



LRBA Eksikliği Tanısında Akan Hücre Ölçerde Protein İfadesi

Protein Expression in the Diagnosis of LRBA Deficiency by Flow Cytometer

İsmail ÖĞÜLÜR¹, Ayça KIYKIM¹, Ercan NAIN¹, Ayper SOMER², Ayla GÜVEN^{3,4}, Safa BARIŞ¹, Ahmet ÖZEN¹, Elif KARAKOÇ AYDINER^{1,5}

- Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Pediatrik Allerji ve İmmünoloji Bilim Dalı, İstanbul, Türkiye**
Department of Pediatric Allergy and Immunology, Marmara University, Faculty of Medicine, İstanbul, Turkey
- İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Çocuk Enfeksiyon Bilim Dalı, İstanbul, Türkiye**
Department of Pediatric Infection, İstanbul University, İstanbul Faculty of Medicine, İstanbul, Turkey
- Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Pediatri Kliniği, İstanbul, Türkiye**
Department of Pediatrics, Göztepe Training and Research Hospital, İstanbul, Turkey
- Amasya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Pediatri Anabilim Dalı, Amasya, Türkiye**
Department of Pediatrics, Amasya University, Faculty of Medicine, Amasya, Turkey
- Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Temel İmmünoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye**
Department of Basic Immunology, Marmara University, Faculty of Medicine, İstanbul, Turkey

ÖZ

Giriş: Lipopolysaccharide-responsive beige-like anchor (LRBA) inhibitör bir protein olan sitotoksik T lenfosit antijen-4 (CTLA4)'ün hücre yüzeyinde ifade edilmesinde rol oynar. Yakın zamanda tanımlanmış olan LRBA eksikliği immün yetmezlik ve otoimmüniteye yol açar. LRBA eksikliğinin tanısı mutasyon analizi ve protein ifadesinin belirlenmesi ile konur. Bu çalışmada, LRBA eksikliği olan hastalarımızda uyarınlı ve uyarınsız ortamda akan hücre ölçer ile hücre içi LRBA protein ifadesi değerlendirilmiştir.

Gereç ve Yöntem: Çalışmaya LRBA eksikliği olan beş hasta ve yedi sağlıklı kontrol alındı. Periferik kan mononükleer hücrelerde forbol miristat asetat ve ionomisin ile uyarınlı ve/veya uyarınsız olarak LRBA ifadesi ölçüldü. Ortalama florasan yoğunluğu farkı (Δ MFI) hesaplandı.

Bulgular: Uyarınsız durumda ortalama florasan yoğunluğu farkı sağlıklı kontrollerde ortalama 24 ± 9 iken LRBA hastalarında 4.8 ± 2.8 olarak ölçüldü. İki hasta ve bir sağlıklı kontrolde eşzamanlı uyarınsız ve uyarınlı ölçümlerin karşılaştırılması sonucu elde edilen değişime bakıldığında; uyarınsız durumda Δ MFI değeri Hasta-3 (H3)'de 4.8, H4'de 4.6 ve sağlıklı kontrolde 20,1 saptanırken, uyarınlı durumda bu değer H3'de 20.8, H4'de 19 ve sağlıklı kontrolde 49.6 bulundu.

Sonuç: Akan hücre ölçer ile LRBA ifadesinin değerlendirilmesi hızlı ve kolay bir yöntem olup mutasyon tanımlı hastalarımızda etkin ve güvenilir sonuç vermiştir.

ABSTRACT

Objective: Lipopolysaccharide-responsive beige-like anchor (LRBA) plays a role in cell surface expression of inhibitory cytotoxic T lymphocyte-associated protein-4 (CTLA-4) protein. Recently identified LRBA deficiency leads to immune deficiency and autoimmunity and is diagnosed by mutation analyses and protein expression. Herein, we quantified stimulated and unstimulated intracellular LRBA protein expression by flow cytometry in LRBA deficiency patients.

