

DOCK8 Protein Eksikliğinin Saptanmasında Akan Hücre Ölçerin Tanısal Değeri

The Diagnostic Value of Flow Cytometry in DOCK8 Deficiency

İsmail ÖĞÜLÜR¹, Ayça KIYKIM¹, Ercan NAIN¹, Nurhan KASAP¹, Gamze AKGÜN¹, Elif KARAKOÇ-AYDINER¹, Ahmet ÖZEN¹, Safa BARIŞ¹

Öz

Giriş: DOCK8 eksikliği ağır egzema, besin allerjisi ve otoimmünite bileşenleri olan kombine bir immün yetersizliktir. Erken tanı, hastaların tedavisi için önemlidir. Çalışmamızda, DOCK8 eksikliği hastalarında akan hücre ölçer ile DOCK8 protein ifadeleri belirlenerek, bu yöntemin tanısal değeri araştırıldı.

Gereç ve Yöntemler: Çalışmaya, DOCK8 eksikliği tanımlanmış yedi hasta ve 20 sağlıklı kontrol dahil edildi. Hastalar ve sağlıklı kontrollerden periferik kan mononükleer hücreler (PKMH) izole edildi ve DOCK8 protein ifadesi belirlendi. DOCK8 protein ifade analizleri, hastalarda ve sağlıklı kontrollerde DOCK8 antikor ve izotip kontrolün ham ortalama floresan yoğunluğu (MFI) ve bunların farkından elde edilen delta MFI (Δ MFI) değerlerine göre yapıldı. Deneyler farklı günlerde gerçekleştirildiği için, eş zamanlı sağlıklı kontrollere göre Δ MFI değerleri normalleştirildi ve yüzde değerleri hesaplandı.

Bulgular: DOCK8 olgularının ortanca yaşları 12 (8–15) yılıdır. Hastalardan altısı büyük delesyona sahipken bir tanesinde yanlış anlamlı mutasyon vardı. DOCK8 hastalarında ham MFI değerleri ($p=0,0008$) ve Δ MFI normalleştirme yüzde değerleri ($p<0,0001$) sağlıklı kontrollere göre anlamlı derecede düşüktü. Yanlış anlamlı mutasyona sahip olan hastanın ham MFI değeri kontrole yakın olarak belirlendi (hasta MFI: 23,70, kontrol MFI: 35,50). Hastalarda ham MFI ortancası 4,95 (3,65–5,67) iken sağlıklı kontrollerde 26,2 (21,6–32,1) olarak saptandı.

Sonuç: DOCK8 hastalarında, *DOCK8* geninde oluşan delesyonlar genellikle proteinin tama yakın yok olmasına neden olduğundan, akan hücre ölçer bu mutasyona sahip olguların erken tanınmasında oldukça önemlidir. Öte yandan, yanlış anlamlı mutasyonu olan bireylerde protein miktarı korunabildiği için akan hücre ölçer bulguları yanıltıcı olabilmektedir. Dolayısıyla, akan hücre ölçer ile protein tayini DOCK8 hastalığı tanısı için yardımcı bir yöntem olup şüpheli tüm olgulara genetik analiz yapılmalıdır.

Anahtar Kelimeler: Akan hücre ölçer, DOCK8, ortalama floresan yoğunluğu, delesyon, yanlış anlamlı mutasyon

Abstract

Introduction: DOCK8 deficiency is a combined immunodeficiency with severe eczema, food allergy and autoimmunity. Early diagnosis is important for the treatment of patients. In this study, diagnostic value of flow cytometric detection of DOCK8 protein expression was evaluated in patients with DOCK8 deficiency.

Material and Methods: Seven patients with DOCK8 deficiency and 20 healthy controls were enrolled in the study. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from patients and healthy controls, and DOCK8 protein expressions were detected. The data were analyzed as raw mean fluorescein intensity (MFI) and difference in MFI (Δ MFI) between cells stained in patients and healthy controls with anti-DOCK8 antibody and isotype control. As the experiments were done on different days, the Δ MFI values obtained were normalized according to the current healthy control values and percent values were calculated.

