

CD19 Eksikliği Tanısında RFLP Yönteminin Kullanımı

The Use of RFLP Method in the Diagnosis of CD19 Deficiency

 Hatice İrem Efe¹,  Mehmet Ali Karaselek²,  Hasan Kapaklı¹,  Yahya Gül¹,  LINKSevgi Keleş¹,  Şükrü Nail Güner¹,  Ercan Kurar³,  İsmail Reislı¹

¹Necmettin Erbakan Üniversitesi, Meram Tıp Fakültesi, Çocuk Alerji ve İmmünoloji Anabilim Dalı, Konya

²Necmettin Erbakan Üniversitesi, Meram Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Hematoloji Bilim Dalı Konya

³Necmettin Erbakan Üniversitesi, Meram Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Konya

Öz

B lenfosit yüzeyinde bulunan CD19 molekülü olgun B hücrelerinde CD21, CD81, CD225 ile birlikte CD19 kompleksini oluşturur ve antijen uyarısı ile birlikte B lenfosit aktivasyonunu düzenler. CD19 molekülünü kodlayan gende oluşacak mutasyonlar, CD19 protein ekspresyonunu etkilemekte ve primer immün yetmezlik (PIY) tablosu ortaya çıkmaktadır. Bu çalışmada CD19 eksikliği tanısıyla izlediğimiz hastamızın 3 aylık bebeğinin, RFLP yöntemiyle aynı gen mutasyonu yönünden değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Çalışmaya bilinen CD19 mutasyonlu hasta, bu hastanın yeni doğan bebeği ile hastanın annesi ve iki sağlıklı kontrol dahil edilmiştir. Mutasyon analizi için ilk olarak CD19 genindeki mutasyon bölgesini kapsayan primerler dizayn edilip PZR-RFLP işlemi gerçekleştirilmiştir. Oluşan DNA fragmentleri agaroz jel elektoroforezinde görüntülenip genotiplemesi yapılmıştır. Hastamızın CD19 geninin ekzon 6'da saptanan çerçeve kayması mutasyonu (c.973_973insA) yönünden bebeğinin ve annesinin taşıyıcı olduğu PZR-RFLP yöntemi ile gösterilmiştir. PZR-RFLP yönteminin, bilinen mutasyonların belirlenmesinde kullanılabilir ucuz, hızlı ve güvenilir bir yöntem olduğu kanısındayız.

Anahtar kelimeler: CD19 eksikliği, PIY, PZR-RFLP

Abstract

CD19 molecule on the B lymphocyte surface forms the CD19 complex together with CD21, CD81, CD225 in mature B cells and regulates B lymphocyte activation with antigen stimulation. Mutations that will occur in the gene encoding the CD19 molecule affect CD19 protein expression and the picture of primary immunodeficiency (PIY). In this study, we aimed to evaluate the 3-month-old baby of our patient, who was followed up with a diagnosis of CD19 deficiency, in terms of the same gene mutation using the RFLP method. The patient with known CD19 mutation, the newborn baby of this patient and the patient's mother were included in the study. First, primers covering the mutation region in the CD19 gene were designed for mutation analysis and the PCR-RFLP procedure was performed. The DNA fragments formed were imaged and genotyped in agarose gel electrophoresis. In terms of the frame shift mutation (c.973_973insA) of the CD19 gene detected in exon 6 of our patient, it was shown by the PCR-RFLP method that her baby and mother were carriers. It is concluded that the PCR-RFLP method is an inexpensive, fast and reliable method that can be used in the detection of known mutations.

Key word: CD19 deficiency, PID, PCR-RFLP

Çalışma 182018008 proje numarası ile Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir.

Yazışma Adresi: Mehmet Ali Karaselek, Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Hematoloji Bilim Dalı Konya

E-Posta: malikaraselek@gmail.com

Alınma tarihi : 24.08.2021 / **Kabul tarihi:** 09.09.2021 / **Yayımlanma tarihi:** 15.12.2021

CD19 Eksikliği Tanısında RFLP Yönteminin Kullanımı - Efe ve ark.

