

Hiperimmünoglobulin E Sendromlu Hastalarda DOCK8 Düzeyleri: Akan Hücre Ölçer ile Saptanması

DOCK8 Levels in Patients with Hyperimmunoglobulin E Syndrome: Detection by Flow Cytometry

Suzan Çınar,¹ Metin Yusuf Gelmez,¹ Serdar Nepesov,² Yıldız Camcıoğlu,² Günnur Deniz¹

¹Istanbul Üniversitesi, Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, İmmünoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

²Istanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik İmmünoloji-Allerji Bilim Dalı, İstanbul, Türkiye

İletişim adresi:

Dr. Suzan Çınar
Istanbul Üniversitesi, Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, İmmünoloji Anabilim Dalı, 34093 Fatih, İstanbul, Türkiye
Tel: 0212 - 414 20 00 / 33342
e-posta: suzancinar@yahoo.com

©2015 Turkish Journal of Immunology.
All rights reserved.

doi: 10.5606/tji.2015.424

Geliş tarihi: 24 Temmuz 2014
Kabul tarihi: 20 Ağustos 2015

ÖZ

Amaç: Bu çalışmada hiperimmünoglobulin E sendromu (HIES) tanısı konmuş hastalarda akan hücre ölçer ile saptanan DOCK8 bulguları bildirildi.

Hastalar ve yöntemler: HIES tanılı 10 hasta (1 kız, 9 erkek; ort. yaş 11.60±3.17 yıl) ve yedi sağlıklı (2 kız, 5 erkek; ort. yaş 31.14±19.31 yıl) bireyden alınan heparinli periferik kan örneklerindeki T hücrelerinde DOCK8 ekspresyonu anti-CD3PE, anti-DOCK8, anti-fare IgG1FITC ve fare IgG1FITC monoklonal antikorları kullanılarak hücre içi boyama tekniği ile işaretlendi. Hücre içi boyama için iki farklı üretilmeye ait (BD-Pharmingen ve Invitrogen) fiksasyon-permeabilizasyon kitleri kullanıldı. DOCK8 düzeyi tam kan (TK) ve periferik kan mononükleer hücre (PKMH) örneklerinde akan hücre ölçer ile ölçüldü. DOCK8 düzeyi, izotipe göre ortalama floresan yoğunluğu (MFI), MFI-fark (F) ve MFI-İndeks (I) ile hesaplandı.

Bulgular: HIES olgularının immünoglobulin E (IgE) düzeyleri 10032.50±9454.02 IU/mL idi. Akan hücre ölçer ile yapılan ölçümlere göre DOCK8 eksikliği gözlenmedi. BD-Pharmingen veya Invitrogen fiks-perm kitinin kullanıldığı TK ve PKMH sonuçları karşılaştırıldığında, MFI ve MFI-F değerleri açısından, DOCK8 ekspresyonunda anlamlı fark saptandı (sırasıyla, p=0.004, p=0.006, p=0.012, p=0.012).

Sonuç: HIES hastalarında DOCK8 ekspresyonundaki farklılıkların tespitinde MFI önemlidir. PKMH ile karşılaştırıldığında, akan hücre ölçer ile DOCK8 ekspresyonu daha yüksek düzeyde olduğu için TK yöntemi seçilmelidir. Çalışma bulgularımız, DOCK8 tespitinde TK yöntemlerinin kullanımını desteklemektedir. DOCK8 gen mutasyonları, genetik testler ile belirlenmelidir.

Anahtar sözcükler: DOCK8; akan hücre ölçer; Hiper İmmünoglobulin E Sendromu.

ABSTRACT

Objectives: In this study, we report the findings of DOCK8 detected by flow cytometry in patients diagnosed with hyperimmunoglobulin E syndrome (HIES).