Results: The median age of DOCK8 patients was 12 years (8–15). Six of the patients have large deletions and 1 has a missense mutation in DOCK8 gene. Raw MFI values ($p=0.0008$) and normalized Δ MFI-percent values ($p<0.0001$) were significantly lower in DOCK8 patients compared to healthy controls. The patient with missense mutation had a raw MFI value close to the control (patient MFI: 23.70, control MFI: 35.50). Median of raw MFI was 4.95 (3.65–5.67) in patients and 26.2 (21.6–32.1) in healthy controls.

Conclusion: Flow cytometric detection of DOCK8 protein is very important for the diagnosis of DOCK8 deficiency since the deletion mutations cause almost complete loss of DOCK8 protein expression, while patients with missense mutations could have nearly normal levels of protein, and this can lead to the underestimation of the diagnosis. Therefore, flow cytometric detection is an adjunct method for the diagnosis of DOCK8 disease, and genetic analysis should be offered to all suspicious cases.

Keywords: Flow cytometer, DOCK8, mean fluorescein intensity, deletion, missense mutation

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Pediyatrik Allerji ve İmmünoloji Bilim
Dalı, İstanbul, Türkiye

Correspondence:

Safa BARIŞ
Marmara Üniversitesi Eğitim ve
Araştırma Hastanesi
Çocuk Allerji ve İmmünoloji Bilim Dalı
Fevzi Çakmak Mah. No: 41, 34890,
İstanbul, Türkiye
Tel: 0216 657 24 24 - 4736
E-posta: safabaris@hotmail.com,
sbaris@marmara.edu.tr

Received: Apr 05, 2019

Accepted: Aug 20, 2019

<https://doi.org/10.25002/tji.2019.1109>

©2019 Turkish Journal of Immunology.
All rights reserved.

Giriş

Primer immün yetersizlikler (PİY), akraba evliliğinin sık olduğu ülkelerde daha sık görülen ve 350'den fazla hastalığı barındıran genetik kökenli hastalık grubudur.^[1] Hastaların çoğunun geç tanı alması ya da tanı alamadan kaybedilmesi nedeniyle, mortalitesi yüksek olabilmektedir. Hastaların doğru tanısı ve erken tedavisi ile, yaşam kalitelerinin artması yanında hastalığa bağlı ölümlerin engellenmesi de sağlanabilecektir.^[2]

Hiper-IgE sendromu (HIES), ağırlıklı olarak deri ve akciğerlerde tekrarlayan enfeksiyonlar, kronik egzema, yüksek serum IgE düzeyi ve eozinofili ile karakterize primer immün yetersizliktir. Hiper-IgE sendromu farklı kalıtım biçimlerine sahiptir. Otozomal dominant HIES formu *signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3)* genindeki mutasyonlardan kaynaklanırken, otozomal çekinik HIES vakalarının çoğu *dedicator of cytokinesis 8 (DOCK8)* kodlayan gendeki mutasyonlardan oluşmaktadır.^[2,3] Dokuzuncu kromozom üzerinde bulunan *DOCK8* büyük bir gen olup 48 ekzona sahiptir.^[3] Çoğu olguda *DOCK8*'i etkileyen mutasyonlar büyük delesyonlar şeklinde olmaktadır. Bu da çoğu zaman protein ifadesinin tama yakın kaybolmasına neden olur.^[4] Ayrıca bu hastalarda belirlenen diğer mutasyon tipleri anlamsız (*nonsense*) mutasyon, kırılma bölgesi (*splice site*) mutasyonu ve 1–2 bazlık insersiyon mutasyonudur. Yanlış anlamlı mutasyonlar ise çok daha nadirdir.^[4] Klinik olarak hastalık tekrarlayan viral, fungal ve sinopulmoner enfeksiyonlarla karakterizedir.^[5,6] Bu hastalarda ayrıca ciddi atopik dermatit, alerji ve kanser gelişme olasılığı artmaktadır.^[7]

Bu çalışmanın amacı akan hücre ölçerin DOCK8 eksikliğini saptamadaki tanısal değerinin belirlenmesidir.