Genel Tıp Derg 2021;31(4)420-422

Giriş

Primer immün yetmezlikler (PİY), immün sistem hücrelerinin gelişimini veya fonksiyonlarını etkileyen bir gendeki mutasyon sonucu meydana gelir. Kronik ve/veya tekrarlayan bakteriyel, fungal ve viral enfeksiyonlara yatkınlık ile karakterize bir hastalık grubudur. Son yıllarda PİY'e sebep olan birçok gen tanımlanmıştır. Temel olarak bakteriyel enfeksiyonlara yatkınlık ile seyreden primer antikor eksiklikleri, B hücre farklılaşmasında rol oynayan genlerdeki mutasyonlar sonucu oluşabilmektedir. Bu genlerde meydana gelen mutasyonlar sonucu kemik iliğinde B hücre gelişimi ve farklılaşmasını engellemekte ve periferik kanda B hücre yokluğu ile agammaglobulinemiye meydana gelmektedir (1,2).

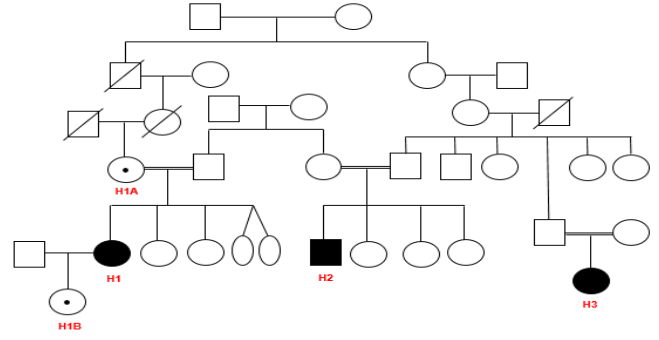
CD19 molekülü, immüoglobulin (Ig) süper ailesine ait transmembran bir glikoproteindir. 16.kromozomun p11.2 bölgesinde yer alan, 7.41 kb uzunluğunda ve 15 ekzondan oluşan CD19 geni tarafından kodlanmaktadır. CD19, foliküler dendritik hücrelerin yanı sıra spesifik olarak normal ve neoplastik B hücrelerde de eksprese edilmekle birlikte bu ekspresyon B hücreler için kemik iliğinde başlayıp plazma hücresine dönüşene kadar devam etmektedir. İlave olarak CD19 molekülü, olgun B hücrelerin yüzeylerinde CD21, CD81 ve CD225 ile birlikte bir kompleks (CD19 kompleksi) oluşturmaktadır.

Bu kompleks, B hücre reseptörü (BHR) ile birlikte görev yapmakta hem BHR bağımlı hem de BHR bağımsız hücre içi B lenfosit sinyal yolağını uyarmaktadır. CD19 geninde meydana gelen mutasyon sonucu, kemik iliğinde normal B lenfosit farklılaşması devam etmekte, periferik kanda B lenfosit sayısı ve B hücre repertuarı normal olmaktadır. Ancak BHR yoluyla uyarım bozulmakta ve periferik kanda bellek B lenfosit sayısı azalmaktadır. Sonuçta özgül antikor yanıtlarında bozulma meydana gelmektedir (3,4).

B hücre yanıtlarının düzenlenmesinde rol oynayan CD19 genindeki mutasyonuna bağlı ilk PİY olgusu 10 yaşında bir kız çocuğunda kliniğimizde tarafımızca tanımlanmıştır (5). Ardından 208 olguyu içeren köy taraması yapılmış ve akım sitometrik yöntem ile 20 olguda taşıyıcılık durumu tespit edilmiş ve bunların taşıyıcılığı CD19 gen analizi yöntemi ile de doğrulanmıştır (6). Daha sonraki yıllarda ilk olgu ile akraba ve aynı mutasyona sahip 2 hastada CD19 eksikliği olgusu tanımlanmıştır. Bu tür bilinen gen defektlerinde şüphelenilen olgularda ilgili gendeki mutasyonun ucuz, hızlı ve güvenilir bir yöntemle tanımlanması önem arz etmektedir. Bu noktadan hareketle bu çalışmada, bilinen CD19 eksikliği olgusunun doğan bebeğinde CD19 eksikliği olup olmadığının, Polimeraz Zincir Reaksiyonu-Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (PZR-RFLP) yöntemi ile değerlendirilmesi ve bu yöntemin uygulanabilirliğinin araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntemler

