



T.C.

GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PERFORİN VE SİNTAXİN11 GENLERİNİN AİLESEL  
HEMOFAGOSİTİK LENFOHİSTİYOSİTOZİS (FHL)  
HASTALIĞINDAKİ ETKİLERİ**

Ayshan Rafat YASSIN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr Serdar ÖZTUZCU

Gaziantep

2013

T.C.  
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**PERFORİN VE SİNTAXİN11 GENLERİNİN AİLESEL HEMOFAGOSİTİK  
LENFOHİSTİYOSİTOZİS (HLH) HASTALIĞINDAKİ ETKİLERİ**

Aishan Rafat YASSIN

Tez Savunma Tarihi:  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Onayı

Prof. Dr. Mehmet TARAKÇIOĞLU  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez çalışmasının bir “Yüksek Lisans” derecesi için uygun ve yeterli bir çalışma olduğunu onaylıyorum.  
Anabilim Dalı Başkanı

Bu tez tarafımda okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir “Yüksek Lisans” tezi olarak kabul edilmiştir.  
Tez Danışmanı

Bu tez tarafımda okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir “Yüksek Lisans” tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

İmzası

Prof. Dr. Ahmet ARSLAN  
Yrd. Doç. Dr Serdar ÖZTUZCU  
Yrd. Doç. Dr Feridun AKKAFİ

## **BEYAN**

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen 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 olmadığını beyan ederim.

22.08.2013

Ayshan Rafat YASSIN

## TEŞEKKÜR

Öncelikle tez danışmanım olan Yrd. Doç. Dr. Serdar ÖZTUZCU'ya teşekkürlerimi sunmak istiyorum. Eğitim sürecim ve tez dönemim boyunca katkılarını esirgemeyen Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Ahmet ARSLAN'a ve diğer Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerine katkılarından dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam boyunca bilimsel katkı ve önerilerini eksik etmeyen Uzm. Dr. Ali BAY'a teşekkürü bir borç bilirim.

Tez çalışmamda katkılarını sağlayan Arş. Gör. Recep BAYRAKTAR ve Emine BAYRAKTAR'a çok teşekkür ederim.

Bütün çalışmalarım süresince beraber uyum içerisinde çalıştığım laboratuvar arkadaşlarıma destek ve hoşgörülerinden dolayı teşekkür ederim.

Sallahadin Üniversitesi Öğretim Üyesi Yrd. Doç. Dr. Saadullah Abbas Rashid'a tüm desteğinden dolayı teşekkürü bir borç bilirim.

Maddi-manevi desteklerini esirgemeyen aileme saygı ve sevgilerimi sunarım.

# İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR .....	i
İÇİNDEKİLER .....	ii
SİMGE ve KISALTMALAR .....	v
ŞEKİL LİSTESİ.....	vi
TABLO LİSTESİ.....	vii
RESİM LİSTESİ.....	viii
ÖZET .....	1
ABSTRACT.....	2
1. GİRİŞ VE AMAÇ .....	3
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. Hemofagositik lenfositosis .....	5
2.1.1. Epidemiyolojisi.....	5
2.1.2. Patofizyolojisi .....	8
2.1.3. Ayırıcı Tanı.....	9
2.1.4. Klinik bulgular .....	11
2.1.5. Ölüm oranı (Mortalite).....	11
2.2. HLH'nin sınıflandırılması.....	11
2.2.1 Ailesel HLH (FHL) .....	11
2.2.1.1. FHL 1 .....	13
2.2.1.2. FHL 2 .....	13
2.2.1.3. FHL 3 .....	13
2.2.1.4. FHL 4 .....	14

2.2.1.5. FHL 5 .....	14
2.2.2. Sonradan kazanılan HLH (sekonder HLH) .....	14
2.3. <i>Perforin (PRF1)</i> Geni.....	15
2.3.1. Perforin Proteininin C2 Bölgesi (Domain) .....	18
2.3.2. Perforin proteinin zar atak bileşim bölgesi (The membrane attack complex/perforin; MACPF).....	18
2.4. <i>Sintaksin11 (STX11)</i> Geni.....	19
2.4.1. Sintaksin 11 proteininin N-Ucu bölgesi .....	20
2.4.2. Çözünebilir NSF bağlı protein almaç bölgesi (Soluble NSF (N ethylmaleimide sensitive fusion protein)- Attachment protein (SNAP) Receptor domain).....	20
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	22
3.1. Hasta Grubunun Oluşturulması.....	22
3.2. Hastalardan Kan Numunelerinin Toplanması.....	23
3.3. Kan Numunelerinden DNA Eldesi .....	23
3.4. DNA'ların Kalite ve Miktar Tayinleri .....	23
3.5. Primerlerin Tasarlanması .....	24
3.6. <i>Perforin</i> ve <i>Sintaksin11</i> Gen Bölgelerinin PCR Yöntemi ile Çoğaltılması.....	26
3.7. PCR Ürünlerinin Agaroz Jelde Yürütülmesi.....	28
3.8. Dizin Analizi .....	32

<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>34</b>
<b>4.1. <i>Perforin</i> Geninde Tespit Edilen Mutasyonlar .....</b>	<b>34</b>
<b>4.2. STX11 Geninde Tespit Edilen Mutasyonlar .....</b>	<b>38</b>
<b>5. TARTIŞMA.....</b>	<b>40</b>
<b>6. KAYNAKLAR .....</b>	<b>43</b>

## **ÖZGEÇMİŞ**

## SİMGE ve KISALTMALAR

CMV	Sitomegalo virüs
EBV	<i>Epstein- Barr virüs</i>
FHL	Ailesel hemofagositik lenfohistiyozis
GMSF	Granülosit makrofaj uyarıcı faktörü
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HLH	Hemofagositik lenfohistiyozis
HSV	Herpes simplex virüs
IFN- $\gamma$	İnterferon gama
IL-1	İnterlökin-1
IL-6	İnterlökin-6
MACPF	The membrane attack complex/perforin
NK	Doğal öldürücü hücre
PRF1	Perforin (Pore forming protein)
SDS	Sodyum dodecyl sulphate
SNARE	Soluble N- ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor
STX11	Syntaxin 11
TNF- $\alpha$	Tümör nekroz faktörü alfa
VZV	Varicella-zoster virüs

## ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1. Perforin geninin kromozomal yerleşkesi .....	16
Şekil 2.2. Ailesel HLH hastalığında <i>perforin</i> geninde meydana gelen mutasyonların Perforin proteinindeki yerlerinin gösterilmesi.....	17
Şekil 2.3. <i>Sintaksin11</i> geninin kromozom üzerindeki yeri .....	19
Şekil 2.4. Gene Mania veritabanı ile <i>perforin</i> ve <i>sintaksin 11</i> genlerinin arasındaki ilişkinin gösterilmesi .....	21
Şekil 4.1. <i>Perforin</i> geninin 3. ekzonunda tespit edilen CAC→CAT değişiminin gösterilmesi.....	34
Şekil 4.2. <i>Perforin</i> ekzon 3.3 bölgesinin normal dizisinin gösterilmesi.....	35
Şekil 4.3. <i>Perforin</i> ekzon 3.3 bölgesindeki His-His dönüşümünün gösterilmesi.....	35
Şekil 4.4. <i>Perforin</i> geninin 3. ekzonunda tespit edilen His-His değişiminin gösterilmesi..	36
Şekil 4.5. <i>Perforin</i> geninin 3. ekzonunda tespit edilen baz eklenmesinin gösterilmesi. ....	36
Şekil 4.6. <i>Perforin</i> 3.3 bölgesinin normal dizisi.....	37
Şekil 4.7. <i>Perforin</i> ekzon 3.3 bölgesindeki TACTGAC bazlarının eklenmesi. ....	37
Şekil 4.8. <i>Syntaxin 11</i> geninin 2. Ekzonunda tespit edilen baz eksilmesinin gösterilmesi. 38	
Şekil 4.9. <i>STX11</i> ekzon 2 bölgesinin normal dizisi. ....	39
Şekil 4.10. <i>STX11</i> ekzon 2 bölgesindeki AG-CGC bazlarının delesyonu. ....	39

## TABLO LİSTESİ

<b>Tablo 2.1.</b> Sonradan kazanılan HLH hastalığına neden olan yangı etkenleri .....	7
<b>Tablo 2.2.</b> Sonradan kazanılan HLH hastalığına neden olan enfeksiyonlar ve diğer hastalıklar .....	8
<b>Tablo 2.3.</b> HLH hastalığında klinik ve laboratuvar bulgular . .....	9
<b>Tablo 2.4.</b> Hemofagositik lenfohistiyositoz tanı kriterleri (2004) .....	10
<b>Tablo 2.5.</b> HLH hastalığının genetik türleri .....	12
<b>Tablo 2.6.</b> <i>PRF 1</i> geninin ekzon, intron ve kodlanan bölgelerinin baz uzunlukları .....	16
<b>Tablo 2.7.</b> <i>STX11</i> geninin ekzon-intron bilgileri .....	19
<b>Tablo 3.1.</b> Çalışmada kullanılan hastalara ait bilgiler .....	22
<b>Tablo 3.2.</b> <i>Perforin</i> geninin ekzonlarına göre tasarlanan primerlerin özellikleri.....	24
<b>Tablo 3.3.</b> <i>Sintaksin11</i> geninin ekzonlarına göre tasarlanan primerlerin özellikleri.....	25
<b>Tablo 3.4.</b> <i>Perforin</i> geninin ekzon bölgelerinin PCR bileşenleri ve eklenen miktarlar. ....	26
<b>Tablo 3.5.</b> <i>STX11</i> geninin ekzon bölgelerinin PCR bileşenleri ve eklenen miktarlar. ....	27
<b>Tablo 3.6.</b> <i>Perforin</i> geninin ekzon bölgelerinin PCR koşulları. ....	27
<b>Tablo 3.7.</b> <i>STX11</i> geninin ekzon bölgelerinin PCR koşulları. ....	28
<b>Tablo 3.8.</b> PCR'dan elde edilen ürünleri saflaştırılması. ....	32
<b>Tablo 3.9.</b> ExoSAP tepkime koşulları .....	32
<b>Tablo 3.10.</b> Nükleotid dizileme PCR'ının bileşenleri ve miktarları. ....	33
<b>Tablo 3.11.</b> Nükleotid dizileme PCR koşulları. ....	33

## RESİM LİSTESİ

- Resim 3.1.** Perforin geninin 1. ekzon bölgesinin PCR yöntemi ile çoğaltılması (171 bç).. 29
- Resim 3.2.** Perforin geninin 3.2 ekzon bölgesini iyileştirmek amacıyla yapılan gradient PCR'nın agaroz jel görüntüsü (557 bç). ..... 29
- Resim 3.3.** Perforin geninin 3.3 ekzon bölgesini iyileştirmek amacıyla yapılan gradient PCR'nın agaroz jel görüntüsü (763 bç). ..... 30
- Resim 3.4.** STX11 geninin 1. ekzon bölgesini iyileştirmek amacıyla yapılan gradient PCR'nın agaroz jel görüntüsü (273 bç). ..... 30
- Resim 3.5.** STX11 geninin 2.1 ekzon bölgesini iyileştirmek amacıyla yapılan gradient PCR'nın agaroz jel görüntüsü (615 bç). ..... 31

## ÖZET

### PERFORİN VE SİNTAXİN11 GENLERİNİN AİLESEL HEMOFAGOSİTİK LENFOHİSTİYOSİTOZİS (HLH) HASTALIĞINDAKİ ETKİLERİ

Aishan Rafat YASSIN

Yüksek Lisans Tezi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı Yrd. Doç. Dr. Serdar ÖZTUZCU

Temmuz 2013, 53 Sayfa

Ailesel hemofagositik lenfositiositoz (FHL), doğal katil hücre (NK) ve sitotoksik T lenfositlerin (CTL) aşırı çoğalımı sonucu biriken ve hipersitokinemi (sitokin fırtınası) ile birlikte hücresele bağışıklığın etkisizleştiği otozomal resesif bir hastalıktır. FHL, T-lenfositlerin kontrolsüz çoğalmasından kaynaklanan ciddi ve ölümcül bir hastalıktır. *Perforin* (PRF1, FHL 2), *Munc13-4* (UNC14D, FHL3) ve *sintaksin 11* (STX11, FHL 4) genlerinde meydana gelen mutasyonlar ile Chr9q21.3-q22 bölgesine yerleşik (FHL 1) henüz tanımlanmamış gendeki mutasyonlar ailesel FHL hastalığına sebep olmaktadır. Çalışmada toplam 14 FHL hastasının periferik kanından tuzla çöktürme yöntemi ile genomik DNA elde edilmiştir. *Sintaksin11* (STX11) ve *perforin* genlerinin ekzon bölgelerinin analizi için primer tasarlanmıştır. Bu ekzon bölgeleri PCR yöntemi ile çoğaltılarak otomatik dizileme cihazı ile STX11 ve *perforin* genlerinin mutasyonel taraması yapılmıştır. Mutasyonel ve nükleotid dizi analizi sonucu, 3 hastada *sintaksin11* ve *perforin* genlerinin ekzon bölgelerinde 3 mutasyon tespit edilmiştir. *Sintaksin 11* geninin 2. ekzonunda bir hastada AG ve CGC dizilerinin delesyonu tespit edilmiştir. İkinci hastada, *Perforin* geninin 3. ekzonunda bir hastada CAC→CAT değişimi görülmüştür. Üçüncü hastada ise, *Perforin* geninin 3. ekzonunda 7 baz çiftlik (TACTGAC) bir insersiyon tespit edilmiştir. Bulunan mutasyonlar çalışılan hastalarda *perforin* geninde 7 bazlık ekleme tarzında (FHL 2 varyantı) diğer 2 hastada iki tip eksilme tarzında *sintaksin 11*(FHL 4) varyantları bulunmuştur. Ailesel hemofagositik lenfositiositoz (FHL) hastalığının teşhisinde moleküler analiz çok önemli bir yer tutmaktadır ve *Sintaksin11* ve *perforin* genlerinde meydana gelen mutasyonel değişimlerin yol açtığı gen ürün bozukluğunun hastalığın gelişmesi ve seyrinde önemli olduğu diğer çalışmalarla birlikte bu çalışma ile ortaya konulmuştur.

**Anahtar sözcükler:** FHL, Dizin Analizi, *Perforin* varyantı, STX11 varyantları, Mutasyonel Tarama.

## **ABSTRACT**

### **PERFORIN AND STX11 EFFECT IN (FHL) FAMILIAL HEMOPHAGOCYtic LYMPHOHISTIOCYTOSIS**

Aishan Rafat YASSIN

Master of Science Thesis, Department of Medical Biology

Supervisor: Ass. Prof. Dr. Serdar ÖZTUZCU

July 2013, 53 pages

Familial hemophagocytic lymphohistiocytosis (FHL) is an autosomal recessive disorder caused by immune dysregulation with hypercytokinemia (cytokine storm) which leads to a defective natural killer cell (NK) and cytotoxic T lymphocyte (CTL) development. This is severe and fatal syndrome because of uncontrolled activation and proliferation of T-lymphocytes. Mutations in perforin (PRF1, FHL 2), Munc13-4 (UNC14D, FHL3) and SINTAX 11 (STX11, FHL 4) genes cause Familial Hemophagocytic Lymphohistiocytosis disease. Genomic DNA of 14 patients was obtained from their peripheral blood by using standart salting out DNA isolation technique. Primer designs of perforin and syntaxin genes were made to analyze the exons of both genes. After amplification of exonic region of STX11 and perforin genes, mutational screening of STX11 and perforin genes was done using automatic sequence analysis. Mutational and nucleotide sequence analysis of the exons revealed three mutations found in three patients in their perforin and syntaxin 11 genes. In one patient, AG and CGC nucleotide sequence deletions of second exon of STX11 gene was detected. In the second patient, CAC→CAT exchange was identified in the third exon of perforin gene. In the third patient, insertion of 7 nucleotide sequences (TACTGAC) was detected in the third exon of perforin gene. Molecular analysis plays an important role in the diagnosis of Familial Hemophagocytic Lymphohistiocytosis (FHL) disease. Detection of perforin and STX11 mutations deserve importance in this respect.

