Dogu, F., Haskologlu, S., . . . the European Society for, I. (2020). Long-term outcome of LRBA deficiency in 76 patients after various treatment modalities as evaluated by the immune deficiency and dysregulation activity (IDDA)

- score. *J Allergy Clin Immunol*, 145(5), 1452-1463. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2019.12.896>
- Thompson, C. B., Lindsten, T., Ledbetter, J. A., Kunkel, S. L., Young, H. A., Emerson, S. G., Leiden, J. M., & June, C. H. (1989). CD28 activation pathway regulates the production of multiple T-cell-derived lymphokines/cytokines. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86(4), 1333-1337. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.4.1333>
- Verma, N., Burns, S. O., Walker, L. S. K., & Sansom, D. M. (2017). Immune deficiency and autoimmunity in patients with CTLA-4 (CD152) mutations. *Clin Exp Immunol*, 190(1), 1-7. <https://doi.org/10.1111/cei.12997>
- Vogt, B., Warncke, M., Micheel, B., & Sheriff, A. (2009). Lentiviral gene transfer of CTLA4 generates B cells with reduced costimulatory properties. *Autoimmunity*, 42(4), 380-382. <https://doi.org/10.1080/08916930902832470>
- Walker, L. S. K. (2022). The link between circulating follicular helper T cells and autoimmunity. *Nat Rev Immunol*, 22(9), 567-575. <https://doi.org/10.1038/s41577-022-00693-5>
- Wang, C. J., Heuts, F., Ovcinnikovs, V., Wardzinski, L., Bowers, C., Schmidt, E. M., Kogimtzis, A., Kenefeck, R., Sansom, D. M., & Walker, L. S. (2015). CTLA-4 controls follicular helper T-cell differentiation by regulating the strength of CD28 engagement. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112(2), 524-529. <https://doi.org/10.1073/pnas.1414576112>
- Ward, S. G. (1996). CD28: a signalling perspective. *Biochem J*, 318 (Pt 2)(Pt 2), 361-377. <https://doi.org/10.1042/bj3180361>
- Wardemann, H., Yurasov, S., Schaefer, A., Young, J. W., Meffre, E., & Nussenzweig, M. C. (2003). Predominant autoantibody production by early human B cell precursors. *Science*, 301(5638), 1374-1377. <https://doi.org/10.1126/science.1086907>
- Wollenberg, I., Agua-Doce, A., Hernandez, A., Almeida, C., Oliveira, V. G., Faro, J., & Graca, L. (2011). Regulation of the germinal center reaction by Foxp3⁺ follicular regulatory T cells. *J Immunol*, 187(9), 4553-4560. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1101328>
- Zheng, Y., Josefowicz, S. Z., Kas, A., Chu, T. T., Gavin, M. A., & Rudensky, A. Y. (2007). Genome-wide analysis of Foxp3 target genes in developing and mature regulatory T cells. *Nature*, 445(7130), 936-940. <https://doi.org/10.1038/nature05563>

9. ÖZGEÇMİŞ

10. BİLİMSEL FAALİYETLER

Yayın

- Babayeva, R., Mongellaz, C., Karakus, I. S., Cansever, M., Bilgic Eltan, S., **Catak, M. C.**, Bulutoglu, A., Kendir Demirkol, Y., Eser, M., Karakoc-Aydiner, E., Ozen, A., Zimmermann, V. S., Taylor, N., & Baris, S. (2022). A boy with a novel homozygous ZAP70 mutation presenting with a dermatological phenotype and postnatal decrease in CD8(+) T cells. *Pediatr Allergy Immunol*, 33(3), e13756. <https://doi.org/10.1111/pai.13756>
- Baris, S., Benamar, M., Chen, Q., **Catak, M. C.**, Martinez-Blanco, M., Wang, M., Fong, J., Massaad, M. J., Sefer, A. P., Kara, A., Babayeva, R., Eltan, S. B., Yucelten, A. D., Bozkurtlar, E., Cinel, L., Karakoc-Aydiner, E., Zheng, Y., Wu, H., Ozen, A., . . . Chatila, T. A. (2023). Severe allergic dysregulation due to a gain of function mutation in the transcription factor STAT6. *J Allergy Clin Immunol*, 152(1), 182-194 e187. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2023.01.023>
- Catak, M. C.**, Akcam, B., Bilgic Eltan, S., Babayeva, R., Karakus, I. S., Akgun, G., Baser, D., Bulutoglu, A., Bayram, F., Kasap, N., Kiykim, A., Hancioglu, G., Kokcu Karadag, S. I., Kendir Demirkol, Y., Ozen, S., Cekic, S., Ozcan, D., Edeer Karaca, N., Sasihuseyinoglu, A. S., . . . Baris, S. (2022). Comparing the levels of CTLA-4-dependent biological defects in patients with LRBA deficiency and CTLA-4 insufficiency. *Allergy*, 77(10), 3108-3123. <https://doi.org/10.1111/all.15331>
- Ozturk, E., **Catak, M. C.**, Kiykim, A., Baser, D., Bilgic Eltan, S., Yalcin, K., Kasap, N., Nain, E., Bulutoglu, A., Akgun, G., Can, Y., Sefer, A. P., Babayeva, R., Caki-Kilic, S., Tezcan Karasu, G., Yesilipek, A., Ozen, A., Karakoc-Aydiner, E., & Baris, S. (2022). Clinical and Laboratory Factors Affecting the Prognosis of Severe Combined Immunodeficiency. *J Clin Immunol*, 42(5), 1036-1050. <https://doi.org/10.1007/s10875-022-01262-0>