Gereç ve Yöntem

Bu çalışmaya mutasyonu tanımlanmış yedi DOCK8 hastası ve 20 sağlıklı kontrol olmak üzere 27 kişi alındı. Çalışma için Marmara Üniversitesi Hastanesi, Çocuk Allerjisi ve İmmünolojisi Bilim Dalında takip edilmekte olan hastalardan ya da ebeveynlerinden bilgilendirilmiş onam formu ve yerel etik kurulundan 09.2016.618 numara ile onay alındı. Tüm çalışmalar Marmara Üniversitesi Çocuk İmmünoloji Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi.

Hastalardan ve sağlıklı kontrollerden 4 cc heparinli tüpe periferik kan alındı ve ficol yöntemi ile periferik kan mononükleer hücreler (PKMH) izole edildi. 100 µL %1

fötal sığır serumu (FBS) içeren PBS solüsyonu (yıkama solüsyonu) içerisinde 2×10^6 hücre süspanse edildi ve PE boyalı CD3 antikoru eklenerek 15 dak oda ısısında yüzey boyaması yapıldı. İki kez yıkama solüsyonu ile yıkama sonrasında, hücre içi boyama yöntemi için fiksasyon-permeabilizasyon kiti (BD Biosciences, San Diego, ABD) üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda kullanıldı. Kısaca, hücreler 100 µL fiksasyon/permeabilizasyon solüsyonu (BD Biosciences, San Diego, ABD) içerisinde 4°C'de 20 dakika inkübe edildi. Hücrelerin iki kez perm/yıkama solüsyonu (BD Biosciences, San Diego, ABD) ile yıkanması sonrası, 100 µL perm/yıkama solüsyonu içerisinde primer antikorlar olan DOCK8 IgG1 (Santa Cruz Biyoteknoloji, Heidelberg, Almanya) ve fare IgG1 κ izotipi (Biolegend, San Diego, ABD) farklı tüplere eklendi. Hücreler 4°C'de 30 dakika bekletildi. Daha sonra perm/yıkama solüsyonu ile iki kez yıkandı ve tüplere 100 µL perm/yıkama solüsyonu içerisinde ikincil antikor olan FITC işaretli anti-fare IgG1 konuldu. Hücreler 4°C'de 30 dakika bekletildi, iki kez yıkama yapıldı ve akan hücre ölçer cihazında analiz edildi.

Analiz için BD FACS Calibur cihazı ve FlowJo yazılım programı kullanıldı (BD Biosciences, Pharmingen, San Diego, ABD). Canlı lenfositlerde CD3⁺ hücreler kapılanarak histogram görüntüleri elde edildi. DOCK8 protein ifadesi birincil antikor ile işaretli örneklerin ortalama floresan yoğunluğu (*mean fluorescence intensity* –MFI) değerlerinden (ham MFI), izotip kontrol MFI değerleri çıkarılarak, bulunan ΔMFI farkına göre hesaplandı. Deneyler farklı günlerde yapıldığı için, elde edilen ΔMFI değeri o günkü sağlıklı kontrol değerine göre normalleştirildi. Normalleştirme işlemi aşağıda belirtilen formüle göre gerçekleştirildi:

$$\text{Normalleştirme} = \frac{(\text{Hasta ham DOCK8 MFI} - \text{Hasta izotip MFI}) \times 100}{(\text{Kontrol ham DOCK8 MFI} - \text{Kontrol izotip MFI})}$$

Veriler SPSS 16 (Chicago, SPSS Inc) programı ile değerlendirildi. Niteliksel veriler yüzde ve oranlar ile belirtilirken, niceliksel veriler ortanca ve çeyrekler arası aralık (ÇAA) ile belirtildi. İstatistiksel olarak $p < 0,05$ değeri anlamlı kabul edildi.