Patients and methods: DOCK8 expression in T cells of peripheral blood samples with heparin obtained from 10 HIES patients (1 girl, 9 males; mean age 11.60±3.17 years) and seven healthy controls (2 girls, 5 males; mean age 31.14±19.31 years) were stained using anti-CD3PE, anti-DOCK8, anti-mouse IgG1FITC, and mouse IgG1FITC monoclonal antibodies through the intracellular staining technique. For intracellular staining, two fixation-permeabilization kits (BD-Pharmingen and Invitrogen) from different manufacturers were used. Detection of DOCK8 level was measured in whole blood (WB) and peripheral blood mononuclear cell (PBMC) samples by flow cytometry. DOCK8 level was calculated as mean fluorescence intensity (MFI), MFI-minus (M), and MFI-index (I) according to the isotype.

Results: The immunoglobulin (IgE) levels of HIES patients were 10032.50±9454.02 IU/mL. DOCK8 deficiency was not found by flow cytometry. Comparison of WB and PBMC results using BD-Pharmingen and Invitrogen fix-perm kit revealed significant differences in MFI and MFI-F values of DOCK8 expression (p=0.004, p=0.006, p=0.012, p=0.012, respectively).

Conclusion: Mean fluorescence intensity is important to detect the differences of DOCK8 expression in HIES patients. Compared to PBMC, WB should be preferred due to increased DOCK8 expression by flow cytometer. Our study findings support that WB methods can be used for the detection of DOCK8. Mutations in DOCK8 gene should be determined by genetic testing.

Keywords: DOCK8; flow cytometry; Hyper Immunoglobulin E Syndrome.

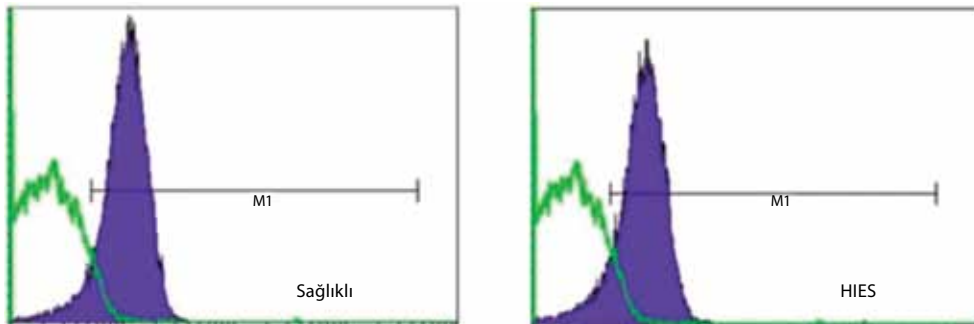
Kompleks primer immün yetmezlikli bozukluk olan Hiperimmünoglobulin E sendromu (HIES) deri ve akciğerlerde tekrarlayan *Staphylococcus aureus* enfeksiyonları, kronik egzema ve yüksek serum immünoglobulin E (IgE) düzeyi ile karakterizedir.^[1] 1966'da Job (Eyüp) sendromu, 1972'de Buckley sendromu, 1999 yılında yüksek IgE, nötrofil kemotaksi defektlerinden dolayı benzerlik göstermesi sonucu HIES tekrarlayan enfeksiyon sendromu olarak adlandırılmıştır.^[2-5] Neonatal periyotta başlayan atopik dermatite bazen gıda allerjisi eşlik edebilmektedir. İmmün sistem ile ilgili egzema, "soğuk" apseler, pnömoni, mukokütanöz kandidiyaz, serumda yüksek IgE ve eozinofili gibi bulgularla birlikte multisistem tutulum da gözlenmektedir. İskelet ve bağ dokusu anomalileri: skolyoz, osteoporoz, minör travmalar sonucu uzun kemikler ve kaburgalarda kırıklar, genişlemiş eklemler, süt dişlerinin düşmemesi, kranyosinotiz, kaba yüz görünümü, geniş burun kemeri, yüksek kemerli damak, kulak ve burun yumuşak dokusunda kalınlaşma söz konusudur.^[1,2] Hiperimmünoglobulin E sendromlu olgulara ait aile ağaçlarının 2004'de detaylı incelemesi sonucunda sporadik, otozomal dominant geçişliler AD-HIES veya tip 1; akraba evliliği söz konusu olan ailelerdeki olgular ise otozomal resesif (AR)-HIES veya tip 2 olarak sınıflandırılmıştır.^[1] İskelet anomalisi ve pnömatoselin gözlenmediği, hücre içi bakteriyel ve *Herpes simplex*, *Molluscum contagiosum* gibi viral ajanların neden olduğu enfeksiyonların ağır bastığı AR-HIES olgularda *TYK2* geninde mutasyon 2006'da, bir yıl sonra iskelet sistemindeki bozukluklar ile ayırt edilen AD-HIES'ye *STAT3* genindeki mutasyonların neden olduğu bildirilmiştir.^[1] Otozomal resesif (tip 2)-HIES olgularının büyük bir kısmında dedicator of cytokinesis 8 (DOCK8) genindeki delesyonların sorumlu olduğu 2009'da keşfedilmiştir.^[6] DOCK8, *TYK2* veya *STK3* genlerindeki homozigot veya heterozigot mutasyonların neden olduğu AR-HIES hastaları AD-HIES hastalarında gözlenen immün sistem dışı bulgulara sahip değildir.^[6-8] DOCK8 eksikliği, tekrarlayan akciğer ve deri enfeksiyonları, artmış serum IgE düzeyi ve allerji ile karakterize AR-HIES'ye neden olmaktadır.