Materials and Methods: Five LRBA deficient patients and seven healthy controls were evaluated. The LRBA expressions were assessed in peripheral-blood-mononuclear-cells in the presence or absence of phorbol-miristat-acetate and ionomycin stimulation. The difference in mean-fluorescence-intensity (Δ MFI) was calculated.

Results: The differences in mean-fluorescence-intensity values of LRBA by flow cytometry were 24 ± 9 for the healthy controls and 4.8 ± 2.8 for the patients. Δ MFI were 20.8 for P3, 19 for P4 and 49.6 for healthy controls with stimulants and 4.8, 4.6 and 20.1 respectively without stimulants.

Conclusion: As a rapid and widely available assay, flow cytometric assessment of intracellular LRBA expression has been found to be an effective and reliable method in the identification of LRBA deficiency.

Anahtar kelimeler: Hücre içi, LRBA, protein ifadesi**Key words:** Intracellular, LRBA, protein expression**Geliş Tarihi:** 06/03/2017 • **Kabul Tarihi:** 30/04/2017**Received:** 06/03/2017 • **Accepted:** 30/04/2017

GİRİŞ

Lipopolysaccharide-responsive beige-like anchor (LRBA) eksikliği ilk olarak, erken başlangıçlı hipogamaglobulinemi, otoimmün belirtiler, enflamatuvar barsak hastalığına (IBD) yatkınlık ve tekrarlayan enfeksiyonlar ile tanımlanmıştır (1). Daha sonra yapılan çalışmalar ve olgu bildirimleri, hastalığın geniş bir klinik yelpazeye sahip olduğunu ve sık görülen bir sendrom olduğunu göstermiştir (2). LRBA-eksikliği hastalarında gözlenen *in vitro* bozukluklar IgG antikor üretiminde azalma, T hücre aktivasyonu ve proliferasyonunda yetersizlik, artmış apoptoz ve B hücrelerde azalan otofajiyi içermektedir (1). Ayrıca, Charbonnier ve ark. (3) yaptıkları çalışmada, hücre aracılı baskılamada bozulma, artmış apoptozis ve regülatör T hücre (Treg) belirteçlerinde azalmış ifadeyi içeren Treg hücre değişiklikleri ve sitotoksik T lenfosit antijen-4 (CTLA-4) ifadesinde azalma bildirmiştir. Sitotoksik T lenfosit antijen-4 aktive olmuş T hücreler ve FoxP3⁺ Treg hücrelerde ifade edilen inhibitör kontrol noktası proteindir (4). Bu protein endositik veziküllerde bulunur ve T hücre reseptörünün uyarılması sonrası hücre yüzeyine taşınır (5). Sitotoksik T lenfosit antijen-4'ü taklit eden ya da hedefleyen ilaçların CTLA-4 modülasyonu üzerine klinik etkinliği ve yan etkileri çalışılmıştır (6). Hematopoetik kök hücre naklinin 4 hastaya uygulandığı, fakat sadece iki hastanın sağ kaldığı bildirilmiştir (2). Bu nedenle LRBA hastalığında bu tedavinin yeri henüz net olarak bilinmemektedir.

LRBA eksikliği, homozigot ya da bileşik heterozigot mutasyonlar sonucu LRBA protein ifadesinin kaybindan kaynaklanmaktadır (2). Bu hastalarda kesin tanı gen dizileme ile mutasyon varlığının belirlenmesi sonucu konmakta ancak bu yöntem uzun zaman almaktadır. Bu nedenle, daha kısa sürede tanı sağlayabilecek yöntemlere gereksinim duyulmaktadır. Akan hücre ölçer ile LRBA protein ifadesinde azalmanın gösterilmesinin ayırıcı tanıda uygun olduğu, hızlı ve güvenilir sonuç verdiği gösterilmiştir (2,6). LRBA eksikliğinde hızlı tanı özellikle, hayat kurtarıcı medikal tedavilerin başlatılması ve hematopoetik kök hücre nakli hazırlıklarının hızlandırılması açısından hayati önem taşımaktadır.