Bulgular

Çalışmaya alınan yedi hastanın dördü kız (%57), üçü ise erkekti (%43). Hastaların güncel ortanca yaşları 12 (8–15) yıldı. Hastalarda saptanan mutasyonlar delesyon (altı

Tablo 1. Hastaların özellikleri ve mutasyon tipleri

Hasta	Yaş (Yıl)	Cinsiyet	Tanı	Mutasyon tipi
P1	15	Kadın	DOCK8	Delesyon
P2	14	Erkek	DOCK8	Delesyon
P3	12	Kadın	DOCK8	Delesyon
P4	25	Erkek	DOCK8	Delesyon
P5	4	Kadın	DOCK8	Delesyon
P6	8	Erkek	DOCK8	Delesyon
P7	9	Kadın	DOCK8	Yanlış anlamlı (Missense) mutasyon

olgu) ve yanlış anlamlı mutasyon (bir olgu) şeklindeydi (Tablo 1).

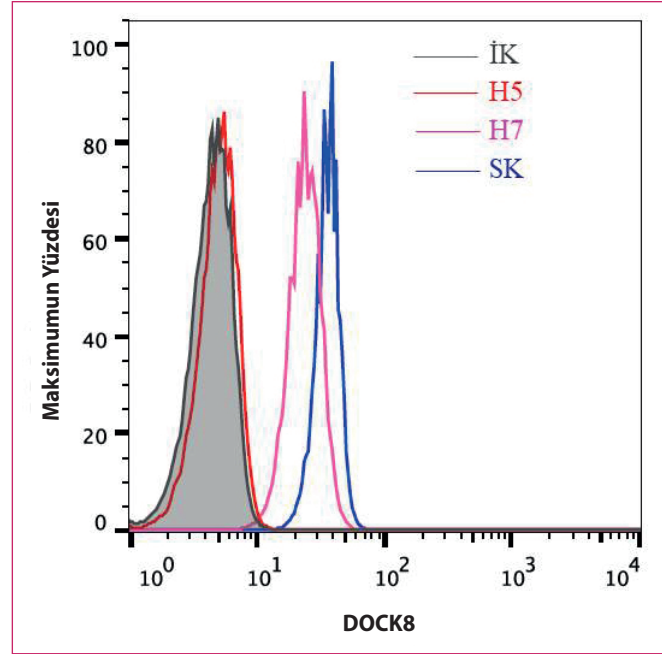
DOCK8 hastalarında akan hücre ölçer ile protein ifadesini belirlemek amacıyla eşzamanlı şekilde immün yetmezlik uyarıcı bulgusu ve kronik hastalığı olmayan 20 sağlıklı gönüllü çalışmaya dâhil edildi. Akan hücre ölçerde hücre içi DOCK8 boyaması ile farklı mutasyonlara sahip hastalar ve sağlıklı kontrollerde bu proteinin CD3⁺T hücrelerinde ifade deseni belirlendi (Şekil 1).

Tablo 2. Hastalarda ve sağlıklı kontrollerde DOCK8 protein ifadesi için ham MFI, ΔMFI ve sağlıklı kontrollere göre normalleştirilmiş ΔMFI-yüzde değerleri

	Ham MFI	ΔMFI	Kontrolle göre normalleştirilmiş ΔMFI (%)
DOCK8 olguları	5,0 (3,7-5,7)	0,3 (0-0,6)	1,0 (0-3,0)
Sağlıklı kontroller	26,2 (21,6-32,1)	22,6 (17,1-26,5)	100,0 (100,0-100,0)