DOCK8 immün sistem hücrelerinde sinyal iletiminde özellikle hücre içi iskelet yapısı düzenlenmesinde rol oynayan adaptör bir proteindir.^[9] DOCK8 eksikliği olan hastaların prognozu diğer HIES'li hastalara göre daha kötü seyretmektedir. Hiperimmünoglobulin E sendromlu hastalarda DOCK8 düzeyinin saptanması klinik açıdan oldukça önemlidir. Bu çalışmada HIES tanısı almış olgularda DOCK8 düzeylerinin akan hücre ölçer ile saptanması amaçlanmıştır.

HASTALAR VE YÖNTEMLER

Çalışmaya İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik İmmünoloji-Allerji Bilim Dalı tarafından takibi yapılan ve HIES tanısı konmuş 10 hasta (1 kız, 9 erkek; ort. yaş 11.60±3.17 yıl) ve yedi sağlıklı birey (2 kız, 5 erkek; ort. yaş 31.14±19.31 yıl) dahil edildi. Reşit olmayan çocukların veli veya vasileri ve gönüllüler yapılacak işlem hakkında bilgilendirildi ve bilgilendirilmiş hasta onamları yazılı olarak alındı.

Hiperimmünoglobulin E sendromlu hastalar ve sağlıklı bireylerden alınan heparinli periferik kan örneklerinden ya doğrudan tam kanda (TK) ya da periferik kan mononükleer hücreler (PKMH) izole edilerek CD3⁺ T hücrelerinde DOCK8 ekspresyonu belirlendi. Anti-CD3PE (BD-Biosciences, San Jose, CA, ABD) monoklonal antikor ile T hücrelerinin yüzeyi işaretlendikten sonra anti-DOCK8 (Santa Cruz Biotechnology Inc., Texas ABD), sekonder olarak anti-fare IgG1FITC (San Diego, CA, ABD) ve izotip kontrol olarak fare IgG1FITC (BD-Biosciences, San Jose, CA, ABD) antikorları kullanılarak hücre içi boyama tekniği ile DOCK8 proteini işaretlendi. Anti-DOCK8 ile hücre içi boyama aşamasında iki farklı üreticiye ait (BD-Pharmingen, San Diego, CA, ABD ve Invitrogen, Grand Island NY, ABD) fiksasyon-permeabilizasyon (fix-perm) kitleri üretici firmasının tavsiyeleri doğrultusunda kullanıldı. FACSCalibur akan hücre ölçer cihazı (BD Biosciences, San Jose, CA, ABD) ile CellQuest yazılımının (BD Biosciences, San



Şekil 1. Hiperimmünoglobulin E sendromu ve sağlıklı bireye ait izotip ve DOCK8 histogram örneği (çizgi: izotip kontrol). HIES: Hiperimmünoglobulin E sendromu.