**Key words:** FHL, gene sequencing, Perforin variant, STX11 variants, mutational screening.

## 1. GİRİŞ ve AMAÇ

Hemofagositoz, T lenfositlerinin aşırı çoğalması ve kontrolsüz işlevinden kaynaklanan aşırı makrofaj etkinliği ile birden çok zararlı durumlara yol açan ciddi ve genellikle öldürücü bir hastalıktır (1).

Hemofagositozun klinik göstergeleri, nörolojik belirtiler, kan pıhtılaşma bozuklukları ve normal olmayan uzun süreli ateş durumlarıdır (2,3). Hemofagositoz hastalığında en fazla etkilenen organlar karaciğer, dalak, lenf düğümleri, kemik iliği ve merkezi sinir sistemidir (4).

Genel olarak HLH hastalığı, hemofagositoz altında yatan etiyolojik nedenlere göre genetik (primer) ve sonradan kazanılmış (sekonder) olarak iki sınıfa ayrılmaktadır (5).

Ailesel HLH lenfosit sitotoksitesi ile ilişkili genlerde meydana gelen mutasyonlara göre sınıflandırılır (6-7). Buna göre *perforin* genindeki mutasyonlar FHL2 hastalığına, *Munc13-4* genindeki mutasyonlar FHL3 hastalığına, *sintaksin11* genindeki mutasyonlar FHL4 hastalığına, *STXBP2* (Munch 18-2) genindeki mutasyon ise FHL5 hastalığına neden olmaktadır (6-7). Chr9q21.3-q22 bölgesine yerleşik henüz tanımlanmamış bir gen FHL1 hastalığına neden olmaktadır (6-7).

HLH hastalığında 1999 yılında Stepp ve arkadaşları tarafından ilk tanımlanan *perforin* gen mutasyonunun ardından günümüzde belirli mutasyonlar tanımlanmıştır (5).

Bununla birlikte şimdiye kadar populasyon gruplarına bağlı olarak HLH hastalığının patogenezi tam olarak bilinmemektedir (8).

HLH hastalığında, genetik bozuklukların sitolitik salgı yolağında önemli rol oynayan proteinlerin hasarına yol açtığı kesin olarak bilinmektedir (9). Bu yolak içerisinde perforin ve granzim içeren granül sitolitik hücreleri (NK ve sitotoksik T hücreleri) ile hedefleri arasında bağlantı gerçekleşmektedir (9). Aynı proteinlerin bazıları melanozom gibi diğer granüllerin taşınmasında önemlidir (9).

Son zamanlarda, 10. kromozomun 22 ve 23. bölgesinden kodlanan *perforin* geninin hücrel sitotoksistide önemli olan temas porunun oluşması ve granüllerin hedef hücreye aktarılmasında ciddi bir görevi olduğu açığa çıkmıştır (5).

Otozomal resesif geçişli bir hastalık olan Ailesel HLH hastalığının teşhisi, PRF1, UNC13D, STX11 ve STXBP2 gibi genlerde meydana gelen mutasyonlar saptanarak belirlenebilir (10).

STX11 geninde meydana gelen mutasyonlar genellikle Türk kökenli hastalarda görülmektedir (11-13).

Yapılan bu tez çalışmasında ailesel hemafagositik lenfohistiyozis (FHL) hastalığı olan bir grup hastadan kan örnekleri toplamayı hedefledik. Daha sonra, toplanan kan örneklerinden DNA elde etmeyi amaçladık. Sonrasında, elde edilen kalıp DNA kullanılarak *perforin* ve *sintaksin 11* genlerinin ekzon bölgelerine göre tasarlanan sentetik primerler ile PCR yöntemi kullanılarak *perforin* ve *sintaksin 11* genlerinin ekzon bölgeleri çoğaltılmayı hedefledik. *Perforin* ve *sintaksin 11* genlerinin ekzon bölgeleri çoğaltıldıktan sonra, dizin PCR'ı yapılarak her bir hastanın *perforin* ve *sintaksin 11* genlerinin ekzon bölgeleri için mutasyon taraması yapmayı amaçladık.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Hemofagositik lenfohistiyositozis

Hemofagositik lenfohistiyositozis (HLH) ender rastlanan ölümcül bir hastalıktır (2,14-17). HLH hastalığı immün bir düzensizliktir (2,14-17). T lenfositler ve makrofajların aşırı ifade edilmesi ve yangısal sitokinlerin (interferon-gama (INF- $\gamma$ ), interlökin-1 (IL-1), interlökin-6 (IL-6), tümör nekroz faktörü (TNF) gibi) bol miktarda üretimi bulunmaktadır (2,14-17). HLH, ailesel (primer) ve sekonder HLH olmak üzere iki ana gruba ayrılır (2,14-17). Her iki gruptaki klinik bulgular aynıdır (2,14-17). Ateş, hepatosplenomegali, pansitopeni, lenfadenopati en sık rastlanan bulgulardır (2,14-17).

Ailesel HLH (Familial Hemafagositik lenfohistiyositozis; FHL) otozomal resesif kalıtım göstermekte ve genellikle 0-2 yaş arasında görülmektedir (2,14-20). Sekonder HLH ise genellikle viral enfeksiyonlar sonucunda oluşmaktadır (2,14-20). Bu nedenle, sekonder HLH “virus ilişkili hemofagositik sendrom” olarak da adlandırılmaktadır (2,14-20). Virus dışında bakterilerin, mantarların ve protozoal enfeksiyonların da HLH hastalığına neden olmasından dolayı hastalığın ismi “enfeksiyon ilişkili hemofagositik sendrom” olarak değiştirilmiştir (2,14-20). Sistemik lupus eritematozus, romatoid artrit gibi kollajen doku hastalıklarına bağlı gelişen HLH’lar sekonder HLH grubunun içerisinde yer almaktadır (2,14-20). Çeşitli sebeplerden kaynaklanan bazı immün yetmezlikler de HLH hastalığına neden olmaktadır (2,14-20).

#### 2.1.1. Epidemiyolojisi

HLH hastalığı her yaş aralığında görülebilmektedir (3,15,16,21). Ailesel HLH hastalığı yüksek oranda çocukluk döneminde tespit edilmektedir (3,15,16,21). Sonradan kazanılan HLH (sekonder) ise her yaş döneminde görülebilmektedir (3,15,16,21). Ailesel HLH otozomal resesif kalıtımla geçiş gösteren bir hastalık olduğu için akraba evliliğinin yüksek olduğu toplumlarda görülme sıklığı daha yüksektir (3,15,16,21). Örneğin; Türkiye’de ailesel HLH hastalığında perforin gen mutasyonu normalden daha sık görülmektedir (3,15,16,21).

HLH kadın ve erkeklerde benzer oranda bulunmaktadır (15-16,22). HLH hastalığının görülme sıklığı yılda milyonda 1,2 vaka olarak tespit edilmiştir (15-16,22). Ayrıca, 50 bin doğumda bir HLH hastasına rastlanmaktadır (15-16,22). Son zamanlarda, sonradan kazanılan HLH hastalığının daha iyi tanımlanabilmesi sonucu HLH görülme sıklığı gittikçe artmaktadır (15-16,22).

HLH hastalarında ayrıca eritrosit, lökosit, trombosit ve doğal katil (NK) hücrelerin sayısı azaldığından dolayı da immün yetmezlik meydana gelmektedir (15-16,22). Sonradan kazanılan HLH hastalığına neden olan mikroorganizmalar Tablo 2.1’de gösterilmektedir. Pediatrik Hematoloji Derneği, Türk Histiosit Grubu’nun 6 merkezden gelen sonuçlara göre elde ettiği sonradan kazanılan HLH hastalığına neden olan hastalıklar Tablo 2.2’de gösterilmiştir.

**Tablo 2.1.** Sonradan kazanılan HLH hastalığına neden olan yangı etkenleri (15).

<b>Virus</b>	EBV	HIV
	CMV	Kızamık
	Adenovirus	Kızamıkçık
	Hepatit A,B,C	Human herpes virus 6 ve 8
	Herpes simplex	İnfluenza
	Parvovirus B-19	Parainfluenza
	Varisella	
<b>Bakteri</b>	Brucella melitensis	Salmonella typhi
	Mycobacteria tuberculosis	Coxiella burnetii
	Chlamydia psittaci	Ehrlichia sp.
	Chromobacterium violaceum	Mycoplasma pneumoniae
	Orientia tsutsugamushi	Rickettsia conorii
	Borrelia burgdorferi	Leptospira sp.
<b>Mantar</b>	Aspergillus sp.	Candida albicans
	Cryptococcus neoformans	Histoplasma capsulatum
	Penicillium marneffeii	Pneumocystis carinii
<b>Parazit</b>	Leishmania sp.	Toxoplasma gondii
	Trypanosoma brucei	Plasmodium falciparum
	Babesia microti	Strongyloides stercoralis

**Tablo 2.2.** Sonradan kazanılan HLH hastalığına neden olan enfeksiyonlar ve diğer hastalıklar (15, 23).

<b>Enfeksiyonlar</b>	<b>%</b>	<b>Diğer Hastalıklar</b>	<b>%</b>
EBV	11,8	SLE	2
Parvovirus	7,8	Ülseratif kolit	2
Brucella	5,9	Psöriatik artrit	2
Borellia Burgdoferi	2	Aplastik anemi	2
Leishmania	2	Akut lenfoblastik lösemi	23,6
Tuberküloz	2	Nedeni bulunamayan	13,8
Candida	2		
Kırım Kongo Hemorajik Ateşi	2		
Hepatit A virusü	2		
Rubella	2		

### **2.1.2. Patofizyolojisi**

HLH hastalığında karaciğer, lenf düğümü, dalak, kemik iliği, deri gibi dokularda monosit, makrofaj, histiosit etkinliği ve çoğalması sonucu lökosit, eritrosit ve trombositlerin azalması ile klinik bulgular tespit edilmektedir (10,15,24-26). HLH hastalığının altta yatan patofizyolojisi son yıllarda çokça çalışılan bir konudur (10,15,24-26). İmmunojen hücrelerinin yetersiz programlı hücre ölümü (apoptozis) ve makrofaj etkinliği ile aktif T hücrelerinin çoğalması sonucu uygun olmayan tepkimelerin oluşması son yıllarda kabul edilen bir görüştür (10,15,24-26). Ancak, kesin olarak bu mekanizma açıklığa kavuşamamıştır (10,15,24-26). Özellikle, ailesel HLH hastalığında *perforin* geninde meydana gelen mutasyonlar sonucunda NK hücrelerinin etkinliğindeki azalmanın HLH'a sebep olduğu bildirilmektedir (3,5,15,21,27,28).

*Perforin* geni 10. kromozomun uzun kolunun (q kolu) 22. bölgesinde bulunan sitotoksik özelliğe sahip bir proteini kodlayan bir gendir (3,5,15,21,27,28). NK hücreleri etkin hale geldiğinde, Perforin proteini granzim içeren kesecikleri salgılayarak hedef hücre zarında

porlar oluşturmaktadırlar (3,5,15,21,27,28). Bu şekilde hücrenin proteinlerinin yıkımına ve parçalanmasına neden olmaktadır (3,5,15,21,27,28). *Perforin* geni eksiltelen (knockout) deney hayvanlarında hücre içi patojenlere karşı savunma bozukluğu görüldüğü bildirilmiştir (3,5,15,21,27,28). Ailesel HLH teşhisi konulan hastaların yaklaşık olarak % 20-30'unda *perforin* gen mutasyonu tespit edilmiştir (3,5,15,21,27,28).

HLH hastalığında NK hücre etkinliği azalmaktadır (10,15,25,26). Ancak, T hücrelerinin işlevsel hale gelmesi sonucu aşırı miktarda sitokin üretimi gerçekleşmektedir (10,15,25,26). IFN- $\gamma$ , IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  ve granülosit makrofaj uyarıcı faktörü (GMSF) artışı ve makrofaj etkinliği ile oluşan aşırı inflamatuvar yanıt gerçekleşmektedir (10,15,25,26).

### 2.1.3. Ayırıcı Tanı

HLH hastalığının tanısının tam olarak belirlenebilmesi için tanı kriterleriyle örtüşmesi gerekmektedir (15). Birçok HLH vakası dikkatli incelenmediğinden dolayı gerçek tanı konulamayabilir ya da sepsis (kan zehirlenmesi) gibi yanlış tanıları konulabilir (15). HLH hastalığının teşhisinde kullanılan klinik ve laboratuvar bulguları ayrıntılı bir şekilde Tablo 2.3'te gösterilmektedir.

**Tablo 2.3.** HLH hastalığında klinik ve laboratuvar bulgular (15).

<b>Klinik bulgular</b>	<b>%</b>	<b>Laboratuvar bulgular</b>	<b>%</b>
Ateş	60-100	Anemi	89-100
Splenomegali	35-100	Trombositopeni	82-100
Hepatomegali	39-97	Nötropeni	58-87
Lenfadenopati	17-52	Hipertrigliseridemi	59-100
Döküntü	3-65	Hipofibrinojemi	19-85
Nörolojik bulgular	7-47	Hiperbilirubinemi	74

HLH hastalığının teşhisi Histiosit Derneği'nin HLH-94 ve HLH-2004 numaralı çalışmalarına göre yapılmaktadır (29). HLH hastalığının tanısı için yukarıdaki testlerde bulunan 8 kriterden 5'inin tanısı gereklidir (Tablo 2.4) (29).

**Tablo 2.4.** Hemofagositik lenfositosis tanı kriterleri (2004) (29).

<b>Majör kriterler</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Ateş</li><li>• Splenomegali</li><li>• <math>\geq 2</math> hücre serisini etkileyen sitopeni<ul style="list-style-type: none"><li>– Hb <math>&lt; 9</math> g/dl veya</li><li>– Trombosit <math>&lt; 100</math> bin/ul veya</li><li>– Mutlak nötrofil sayısı <math>&lt; 1000</math>/ul</li></ul></li><li>• Hipertrigliseridemi veya hipofibrinojenemi<ul style="list-style-type: none"><li>– Trigliserid <math>\geq 265</math> mg/dl veya</li><li>– Fibrinojen <math>\leq 150</math> mg/dl</li></ul></li><li>• Hemofagositoz<ul style="list-style-type: none"><li>– Kemik iliği</li><li>– Dalak</li><li>– Lenf düğümü</li><li>– BOS</li></ul></li></ul>
<b>Alternatif kriterler</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>• NK aktivitesinin yokluğu ya da azalması</li><li>• Serum ferritin <math>&gt; 500</math> ug/dl</li><li>• sIL2R (CD25) <math>\geq 2400</math> U/ml</li></ul>
<b>Tanı</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>• 5 majör kriter</li><li>• Alternatif kriterlerden 1.'si ya da 2+3 bir majör kriter yerine geçebilir.</li></ul>

Splenomegali, ateş, en az iki hücreyi etkileyen hipertrigliseridemi, sitopeni, veya hipofibrinojenemi ve hemofagositozdan oluşan 5 ana kriter tanı için gerekli görülmektedir (30). Doku örnekleme ile tanı yapmak mümkündür (30).

#### **2.1.4. Klinik bulgular**

HLH hastalığının en belirgin bulguları ateş, hepatosplenomegali ve sitopenidir (2,14-17). HLH hastalığı bulunan kişilerde bir haftadan uzun süre 38,5 °C'nin üzerinde ateş gözlenir (2,14-17). Bazı durumlarda ise sarılık hastalığına da rastlanabilmektedir (2,14-17). HLH hastalarının genellikle % 65'inde özgül olmayan döküntü gözlenmektedir (2,14-17). Bunun dışında ataksi, konvulsiyon, hemipleji, mental durum bozuklukları gibi nörolojik belirtiler kaydedilmiştir (2,14-17). İstahsızlık, halsizlik, kilo kaybı gibi belirtiler de HLH hastalarında görülebilmektedir (2,14-17).