Çalışmamız kapsamında LRBA eksikliği gösterilen beş hastada akan hücre ölçer ile hücre içi LRBA protein ifadesi uyaranlı ve uyaransız koşullarda değerlendirildi.

GEREÇ ve YÖNTEM

Hastaların Seçimi ve Değerlendirilmesi

LRBA eksikliği ile takip edilen beş hasta ile birlikte yaş uyumlu yedi sağlıklı kontrol çalışmaya dahil edildi. Çalışma için yerel etik kurulundan 09.2016.618 numara ile onay alındı.

Periferik Kan Mononükleer Hücre İzolasyonu

Gen sekanslama yöntemi ile LRBA mutasyonu tespit edilen hastalar ve sağlıklı kontrollerden iki ml heparinli tüpe periferik kan örnekleri alındı ve fikal gradyan santrifüj yöntemi ile periferik kan mononükleer hücre (PKMH) izolasyonu gerçekleştirildi. Fosfat tuzlu tampon çözeltisi (PBS) ile birebir oranında sulandırılan kan, fikal üzerine yayıldı ve 2000 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi. İnterfazda toplanan PKMH'ler pastör pipeti yardımıyla toplandı ve PBS içerisinde 1500 rpm'de beş dakika olacak şekilde iki kez yıkandı. Kuyu başına 3×10^5 PKMH /250 µl olacak şekilde 96 kuyucuklu kültür plaklarına uyaransız ve forbol miristat asetat (PMA, son yoğunluk: 50 ng/ml) (Santa Cruz Biotech, Heidelberg, Almanya) ve ionomisin (I, son yoğunluk: 1 µg/ml) (Santa Cruz Biotech, Heidelberg, Almanya) uyarıcı olarak eklendi ve 37°C'de %5 CO₂'li etüv içerisinde beş saat inkübe edildi.

Hücre İçi Boyama Yöntemi ile LRBA Protein İfadesi

Uyaranlı ve uyaransız koşullarda inkübe edilen PKMH'ler akan hücre tüpü içerisine alınarak yıkandı. Hücre içi boyama aşamasına geçebilmek için, fiksasyon-permeabilizasyon kiti (BD Biosciences, Pharmingen, San Diego, ABD) üretici firmanın önerileri doğrultusunda kullanıldı. Bu işlem için kısaca, hücreler 250 µl fiksasyon/permeabilizasyon solüsyonu içerisinde 4°C'de 20 dakika inkübe edildi. Hücrelerin 2 kez daha yıkanması sonrası, 100 µl fiksasyon/permeabilizasyon yıkama solüsyonu içerisinde 1:100 oranında dilüe edilmiş birincil antikor

anti-insan LRBA (Sigma-Aldrich, Gallen, İsviçre, katalog: HPA023597) eklendi. Örnekler 4°C'de 30 dakika bekletildi. İki kez yıkama sonrası, hücreler üzerine 100 µl fiksasyon/permeabilizasyon yıkama solüsyonu içerisinde 1:500 oranında dilüe edilmiş ikincil anti-tavşan IgG-FITC antikorunu (Thermo Fisher Scientific, San Diego, ABD) konuldu. Negatif kontrol olarak tüm işlemlerin yapıldığı ve sadece ikincil antikorun kullanıldığı örnek çalışmaya dahil edildi. Örnekler tekrar 4°C'de 30 dakika inkübe edildi. Hücreler fiksasyon/permeabilizasyon yıkama solüsyonu ile 2 kez daha yıkandı ve akan hücre ölçer cihazında analiz edildi.

Akan Hücre Ölçer Analizi

Analiz için BD FACS Calibur cihazı ve Cellquest yazılım programı kullanıldı (BD Biosciences, Pharmingen, San Diego, ABD). Lenfosit hücreleri etrafında oluşturulan kapılama ile hücre dağılımı histogram olarak görüntüldü. Histogramlar üzerinde hücre içi protein ifadeleri, birincil antikor ile işaretli örneklerin ortalama florasan yoğunluğu (MFI) değerlerinden, birincil antikor kullanılmadan sadece ikincil antikor kullanılarak ölçüm yapılan negatif kontrol MFI değerleri çıkarılarak, bulunan ortalama florasan yoğunluğu farkına (Δ MFI) göre belirlendi.