TABLO 1

Hiperimmünoglobulin E sendromu olgularının serum immünoglobulin düzeyleri

| İmmünoglobulin | Ort.±SS | Medyan | Minimum-Maksimum | Normal değerler (8-14 yaş arası) |
|--------------------------|------------------|---------|------------------|----------------------------------|
| İmmünoglobulin A (mg/dL) | 224.98±264.02 | 148.9 | 0.1-869.7 | 40-350 |
| İmmünoglobulin G (mg/dL) | 1377.00±724.20 | 1110.00 | 821-3160 | 650-1600 |
| İmmünoglobulin M (mg/dL) | 87.54±46.23 | 84.00 | 34.6-190.00 | 50-300 |
| İmmünoglobulin E (IU/mL) | 10032.50±9454.02 | 7070.00 | 1520.00-31900.00 | 0-200 |

Ort.±SS: Ortalama ± standart sapma.

Jose, CA, ABD) yardımıyla ortalama floresan yoğunluğu (MFI) değerleri saptandı (Şekil 1). DOCK8 düzeyi MFI, MFI-fark (F) ve MFI-indeks (I) ile belirlendi. Kısaca, olgu TK ve PBMH örneklerinin izotip ve DOCK8 işaretlemeinden sonra elde edilen MFI^{izotip} ve MFI^{olgu} not edildi; MFI olarak doğrudan DOCK8 işaretlemeinden elde edilen MFI^{olgu} kullanıldı. MFI-F, MFI^{olgu} değerinden MFI^{izotip} değerinin çıkarılması; MFI-I ise MFI^{olgu} değerinin MFI^{izotip} değerine bölünmesi ile hesaplandı.^[10]

İstatistiksel değerlendirme

İstatistiksel değerlendirme IBM SPSS Windows Versiyon 21.0 programı (IBM Corporation, Armonk, NY, USA) kullanılarak yapıldı. Gruplardaki ölçülebilir değişkenlere non-parametrik Mann-Withney-U testi

uygulandı. İstatistiksel olarak p<0.05 değerleri anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Hiperimmünoglobulin E sendromlu olguların IgE düzeyleri 10032.50±9454.02 IU/mL idi (Tablo 1). CD4⁺ ve CD8⁺ T hücre sayıları normal düzeylerde idi (Tablo 2). Nötrofil fonksiyonlarında değişiklik gözlenmedi. Akan hücre ölçer ile yapılan ölçümlere göre olgularda DOCK8 eksikliği gözlenmedi (Tablo 3).

TK ve PKMH karşılaştırması

Tam kan ve PKMH örneklerinden BD-Pharmingen kiti kullanılarak elde edilen DOCK8 MFI ve MFI-F değerlerinde anlamlı fark saptandı (sırasıyla, p=0.004,

TABLO 2Hiperimmünoglobulin E sendromlu olgularda periferik kan CD4⁺ ve CD8⁺ T hücre sayıları

| İmmünoglobulin | Ort.±SS | Medyan | Minimum-Maksimum | Normal değerler (6-12 yaş arası) | Normal değerler (12-18 yaş arası) |
|--------------------------|----------------|--------|------------------|----------------------------------|-----------------------------------|
| CD4 ⁺ T hücre | 1250.78±579.44 | 1071 | 617-2280 | 980 (650-1500) | 840 (530-1300) |
| CD8 ⁺ T hücre | 820.11±364.85 | 710 | 419-1617 | 680 (370-1100) | 530 (330-920) |

Ort.±SS: Ortalama ± standart sapma.