Çalışma Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Çocuk Allerji ve İmmünoloji Bilim Dalı tarafından gerçekleştirilmiştir. Çalışmaya 2006 yılında ilk defa tarafımızca CD19 eksikliği olduğunu gösterdiğimiz kadın hasta (H1), hastanın annesi (H1A) ve 3 aylık kız bebeği (H1B) ile iki sağlıklı kontrol (K1 ve K2) dahil edilmiştir. Hastalarımıza ait aile ağacı (pedigri) Şekil 1'de gösterilmiştir. CD19 mutasyon araştırması yapılacak gen bölgesi ilk hastamızda tanımlanan gen bölgesi olarak belirlenmiştir (CD19 geni 6. exon: c.973_973insA; p.Arg325AlafsX4; GenBank: AH005421.2).



Şekil 1: CD19 eksikliği olgumuzun aile ağacı

Çalışma Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi İlaç ve Tıbbi Cihaz Dışı Araştırmalar Etik Kurulu (Karar No: 2017/818) tarafından onaylanmıştır.

Periferik Lenfosit Alt Grup Analizi

Hastamızın periferik lenfosit alt grup oranları CD4 (PerCp-Cy5.5, PRA-T4), CD16 (PE,3G8), CD56 (PE, N901), CD45 (PerCP, HI30), HLA-DR (FITC), CD3 (APC-H7, SK7), CD8 (PerCP-Cy5.5, SK1) ve CD19 (PE-Cy7, SJ25C1; APC, 4G7; PE, HIB19) monoklonal antikorları (mAb) kullanılarak tespit edilmiştir. Bu amaçla yüzey boyama protokolü uygulanmıştır. Boyamanın ardından Becton Dickinson Canto II (BD Biosciences, Heidelberg, Germany) akım sitometri cihazı ile hücre sayımları yapıp FACSDiva software version 6.1.3. programı ile analizi gerçekleştirilmiştir.

DNA İzolasyonu, PZR ve PZR-RFLP

DNA izolasyonu fenol-kloroform yöntemi ile gerçekleştirilmiş olup DNA kalite ve miktarı Nanodrop/Mresto cihazı ile belirlenmiştir. CD19 genom bölgesine ait DNA dizi Gen Bankasından (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) temin edilmiştir. Ekzon 6'da bulunan mutasyon bölgesini (SNP) kapsayan PZR primerleri dizayn edilmiştir. (F primer: 5'CCTGAGGAGGAAAAGAAT-3'; R-primer: 5'GGAAACAGTAAGTGCAAGGCATA-3'). Mutasyon bölgeleri, oluşturulan primerler kullanılarak PZR ile amplifiye edilmiştir. RFLP için BsmI (New England Biolabs® Inc.) enzimi kullanılmış olup PZR ürünleri bu enzim ile 65°C'de 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası oluşan fragmentler %3'lük agaroz jelde görüntülenmiş ve genotipleme yapılmıştır. Genotipler homozigot normal, homozigot mutant ve heterozigot olarak belirlenmiştir.

CD19 mutasyon bölgesi için tasarlanan primerler ile PZR sonrası 118 bp'lik DNA fragmentleri elde edilmiştir. BsmI enzimi tanıma bölgesi 5'...GAATGCN^...3'; 3'...CTTAC^GN...5' olup normal tip allele göre seçilmiştir. Mutasyon olmadığında enzim kesim işlemi gerçekleşecek ve RFLP sonucu yine 94 ve 24 bp'lik DNA fragmenti elde edilecektir. Homozigot hasta olduğu durumda enzimatik kesim işlemi gerçekleşmeyecek yine 118 bp'lik fragmenti elde edilecektir. Heterozigot olduğu durumda ise 118 bp, 94 bp ve 24 bp olmak üzere üç DNA fragmenti elde edilecektir.