#### **2.1.5. Ölüm oranı (Mortalite)**

Modern tedavi yöntemleri uygulanmadan önce, ailesel HLH çocuklarının yıllık sağkalım oranları sıfıra yakındı (17). İlk tedavi protokolü HLH-94'ten sonra, hemapoetik hücre transplantasyonu sonrasında FHL olan hastalarda % 62 sağkalım ve % 55 genel sağkalım oranı ile sonuçlanmıştır (31).

Sonradan kazanılan HLH hastalığı için ölüm oranı % 8 ile % 22 arasında değişmektedir (32). Geri dönüşümü olmayan doku hasarını önlemek amacı ile ister primer ister sekonder olsun çoklu teşhis ile derhal tedaviyi gerektirmektedir (32).

### **2.2. HLH'nin sınıflandırılması**

HLH hastalığı genetik (ailesel HLH; FHL) ve sonradan kazanılan (sekonder) olmak üzere iki çeşittir (33-35).

#### **2.2.1 Ailesel HLH (FHL)**

Genetik HLH, immun yetmezlik sendromu ve ailesel türlerine göre sınıflandırılmıştır (5,27,35-37). Ailesel ve immun yetmezlik durumlarına göre sınıflandırılan FHL hastalığının alt tipleri, mutasyon görülen genler ve mutasyonun kromozomdaki yerleşkesi Tablo 2.5'te ayrıntılı bir şekilde gösterilmiştir.

Otozomal resesif bir hastalık olan FHL hastalığının 5 adet alt tipi bulunmaktadır (FHL1, FHL2, FHL3, FHL4, FHL5) (5,27,35-37). Bu alt tiplendirme lenfosit sitotoksitesi ile ilişkili proteinleri kodlayan genlerdeki farklı mutasyonlarla ilişkilendirilmiştir (5,27,35-37).

**Tablo 2.5.** HLH hastalığının genetik türleri (35).

<b>(1) Ailesel hemofagositik lenfohistiyozis (FHL)</b>		
<b>Alt tipi</b>	<b>Gen</b>	<b>Mutasyonun yerleşkesi</b>
FHL1	bilinmiyor	9q21.3-22
FHL2	<b>PFR1</b>	10q21-22
FHL3	UNC13D	17q25
FHL4	<b>STX11</b>	6q24
FHL5	STXBP2	19p13
<b>(2) İmmün yetmezlik hastalığı</b>		
<b>Hastalık</b>	<b>Gen</b>	<b>Mutasyonun yerleşkesi</b>
Chédiak-Higashi hastalığı	LYST	1q42.1-42.2
Griscelli hastalığı 2	RAB27A	15q21
X'e bağlı lenfoproliferatif hastalık	SH2D1A	Xq24-26
	XIAP	Xq25

Yapılan bir araştırmaya göre, İsveç'te her yıl FHL hastalığının görülme sıklığı 100 binde 0,12 olarak bildirilmektedir (3,35). FHL hastalığı, % 80 oranında bebeklerde ortaya çıkmakta olup, nadiren de olsa yetişkinlerde de ortaya çıkabilmektedir (3,35).

Sitotoksik T ve doğal öldürücü hücre etkinliği, FHL hastalarında sürekli düşük veya hiç bulunmamaktadır (21,38-41).

*Perforin* (PRF1, FHL 2), *Munc13-4* (UNC14D, FHL3) ve *sintaksin 11* (STX11, FHL 4) genlerinde meydana gelen mutasyonlar ailesel HLH hastalığına sebep olmaktadır (5,27,36,42). FHL hastalarında gözlenen *PRF1* ve *UNC14D* mutasyonları sırasıyla coğrafi bölgelere bağlı olarak değişmekle birlikte % 15-50 ve % 15-25 oranında bulunmaktadır (5,27,36,42). *STX11* mutasyonları ise Türkiye kökenli olup, FHL hastalarının yaklaşık % 20'sinde görülmektedir (12,42).

### **2.2.1.1. FHL 1**

FHL hastalığının genetik belirteçleri uzun yıllar araştırılmış, kromozomal anormallikler çok büyük çalışmalar yapılarak araştırılmıştır (1,43). Fakat yine de, FHL hastalığının genetik belirteçleri tam olarak açıklığa kavuşmamıştır (1,43). Son birkaç yıl içerisinde yapılan bir çalışmada, Pakistan asıllı dört akraba FHL hastalığına sahip aile üzerinde 9. kromozomun uzun kolunun 21.3 bölgesinde FHL 1 yeri (locus) tespit edilmiştir (1,27). Ancak, bu bölgedeki hasar herhangi bir gen ile ilişkilendirilememiştir (1,27).

### **2.2.1.2. FHL 2**

FHL hastalığına neden olan sebeplerden birisi sitolitik etkinliğin önemli elemanlarından perforin proteininin (Prf1) yapısal bozukluğu olup perforin geninde gelişen mutasyonlarla ilgilidir (1,5). Prf1 sitolitik granüllerin ana proteinlerinden birisidir. Sitolitik etkinlikli T hücresi ve NK hücrelerinin hedef hücrelerinin zarlarında delik (por) oluşturulmasında rol oynayan proteinlerden birisidir (1,5). İnsan perforin geni 555 amino asit kodlayan, ekzon 2 ve ekzon 3 olmak üzere 3 adet ekzon içereren bir gendir (1,44). Yani ekzon 1 herhangi bir amino asidi kodlamamaktadır (Şekil 2.2) (1,44). Perforin geni FHL 2 hastalığı ile ilişkilendirilmiştir (1,44). FHL 2 hastalığına sebep olan perforin geninde oluşan mutasyonlar, ciddi ölçüde lenfosit dengesinin bozulmasına sebep olarak hemofagositik hastalığının gelişmesine neden olmaktadır (1). Şimdiye kadar tespit edilen perforin gen mutasyonları lenfositlerin granül bağımlı sitotoksik işlevini etkilediği için perforinin hemafagositik hastalığındaki rolünü açıkça göstermektedir (1).

### **2.2.1.3. FHL 3**

FHL 3 hastalığı olan hastalar, perforin gen mutasyonu olan FHL 2 hastalarıyla çok sayıda ortak özellik içermektedirler (1,27). Ancak FHL 3 hastalığına sahip olan bireylerde, perforin geninden bağımsız olarak lenfosit sitotoksik bozuklukları meydana gelmektedir (1,27). FHL 3 hastalığı Munc13-4 UNC13 ailesine mensup olan hMunc13-4 proteinini kodlayan *UNC13D* geninde meydana gelen mutasyonlarla ilişkilendirilmiştir (1,27). *UNC13D* geni 123 kDa protein kodlayan 32 adet ekzon içermektedir (1,27). Litik granüllerin ekzosistosis yoluyla hücreler arası salınımında temel görevi olan bir protein

olup ekzosistosis esnasında veziküllerin olgunlaşması ve sitolitik granüllerin salınımının düzenlenmesinde işlevsel bir özelliği vardır (1,27). Bu proteinin C ucundaki C2 bölgesi vezikül olgunlaşması ve salınımının düzenlenmesi işlevinde yer alır (1,27). Özellikle C2 bölgesinde olabilecek mutasyonlar hücrel bağışıklık sisteminin etkinliğini azaltacaktır.

#### **2.2.1.4. FHL 4**

Son zamanlarda diğer ailesel FHL hastalığına sebep olan mutasyonların yanında *sintaksin 11* gen mutasyonu sonucu oluşan FHL 4 hastalığı tespit edilmiştir (11,36). Son yapılan bir çalışmada, 6 FHL ailesinden alınan örneklerle SNARE proteinini kodlayan *STX11* geninde çeşitli mutasyonlar tespit edilmiştir (11,36). *STX11* geni fagositlerde ve antijen sunan hücrelerde çok miktarda ifade edilmekle birlikte, FHL hastalığının oluşumundaki rolü tam olarak açıklığa kavuşmamış olmakla birlikte (11,45). *STX11* ifadesindeki artış Fc almacının tetiklediği salınımı arttırdığı ve buna bağlı olarak hücre aracılı hücre ölümünü tetiklediği ve *STX 1*'in baskılandığı durumlarda ekzosistosisin de durduğu bulunmuştur (46). Arneson ve ark (2007) kendi ve diğer çalışmalar birlikte değerlendirildiğinde hücre aracılı sitotoksitenin gelişimi sırasında hücre içi vezikül göçünün düzenlenmesindeki işlevi ile *STX11* doğal katil hücrelerin ve etkinleştirilmiş CT limfositlerin işlevini düzenlediğini yorumlamaktadırlar (46).

#### **2.2.1.5. FHL 5**

FHL 5 hastalığına *syntaxin bağlayıcı protein 2* (*STXBP2*; syntaxin binding protein 2)'de meydana gelen mutasyonlar neden olmaktadır (37). *STXBP2* proteini hücre içi trafiğin düzenlenmesi ve SNARE bileşiminin kontrolünden sorumlu bir proteindir (37).

#### **2.2.2. Sonradan kazanılan HLH (sekonder HLH)**

Sonradan kazanılan HLH hastalığı genellikle çocuk yaşlarda ortaya çıkmakla beraber, her yaşta ortaya çıkabilmektedir (19,35,47). Günümüzde sonradan kazanılan HLH hastalığının görülme sıklığına dair kesin veriler bulunmamaktadır (19,35,47). Fakat toplum temelli

yapılan bir çalışmada, sonradan kazanılan HLH hastalığının görülme sıklığının yılda 280 binde bir ya da 100 binde 0,36 olduğu bildirilmiştir (48).

Sonradan kazanılan HLH hastalığı genellikle birçok virüsle ilişkili olmasına rağmen, hastalığın yaklaşık olarak % 50'si *Epstein-Barr virüs (EBV)* enfeksiyonları ile ilişkilendirilmiştir (47,49). Sitomegalo virüs (CMV), adenovirüs, herpes simplex virüs (HSV) , varicella-zoster virüs (VZV), influenza virüsleri, hepatit virüsleri ve HIV gibi virüslerde sonradan kazanılan HLH hastalığı ile ilişkilendirilmiştir (47,49). Bununla beraber parazitik, mantar ve bakteriyel enfeksiyonlar da sonradan kazanılan HLH hastalığına yol açabilmektedir (47,49).

### **2.3. Perforin (PRF1) Geni**

FHL hastalığına neden olan tanımlanan ilk gen *PRF1* genidir (5). *PRF1* geni 555 amino asidi kodlayan Ekzon 2 ve Ekzon 3'ten oluşmaktadır (44). *PRF1* geninin 1inci ekzonu herhangi bir amino asit kodlamamaktadır (44). Perforin proteini endoplazmik retikulumun lümeni içerisinde parçalanabilen 21 amino asitlik bir önder peptid dizisi bulundurmaktadır (44).

Perforin proteini 70 kDa olup, işlevsel olmayan öncül bir yapıda sentezlenmektedir (50). Karboksil (C) ucunda bulunan asidik bir bölgeden kesilerek, 60 kDa'lık işlevsel yapı elde edilmektedir (Şekil 2.2) (50).

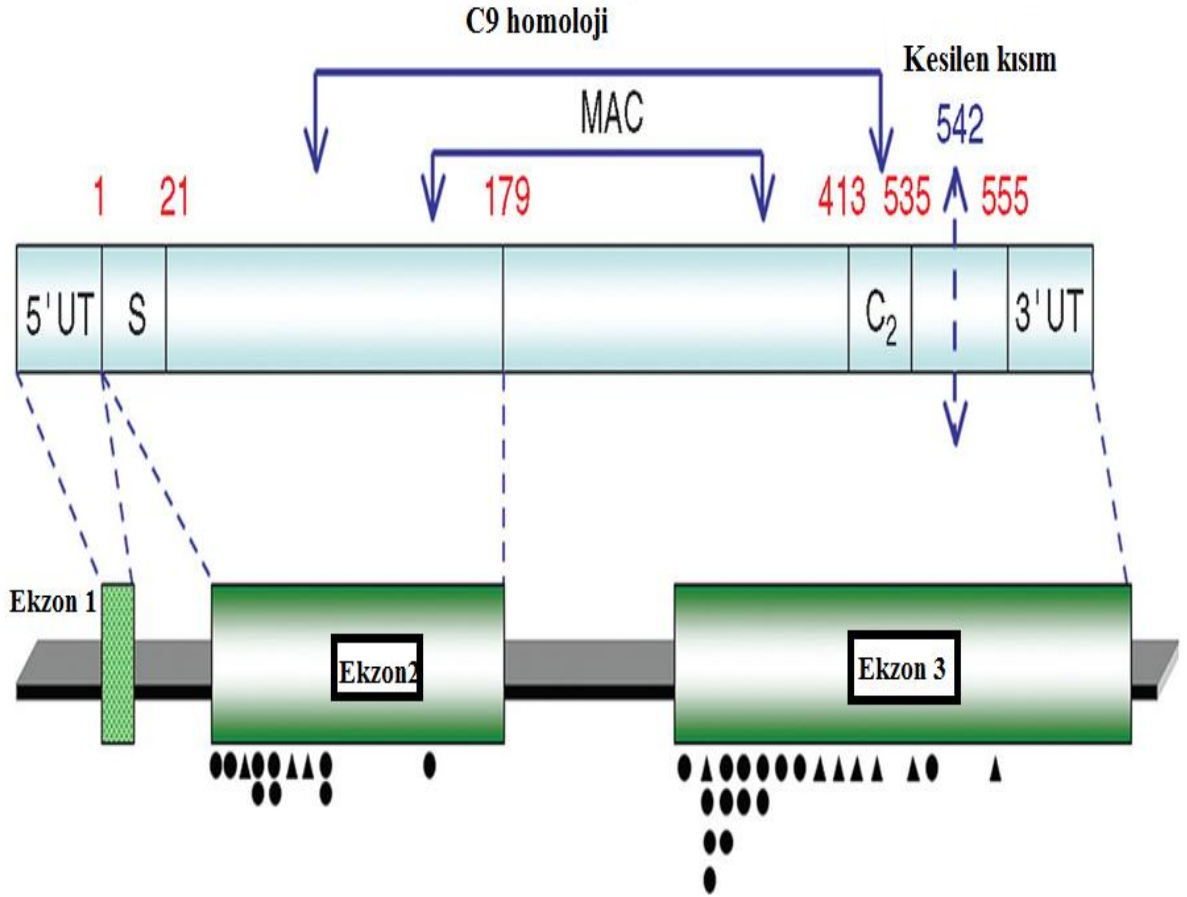
*PRF 1* geninin ekzon, intron ve kodlanan bölgelerinin baz uzunlukları Tablo 2.6'da ayrıntılı bir şekilde gösterilmektedir (50).

Perforin P1, PFP, FLH2, PFN1 ve HPLH2 olarak da bilinmektedir (51).



Ailesel HLH hastalarının yaklaşık olarak % 50'sinden fazlasında *perforin* gen mutasyonu tespit edilmiştir (54). Bu mutasyonlar anlamlı, anlamsız ya da mikrolelesyon şeklinde olabilmektedir (54). Bu mutasyonlar C9 bölgesinin içerisinde zarlar arası geçiş bölgesinde bulunan dizi boyunca dağılmaktadırlar (54).

*Perforin* geninde görülen bazı mutasyonlar genellikle akraba evliliklerinin yaygın olduğu toplumlarda daha sık görülmektedir (54).



**Şekil 2.2.** Ailesel HLH hastalığında *perforin* geninde meydana gelen mutasyonların Perforin proteinindeki yerlerinin gösterilmesi (1).