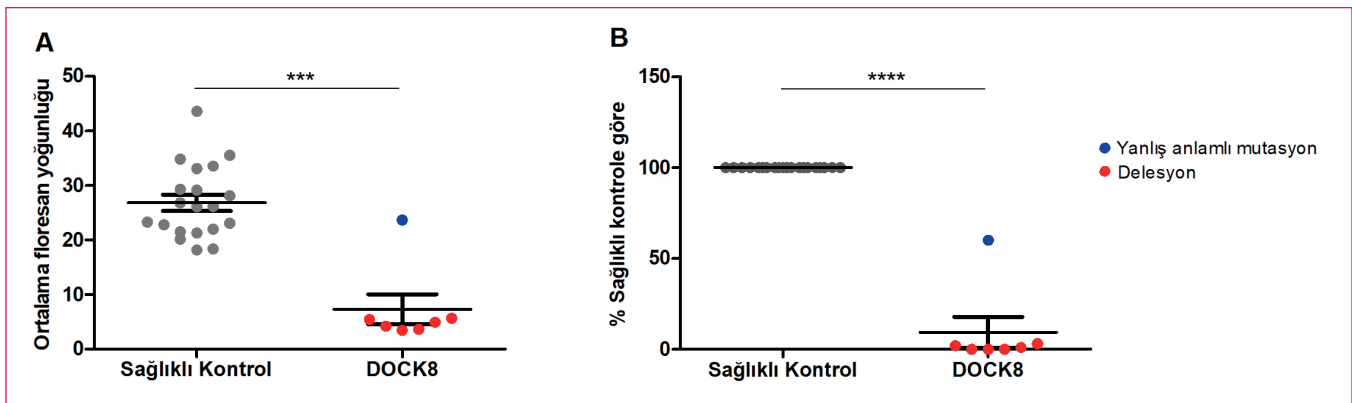
MFI, ortalama floresan yoğunluğu.

Değerler ortanca ve çeyrekler arası olarak ifade edilmiştir.



Şekil 1. Delesyon ve anlamsız mutasyon gözlenen DOCK8 hastalarının ve sağlıklı kontrolün CD3⁺ T hücrelerinde DOCK8 protein ifadesinin histogram görüntüsü (İK, izotip kontrol; H, hasta; SK, sağlıklı kontrol)

Hastalarda ve sağlıklı kontrollerde izotip kontrol ve DOCK8 antikoruna ile işaretlenen hücrelerde MFI değerleri, bunların farkından elde edilen ΔMFI değerleri ve ΔMFI değerlerinin eş zamanlı sağlıklı kontrollere göre normalleştirilmiş yüzde değerleri belirlendi (Tablo 2). Ham MFI değeri ortancası DOCK8 olgularında 4,95 (3,65-5,67) iken, sağlıklı kontrollerde 26,2 (21,6-32,1) saptandı. ΔMFI ve normalleştirilmiş ΔMFI-yüzde ortancaları ise sırasıyla olgularda 0,27 (0-0,59) ve 1 (0-3) iken, sağlıklı kontrollerde ise 22,58 (17,07-26,46) ve 100 (100-100) olarak bulundu (Tablo 2).



Şekil 2. DOCK8 protein ifadesi MFI değerlerinin DOCK8 hastaları ve sağlıklı kontroller arasında kıyaslanması. (A) Ham MFI değerleri, (B) Sağlıklı kontrollere göre normalleştirme ΔMFI-yüzde değerleri. Kırmızı: Delesyon mutasyonlu DOCK8 hastaları, Mavi: Yanlış anlamlı mutasyonlu DOCK8 hastası. MFI: ortalama floresan yoğunluğu. (***)p<0,001, (****)p<0,0001)

Elde edilen MFI değerlerinin DOCK8 olguları ve sağlıklı kontroller arasında karşılaştırılması Şekil 2'de göstermektedir. DOCK8 protein ifadesi için, ham MFI değerlerinin ($p=0,0008$) ve sağlıklı kontrollere göre Δ MFI normalleştirme yüzde değerlerinin ($p<0,0001$) sağlıklı kontrollerde DOCK8 olgularına göre anlamlı olarak yüksek olduğu bulundu (Şekil 2).