BULGULAR

Hastaların Demografik Özellikleri, Klinik ve Laboratuvar Bulguları

LRBA eksikliği tanımlanan dört erkek ve bir kız hastanın (yaşları ortalama±standart sapma: 7.8±4.6 yıl), yakınmalarının başlama yaşları ortalama 0.9±0.6 yıl idi. Hastaların dört tanesinde lenfoproliferasyon, sitopeni ve kronik ishal gözlenirken, üç tanesinde sık enfeksiyon, üç hastada otoimmünite ve üç hastada ise kronik akciğer bulgusu belirlendi (Tablo I). İki hastada immünglobülin G (IgG) ve üç hastada IgA değerleri düşük iken, üç hastada IgM değerinin düşük olduğu gözlemlendi. Lenfosit alt grup incelemelerinde sadece bir hastanın (H2) yardımcı (CD4⁺) T hücre, B hücre ve doğal öldürücü (NK) hücre yüzdesinde azalma, sitotoksik (CD8⁺) T hücrelerin yüzdesinde ise artma saptandı. Naif ve bellek CD8⁺CD45⁺ T hücrelerin yüzdesine bakıldığında ise, H2 ve H4'de naif hücrelerin azaldığı, bellek hücrelerin ise artmış olduğu gözlemlendi (Tablo I).

Hastalarda ve Sağlıklı Kontrollerde Uyarınlı ve Uyarınsız LRBA Protein İfadesi

LRBA hastalarında akan hücre ölçer ile protein ifadesini belirlemek amacıyla eş zamanlı, yaşları 15 ile 40 arasında değişen immün yetmezlik uyarıcı bulgusu ve kronik hastalığı olmayan yedi sağlıklı gönüllü (yaşları 29.5±9.5 yıl) çalışmaya alındı. Hastaların tamamında ve sağlıklı bireylerde negatif kontrol ve LRBA antikorunu ile işaretlenen hücrelerde MFI değerleri ve bunların farkından elde edilen Δ MFI değerleri belirlendi.

LRBA mutasyonu belirlenen beş hastanın Δ MFI değeri 4,8±2,8 olarak belirlendi (Şekil 1A,B). Hastalarla eş zamanlı olarak LRBA protein ifadelerine sağlıklı kontrollerde bakıldığında ise Δ MFI değeri 24±9 olarak bulundu (Şekil 1A,B). Uyarınsız koşulda Δ MFI değerleri H3 için 4.8, H4 için 4.6 ve sağlıklı kontrol için 20,1 bulundu (Şekil 2A). PMA+I ile beş saatlik uyarım sonrası hesaplanan Δ MFI değerleri ise H3 için 20.8, H4 için 19 ve sağlıklı kontrol için 49.6 bulundu (Şekil 2B).