### **2.3.1. Perforin Proteininin C2 Bölgesi (Domain)**

Perforin, C-ucunda lenfosit aracılı sitotoksitite olarak rol oynayan bir C2 bölgesi içermektedir (55-57). Perforin genindeki mutasyonlar FHL2 'ye yol açmaktadır (55-57). Perforinin işlevi, kalsiyuma bağımlı C2 bölgesi ile hedef hücrelere bağlanmaktadır (55-57). C2 bölgelerinin çoğu hücrelerarası proteinler, inositol polifosfatlar ve fosfolipitler gibi geniş yelpazedeki maddeleri içeren kalsiyum bağımlı zar hedef modülleridir (55-57).

### **2.3.2. Perforin proteinin zar atak bileşim bölgesi (The membrane attack complex/perforin; MACPF)**

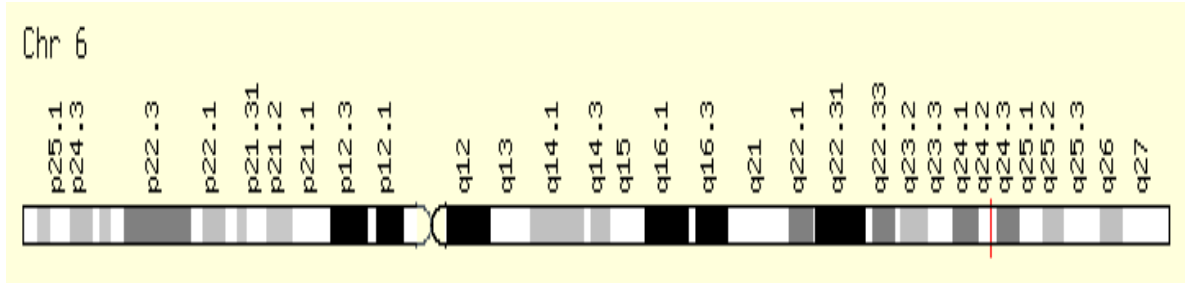
Zar atak bileşimi bölgeleri (The membrane attack complex/perforin) bitkilerde, mantarlarda, memelilerde ve bakterilerde korunmuştur (58). Bu terim, ilk zamanlarda perforin ve beş tane kompleman sistem (C6, C7, C8-alfa, C8-beta ve C9) için ortak olarak kullanılmıştır (58). Bu moleküller doğal ve sonradan kazanılmış bağışıklıkta çok önemli bir işlev gösterirler (59). MAC ailesi proteinleri ve perforin, bilinen litik por oluşturan proteinlerdir (59). Patojen enfeksiyonlarına karşı, zar hücum karmaşımı olarak bilinen bu yapı, zarlar arası kanalları oluştururlar (59).

## 2.4. Sintaksin11 (STX11) Geni

STX11 geni, syntaxin ailesi üyesi tarafından kodlanmaktadır (11-13). Sintaksinler, hücre içi keseciklerin taşınması ve hedeflenmesi ile ilişkilidirler (11-13). Bu aile üyeleri, golgi ağı ve geç endozomlar arasındaki protein geçişini düzenlemektedirler (11-13). STX11 geninde meydana gelen mutasyonlar ailesel HLH hastalığı ile ilişkilendirilmiştir (11-13).

*Syntaxin11* geninin kromozom üzerindeki yeri Şekil 2.3'te gösterilmektedir (60).

*STX11*, FHL4, HLH4 ve HPLH4 olarak da bilinmektedir (60).



Şekil 2.3. *Syntaxin11* geninin kromozom üzerindeki yeri (60).

*STX11* geni iki ekzondan oluşmaktadır (11-13). *STX11* geni 37 kb'lık bir aralığı kapsamaktadır (11-13). *STX11* geninin sadece ikinci ekzon bölgesi kodlanmaktadır (11-13). *STX11* geninin ekzon- intron bilgileri Tablo 2.7'de gösterilmektedir.

Tablo 2.7. *STX11* geninin ekzon-intron bilgileri (61).

Aralık (5' ten 3' e)		Uzunluk (bç)		
Ekzon	Kodlanan	Ekzon	Kodlanan	İntron
144471654-144471840		187		35919
144507760-144513076	144507765-144508628	5317	864	

#### **2.4.1. Sintaksin 11 proteininin N-Ucu bölgesi**

Sintaksinler presinaptik plazma zarı ile sinaptik veziküllerin bağlanmasında rol oynayan sinir sistemine özgü proteinlerdir (55-57). Sintaksinler Habc olarak isimlendirilen iyi korunmuş antiparalel üçlü sarmal şeklinde bir amino bölgesi içermektedir (55-57). Bu bölge karboksil ucuna yaklaşık 30 aminoasit ile bağlanmaktadır (55-57).

#### **2.4.2. Çözünebilir NSF bağlı protein almaç bölgesi (Soluble NSF (N ethylmaleimide sensitive fusion protein)- Attachment protein (SNAP) Receptor domain)**

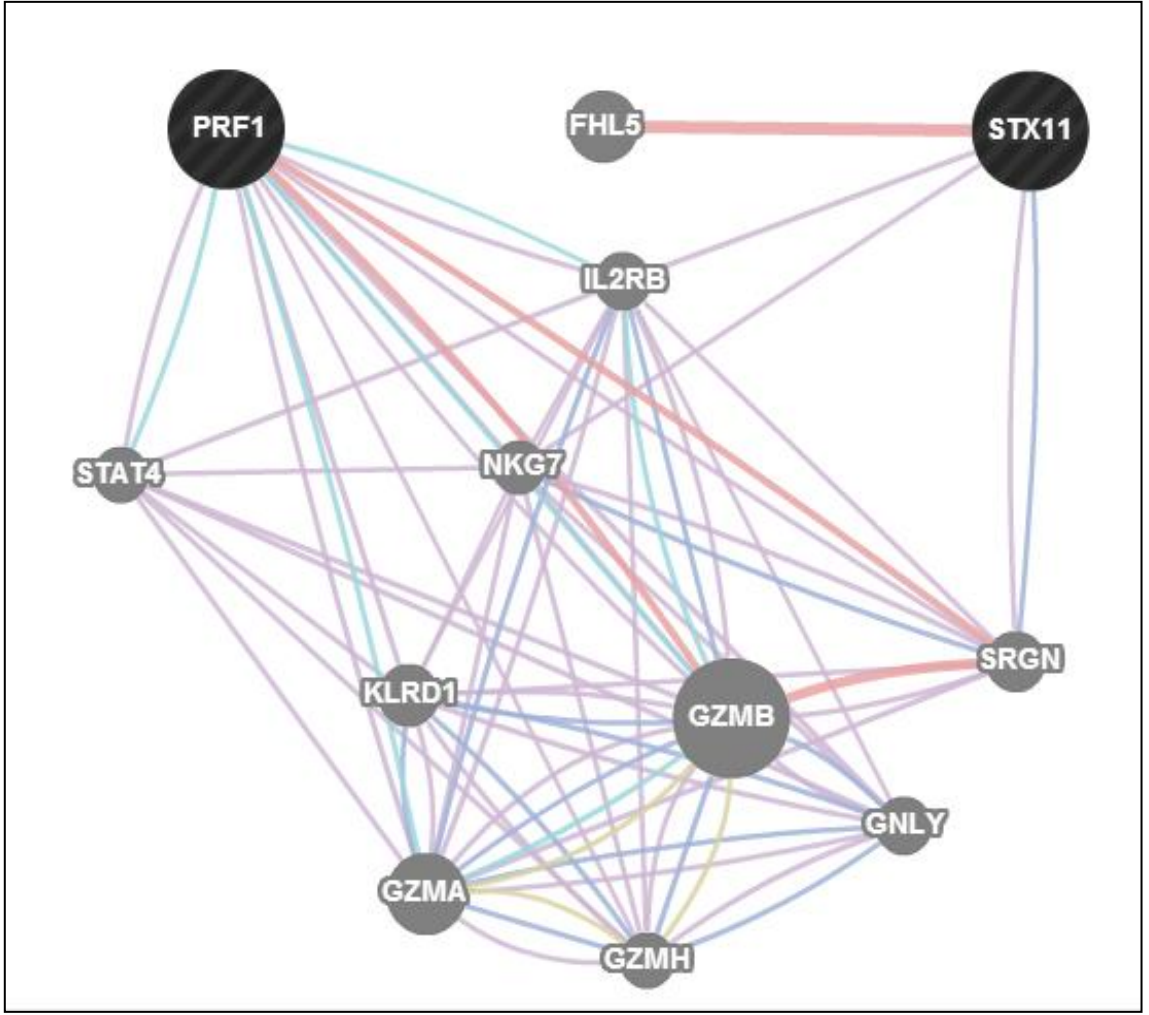
Alfa- sarmal motifleri bükülmüş ve paralel heterotetramerik sarmal demetleridir (55-57). Ana bileşim kese zarına sıkı sıkıya bağlı sarmal bir şekilde protein (synaptobrevin), hedef zardaki sarmal protein (syntaksin) ve hedef zara sabitlenmiş iki sarmal protein içerir (SNAP-25) (55-57).

Şekil 2.4'e göre perforin 1 geni serglycin (SRGN) geni ve granzyme B (granzyme 2, cytotoxic T-lymphocyte-associated serine esterase 1) geni ile fiziksel etkileşim göstermektedir (62). Syntaksin 11 geni ise FHL5 geni (four and a half LIM domains 5) ile fiziksel etkileşim göstermektedir (62).

Perforin 1 geni, granzim A (granzyme 1, cytotoxic T-lymphocyte-associated serine esterase 3), granzyme B, STAT4 (signal transducer and activator of transcription 4), IL2RB (interleukin 2 receptor, beta) ve NKG7 (natural killer cell group 7 sequence) ile aynı yolda yer almaktadır (62).

Syntaksin 11, NKG7 ve SRGN ile birlikte yerleşim göstermektedir (62). Granzim A, granzim B ve granzim H (cathepsin G-like 2, protein h-CCPX) ortak protein bölgeleri (domain) içermektedir (62).

Şekil 2.4'e göre *STX11* ve *perforin* genleri birlikte ifade edilmekle birlikte STX11 proteinin bu şemadaki FHL5 geni hariç diğer proteinlerle fiziksel etkileşim göstermemesi STX11'in hücre içi yerleşimi ve etki mekanizmasının farklı olduğunu gösterir (62).



Şekil 2.4. Gene Mania veritabanı ile *perforin* ve *sintaksin 11* genlerinin arasındaki ilişkinin gösterilmesi (62).

- |                                       |         |
|---------------------------------------|---------|
| • <u>Birlikte ifade edilmesi</u>      | % 37,73 |
| • <u>Fiziksel etkileşim</u>           | % 32,73 |
| • <u>Yolak</u>                        | % 6,73  |
| • <u>Birlikte yerleşim</u>            | % 5,32  |
| • <u>Paylaşılan protein bölgeleri</u> | % 0,98  |
| • <u>Genetik etkileşim</u>            | % 0,36  |



### **3.2. Hastalardan Kan Numunelerinin Toplanması**

Bu çalışmada; Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi, Şahinbey Araştırma ve Uygulama Hastanesi Hematoloji Bölümünde, Hemofagositik Lenfohistiyozis teşhisi koyulan 14 hastadan DNA eldesi için kullanılmak üzere EDTA'lı tüplere 5'er ml kan alındı. EDTA'lı tüplere alınan kanlar, DNA eldesi için kullanılmak üzere -20 ° C'deki derin dondurucuda saklandı.

### **3.3. Kan Numunelerinden DNA Eldesi**

-20 °C'deki EDTA'lı tüplerdeki kan örnekleri oda sıcaklığına çıkartılıp, çözülmesi sağlandı. Daha sonra, EDTA'lı tüplerden alınan 5 ml kan örnekleri 15 ml'lik yeni tüplere aktarıldı. 15 ml'ye kadar üzeri soğuk su ile tamamlandı. 4000 rpm'de 25 dakika boyunca santrifüj edildi. 6 ml'ye kadar dökülüp, üzeri tekrar soğuk su ile tamamlandı. 4000 rpm'de 25 dakika boyunca santrifüj edildi. Bu işlem üç kez tekrar edildi. Alt kısımda oluşan pelletin üzerine 3ml üre içeren parçalama çözeltilisi koyuldu. Pelletin Üzerine 400 µl % 20'lik SDS (Sodyum dodecyl sulphate) ve 100 µl proteinaz K eklendi. Tüpler 37 ° C'de bir gece boyunca inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün, tüpleri 2 ml 5 M NaCl eklenip, tüpler çalkalandı ve oda koşullarında 20 dakika bekletildi. Daha sonra, tüplerin içerisine 8 ml kloroform eklendi ve 4000 rpm'de 25 dakika santrifüj edildi. Tüplerin içerisinde 3 tabaka oluştu. En üst tabaka alınıp, yeni bir tüpe aktarıldı. Üzerine 15'yi tamamlayacak kadar soğuk % 96'lık etil alkol koyuldu. Bu aşamada, DNA görüldü. DNA alınıp, 1,5 ml'lik tüplere aktarıldı. DNA'lar % 70'lik etil alkol ile yıkandı. Daha sonra, 13,000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. DNA'yı % 70'lik alkol ile yıkama işlemi üç kez tekrar edildi. Tüpler kurumaya bırakılarak, alkolün buharlaşması sağlandı. DNA'lar kurutulduktan sonra, 300 µl steril su eklendi ve DNA'lar 4 °C'de çözüldü ve -20 ° C'ye kaldırıldı.

### **3.4. DNA'ların Kalite ve Miktar Tayinleri**

Elde edilen DNA örnekleri Nanodrop spektrofotometrede  $A_{260}/A_{280}$  oranları belirlenerek her örnek için miktar ve kalite tayini yapılmıştır. PCR tepkimeleri için DNA yoğunluklarına göre gerekli olan seyreltmeler yapılmıştır.

### 3.5. Primerlerin Tasarlanması

Çalışmada kullanılmak üzere, *perforin* ve *STX11* genlerine ait ekzon dizilerine uygun sentetik primerlerin tasarlanması NCBI/Primer Blast veritabanı kullanılarak yapılmıştır. *Perforin* ve *STX11* genlerinin ekzon dizileri için tasarlanan primerlerin dizileri, uzunlukları, bağlanma sıcaklıkları, GC oranları ve PCR ürün büyüklükleri Tablo 3.2 ve Tablo 3.3'te ayrıntılı bir şekilde gösterilmiştir.