TABLO 3

Tam kan ve periferik kan mononükleer hücre örneklerinde BD-Pharmingen ve Invitrogen tamponları ile muameleden sonra akan hücre ölçer ile elde edilen DOCK8 MFI, MFI-fark ve MFI-indeks bulguları

| <i>MFI olgu</i> | Tam kan | | | | Periferik kan mononükleer hücre | | | |
|---------------------------------------|---------------|------------|------------|-------------|---------------------------------|------------|------------|------------|
| | BD-Pharmingen | | Invitrogen | | BD-Pharmingen | | Invitrogen | |
| | Medyan | Min.-Maks. | Medyan | Min.-Maks. | Medyan | Min.-Maks. | Medyan | Min.-Maks. |
| HIES | 15.26 | 9.10-29.36 | 23.16 | 13.84-51.29 | 10.28 | 8.99-19.63 | 21.13 | 8.73-37.81 |
| Sağlıklı | 14.98 | 9.93-28.05 | 27.58 | 15.97-47.61 | 10.34 | 8.46-16.99 | 22.98 | 9.33-33.16 |
| <i>MFI Fark= MFI olgu-MFI izotip</i> | | | | | | | | |
| HIES | 11.33 | 5.17-25.43 | 20.17 | 10.85-48.30 | 7.08 | 5.79-16.43 | 18.72 | 6.32-35.40 |
| Sağlıklı | 11.05 | 6.00-24.12 | 24.59 | 12.98-44.62 | 7.14 | 5.26-13.79 | 20.57 | 6.92-30.75 |
| <i>MFI index= MFI olgu/MFI izotip</i> | | | | | | | | |
| HIES | 3.88 | 2.32-7.47 | 7.75 | 4.63-17.15 | 3.21 | 2.81-6.13 | 8.77 | 3.62-15.69 |
| Sağlıklı | 3.81 | 2.53-7.14 | 9.22 | 5.34-15.92 | 3.23 | 2.64-5.31 | 9.54 | 3.87-13.76 |

MFI: Ortalama floresan yoğunluğu; Min.: Minimum; Maks.: Maksimum; HIES: Hiperimmünoglobulin E sendromu.

TABLO 4

Tam kan ve periferik kan mononükleer hücre örneklerinde BD-Pharmingen ve Invitrogen tamponlarının karşılaştırması

| | BD-Pharmingen | | | | p | Invitrogen | | | | p |
|----------|---------------|------------|--------|------------|-------|------------|-------------|--------|------------|-------|
| | Tam kan | | PKMH | | | Tam kan | | PKMH | | |
| | Medyan | Min.-Maks. | Medyan | Min.-Maks. | | Medyan | Min.-Maks. | Medyan | Min.-Maks. | |
| MFI | 15.26 | 9.1-29.36 | 10.37 | 8.46-19.63 | 0.004 | 23.16 | 13.84-51.29 | 21.13 | 8.73-37.81 | 0.012 |
| MFI fark | 11.33 | 5.17-25.43 | 7.17 | 5.26-16.43 | 0.006 | 20.17 | 10.85-48.3 | 18.72 | 6.32-35.4 | 0.012 |

PKMH: Periferik kan mononükleer hücre; Min.: Minimum; Maks.: Maksimum; MFI: Ortalama floresan yoğunluğu.

p=0.006, Tablo 4). Invitrogen kiti kullanıldığında da TK ve PKMH örneklerinden elde edilen MFI (p=0.012) ve MFI-F değerlerinde (p=0.012) anlamlı fark bulundu (Tablo 4).

Fiksasyon-permeabilizasyon kit karşılaştırması

DOCK8'i işaretlemek için hücrelerin önce fikse edilip sonra antikorların geçmesi için hücre membranında delikler açılması gerekmektedir. Hücre içi boyama tekniğinde BD-Pharmingen ve Invitrogen firmalarına ait fix-perm kitleri karşılaştırıldı ancak herhangi bir fark saptanmadı (Tablo 3).