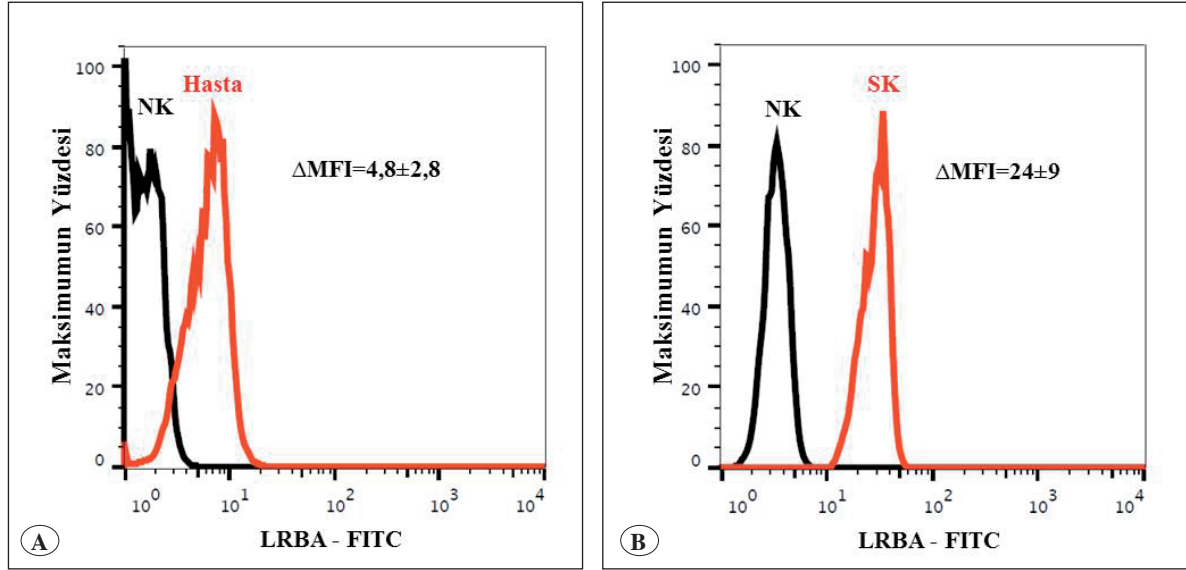
TARTIŞMA

LRBA eksikliğinde homoziot mutasyonlar, otoimmün ve enflamatuvar barsak hastalığıyla birlikte erken başlangıçlı hipogamaglobülinemiye neden olmaktadır (1). Lopez-Herrera ve ark. (1) tarafından yapılan çalışmada, LRBA hastalarında etkilenen bireylerde en az iki immünoglobülin sınıfında azalma gösterilirken, son zamanlarda yapılan bir derlemede 31 LRBA hastasından üç tanesinde sadece IgM düşüklüğü belirlenmiş, 17'sinde ise hipogamaglobülinemi ile birlikte düşük IgA düzeyi saptanmıştır (7). Çalışmamızda, literatüre benzer şekilde birinci hastada (H1) her üç Ig sınıfında (IgG, IgA ve IgM) düşüklük gözlenirken, ikinci hastada IgG ve IgM değerlerinde bir azalma belirlendi. Üçüncü hastada (H3) sadece IgA düzeyinde bir azalma saptanırken, dördüncü hastada (H4), literatürde de daha önce bildirildiği gibi (7), sadece IgM düzeyinde bir düşüklük görüldü. Bu klinik ve laboratuvar bulguların varlığında hastalarda ön tanı olarak LRBA eksikliği düşünülmesi halinde hücre içi protein ifadesinin gösterimi ile hızlı tanının mümkün olduğu çalışmamızda gösterilmektedir.

LRBA hastalarında T hücre sayılarının genelde normal düzeyde olduğu rapor edilmiştir (2,7). Gamez-Diaz ve ark. (2), 21 LRBA hastasının %81'inde CD4⁺ T hücrelerin ve %71'inde ise CD8⁺ T hücrelerin normal düzeyde olduğunu belirlemiştir. Yine aynı çalışmada, 20 hastadan 11'inde B