Bulgular

Çalışmaya dahil edilen CD19 eksikliği olan hasta 28 yaşında kadın,

CD19 Eksikliği Tanısında RFLP Yönteminin Kullanımı - Efe ve ark.

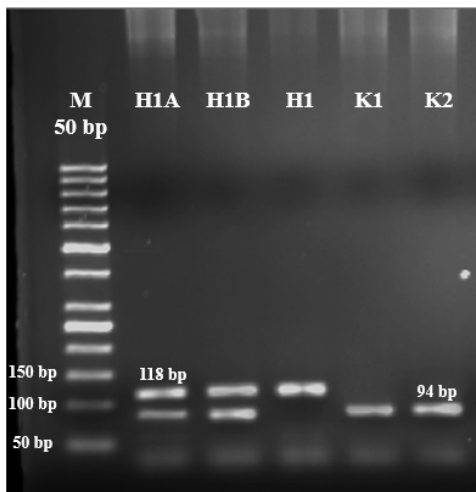
54 yaşında annesi ve 3 aylık kız bebeği olup klinik ve laboratuvar bulguları Tablo 1’de gösterilmiştir.

Çalışmaya alınan tüm olguların periferik kan lenfositleri akım sitometrik yöntemle analiz edilmiştir. CD19 eksikliği olan hastamızın CD19 ekspresyonu, üç farklı CD19 (PE-Cy7, SJ25C1; PE, HIB19, APC, 4G7) klonu ile çalışılmış olup, 3 klon ile de CD19 ekspresyonu olmadığı gösterilmiştir. CD19 eksikliği olan olgumuzun annesi ve bebeğinde ise CD19 ekspresyonu normal olduğu görülmüştür (Tablo 1). Ayrıca diğer periferik kan lenfosit oranları da normal olarak değerlendirilmiştir.

Tablo 1: Hastamızın, annesinin ve doğan bebeğin bulguları ve laboratuvar bulguları

Parametreler	CD19 Eksikliği Olgusu (H1)	CD19 Eksikliği Olgusu (H1)	Hastanın Annesi (H1A)	Hastanın Bebeği (H1B)
Yaş	10 yaş	28 yaş	54 yaş	3 ay
Lenfosit sayısı/mm ³	4480	990	2130	5010
CD3+ (%) (mutlak sayı)	72(3270)	90(891)	75(1597)	58(2905)
CD4+ (%) (mutlak sayı)	40(1792)	45(445)	44(937)	33(1653)
CD8+ (%) (mutlak sayı)	32(1478)	42(415)	35(745)	22(1102)
CD19+ (%) (mutlak sayı)	0	0	11(234)	23(1152)
CD16/CD56 (%) (mutlak sayı)	6(313)	1(9,9)	5(106)	14(701)
IgG(mg/dl)	325(842-1943)	1070(944-1505)	702(944-1505)	789(574-974)
IgA(mg/dl)	292(62-390)	178(65-176)	273(65-176)	37(25-62)
IgM(mg/dl)	25(54-392)	384(86-175)	74(86-175)	79(58-138)
Başvurudaki Özellik	Tekrarlayan bronşiyolit ve bronkopnömoni	Klinik takipte SLE	Kontrol amaçlı	Kontrol amaçlı

CD19 mutasyon bölgesi için tasarlanan primerler ile PZR sonrası 118 bp’lik DNA fragmentleri elde edilmiştir. RFLP analizi neticesinde CD19 eksikliği olan hastamızın (H1) homozigot mutant, CD19 eksikliği olan hastamızın annesinin (H1A) ile doğan bebeğin (H1B) heterozigot genotip sahip olduğu belirlenmiştir. Bu DNA örneklerine BsmI enzimi ile RFLP işlemi uygulanmış olup PZR ve RFLP sonrası agaroz jel elektroforez görüntüsü Şekil 2’de gösterilmiştir.