Tartışma

Dedicator of cytokinesis 8 (DOCK8) genindeki bialelik mutasyonlar, sinopulmoner enfeksiyonlar, deri ve sistemik viral enfeksiyonlar, egzema ve gıda allerjisi ile karakterize kombine bir immün yetersizlik olan otozomal çekinik hiper-IgE sendromuna neden olur. DOCK8 eksikliği enfeksiyondan erken ölüme ve maligniteye yol açabilmektedir.^[6,8] Hastalık hematopoetik hücre transplantasyonu (HHT) ile tedavi edilebilmektedir,^[9,10] bu nedenle DOCK8 eksikliğinin erken tanısı tedavi için çok önemlidir. Tanının doğrulanması rutin olarak uygulanmayan Western-blot ve gen dizilemesi tekniklerine dayanmaktadır. Günümüzde ise ön tanı olarak DOCK8 eksikliği ve taşıyıcı durumunun saptanmasını sağlayan akan hücre ölçerde DOCK8 protein ifadesi yöntemi kullanılmaktadır.^[11] Bu yöntemin oldukça maliyet etkin ve güvenilir bir tarama metodu olduğu daha önceki çalışmamızda gösterilmiştir.^[12] Bu çalışmada kliniğimizde takip edilen ve gen dizileme ile mutasyonu gösterilmiş yedi DOCK8 hastasında akan hücre ölçerde protein ifadesi belirlenerek, günümüzde kullanılan bu yöntemin tanısallığı araştırılmıştır.

Akan hücre ölçerde DOCK8 protein ifadesi heterozigot taşıyıcılar, sağlıklı bireyler ve hastalar arasında bir ifade düzeyi göstermektedir.^[11] Böylece bu yöntemle aile içerisinde patolojik varyantların araştırılması mümkündür. Ayrıca, HHT sonrası hastalarda DOCK8 ifadesinin artışı da belirlenebilmekte ve bu yöntem ile hasta takibi gerçekleştirilmektedir.^[11]

DOCK8 eksikliği hastalarının büyük çoğunluğunda protein ifadesinin çok azalmasına ya da hiç gözlenmemesine neden olan *DOCK8* geninde delesyon, kırılma bölge (*splice site*) mutasyonu veya anlamsız (*nonsense*) mutasyon gözlenmektedir.^[6,8] Yanlış anlamlı mutasyonlar ise çok nadirdir ve literatürde iki hasta rapor edilmiştir.^[4,13] Yanlış anlamlı mutasyona sahip bir hastada akan hücre ölçer ile DOCK8 protein ifadesinin az miktarda azaldığı gösterilmiştir.^[13] Çalışmamızda *DOCK8* geninde büyük

delesyon gösterilen altı olguda akan hücre ölçerde analiz sonrası protein ifadesinin neredeyse hiç olmadığı saptanmıştır. Bu durumda aile bireylerinin taranmasının da hastalığın tanısını çok kolaylaştıracağı düşünülmektedir. Fakat, genetik sekanslama ile *DOCK8* geninde yanlış anlamlı mutasyon gösterilen bir olguda, literatüre benzer olarak, protein ifadesinin izotip kontrol ile sağlıklı kontrol arasında ara fenotip olduğu belirlenmiştir. DOCK8 protein ifadesinin olduğu mutasyon tiplerinde yanlış teşhis konmaması çok önem arz etmektedir. Bu durumda, hastaların DOCK8 klinik fenotipi ile uyumlu olup olmadıkları çok iyi araştırılmalı, tanıya yol gösterebilecek tüm laboratuvar testleri yapılmalı ve bu hastalarda genetik analiz gerçekleştirilerek DOCK8 mutasyonu bulunup bulunmadığı kanıtlanmalıdır.