**Tablo 3.2.** *Perforin* geninin ekzonlarına göre tasarlanan primerlerin özellikleri.

	Dizi (5'->3')	Primer uzunluğu	Bağlanma sıcaklığı (°C)	GC%	PCR ürünü (bp)
<b>Ekzon 1</b>	CCCCCAATCCCTGCTCT	17	57.75	64.71	171
	GCGGGGCAGGAAGTAGAAGT	20	61.90	60.00	
<b>Ekzon 2</b>	TTTCCAGGGCTCCTAGACCA	20	59.88	55.00	680
	AGCAGTCATCCTCCATCCCT	20	60.03	55.00	
<b>Ekzon 3.1</b>	TCTCTGGGGTGTGTTTGGTC	20	59.53	55.00	743
	AGGACCAGTATGCTTGGACTG	21	59.44	52.38	
<b>Ekzon 3.2</b>	CCCACTGTGAGAACCCCTTC	20	59.96	60.00	557
	GAGACCCATGCCAGTGTGTG	20	60.96	60.00	
<b>Ekzon 3.3</b>	CCCCATGCTTGGATGAAGGT	20	60.03	55.00	766
	GGGAGCTGAGGTCTCTCTCT	20	59.74	60.00	

**Tablo 3.3.** *Sintaksin11* geninin ekzonlarına göre tasarlanan primerlerin özellikleri.

	Dizi (5'→3')	Primer uzunluğu	Bağlanma sıcaklığı (°C)	GC%	PCR ürünü (bç)
<b>Exon 1</b>	AGCTGTGGTCGCTTCCTAA	19	58,64	52.63	273
	TCAGGAAGAGAAATGGGGGC	20	59,37	55.00	
<b>Exon 2.1</b>	ACTTATTGCCACACCGAGG	20	60.04	55.00	615
	TGGATGCGGATCTTGCAGTT	20	60.04	50.00	
<b>Exon 2.2</b>	AGGTCATCCACTGCAAGCTG	20	60,32	55.00	575
	CTGCTACTTGAGGCAGGGAC	20	60,11	60.00	

### 3.6. *Perforin* ve *Sintaksin11* Gen Bölgelerinin PCR Yöntemi ile Çoğaltılması

*Perforin* ve *STX11* genlerinin ekzon bölgelerine ait primerler kullanılarak, her ekzon bölgesi için primerlerin bağlanma sıcaklıkları ve MgCl<sub>2</sub> miktarlarının belirlemek amacıyla iyileştirme (gradient) tepkimeleri yapılmıştır. İyileştirme tepkimelerinden sonra, *perforin* ve *STX11* genlerinin ekzon bölgelerinin PCR şartları belirlenmiştir. Her hasta için bu ekzon bölgeleri PCR yöntemi ile çoğaltılmıştır. *Perforin* ve *STX11* genlerinin ekzon bölgelerinin PCR bileşenleri ve eklenen miktarlar Tablo 3.4 ve Tablo 3.5'te ayrıntılı bir şekilde gösterilmiştir.

**Tablo 3.4.** *Perforin* geninin ekzon bölgelerinin PCR bileşenleri ve eklenen miktarlar.

PCR bileşenleri	Miktar (µl)
10X PCR tamponu	2,5
25 mM MgCl <sub>2</sub>	2
2 mM dNTP	2
10 pm ileri primer	1
10 pm geri primer	1
Steril su	16,375
Taq polimeraz enzimi	0,125
<b>Toplam hacim</b>	<b>25</b>

**Tablo 3.5.** *STX11* geninin ekzon bölgelerinin PCR bileşenleri ve eklenen miktarlar.

PCR bileşenleri	Miktar (µl)
10X PCR tamponu	2,5
25 mM MgCl <sub>2</sub>	2,5
2 mM dNTP	2,5
10 pm ileri primer	1
10 pm geri primer	1
Steril su	15,375
Taq polimeraz enzimi	0,125
<b>Toplam hacim</b>	<b>25</b>

**Tablo 3.6.** *Perforin* geninin ekzon bölgelerinin PCR koşulları.

	Aşama	Sıcaklık (°C )	Süre
<b>1</b>	İlk denaturasyon	95	5 dk
<b>2</b>	İkinci denaturasyon	95	45 s
<b>3</b>	Primer bağlanma	*	45 s
<b>4</b>	Uzama	72	45 s
<b>5</b>	Son uzama	72	5 dk
<b>6</b>		4	∞
<b>2'den 4'e 35 döngü</b>			

\*Primerlerin bağlanma sıcaklıkları Tablo 3.2'de belirtilmiştir.

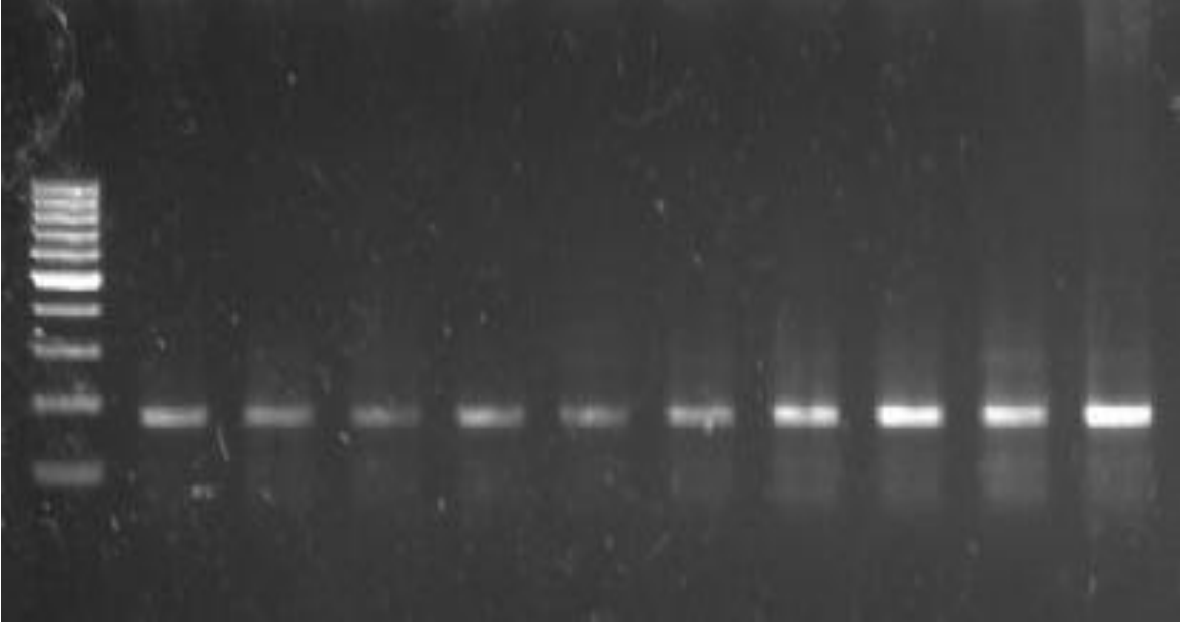
**Tablo 3.7.** *STX11* geninin ekzon bölgelerinin PCR koşulları.

	<b>Aşama</b>	<b>Sıcaklık (°C )</b>	<b>Süre</b>
<b>1</b>	İlk denaturasyon	95	5 dk
<b>2</b>	İkinci denaturasyon	95	40 s
<b>3</b>	Primer bağlanma	*	45 s
<b>4</b>	Uzama	72	40 s
<b>5</b>	Son uzama	72	7 dk
<b>6</b>		4	∞
<b>2'den 4'e 35 döngü</b>			

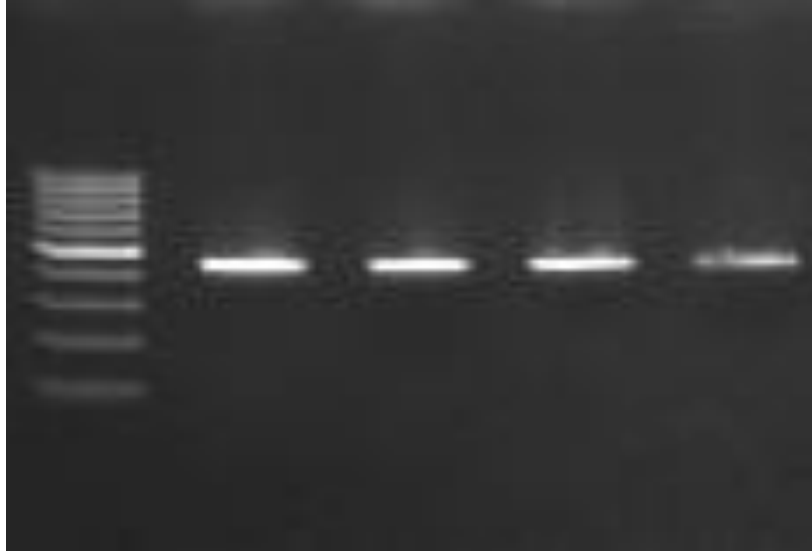
\*Primer bağlanma sıcaklıkları Tablo 3.3'te belirtilmiştir.

### **3.7. PCR Ürünlerinin Agaroz Jelde Yürütülmesi**

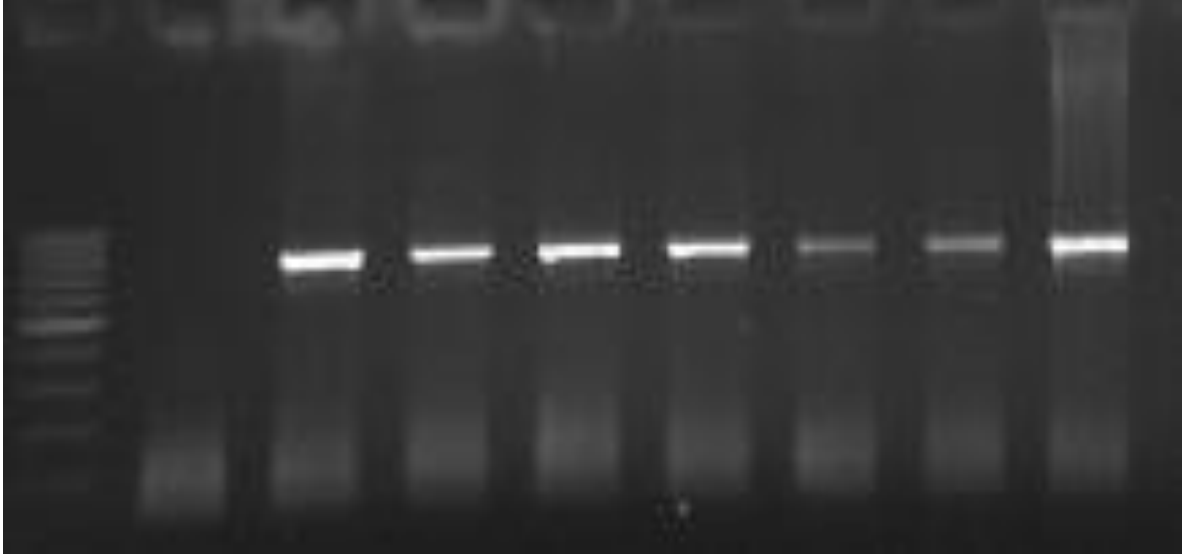
% 2'lik agaroz jel hazırlandı. Oluşan PCR ürünleri % 2'lik agaroz jel üzerinde 140 Volt'ta 30 dakika boyunca yürütüldü. Daha sonra oluşan bantlar UV görüntüleme cihazı ile (EC^Imaging System, UK) görüntülendi. *Perforin* ve *STX11* genlerinin ekzon bölgelerine ait PCR bantlarının görüntüleri Resim 3.1, Resim 3.2, Resim 3.3, Resim 3.4 ve Resim 3.5'te gösterilmiştir.



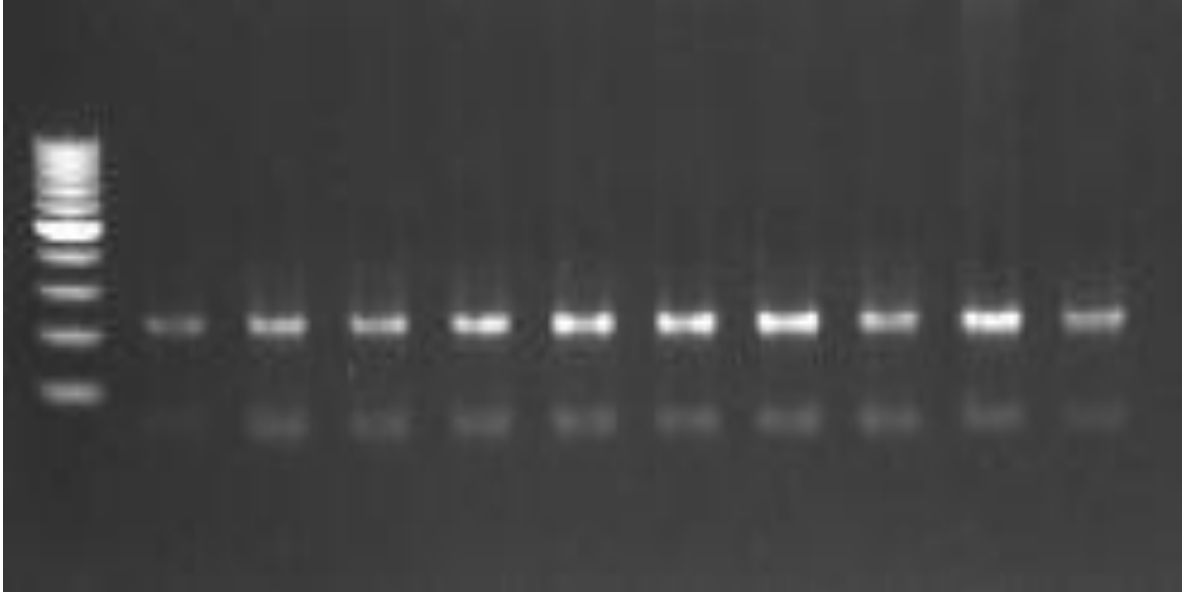
**Resim 3.1.** Perforin geninin 1. ekzon bölgesinin PCR yöntemi ile çoğaltılması (171 bç).



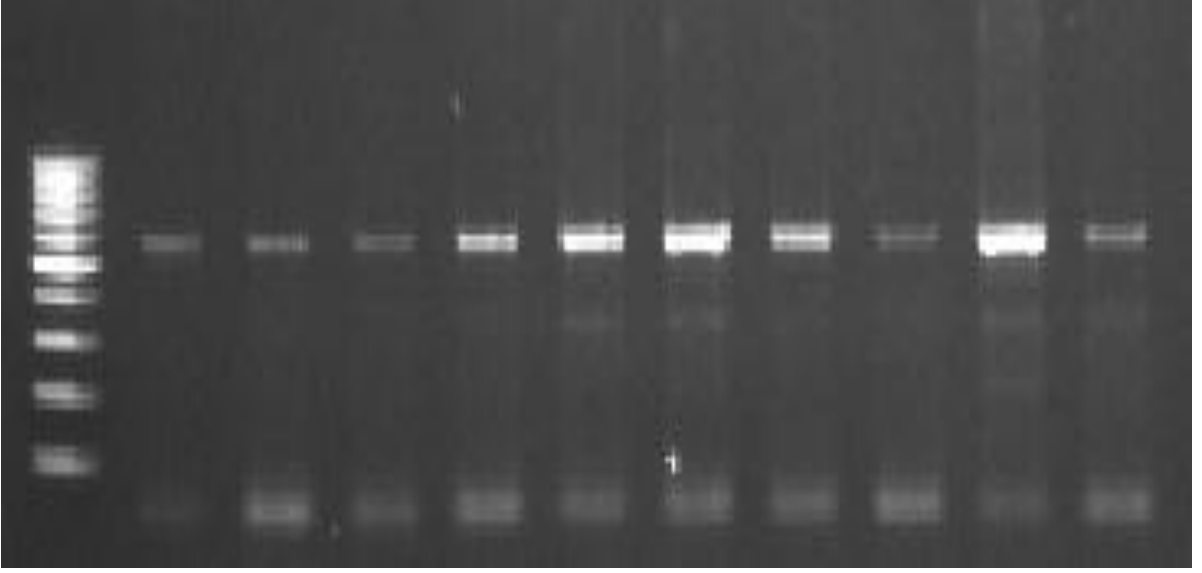
**Resim 3.2.** Perforin geninin 3.2 ekzon bölgesini iyileştirmek amacıyla yapılan gradient PCR'nin agaroz jel görüntüsü (557 bç).



**Resim 3.3.** Perforin geninin 3.3 ekzon bölgesini iyileştirmek amacıyla yapılan gradient PCR'nin agaroz jel görüntüsü (763 bç).



**Resim 3.4.** STX11 geninin 1. ekzon bölgesini iyileştirmek amacıyla yapılan gradient PCR'nin agaroz jel görüntüsü (273 bç).



**Resim 3.5.** STX11 geninin 2.1 ekzon bölgesini iyileştirmek amacıyla yapılan gradient PCR'nin agaroz jel görüntüsü (615 bç).