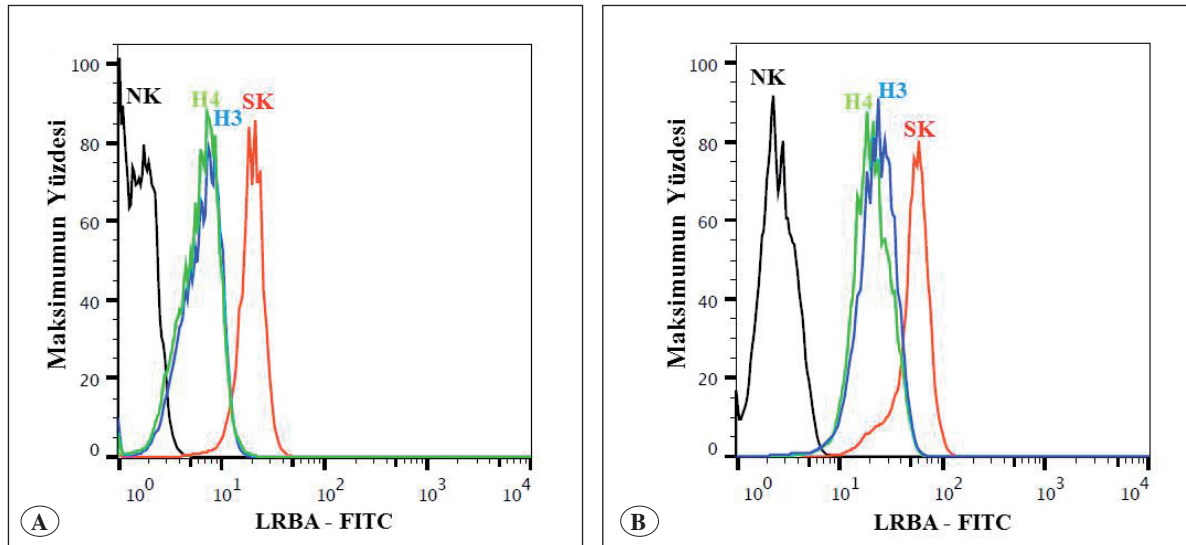
hücre yüzdesi düşük olduğu bildirilmiştir (2). Alkhairi ve ark. (7) ise yaptıkları çalışmada, 31 LRBA hastasının 13'ünde (%42) B hücre yüzdesinde düşüklük saptamıştır. Bu çalışmamızda, tüm hastalarımızda CD3⁺ T hücre oranının normal olduğu, sadece 1 hastamızda (H2) oransal olarak CD4⁺ T hücrelerde azalma ve CD8⁺ T hücrelerde ise artış belirlendi. Benzer olarak, dört hastada B hücre oranının

normal olduğu, H2'de ise düşük olduğu saptandı. NK hücre oranlarında ise, Alkhairi ve ark.nın (7) çalışmalarına benzer olarak, yine H2'de düşüklük gözlemlendi. Naif ve bellek T hücre yüzdelere baktığımızda, iki hastamızda (H2 ve H4), naif CD8⁺ T hücrelerde azalma, tersine bellek CD8⁺ T hücrelerde ise artış belirlendi.



Şekil 1. LRBA mutasyonu gösterilen hastalarda lenfosit hücrelerinde ortalama LRBA protein ifadesinin histogram görünümü (A). Sağlıklı kontrollerin lenfosit hücrelerinde ortalama LRBA protein ifadesinin histogram görünümü (B).

NK: Negatif kontrol, SK: Sağlıklı kontrol, Δ MFI: Birincil antikor ile işaretli örneklerin ortalama floresan yoğunluğu (MFI) değerinden sadece ikincil antikor kullanılarak ölçüm yapılan negatif kontrol MFI değerinin çıkarılması ile elde edilen fark).



Şekil 2. Uyaransız (A) ve PMA+I uyaranlı (B) koşullarda negatif kontrol (NK), hasta 3 (H3), hasta 4 (H4) ve sağlıklı kontrollerde (SK) LRBA ekspresyon değerlerinin histogram görünümü.

Tablo I. Lipopolysaccharide-responsive beige-like anchor (LRBA) eksikliği gösterilen hastaların klinik ve immünolojik verileri