Bildiri (Poster veya Sözel)

Babayeva, R., **Catak, M.C.**, Hafizoglu, D., Yakici, N., Celmeli, F., Bulutoglu, A., Bilgic Eltan, S., Baser, D., Karakoc-Aydiner, E., Ozen, A., & Safa Baris. (2022, 12-15 October) *Clinical and immunological effects of Ruxolitinib in STAT3 gain-of-function patients*. [Poster Sunum]. ESID22, Gothenburg, Sweden.

Catak, M., Babayeva, R., Bilgic Eltan, S., Baser, D., Akgun, G., Bulutoglu, A., Karakus, I., Kokcu Karadag, S., Hancioglu, G. Ozen Boluk, S., Şaşıhüseyinoğlu, Ş., Ozek Yucel, E., Aydogmus, C., Yildiran, A., Gulez, N., Genel, F., Kiykim, A., Karakoc-Aydiner, E., Ozen, A., & Baris, S. (2019, 27-29 September). *The effects of abatacept in patients with LRBA deficiency and CTLA4 insufficiency*. [Sözel Sunum]. ESID21, Online.

Çatak, M.C., Babayeva, R., Bayram Çatak, F., Bulutoğlu, A., Karakuş, İ.S., Sürücü, N., Kayaoğlu, B., Karabiber, E., Akay Hacı, İ., Akgün, G., Başer, D., Eltan, S.B., Sefer, A.P, Kiykim, A., Kökcü Karadağ, Ş.İ., Aydoğmuş, Ç., Genel, F., Gülez, N., Yücel, E., Şaşıhüseyinoğlu, A.Ş., Yıldiran, A., Metin, A., Karakoç Aydın, E., Özen, A.O., Gürsel, M., & Barış, S. (2023, 01- 04 Mayıs). *LRBA ve CTLA4 eksikliği olgularında abatacept molekülünün immünolojik etkileri*. [Poster Sunum]. 9. Klinik İmmünoloji Kongresi, Antalya, Türkiye.

Karakurt, T., Babayeva, R., Bilgic Eltan, S., Ayhan, C.M., Alibas, B.A., **Catak, M.C.**, Bulutoglu, A., Karakoc-Aydiner, E., Ozen, A., & Safa Baris. (2022, 12-15 October) *Persistent T lymphopenia after cardiac surgery: long-term follow-up with detailed clinical and immunological evaluation*. [Poster Sunum]. ESID22, Gothenburg, Sweden.

Proje

Barış, S., **Çatak, M.C.**, Güllüoğlu, Ş., Tekin, Ş., & Erman, B. LRBA ve CTLA4 eksikliği olgularında abatacept molekülün immünolojik etkileri. Araştırma Üniversiteleri Destek Programı (ADT-2022-10661), 2022-2024.