### 3.8. Dizin Analizi

#### 3.8.1. ExoSAP ile PCR ürünlerinin saflaştırılması

*Perforin* ve *STX11* genlerinin ekzon bölgeleri PCR yöntemi ile çoğaltıldıktan sonra, PCR ürünleri ExoSAP kullanılarak saflaştırıldı. ExoSAP koşulları Tablo 3.8 ve Tablo 3.9’da gösterilmiştir.

**Tablo 3.8.** PCR’den elde edilen ürünleri saflaştırılması.

PCR ürünü (µl)	ExoSAP (µl)
5	2

**Tablo 3.9.** ExoSAP tepkime koşulları.

Sıcaklık (°C)	Zaman (dk)
37	30
80	15

#### 3.8.2. Nükleotid dizileme PCR’ının yapılması

ExoSAP ile muamele edilen PCR örnekleri Tablo 3.10’da gösterilen miktarlarda kullanılarak, sekans analizi öncesi ileri (forward) ve geri (reverse) primerleri ile dizileme PCR’ı yapıldı. Dizileme PCR’ının tepkime koşulları Tablo 3.11’de ayrıntılı olarak gösterilmiştir.

**Tablo 3.10.** Nükleotid dizileme PCR'ının bileşenleri ve miktarları.

PCR Bileşenleri	Miktar (µl)
Big Dye Cyle Sequencing V3.1 Kit	1
5X Sekans Tamponu	2
2 pm F ya da R	2
Steril su	3
ExoSAP'lı ürün	2
Toplam hacim	10

**Tablo 3.11.** Nükleotid dizileme PCR koşulları.

	Aşama	Sıcaklık (°C )	Süre
1	İlk denaturasyon	96	1 dk
2	İkinci denaturasyon	96	10 s
3	Primer bağlanması	50	5 s
4	Uzama	60	4 dk
5		4	∞
<b>2'den 4'e 25 döngü</b>			

### 3.8.3 Dizileme PCR örneklerinin Sephadex'li kolonlardan geçirilmesi

Sephadex G-50 (Sigma Aldrich, İsveç) maddesinden 3 gram alınarak, 42 ml distile su içerisine koyuldu. 45-60 dakika boyunca vortex üzerinde Sephadex G-50 maddesinin çözünmesi sağlandı. 1,5 ml'lik boş kolonlara 850 µl Sephadex G-50 çözeltisi eklenerek, 3800 rpm'de 2 dakika boyunca santrifüj edildi. Kolon tüplerin altındaki tüpler atılarak, yerine yeni tüpler koyuldu. Daha sonra 10 µl PCR ürünü alınarak, katı hale gelen Sephadex G-50 üzerine eklendi. 3800 rpm'de 2 dakika boyunca santrifüj edildi. Altındaki tüplere geçen PCR örnekleri steril pipet uçları ile alınarak sekans analizi için plate'lere yüklendi.

## 4. BULGULAR

### 4.1. *Perforin* Geninde Tespit Edilen Mutasyonlar

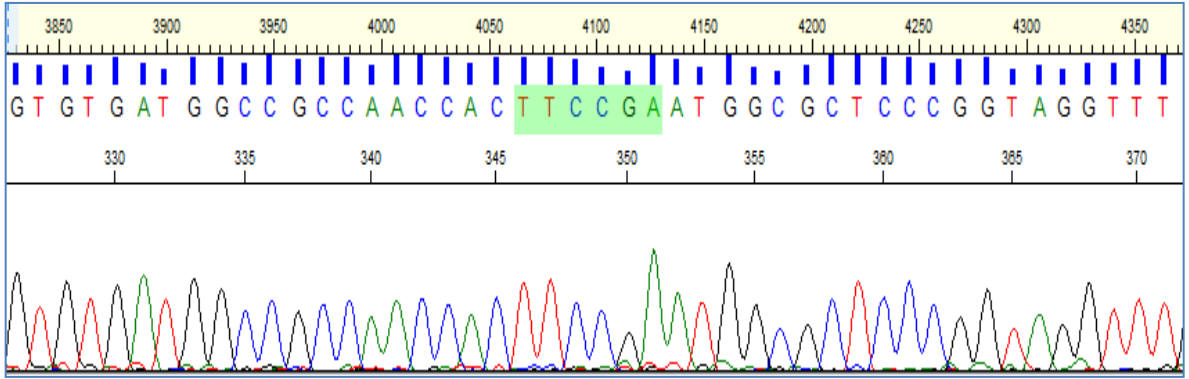
Dizi analizi sonuçlarına göre, bir hastada *perforin* geninin 3. Ekzonunda anlamsız bir mutasyon tespit edilmiştir. Bu mutasyon *perforin* geninin 3. Ekzonunda C>T (CAC→CAT) değişimine neden olmuştur. Aynı zamanda, H300H (Histidin-Histidin) değişikliği olmuştur. Sonuç olarak, bu değişim amino asit değişimine neden olmamıştır.

CAC→CAT değişimi Şekil 4.1’de detaylı olarak gösterilmiştir.

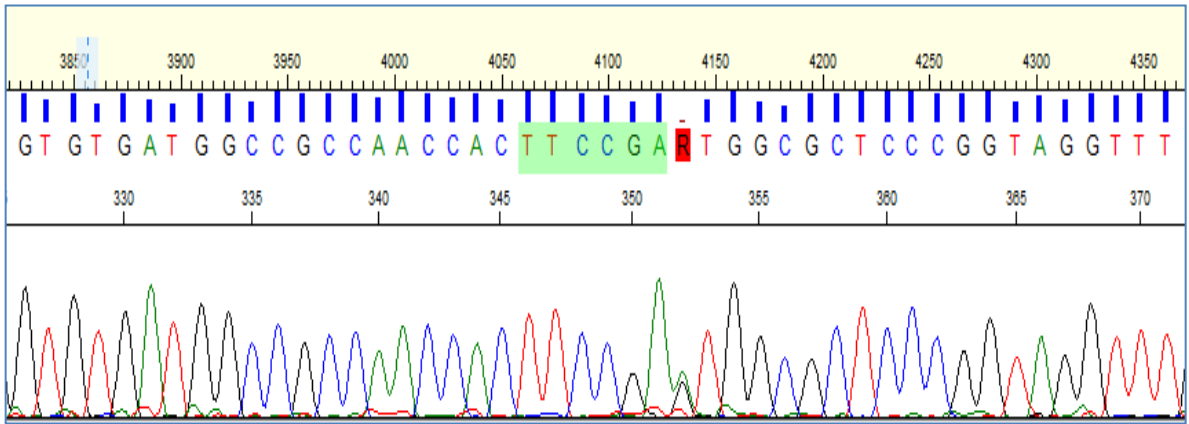
```
TTTCCATGTGGTACACACTCCCCGCTGCACCCTGACTTCAAGAGGGCCCTCGGGGACCTGCCCCAC
CACTTCAACGCCTCCACCCAGCCCGCTACCTCAGGCTTATCTCCAACACGGCACCACCTTCATCC
GGGCTGTGGAGCTGGGTGGCCGCATATCGGCCCTCACTGCCCTGCGCACCTGCGAGCTGGCCCTGGA
AGGGCTCACGGACAACGAGGTGGAGGACTGCCTGACTGTCGAGGCCAGGTCAACATAGGCATCCAC
GGCAGCATCTCTGCCGAAGCCAAGGCCTGTGAGGAGAAGAAGAAGCACAAGATGACGGCCTCCT
TCCACCAAACCTACCGGGAGCGCCaCCTCGGAAGTGGTTGGCGGCCATCACACCTCCATTAACGACC
TGCTGTTCTGGGATCCAGGCCGGGCCCCGAGCAGTACTCAGCCTGGGTAAACTCGCTGCCCGGCAGCCC
TGGCCTGGTGGACTACACCCTGGAACCCCTGCACGTGCTGCTGGACAGCCAGGACCCGCGGGGGAG
GCACTGAGGAGGGCCCTGAGTCAGTACCTGACGGACAGGGCTCGCTGGAGGGACTGCAGCCGGCCGT
GCCCACCAGGGCGGCAGAAGAGCCCCCGAGACCCATGCCAGTGTGTGTGCCATGGCTCAGCGGTAC
CACCAGGACTGCTGCCCTCGGCAGAGGGGCTGGCCAGCTGGAGGTGACCTTCATCCAAGCATGG
GGCCTGTGGGGGGACTGGTTCACTGCCACGGATGCCTATGTGAAGCTCTTCTTTGGTGGCCAGGAGC
TGAGGACGAGCACCGTGTGGGACAATAACAACCCCATCTGGTCAGTGGGCTGGATTTTGGGGATGT
GCTCCTGGCCACAGGGGGGGCCCTGAGGTTGCAGGTCTGGGATCAGGACTCTGGCAGGGACGATGAC
CTCCTTGGCACCTGTGATCAGGCTCCCAAGTCTGGTTCCCATGAGGTGAGATGCAACCTGAATCATG
GCCACCTAAAATTCCGCTATCATGCCAGGTGCTTGCCCCACCTGGGAGGAGGCACCTGCCTGGACTA
TGTCCCCCAAATGCTTCTGGGGGAGCCTCCAGGAAACCGGAGTGGGGCCGTGTGGTGA
```

**Şekil 4.1.** *Perforin* geninin 3. ekzonunda tespit edilen CAC→CAT değişiminin gösterilmesi.

*Perforin* geninin 3. ekzonunun normal ve CAC→CAT değişimi tespit edilen dizileri Şekil 4.2 ve Şekil 4.3’te ayrıntılı olarak gösterilmiştir.



**Şekil 4.2.** *Perforin* ekzon 3.3 bölgesinin normal dizisinin gösterilmesi.



**Şekil 4.3.** *Perforin* ekzon 3.3 bölgesindeki His-His dönüşümünün gösterilmesi.

```
MAARLLLLGILLLLLPLPVPAPCHTAARSECKRSHKFVPGAWLAGEGVDVTSLRR
SGSFPVDTQRFLRPDGTCTLCENALQEGTLQRLPLALTNWRAQGSQCQRHVTRAK
VSSTEAVARDAARSI RNDWKVGLDVTPKPTSNVHVS VAGSHSQAANFAAQKTHQD
QYSFSTDTVECRFYSFHVVHTPPLHPDFKRALGDLPHHFNASTQPAYLRLISNYG
THFIRAVELGGRISALTALRTCELALEGLTDNEVEDCLTVEAQVNIGIHGSI SAE
AKACEEKKKKHKMTASFHQTYRERHSEVVGGHHTSINDLLEFGIQAGPEQYSAWVN
SLPGSPGLVDYTLLEPLHVL LDSQDPRREALRRALSQYLTD RARWRDCSRPCPPGR
QKSPRDPCQCVCHGSAVTTQDCCPRQRGLAQLEVTFIQAWGLWGDWFTATDAYVK
LFFGGQELRTSTVWDNNNP IWSVRLDFGDVLLATGGPLRLQVWDQDSGRDDDLLG
TCDQAPKSGSHEVRCNLNHGHLKFRYHARCLPHLGGGTCLDYVPQMLLGEPPGNR
SGAVW
```

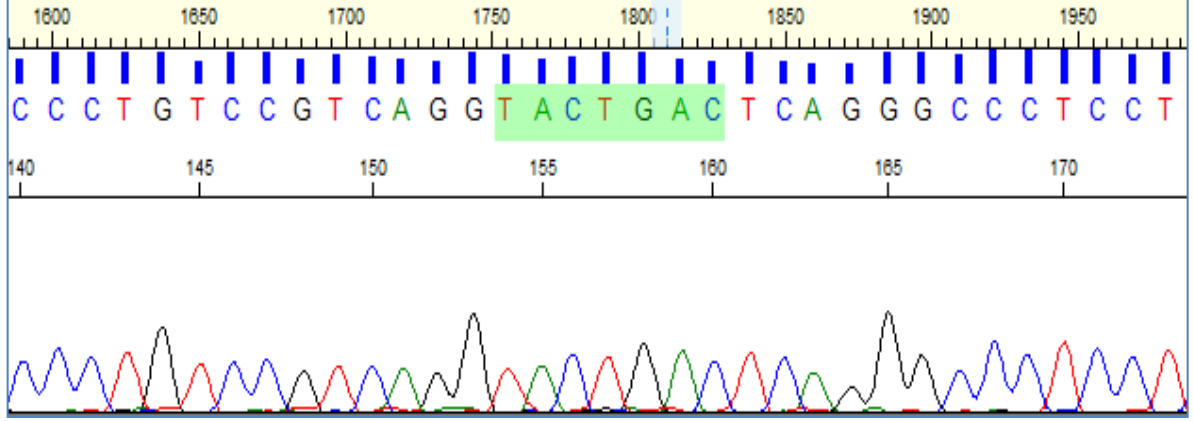
Şekil 4.4. *Perforin* geninin 3. ekzonunda tespit edilen His-His değişiminin gösterilmesi.

*Perforin* geninde mutasyon bulunan diğer hastada ise 3. ekzonda 7 baz çiftlik bir ekleme (insersiyon) tipi mutasyon tespit edilmiştir. 365inci pozisyondaki Serin (S) amino asidinden sonra 7 bazlık TACTGAC dizisi ayrıntılı olarak gösterilmektedir.

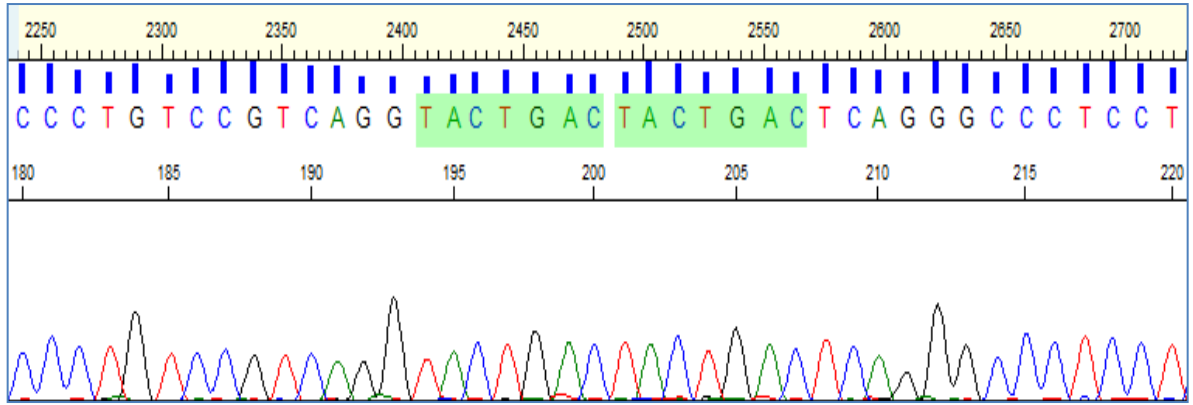
```
TTTCCATGTGGTACACACTCCCCCGCTGCACCCTGACTTCAAGAGGGCCCTCGGGGACCTGCCCCAC
CACTTCAACGCCTCCACCCAGCCCGCCTACCTCAGGCTTATCTCCAACACTACGGCACCCACTTCATCC
GGGCTGTGGAGCTGGGTGGCCGCATATCGGGCCCTCACTGCCCTGCGCACCTGCGAGCTGGCCCTGGA
AGGGCTCACGGACAACGAGGTGGAGGACTGCCTGACTGTGAGGCCCAGGTCAACATAGGCATCCAC
GGCAGCATCTCTGCCGAAGCCAAGGCCTGTGAGGAGAAGAAGAAGCACAAGATGACGGCCTCCT
TCCACCAAACCTACCGGGAGCGCCACTCGGAAGTGGTTGGCGGCCATCACACCTCCATTAACGACC
TGCTGTTTCGGGATCCAGGCCGGGCCGAGCAGTACTCAGCCTGGGTAAACTCGCTGCCCGGCAGCCC
TGGCCTGGTGGACTACACCCTGGAACCCCTGCACGTGCTGCTGGACAGCCAGGACCCGCGGGCGGGAG
GCACTGAGGAGGGCCCTGAGTCA GTATACTGAC CCTGACGGACAGGGCTCGCTGGAGGGACTGCAG
CCGGCCGTGCCACCAGGGCGGCAGAAGAGCCCCGAGACCCATGCCAGTGTGTGTGCCATGGCTCA
GCGGTCAACCACCCAGGACTGCTGCCCTCGGCAGAGGGGCTGGCCCAGCTGGAGGTGACCTTCATCC
AAGCATGGGGCCTGTGGGGGACTGGTTCACTGCCACGGATGCCTATGTGAAGCTCTTCTTTGGTGG
CCAGGAGCTGAGGACGAGCACCCTGTGGGACAATAACAACCCCATCTGGTCAGTGC GGCTGGATTTT
GGGGATGTGCTCCTGGCCACAGGGGGGCCCTGAGGTTGCAGGTCTGGGATCAGGACTCTGGCAGGG
ACGATGACCTCCTTGGCACCTGTGATCAGGCTCCCAAGTCTGGTTC CATGAGGTGAGATGCAACCT
GAATCATGGCCACCTAAAATTCCGCTATCATGCCAGGTGCTTGGCCCCACCTGGGAGGAGGCACCTGC
CTGGACTATGTCCCCAAATGCTTCTGGGGGAGCCTCCAGGAAACCGGAGTGGGGCCGTGTGGTGA
```

Şekil 4.5. *Perforin* geninin 3. ekzonunda tespit edilen baz eklenmesinin gösterilmesi.