	H1	H2	H3	H4	H5
Güncel yaş (yıl)	12	10	11	4.5	1.5
Cinsiyet	E	E	E	E	K
Şikayet başlama yaşı (yıl)	0.5	0.6	2	0.8	0.7
Tanı yaşı (yıl)	9	7	9	4	1
Sık enfeksiyon	+	+	+	-	-
Otoimmünite	+	-	+	-	+
Lenfoproliferasyon	+	+	+	+	-
Sitopeni	+	+	+	+	-
Kronik ishal	+	+	+	+	-
Akciğer bulgusu	+	+	-	-	+
Tedaviler					
DİİG	-	+	+	+	+
Profilaksi	-	+	+	+	+
Abatasept	-	+	+	+	-
KİT	+	-	-	-	-
IgG (mg/dl)	696	247	907	1710	605
IgA (mg/dl)	<24	45	40	71	20
IgM (mg/dl)	47	8	90	50	69
IgE (IU/L)	<1	<1	11	8.2	32
MLS/mm ³	3800	1600	1700	2800	5200
T lenfosit (%)	65	93.4	70.5	72.3	62
Yardımcı T lenfosit (%)	40	28.3	45	34.7	40
Sitotoksik T lenfosit (%)	24	65.1	22.5	30.5	20
B lenfosit (%)	25	0.9	18.3	18	29
Doğal öldürücü hücre (%)	5	3.5	10.2	7.2	7.8
Yardımcı naif T lenfosit (%) (CD4 ⁺ CD45RA ⁺)		44.4	34.3	30.9	76
Yardımcı bellek T lenfosit (%) (CD4 ⁺ CD45RO ⁺)		41.2	68.7	63.3	27
Sitotoksik naif T lenfosit (%) (CD8 ⁺ CD45RA ⁺)		28.1	62.2	35.2	91
Sitotoksik bellek T lenfosit (%) (CD8 ⁺ CD45RO ⁺)		72.6	33.9	46.2	8.6
ΔMFI (uyaransız)	6.2	8	4.8	4.6	0.5

DİİG: Damar içi immünglobülin, H: Hasta, Ig: İmmünglobülin, KİT: Kemik iliği transferi, MFI: Ortalama floresan yoğunluğu, MLS: Mutlak lenfosit sayısı.

LRBA hastalarında kesin tanı gen dizileme yöntemi ile mutasyonun belirlenmesi sonucu konmaktadır. Fakat ülkemizde bu yöntemlerin yaygın olmayışı ve sonuçların uzun sürede elde edilmesi nedeniyle bu hastalığın ayırıcı tanıda düşünüldüğü hastalarda daha hızlı sonuç veren tanısız testlere ihtiyaç duyulmaktadır. Böylelikle hem uygun tedavinin ivedilikle gerçekleştirilmesi hem de kemik iliği nakli düşünülen hastalarda ise ön hazırlıkların yapılması açısından zaman kazanılması mümkün olacaktır. Günümüzde, LRBA ön tanısı için akan hücre ölçer veya Western-Blot yöntemi ile protein

miktarı belirlenebilmektedir (2). Western-Blot yöntemi ile karşılaştırıldığında, akan hücre ölçer ile protein ifadesinin belirlenmesi hem daha hızlı sonuç vermesi, daha az emek gerektirmesi ve çoğu zaman daha ucuz olması nedeniyle maliyet etkindir (8). Günümüzde farklı merkezlerde akan hücre ölçer ile periferik kan mononükleer hücrelerindeki LRBA protein ifadesinin belirlenmesi uyaransız ya da uyaransız şartlarda gerçekleştirilebilmektedir (2,6). Lo ve ark. (6) yapmış oldukları çalışmada PMKH'leri uyarmadan hastalarda protein ifadesinin düşük olduğunu belirlerken, Gamez-Diaz ve ark. (2) hastalarda fitohemaglutinin

(PHA) ya da PMA+I uyarımları ile de LRBA protein ifadesinin düşük olduğunu göstermişlerdir. Schreiner ve ark. (9) ise çalıştıkları hastalarda LRBA protein ifadesini hem uyaransız hem de uyarımlı şartlarda belirlemişler ve aynı izotip kontrolü kullanıldığında, hastalarda uyarım sonucu elde edilen MFI değerinin uyaransız olarak elde edilen değere oranının yaklaşık bir olduğunu, bu değer in sağlıklı kontrollerde ise 3.39 olduğunu raporlamışlardır. Çalışmamızda, iki hasta ve sağlıklı kontrolde hem uyarımlı hem de uyaransız şartlarda PMKH'lerinde LRBA protein ifadesi belirlendi ve elde ettiğimiz sonuçlar her iki koşulda da LRBA protein ifadesinin eksikliğinin belirlenebileceğini gösterdi.