Şekil 2: RFLP sonrası %3'lük agaroz jel elektroforezi görüntüsü (H1A: H1 anne; H1B: H1 yeni doğan bebeği; H1: Hasta; K1, K2: Kontrol)

CD19 Eksikliği Tanısında RFLP Yönteminin Kullanımı - Efe ve ark.

Sonuç

Bu çalışmada CD19 eksikliğini ilk kez 2006 yılında tanımladığımız hastamızın (H1) 3 aylık bebeğinin (H1B) RFLP yöntemi ile CD19 eksikliği yönünden taşıyıcı olduğu gösterilmiştir. Böylece erken dönemde RFLP yöntemi kullanılarak, hızlı ve ucuz bir şekilde tanıya gidilebileceği gösterilmiş ve aileye doğan bebek ile ilgili bilgi verilmiştir.

DNA seviyesinde mutasyonların tanımlanmasında DNA dizi analizi, ekzom analizi, array analizleri, gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-RZR), RFLP gibi birçok yöntem olmasına rağmen DNA dizi analizi yöntemi en çok tercih edilen yöntemler arasındadır. Ancak bilinen mutasyonların belirlenmesinde daha az maliyetli olan, daha az laboratuvar ekipmanı gerektiren ve uygulaması daha kolay olan RFLP yöntemi kullanılabilir. RFLP yöntemi güvenilir bir yöntem olup, günümüzde bazı bakteri türlerinin tanımlanmasının yanı sıra immün yetmezliklerde bilinen mutasyonların tanımlanmasında da kullanılmaktadır (7-9). Bundan dolayı çalışmamızda RE kesim mantığına dayanan RFLP yöntemi tercih edilmiş ve hastamız, annesi ve bebeği CD19 eksikliği yönünden bu yöntem ile değerlendirilmiştir.

Sonuç olarak, otozomal çekinik hastalıkların sıklığının yüksek olduğu ülkemizde, taşıyıcıların belirlenip ve ailelerin bilgilendirilmesi, en az hastaların saptanması kadar önem arz etmektedir. Bundan dolayı bu tip hastalıklarda RFLP yönteminin hızlı, ucuz ve güvenilir bir tarama yöntemi olarak kullanılabilirliği kanısındayız.

Teşekkür

Çalışmayı 182018008 proje numarası ile destekleyen Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğüne teşekkür ederiz.

Kaynaklar

- 1.Picard C, Bobby Gaspar H, Al-Herz W, et. al. International union of immunological societies:2017 Primary immunodeficiency diseases committee report on inborn errors of immunity. J Clin Immunol 2018;38(1):96-128.
- 2.Ballow M. Primary immunodeficiency disorders: antibody deficiency. J Allergy Clin Immunol 2002;109:581-91.
- 3.Wang K, Wei G, Liu D, et. al. CD19: A biomarker for B cell development, lymphoma diagnosis and therapy. Exp Hematol Oncol 2012;29(1):36.
- 4.Şekerel BE. Çocukluk Çağında Alerji Astım İmmünoloji. 1st Baskı, Ankara, Türkiye, 2015; p:21-42.
- 5.Van Zelm MC, Reisli I, Van der Burg M, et. al. An antibody-deficiency syndrome due to mutations in the CD19 gene. N Eng J Med 2006;354(18):1901-12.
- 6.Reisli İ, Artaç H, Pekcan S, ve ark. CD19 molekül eksikliği: Bir köy taraması. Tur Arch Ped 2009;44:127-30.
- 7.Dib C, Faure S, Fizames C, et. al. A comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellites. Nature 1996;380(6570):152-54.
- 8.Ota M, Fukushima H, Kulski JK, et. al. Single nucleotide polymorphism detection by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. Nat Protocols 2007;2(11):2857-64.
- 9.Karaselek MA, Kapaklı H, Keleş S, et. al. Intrauterine detection of DCLRE1C (Artemis) mutation by restriction fragment length polymorphism. Pediatr Allergy Immunol 2019;30(6):668-71.

Genel Tıp Derg 2021;31(4)420-422