TARTIŞMA

Hücre kenarlarında lammellipoda, hücre içinde ise veziküler yapıların oluşumunu filamentöz aktini düzenleyerek sağlayan DOCK8 proteininin işlevinin anlaşılmasından kısa bir süre sonra konjenital serebral palsi, akciğer kanseri, otozomal mental retardasyon gibi hastalıklar ile ilişkisini gösteren çalışmalar yayınlanmıştır.^[9,11-13] Hiperimmünoglobulin E sendromu ile bağlantısı 2009 yılında tüm-genom tek nükleotid polimorfizm analizi ile gösterilmiştir.^[6] Genetik defekti DOCK8'deki mutasyona bağlı HIES olgularının klinik bulgularını düşük seviyede T ve B hücre, yüksek IgE ve düşük IgM düzeyleri ile tanımlanmıştır.^[14,15] Zhang ve ark.^[15] bu klinik bulguları sergileyen sekiz aileye mensup 11 hastada kantitatif revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ve immüno blot yöntemi ile lenfositlerde DOCK8 eksikliğini; ayrıca DOCK8 mRNA ekspresyonunu sağlıklı monosit, B ve T hücrelerinde de göstermişlerdir. Bu çalışmada ele alınan HIES olgularında CD4 ve CD8 T hücre oran ve sayıları uygun yaş gruplarına göre beklenen aralıkta olduğu gözlemlendi. İmmünoglobulin düzeyleri açısından incelendiğinde yüksek IgE değerleri dışında dikkat çeken değişiklik gözlemlenmedi.

Zhang ve ark.^[15] gibi Al-Herz ve ark.^[16] da dokuz Kuveytli hastada DOCK8 eksikliğini hem PZR hem de immüno blot yöntemi ile göstermişlerdir. Tanının doğrulanmasında kullanılan PZR ve immüno blot testlerinin rutin olarak kullanılmasının zahmetli olması nedeni ile Pai ve ark.^[10] DOCK8 ekspresyonunun akan hücre ölçer

ile saptanması için yöntem geliştirmişler ve kök hücre tedavisi sonrası takip amaçlı olarak da kullanmışlardır. Anti-DOCK8 ve izotip kontrol ile işaretlenmiş hücreler arasındaki farkı (MFI-F) DOCK8 ekspresyonu olarak hesaplamışlardır. Çalışmamızda tanının doğrulanması ve hızlı sonuç alınabilmesi için akan hücre ölçer yöntemi tercih edildi. DOCK8 ekspresyonunu göstermek için doğrudan MFI, anti-DOCK8 ve izotip kontrol ile işaretlenmiş hücrelerin MFI farkları veya birbirlerine bölümü ile elde edilen indeksler kullanıldı. Hasta örneklerinde T hücre DOCK8 protein ekspresyonu açısından sağlıklı kontroller ile karşılaştırıldığında fark saptanmadı.

Bu çalışmada hücre içi DOCK8 proteininin işaretlenmesini kolaylaştıran iki farklı firmanın üretmiş olduğu Fix-Perm kitleri karşılaştırıldı ve ekspresyonun gösterilmesinde etkileri olmadığı gözlemlendi. Ancak işaretleme sırasında kullanılan örnek türüne göre DOCK8 ekspresyonunun TK kullanılan yöntemde daha yüksek seviyede olduğu gözlemlendi. HIES olgularında beklenen düşük DOCK8 seviyesinden dolayı MFI yoğunluğu önemlidir. Bu nedenle akan hücre ölçerde gösterimin daha iyi olduğu TK yöntemi seçilmelidir. Akan hücre ölçer bulguları immün floresan gibi başka immünolojik yöntemlerle de desteklenebilir. HIES olgularında immünolojik yöntem ile normal düzeylerde saptanan DOCK8 proteinin moleküler yöntemler ile mutasyon yokluğunun gösterilmesi önemlidir.

Teşekkür

Hiperimmünoglobulin E sendromu hakkında yaptığı çalışmalar ve verdiği eğitimlerle ufukumuzu açan, bilgi dağarcığımızı zenginleştiren, DOCK8 ekspresyonunun akan hücre ölçer ile saptanmasına öncülük eden Prof. Dr. Işıl Barlan'ı saygı ve sevgiyle anıyoruz.