Sonuç olarak, LRBA geninde meydana gelen mutasyonlar sık enfeksiyon, otoimmünite, kronik akciğer hastalığı, lenfoproliferasyon, sitopeni ve kronik ishal ile kendini gösteren geniş bir klinik fenotipe neden olmaktadır. Çalışmamızda elde ettiğimiz veriler ışığında, klinikte LRBA eksikliği düşünülen olgularda akan hücre ölçer ile hücre içi LRBA ifadesi belirlenmesi hızlı ve güvenilir bir tanısal test olarak karşımıza çıkmıştır. LRBA gösterimi düşük saptanan hastalarda gen dizileme yöntemi ile mutasyon varlığı doğrulanmalıdır.

TEŞEKKÜR

Hücre içi boyama yöntemi ile protein ifadesinin belirlenmesi konusunda çok büyük emekleri geçen değerli hocamız Prof. Dr. Işıl Barlan'ı saygı, özlem ve minnetle anıyoruz.

LRBA protein ifadesi için protokol ve antikor sağlayan Prof. Michael Lenardo'ya ve Dr. Bernice Lo'ya teşekkür ederiz.

LRBA mutasyonunun H1 ve H2'de gösterilmesine katkısı olan NIH grubundan Prof. Michael Lenardo'ya, H3 ve H4'de gösterilmesine katkısı olan Harvard Üniversitesi'nde Prof. Raif Geha'ya ve H5'in gösterilmesinde katkısı olan Exeter Üniversitesi'nden Yrd. Doçent Elisa De Franco'ya teşekkür ederiz.

Çıkar Çatışması

Bu yazının hazırlanması ve yayınlanması aşamasında herhangi bir çıkar çatışması bulunmamaktadır.

KAYNAKLAR

1. Lopez-Herrera G, Tampella G, Pan-Hammarstrom Q, Herholz P, Trujillo-Vargas CM, Phadwal K, et al. Deleterious mutations in LRBA are associated with a syndrome of immune deficiency and autoimmunity. *Am J Hum Genet* 2012; 90: 986-1001.
2. Gamez Diaz L, August D, Stepensky P, Revel-Vilk S, Seidel MG, Noriko M, et al. The extended phenotype of LPS-responsive beige-like anchor protein (LRBA) deficiency. *J Allergy Clin Immunol* 2016; 137: 223-30.
3. Charbonnier LM, Janssen E, Chou J, Ohsumi TK, Keles S, Hsu JT, et al. 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* 2015; 135: 217-27.e9.
4. Takahashi T, Tagami T, Yamazaki S, Uede T, Shimizu J, Sakaguchi N, et al. Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+) CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Exp Med* 2000; 192: 303-10.
5. Mead KI, Zheng Y, Manzotti CN, Perry LC, Liu MK, Burke F, et al. Exocytosis of CTLA-4 is dependent on phospholipase D and ADP ribosylation factor-1 and stimulated during activation of regulatory T cells. *J Immunol* 2005; 174: 4803-11.
6. Lo B, Zhang K, Lu W, Zheng L, Zhang Q, Kanellopoulou C, et al. Patients with LRBA deficiency show CTLA- loss and immune dysregulation responsive to abatacept therapy. *Science* 2015; 349: 436-40.
7. Alkhairy OK, Abolhassani H, Rezaei N, Fang M, Andersen KK, Chavoshzadeh Z, et al. Spectrum of phenotypes associated with mutations in LRBA. *J Clin Immunol* 2016; 36: 33-45.
8. Koutna I, Simara P, Ondrackova P, Tesarova L. Flow Cytometry Analysis of Intracellular Protein. In: Schmid I, (ed). *Flow Cytometry - Recent Perspectives*. Rijeka: InTech, 2012: 421-38.
9. Schreiner F, Plamper M, Dueker G, Schoenberger S, Gamez-Diaz L, Grimbacher B, et al. Infancy-onset T1DM, short stature, and severe immunodysregulation in two siblings with a homozygous LRBA mutation. *J Clin Endocrinol Metab* 2016; 101: 898-904.