*Perforin* geninin 3. ekzonunun normal ve TACTGAC bazlarının eklendiği tespit edilen diziler Şekil 4.6 ve Şekil 4.7’de ayrıntılı olarak gösterilmiştir.



Şekil 4.6. *Perforin* 3.3 bölgesinin normal dizisi.



Şekil 4.7. *Perforin* ekzon 3.3 bölgesindeki TACTGAC bazlarının eklenmesi.

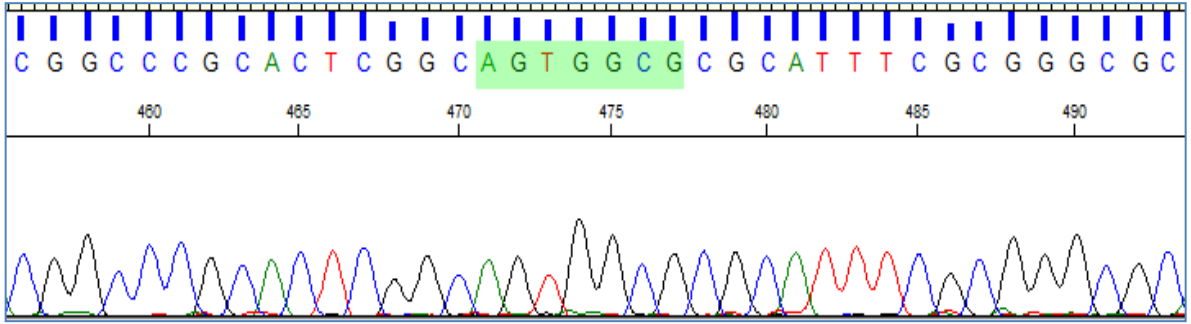
## 4.2. STX11 Geninde Tespit Edilen Mutasyonlar

*Syntaxin 11* geninin 2. ekzonunda bir hastada AG ve CGC dizilerinin eksilmesi (delesyonu) tespit edilmiştir. Bu delesyon 123. Pozisyondaki GCA (Alanin-A) ile 126. Pozisyondaki CGC (Arginin-R) amino asitlerin bulunduğu diziye denk gelmektedir. Delesyonun görüldüğü diziler ayrıntılı olarak gösterilmektedir (Şekil 4.8).

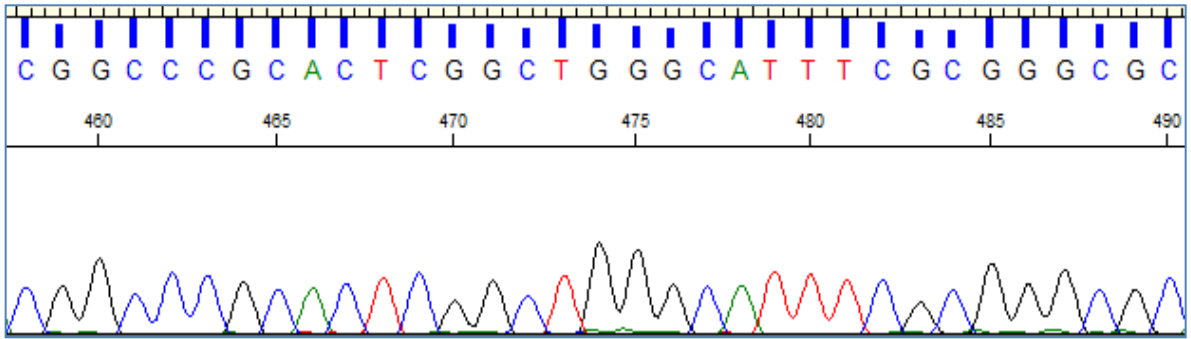
```
ATGAAAGACCGGCTAGCAGAACTTCTGGACTTGTCCAAGCAATATGACCAGCAGTTCCCAGACGGGG
ACGATGAGTTTGACTCGCCCCACGAGGACATCGTGTTTCGAGACGGACCACATCCTGGAGTCCCTGTA
CCGAGACATCCGGGACATTTCAGGATGAAAACCAGCTGCTGGTGGCCGACGTGAAGCGGGCTGGGAAAG
CAGAACGCCCCGCTTCCTCACGTCCATGCGGGGCGCTCAGCAGCATCAAGCGCGACACCAACTCCATCG
CCAAGGCCATCAAGGCCCGGGGCGAGGTCATCCACTGCAAGCTGCGCGCCATGAAGGAGCTGAGCGA
GGCGGCTGAGGCCCGACGCGGCCGCACTCGGCAGTGGCGCGCATTTTCGCGGGCGCAGTACAACGCG
CTCACCCCTCACCTTCCAGCGCGCCATGCACGACTACAACCAGGCCGAGATGAAGCAGCGCGACAAC
GCAAGATCCGCATCCAGCGCCAGCTGGAGATCATGGGCAAGGAAGTCTCGGGCGACCAGATCGAGGA
CATGTTTCGAGCAGGGTAAGTGGGACGTGTTTTCCGAGAACTTGCTGGCCGACGTGAAGGGCGCGCGG
GCCGCCCTCAACGAGATCGAGAGCCGCCACCGGAACTGCTGCGCCTGGAGAGCCGCATCCGCGACG
TACACGAGCTCTTCTTGCAGATGGCGGTGCTGGTGGAGAAGCAGGCCGACACCCTGAACGTCATCGA
GCTCAACGTACAAAAGACGGTCGACTACACCGGCCAGGCCAAGGCGCAGGTGCGGAAGGCCGTGCAG
TACGAGGAGAAGAACCCTGCCGGACCCTCTGCTGCTTCTGCTGTCCCTGCCTCAAGTAG
```

**Şekil 4.8.** *Syntaxin 11* geninin 2. Ekzonunda tespit edilen baz eksilmesinin gösterilmesi.

*STX11* geninin 2. ekzonunun normal ve AG ve CGC delesyonu tespit edilen diziler Şekil 4.9 ve Şekil 4.10'da ayrıntılı olarak gösterilmiştir.



Şekil 4.9. *STX11* ekzon 2 bölgesinin normal dizisi.



Şekil 4.10. *STX11* ekzon 2 bölgesindeki AG-CGC bazlarının delesyonu.

## 5. TARTIŞMA

Hemafagositik lenfohistiyositozis (HLH) hastalığı lenfohistiyositik infiltrasyon, makrofaj etkinliği, hemafagositozis ve kandaki sitokin seviyesinin yükselmesi ile karakterize olmuş birden fazla belirtiyi gösteren karmaşık bir bağışıklık rahatsızlığıdır (63).

HLH hastalığının ilk belirtisi; ağır karaciğer bozukluğudur (64-66). HLH hastalığının ateş, hepatosplengomali, sitopeni ve merkezi sistem bozukluğu gibi belirtileri bulunmaktadır (14). HLH hastalığını teşhis etmek için genellikle kemik iliği aspirasyonu uygulanmaktadır (14).

HLH hastalığının genetik (primary) ve genetik (secondary) olmayan olarak iki türü bulunmaktadır (67).

Ailesel HLH otosomal resesif kalıtım gösteren ve genellikle 0-2 yaş aralığında görülen bir bağışıklık düzensizliğidir (2,11,17). Sekonder HLH hastalığı ise genellikle virüs enfeksiyonlarının sebep olduğu ve bunun yanında bakteri, mantar, protozoal enfeksiyonların da neden olduğu bir hastalıktır (2,11,17). Herpes simpleks virüs ve enterovirüs enfeksiyonları, yeni doğan bebeklerde sonradan kazanılan HLH hastalığını ciddi olarak tetiklemektedir (66,68,69).

Bu tez çalışmasında ailesel hemafagositik lenfohistiyositozis hastalığı üzerinde durulmuştur.

Ailesel HLH, hastalığa neden olan genlerde meydana gelen mutasyonlara göre beş grupta incelenmektedir (9). Ailesel HLH, *PRF1* (FHL2), *MUNC 13.4* (FHL3), *sintaksin 11* (FHL4), ve *syntaksin-binding protein 2* (FHL5) genlerinde meydana gelen mutasyonlara göre sınıflandırılmaktadır (9). FLH1 hastalığına neden olan gen ya da genler hala bilinmemektedir (9).

FHL çok hızlı ilerleyen ve son derece ölümcül bir hastalıktır (31,70,71). Fakat erken teşhis edilebilirse, bağışıklığı baskılayıcı kemoterapi ve allojenik kök hücre transplantasyonu ile tedavi edilebilmesi mümkündür (31,70,71).

FHL hastalığına sebep olan *PRF1*, *UNC13D*, *STX11* ve *STXBP2* proteinlerini kodlayan genlerde meydana gelen mutasyonlardır (10).

Bağıışıklık yetmezliği bulunan hastaların moleküler analizleri, hastalıkların seyri ve bağıışıklık sistemindeki rolünü anlamak için çok güçlü bir yaklaşımdır (72).

Bu çalışmada FHL hastalığı ile bağılantılı *PRF1* ve *STX11* genlerinin ekzon bölgelerinin mutasyonel taraması amaçlanmıştır.

Bu tez çalışmasında toplam 14 FHL hastası çalışılmıştır. Toplam 14 hastanın ikisinde *perforin* geninin ekzonlarında değıişim tespit edilmiştir. *Perforin* geninin 3. ekzonunda bir hastada CAC→ CAT değıişimi görölmüştür. Bu hastada *perforin* geninin 300üncü amino asidi olan Histidin (H) yine Histidine dönüştümüştür. Yani bu değıişim amino asit dizisini değııştirmemiştir. Fakat aynı kökdencilik (dejenere kodonlar) özelliğe göre genetik olarak bir etki olmamakla birlikte CAT kodonunu tanıyan tRNAnin çokluğuna göre protein sentezi etkilenebilir. *Perforin* geninde mutasyon bulunan diğer hastada ise 3üncü ekzonda 7 baz çiftlik bir eklenme (insersiyon) tespit edilmiştir. 365inci pozisyondaki Serin (S) amino asidinden sonra 7 bazlık TACTGAC dizisi 3üncü ekzona eklenmiştir.

*PRF1* geni tarafından kodlanan por oluşturan bir protein olan perforin, lenfosit sitolitik granüllerin büyük bir bölümünü oluşturur ve hücre ölümünü uyararak yolakta önemli bir rol oynamaktadır (21). HLH hastalarının % 20-% 40'ında perforin mutasyonu belirlenmiştir (21).

*Perforin* geni 3 ekzonu olan fakat sadece 2. ve 3. ekzonları kodlayan küçük bir gendir (73). *Perforin*, sitotoksik T lenfositleri ve NK hücreleri tarafından salgılanan hedef hücre ile etkinleştirilmiş CTL ve NK hücreler arasındaki birleşmeyi sağlayan proteindir (73).

*Perforin*, kalsiyum varlığında hedef hücrenin zarına nüfuz ederek hücre ölümünü uyararak porları meydana getirir (74).

*Perforin* proteininin oluşturduğu porlar hedef hücrelerin osmotik lizisle yıkılmasını ve granzimlerin hücreye girişini sağlayarak hücrenin programlı hücre ölümüne (apoptozis) neden olur (75) .

FHL hastalığına neden olarak tanımlanan ilk gen *perforin* genidir (76). *Perforin* geninde daha çok 2inci ve 3üncü ekzonda olmak üzere 50'nin üzerinde mutasyon tanımlanmıştır (76).

Özellikle ailesel HLH'da *perforin* gen mutasyonları “natural killer” (NK) hücrelerin işlevselliklerindeki azalmadan sorumlu tutulmaktadır (5).

*Perforin* gen mutasyonları ailesel HLH tanısında çok önemlidir. Uzun süreli ateş, sitopeni ve hepatosplenomegali saptanan hastalarda *perforin* gen mutasyonları araştırılmalıdır. Hastalığın erken teşhisi için *perforin* gen mutasyon analizleri çok önemli bir yer tutabilir.

*Sintaksin11* geni dalak, lenf düğümleri ve timus bezini de içeren bağışıklık sistemi hücrelerinde genellikle ifade edilir ve hücreler arası zarlarla son derece ilişkilidir (45).

Dizi analizi sonucunda, toplam 14 hastanın birinde *Sintaksin11* geninin 2inci ekzonunda AG ve CGC dizilerinin delesyonu tespit edilmiştir. Bu eksiltme tipi mutasyon 123üncü pozisyondaki GCA (Alanin-A) ile 126ıncı pozisyondaki CGC (Arginin-R) amino asitlerin bulunduğu diziye denk gelmektedir.

STX11, hücre içi keseciklerin taşınması ve hedeflenmesi ile ilişkilidir (8,10). STX ailesi üyeleri, golgi ağı ve geç endozomlar (late endosome) arasındaki protein geçişini düzenlemektedir (8,10). *STX11* geninde meydana gelen mutasyonlar ailesel FHL 4 ile ilişkilendirilmiştir (8,10).

Sonuç olarak, ailesel HLH hastalığının teşhisi için moleküler tanı çok önemli bir yer tutmaktadır. Bu bağlamda, *perforin* ve *STX11* genlerinde tespit edilen mutasyonlar, ailesel HLH hastalığının hızlı teşhis edilebilmesi bakımından son derece önemlidir. Moleküler genetik tanı laboratuvarlarında, *perforin* ve *STX11* genlerinin ekzon bölgelerinin mutasyonel taraması yapılarak hastalığın erken teşhis edilebilmesi ülke ekonomisi ve özellikle de halk sağlığı adına faydaları göz önünde bulundurulmalıdır.

## **6. KAYNAKLAR**

1. Menasche G, Feldmann J, Fischer A, de Saint Basile G. Primary hemophagocytic syndromes point to a direct link between lymphocyte cytotoxicity and homeostasis. *Immunol Rev.* 2005;203:165-79.
2. Henter JI, Elinder G, Ost A. Diagnostic guidelines for hemophagocytic lymphohistiocytosis. The FHL Study Group of the Histiocyte Society. *Semin Oncol.* 1991;18(1):29-33.
3. Henter JI, Elinder G, Soder O, Ost A. Incidence in Sweden and clinical features of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Acta Paediatr Scand.* 1991;80(4):428-35.
4. Henter JI, Tondini C, Pritchard J. Histiocyte disorders. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2004;50(2):157-74.
5. Stepp SE, Dufourcq-Lagelouse R, Le Deist F, Bhawan S, Certain S, Mathew PA, et al. Perforin gene defects in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Science.* 1999;286(5446):1957-9.
6. Muralitharan S, Wali YA, Dennison D, Lamki ZA, Zachariah M, Nagwa el B, et al. Novel spectrum of perforin gene mutations in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis in ethnic Omani patients. *Am J Hematol.* 2007;82(12):1099-102.
7. Cote M, Menager MM, Burgess A, Mahlaoui N, Picard C, Schaffner C, et al. Munc18-2 deficiency causes familial hemophagocytic lymphohistiocytosis type 5 and

impairs cytotoxic granule exocytosis in patient NK cells. *J Clin Invest.* 2009;119(12):3765-73.