Çıkar çakışması beyanı

Yazarlar bu yazının hazırlanması ve yayınlanması aşamasında herhangi bir çıkar çakışması olmadığını beyan etmişlerdir.

Finansman

Yazarlar bu yazının araştırma ve yazarlık sürecinde herhangi bir finansal destek almadıklarını beyan etmişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Minegishi Y. Hyper-IgE syndrome. *Curr Opin Immunol* 2009;21:487-92.
2. In: Ochs HD, Smith CI, Puck JM, editors. Primary immunodeficiency diseases: a molecular and genetic approach. 2nd ed. New York: Oxford University Press; 2007.
3. Davis SD, Schaller J, Wedgwood RJ. Job's Syndrome. Recurrent, "cold", staphylococcal abscesses. *Lancet* 1966;1:1013-5.
4. Buckley RH, Wray BB, Belmaker EZ. Extreme hyperimmunoglobulinemia E and undue susceptibility to infection. *Pediatrics* 1972;49:59-70.
5. Al-Herz W, Bousfiha A, Casanova JL, Chatila T, Conley ME, Cunningham-Rundles C, et al. Primary immunodeficiency diseases: an update on the classification from the international union of immunological societies expert committee for primary immunodeficiency. *Front Immunol* 2014;5:162.
6. Engelhardt KR, McGhee S, Winkler S, Sassi A, Woellner C, Lopez-Herrera G, et al. Large deletions and point mutations involving the dedicator of cytokinesis 8 (DOCK8) in the autosomal-recessive form of hyper-IgE syndrome. *J Allergy Clin Immunol* 2009;124:1289-302.e4.
7. Su HC. Dedicator of cytokinesis 8 (DOCK8) deficiency. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2010;10:515-20.
8. Sanal O, Jing H, Ozgur T, Ayvaz D, Strauss-Albee DM, Ersoy-Evans S, et al. Additional diverse findings expand the clinical presentation of DOCK8 deficiency. *J Clin Immunol* 2012;32:698-708.
9. Ruusala A, Aspenström P. Isolation and characterisation of DOCK8, a member of the DOCK180-related regulators of cell morphology. *FEBS Lett* 2004;572:159-66.
10. Pai SY, de Boer H, Massaad MJ, Chatila TA, Keles S, Jabara HH, et al. Flow cytometry diagnosis of dedicator of cytokinesis 8 (DOCK8) deficiency. *J Allergy Clin Immunol* 2014;134:221-3.
11. Lerer I, Sagi M, Meiner V, Cohen T, Zlotogora J, Abeliovich D. Deletion of the ANKRD15 gene at 9p24.3 causes parent-of-origin-dependent inheritance of familial cerebral palsy. *Hum Mol Genet* 2005;14:3911-20.
12. Takahashi K, Kohno T, Ajima R, Sasaki H, Minna JD, Fujiwara T, et al. Homozygous deletion and reduced expression of the DOCK8 gene in human lung cancer. *Int J Oncol* 2006;28:321-8.
13. Griggs BL, Ladd S, Saul RA, DuPont BR, Srivastava AK. Dedicator of cytokinesis 8 is disrupted in two patients with mental retardation and developmental disabilities. *Genomics* 2008;91:195-202.
14. Notarangelo LD, Fischer A, Geha RS, Casanova JL, Chapel H, Conley ME, et al. Primary immunodeficiencies: 2009 update. *J Allergy Clin Immunol* 2009;124:1161-78.
15. Zhang Q, Davis JC, Lamborn IT, Freeman AF, Jing H, Favreau AJ, et al. Combined immunodeficiency associated with DOCK8 mutations. *N Engl J Med* 2009;361:2046-55.
16. Al-Herz W, Ragupathy R, Massaad MJ, Al-Attayah R, Nanda A, Engelhardt KR, et al. Clinical, immunologic and genetic profiles of DOCK8-deficient patients in Kuwait. *Clin Immunol* 2012;143:266-72.