Sonuç olarak, literatürde günümüze kadar raporlanan ve bizim kohortumuzda bulunan DOCK8 hastalarının büyük çoğunluğunda gözlenen *DOCK8* genindeki delesyon mutasyonları, DOCK8 protein ifadesinin neredeyse yok olmasına neden olmaktadır. Bu durum, akan hücre ölçerde DOCK8 protein ifadesi yönteminin değerini artırmaktadır. Diğer mutasyon tiplerinde ise bir miktar korunmuş protein ifadesi olabileceği akılda tutulmalıdır. Tüm olgularda kesin tanı için genetik analiz yapılmalıdır.

Etik Kurul Onayı: Marmara Üniversitesi İnsan Etik Kurulu'ndan 09.2016.618 numara ile onay alındı.

Hasta Onamı: Katılımcılardan yazılı bilgilendirilmiş onam alınmıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Dış Bağımsız

Yazar Katkıları: Fikir: İÖ, EKA, AÖ, SB; Tasarım: İÖ, SB; Veri Toplama ve/veya İşlenmesi: İÖ, AK, EN, NK, GA; Analiz ve Yorum: İÖ, SB; Literatür Tarama: İÖ, SB; Yazıyı Yazan: İÖ, SB; Eleştirel İnceleme: EKA, AÖ, SB.

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

Finansal Destek: Çalışma için herhangi bir finansal destek alınmamıştır.

Kaynaklar

1. Condino-Neto A, Espinosa-Rosales FJ. Changing the lives of people with primary immunodeficiencies (PI) with early testing and diagnosis. *Front Immunol* 2018;9:1439. [CrossRef]
2. Oliveira JB, Fleisher TA. Laboratory evaluation of primary immunodeficiencies. *J Allergy Clin Immunol* 2010;125:S297–305. [CrossRef]
3. 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. [CrossRef]
4. Biggs CM, Keles S, Chatila TA. DOCK8 deficiency: Insights into pathophysiology, clinical features and management. *Clin Immunol* 2017;181:75–82. [CrossRef]
5. Renner ED, Puck JM, Holland SM, Schmitt M, Weiss M, Frosch M, et al. Autosomal recessive hyperimmunoglobulin E syndrome: a distinct disease entity. *J Pediatr* 2004;144:93–9. [CrossRef]

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. [\[CrossRef\]](#)
7. Ruiz-Garcia R, Lermo-Rojas S, Martinez-Lostao L, Mancebo E, Mora-Diaz S, Paz-Artal E, et al. A case of partial dedicator of cytokinesis 8 deficiency with altered effector phenotype and impaired CD8+ and natural killer cell cytotoxicity. *J Allergy Clin Immunol* 2014;134:218–21.e7. [\[CrossRef\]](#)
8. 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. [\[CrossRef\]](#)
9. Bittner TC, Pannicke U, Renner ED, Notheis G, Hoffmann F, Belohradsky BH, et al. Successful long-term correction of autosomal recessive hyper-IgE syndrome due to DOCK8 deficiency by hematopoietic stem cell transplantation. *Klin Padiatr* 2010;222:351–5. [\[CrossRef\]](#)
10. Al-Mousa H, Hawwari A, Alsum Z. In DOCK8 deficiency donor cell engraftment post-genoidental hematopoietic stem cell transplantation is possible without conditioning. *J Allergy Clin Immunol* 2013;131:1244–5. [\[CrossRef\]](#)
11. 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. [\[CrossRef\]](#)
12. Ogulur I, Baris S, Ozen A, Nain E, Kiykim A, Karakoc-Aydiner E. Diagnostic usage of intracellular protein staining by flow cytometer in primary immune deficiencies; Marmara experience. *Asthma Allergy Immunol* 2018;16:81–9. [\[CrossRef\]](#)
13. Keles S, Charbonnier LM, Kabaleswaran V, Reisli I, Genel F, Gulez N, et al. DOCK8 regulates STAT3 activation and promotes Th17 cell differentiation. *J Allergy Clin Immunol* 2016;138:1384–94.e2. [\[CrossRef\]](#)