11. EKLER

Ek 1: Tezde kullanılan kimyasallar

Kimyasallar	Şirket
Histopaque®-1077	Sigma, Germany
Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS)	HyClone, USA
RPMI Medium 1640 (1X)	Gibco, USA
Fetal Bovine Serum (FBS)	HyClone, USA
Penicillin-Streptomycin Solution	HyClone, USA
L-Glutamine 200 Mm Solution	HyClone, USA
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Gibco, USA
Versa Lyse Lysing Solution	Beckman Coulter, FR
PerFix-nc Buffer 1 (Fixative Reagent)	Beckman Coulter, FR
PerFix-nc Buffer 2 (Permeabilizing Reagent)	Beckman Coulter, FR
PerFix-nc Buffer 3 (Final 10X Solution)	Beckman Coulter, FR
Distile su	Milipore, France
DMSO	Polifarma, TR
Flow-Count Fluorospheres	Beckman Coulter, FR
Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)	Cayman Chemical, USA
Ionomycin	Cayman Chemical, USA

Ek2: Tezde kullanılan cihazlar

Cihaz	Şirket
Santrifüj	Beckman Coulter, Allegra X-22,FR
Vorteks	Fisherbrand, ZX3, USA
Su Banyosu	Nüve, NB5, TR
Isıtmalı manyetik karıştırıcı	Janke&Kunkelik, IKAMAG RH, Germany
Akan hücre ölçer	Beckman Coulter, Navios Ex, FR
CO ₂ İnkübatör	Binder,Germany
Deepfreeze	-80°C, Arctico, Denmark -20°C, Vestel, TR
Refrigerator	Vestel, TR
Laminar Flow	Thermo Fisher Scientific, USA
Liquid Nitrogen Tank	Cryopal, Arpege-40,FR
Işık mikroskobu	Olympus, BX53, Germany

Ek3: Tezde kullanılan antikorlar

Antikor	Parametre	Klon	Kaynak	İzotip	Üretici
CD3	FITC	UCHT1	Fare	IgG1	Beckman Coulter
CD4	APC-A700	13B8.2	Fare	IgG1	Beckman Coulter
CD4	PB	RPA-T4	Fare	IgG1	Biolegend
CD8	PC7	SFCI21Thy2D3	Fare	IgG1	Beckman Coulter
CD14	APC-A700	RMO52	Fare	IgG2a	Beckman Coulter
CD16	PE	3G8	Fare	IgG1	Beckman Coulter
CD19	APC-A750	J3-119	Fare	IgG1	Beckman Coulter
CD20	PB	B9E9	Fare	IgG2a	Beckman Coulter
CD21	PB	BL13	Fare	IgG1	Beckman Coulter
CD25	PC5.5	B1.49.9	Fare	IgG2a	Beckman Coulter
CD31	PB	5.6E	Fare	IgG1	Beckman Coulter
CD38	PB	LS198-4-3	Fare	IgG1	Beckman Coulter
CD45	KO	J33	Fare	IgG1	Beckman Coulter
CD45RA	APC-A750	2H4DH11LDB9	Fare	IgG1	Beckman Coulter
CD45RA	FITC	HI100	Fare	IgG2b	Biolegend
CD45RO	ECD	UCHL1	Fare	IgG2a	Beckman Coulter
CD56	PC5.5	N901	Fare	IgG1	Beckman Coulter
CD127	APC-A750	R34.34	Fare	IgG1	Beckman Coulter
CD127	PE-Cyanine7	A019D5	Fare	IgG1	Biolegend
CD183	PE	G025H7	Fare	IgG1	Biolegend
CD196	PC7	B-R35	Fare	IgG2a	Beckman Coulter
CD197	PE	G043H7	Fare	IgG2a	Beckman Coulter
CXCR5	APC	J252D4	Fare	IgG1	Biolegend
CTLA4	PE	BNI3	Fare	IgG2a	Beckman Coulter
FOXP3	AF647	259D	Fare	IgG1	Beckman Coulter
IgD	FITC	IA6-2	Fare	IgG2a	Beckman Coulter
PD-1	PE	EH12.2H7	Fare	IgG1	Biolegend
IFN-γ	FITC	45.15	Fare	IgG1	Beckman Coulter
IL-4	PC7	MP4-25D2	Sıçan	IgG1	Beckman Coulter
IL-17A	PB	BL168	Fare	IgG1	Beckman Coulter
IL-10	APC	JES3-19F1	Sıçan	IgG2a	Biolegend

Ek4: Etik Kurul Belgesi

Ek5: T_{FH}, hafıza Treg ve CXCR5⁻ yardımcı T hücrelerinin kapılama stratejisi