8. Filipovich A, McClain K, Grom A. Histiocytic disorders: recent insights into pathophysiology and practical guidelines. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2010;16(1 Suppl):S82-9.

9. Weitzman S. Approach to hemophagocytic syndromes. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2011;2011:178-83.

10. Schneider EM, Lorenz I, Muller-Rosenberger M, Steinbach G, Kron M, Janka-Schaub GE. Hemophagocytic lymphohistiocytosis is associated with deficiencies of cellular cytotoxicity but normal expression of transcripts relevant to killer-cell-induced apoptosis. *Blood.* 2002;100(8):2891-8.

11. Rudd E, Goransdotter Ericson K, Zheng C, Uysal Z, Ozkan A, Gurgey A, et al. Spectrum and clinical implications of syntaxin 11 gene mutations in familial haemophagocytic lymphohistiocytosis: association with disease-free remissions and haematopoietic malignancies. *J Med Genet.* 2006;43(4):e14.

12. Zur Stadt U, Beutel K, Kolberg S, Schneppenheim R, Kabisch H, Janka G, et al. Mutation spectrum in children with primary hemophagocytic lymphohistiocytosis: molecular and functional analyses of PRF1, UNC13D, STX11, and RAB27A. *Hum Mutat.* 2006;27(1):62-8.

13. Horne A, Ramme KG, Rudd E, Zheng C, Wali Y, al-Lamki Z, et al. Characterization of PRF1, STX11 and UNC13D genotype-phenotype correlations in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Br J Haematol.* 2008;143(1):75-83.

14. Arico M, Janka G, Fischer A, Henter JI, Blanche S, Elinder G, et al. Hemophagocytic lymphohistiocytosis. Report of 122 children from the International Registry. FHL Study Group of the Histiocyte Society. *Leukemia*. 1996;10(2):197-203.
15. Bör Ö. Hemofagositik Lenfohistiyositozis. *Güncel Pediatri*. 2004;2:113-16.
16. Imashuku S, Hibi S, Todo S. Hemophagocytic lymphohistiocytosis in infancy and childhood. *J Pediatr*. 1997;130(3):352-7.
17. Janka GE. Familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Eur J Pediatr*. 1983;140(3):221-30.
18. Dufourcq-Lagelouse R, Pastural E, Barrat FJ, Feldmann J, Le Deist F, Fischer A, et al. Genetic basis of hemophagocytic lymphohistiocytosis syndrome (Review). *Int J Mol Med*. 1999;4(2):127-33.
19. Janka G, Imashuku S, Elinder G, Schneider M, Henter JI. Infection- and malignancy-associated hemophagocytic syndromes. Secondary hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Hematol Oncol Clin North Am*. 1998;12(2):435-44.
20. Ramanan AV, Baildam EM. Macrophage activation syndrome is hemophagocytic lymphohistiocytosis--need for the right terminology. *J Rheumatol*. 2002;29(5):1105; author reply
21. Goransdotter Ericson K, Fadeel B, Nilsson-Ardnor S, Soderhall C, Samuelsson A, Janka G, et al. Spectrum of perforin gene mutations in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Am J Hum Genet*. 2001;68(3):590-7.

22. Sung L, King SM, Carcao M, Trebo M, Weitzman SS. Adverse outcomes in primary hemophagocytic lymphohistiocytosis. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2002;24(7):550-4.
23. Celkan T P, Özyürek E. . Sekonder lenfositik hemofagositozis ulusal veriler. *Turkish Journal of Hematology*. 2004;21:171.
24. Komp DM, McNamara J, Buckley P. Elevated soluble interleukin-2 receptor in childhood hemophagocytic histiocytic syndromes. *Blood*. 1989;73(8):2128-32.
25. Osugi Y, Hara J, Tagawa S, Takai K, Hosoi G, Matsuda Y, et al. Cytokine production regulating Th1 and Th2 cytokines in hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Blood*. 1997;89(11):4100-3.
26. Teruya-Feldstein J, Setsuda J, Yao X, Kingma DW, Straus S, Tosato G, et al. MIP-1alpha expression in tissues from patients with hemophagocytic syndrome. *Lab Invest*. 1999;79(12):1583-90.
27. Feldmann J, Callebaut I, Raposo G, Certain S, Bacq D, Dumont C, et al. Munc13-4 is essential for cytolytic granules fusion and is mutated in a form of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis (FHL3). *Cell*. 2003;115(4):461-73.
28. Henter JI, Arico M, Elinder G, Imashuku S, Janka G. Familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. Primary hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Hematol Oncol Clin North Am*. 1998;12(2):417-33.
29. Castillo L. High elevated ferritin levels and the diagnosis of HLH/Sepsis/SIRS/MODS/MAS. *Pediatr Blood Cancer*. 2008;51(5):710; author reply -1.

30. Shanmuganandan K KJ. Macrophage activation syndrome II/III. *Indian Journal of Rheumatology*. 2009;4:162-7.
31. Henter JI, Samuelsson-Horne A, Arico M, Egeler RM, Elinder G, Filipovich AH, et al. Treatment of hemophagocytic lymphohistiocytosis with HLH-94 immunochemotherapy and bone marrow transplantation. *Blood*. 2002;100(7):2367-73.
32. Marsh RA, Vaughn G, Kim MO, Li D, Jodele S, Joshi S, et al. Reduced-intensity conditioning significantly improves survival of patients with hemophagocytic lymphohistiocytosis undergoing allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood*. 2010;116(26):5824-31.
33. Henter JI, Horne A, Arico M, Egeler RM, Filipovich AH, Imashuku S, et al. HLH-2004: Diagnostic and therapeutic guidelines for hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Pediatr Blood Cancer*. 2007;48(2):124-31.
34. Janka G. Hemophagocytic Lymphohistiocytosis: When the Immune System Runs Amok. *Klinische Padiatrie*. 2009;221(5):278-85.
35. Machaczka M. Genetic and acquired hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Int Rev Allergol Clin Immunol*,. 2011;17(3-4).
36. zur Stadt U, Schmidt S, Kasper B, Beutel K, Diler AS, Henter JI, et al. Linkage of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis (FHL) type-4 to chromosome 6q24 and identification of mutations in syntaxin 11. *Hum Mol Genet*. 2005;14(6):827-34.

37. zur Stadt U, Rohr J, Seifert W, Koch F, Grieve S, Pagel J, et al. Familial hemophagocytic lymphohistiocytosis type 5 (FHL-5) is caused by mutations in Munc18-2 and impaired binding to syntaxin 11. *Am J Hum Genet.* 2009;85(4):482-92.
38. Perez N, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F, Fischer A, Griscelli C. Impaired natural killer activity in lymphohistiocytosis syndrome. *J Pediatr.* 1984;104(4):569-73.
39. Arico M, Nespoli L, Maccario R, Montagna D, Bonetti F, Caselli D, et al. Natural cytotoxicity impairment in familial haemophagocytic lymphohistiocytosis. *Arch Dis Child.* 1988;63(3):292-6.
40. Eife R, Janka GE, Belohradsky BH, Holtmann H. Natural killer cell function and interferon production in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Pediatr Hematol Oncol.* 1989;6(3):265-72.
41. Egeler RM, Shapiro R, Loechelt B, Filipovich A. Characteristic immune abnormalities in hemophagocytic lymphohistiocytosis. *J Pediatr Hematol Oncol.* 1996;18(4):340-5.
42. Bryceson YT, Rudd E, Zheng C, Edner J, Ma D, Wood SM, et al. Defective cytotoxic lymphocyte degranulation in syntaxin-11 deficient familial hemophagocytic lymphohistiocytosis 4 (FHL4) patients. *Blood.* 2007;110(6):1906-15.
43. Ohadi M, Lalloz MR, Sham P, Zhao J, Dearlove AM, Shiach C, et al. Localization of a gene for familial hemophagocytic lymphohistiocytosis at chromosome 9q21.3-22 by homozygosity mapping. *Am J Hum Genet.* 1999;64(1):165-71.

44. Lichtenheld MG, Olsen KJ, Lu P, Lowrey DM, Hameed A, Hengartner H, et al. Structure and function of human perforin. *Nature*. 1988;335(6189):448-51.
45. Prekeris R, Klumperman J, Scheller RH. Syntaxin 11 is an atypical SNARE abundant in the immune system. *Eur J Cell Biol*. 2000;79(11):771-80.
46. Arneson LN, Brickshawana A, Segovis CM, Schoon RA, Dick CJ, Leibson PJ. Cutting edge: syntaxin 11 regulates lymphocyte-mediated secretion and cytotoxicity. *J Immunol*. 2007;179(6):3397-401.
47. Rouphael NG, Talati NJ, Vaughan C, Cunningham K, Moreira R, Gould C. Infections associated with haemophagocytic syndrome. *Lancet Infect Dis*. 2007;7(12):814-22.
48. Machaczka M, Vaktas J, Klimkowska M, Hagglund H. Malignancy-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis in adults: a retrospective population-based analysis from a single center. *Leuk Lymphoma*. 2011;52(4):613-9.
49. Ishii E, Ohga S, Imashuku S, Yasukawa M, Tsuda H, Miura I, et al. Nationwide survey of hemophagocytic lymphohistiocytosis in Japan. *Int J Hematol*. 2007;86(1):58-65.
50. Uellner R, Zvelebil MJ, Hopkins J, Jones J, MacDougall LK, Morgan BP, et al. Perforin is activated by a proteolytic cleavage during biosynthesis which reveals a phospholipid-binding C2 domain. *EMBO J*. 1997;16(24):7287-96.
51. Perforin gene [database on the Internet]. 2013 [cited 27.07.2013]. Available from: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5551?report=gene\\_table](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5551?report=gene_table).

52. Chromosomal location of perforin gene [database on the Internet]. 2013 [cited 27.07.2013]. Available from: [http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Gene/Summary?g=ENSG00000180644;r=10:72357104-72362531](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?g=ENSG00000180644;r=10:72357104-72362531).
53. Henkart PA. Mechanism of lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol.* 1985;3:31-58.
54. Katano H, Ali MA, Patera AC, Catalfamo M, Jaffe ES, Kimura H, et al. Chronic active Epstein-Barr virus infection associated with mutations in perforin that impair its maturation. *Blood.* 2004;103(4):1244-52.
55. Sayers EW, Barrett T, Benson DA, Bolton E, Bryant SH, Canese K, et al. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res.* 2011;39(Database issue):D38-51.
56. Sayers EW, Barrett T, Benson DA, Bryant SH, Canese K, Chetvernin V, et al. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res.* 2009;37(Database issue):D5-15.
57. Wheeler DL, Church DM, Edgar R, Federhen S, Helmberg W, Madden TL, et al. Database resources of the National Center for Biotechnology Information: update. *Nucleic Acids Res.* 2004;32(Database issue):D35-40.
58. Haefliger JA, Peitsch MC, Jenne DE, Tschopp J. Structural and functional characterization of complement C8 gamma, a member of the lipocalin protein family. *Mol Immunol.* 1991;28(1-2):123-31.

59. Tschopp J, Penea F, Schifferli J, Spath P. Dysfunctional C8 beta chain in patients with C8 deficiency. *Scand J Immunol.* 1986;24(6):715-20.
60. Genomic location of Sintaxin 11 gene [database on the Internet]. 2013 [cited 27.07.2013]. Available from: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=STX11>.
61. Exon-intron information of STX11 gene. [database on the Internet]. 2013 [cited 27.07.2013]. Available from: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/8676?report=gene\\_table](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/8676?report=gene_table).
62. Perforin and STX11 genes [database on the Internet]. 2013 [cited 19.08.2013]. Available from: <http://www.genemania.org/>.
63. Chute DJ, Rawley J, Cox J, Bready RJ. Sudden Unexpected Death due to Hemophagocytic Lymphohistiocytosis Syndrome. *J Forensic Sci.* 2013;58(4):1080-4.
64. Haddad E, Sulis ML, Jabado N, Blanche S, Fischer A, Tardieu M. Frequency and severity of central nervous system lesions in hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Blood.* 1997;89(3):794-800.
65. Danhaive O, Caniglia M, Devito R, Piersigilli F, Corchia C, Auriti C. Neonatal liver failure and haemophagocytic lymphohistiocytosis caused by a new perforin mutation. *Acta Paediatr.* 2010;99(5):778-80.
66. Chandrakasan S, Filipovich AH. Hemophagocytic Lymphohistiocytosis: Advances in Pathophysiology, Diagnosis, and Treatment. *J Pediatr.* 2013.

67. Rudd E, Bryceson YT, Zheng C, Edner J, Wood SM, Ramme K, et al. Spectrum, and clinical and functional implications of UNC13D mutations in familial haemophagocytic lymphohistiocytosis. *J Med Genet.* 2008;45(3):134-41.
68. Suzuki N, Morimoto A, Ohga S, Kudo K, Ishida Y, Ishii E. Characteristics of hemophagocytic lymphohistiocytosis in neonates: a nationwide survey in Japan. *J Pediatr.* 2009;155(2):235-8 e1.
69. Whaley BF. Familial hemophagocytic lymphohistiocytosis in the neonate. *Adv Neonatal Care.* 2011;11(2):101-7.
70. Fischer A, Cerf-Bensussan N, Blanche S, Le Deist F, Bremard-Oury C, Leverger G, et al. Allogeneic bone marrow transplantation for erythrophagocytic lymphohistiocytosis. *J Pediatr.* 1986;108(2):267-70.
71. Ouachee-Chardin M, Elie C, de Saint Basile G, Le Deist F, Mahlaoui N, Picard C, et al. Hematopoietic stem cell transplantation in hemophagocytic lymphohistiocytosis: a single-center report of 48 patients. *Pediatrics.* 2006;117(4):e743-50.
72. Casanova JL, Abel L. The human model: a genetic dissection of immunity to infection in natural conditions. *Nat Rev Immunol.* 2004;4(1):55-66.
73. de Saint Basile G, Fischer A. Defective cytotoxic granule-mediated cell death pathway impairs T lymphocyte homeostasis. *Curr Opin Rheumatol.* 2003;15(4):436-45.
74. Darmon M, Langlois X, Suffisseau L, Fattaccini CM, Hamon M. Differential membrane targeting and pharmacological characterization of chimeras of rat serotonin 5-

HT1A and 5-HT1B receptors expressed in epithelial LLC-PK1 cells. *J Neurochem.* 1998;71(6):2294-303.

75. Fadeel B, Orrenius S, Henter JJ. Induction of apoptosis and caspase activation in cells obtained from familial haemophagocytic lymphohistiocytosis patients. *Br J Haematol.* 1999;106(2):406-15.

76. Risma KA, Frayer RW, Filipovich AH, Sumegi J. Aberrant maturation of mutant perforin underlies the clinical diversity of hemophagocytic lymphohistiocytosis. *J Clin Invest.* 2006;116(1):182-92.

## ÖZGEÇMİŞ

13 Şubat 1986 yılında Irak'ın Erbil şehrinde dünyaya geldim. 2007 yılında Irak'ın Erbil şehrinde bulunan Salahaddin Üniversitesi'nin Ziraat Bölümü'nden mezun oldum. 2011 yılında Gaziantep Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Bölümünde yüksek lisansa başladım. Türkçe, Kürtçe, Arapça ve İngilizce bilmekteyim.

AYSHAN RAFAT YASSIN