

## **Hereditör Anjiyoödem ve Allerjik Hastalıklarda Genetik Tanı**

**Doç. Dr. Esra Birben (PhD)**

**Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji ABD**

**Giriş:** Allerjik hastalıklar ve astım, çocuklarda ve erişkinlerde çeşitli klinik fenotiplerde kendini gösteren; genetik ve çevresel faktörlerin etkilediği kompleks hastalıklardır.

Toplum çalışmaları kalıtılabilirlik (heritability) oranının astımda % 36-79; allerjik rinitte %33-91, atopik dermatitte ise % 71-84 arasında değiştiğini göstermiştir.

Astım ve allerjik hastalıklarla ilişkisi gösterilen genler işlevsel olarak Vercelli tarafından dört ana grupta toplanmıştır:

- 1-Doğal bağışıklık ve immünregülasyon ile ilgili genler,
- 2-TH2 farklılaşması ve efektör fonksiyonlar ile ilgili genler ,
- 3- Epitel hücre biyolojisi ve mukozal immünite ile ilgili genler,
- 4-Akciğer fonksiyonları, yeniden yapılanma (remodelling) ve hastalık şiddeti ile ilgili genler

Bugüne kadar genetik temelli araştırmalarda astım ve diğer allerjik hastalıklarla ilgili yüzlerce gen tanımlanmış olmasına rağmen bunlardan pek azındaki genetik değişiklikler tanıya yardımcı olmak veya diğer hastalıkları ekarte edebilmek için kullanılabilmektedir.

Burada Hereditör Anjiyoödem , mastositoz, hipereozinofili ve atopik dermatitte tanıya yönelik olarak yapılan genetik analizlere değinilecektir.

### **Hereditör Anjiyoödem**

Anjiyoödem damar geçirgenliğinde artış ve damar içindeki sıvının damar dışına çıkması sonucu derinin alt tabakasında, derinin altında yer alan dokuda veya mukozal membranlarda meydana gelen şişliklerdir. Anjiyoödem edinsel ve kalıtsal formları mevcuttur. Edinsel anjiyoödem (EAÖ) klinik olarak HAÖ'ye benzer. Aile hikayesi yoktur, genellikle 40 yaşından sonra ortaya çıkar. Hereditör anjiyoödem (HAÖ) deri, solunum sistemi, gastrointestinal sistem gibi vücudun birçok yerinde subkutan ve submukozal ödemle karakterize, nadir bir hastalıktır. Ürtiker olmadan görülen ve tekrarlayan anjiyoödemde, eğer tekrarlayan ve nedeni açıklanamayan karın ağrıları da varsa hereditör anjiyoödem (HAE)'den şüphelenilmelidir. HAÖ'in tanınması ve tedavisi potansiyel morbidite ve mortalite nedeniyle önemlidir. Hastalığa tanı koymak özellikle larinks ödemi gelişen vakalarda hayat kurtarıcıdır. HAÖ üç gruba ayrılır :

C1INH eksikliğine bağlı HAÖ:

**1-HAÖ-1 (Tip I):** Antijenik ve fonksiyonel C1INH seviyelerinde düşüklük ile karakterizedir. Hastaların büyük çoğunluğu (%80-85) bu grupta yer alır.

**2-HAÖ-2 (Tip II):** C1INH disfonksiyonuna bağlıdır, antijenik seviyeler normal (veya yüksek) ancak fonksiyonel seviyeler düşüktür. Hastaların %15-20'si bu gruptadır.

**3- HAÖ- Tip III:** C1INH'in antijenik ve fonksiyonel seviyelerinin normal veya normale yakın olduğu HAÖ (Tip III): Faktör XII (FXII) geninde mutasyonun görüldüğü veya nedeni bilinmeyen olarak iki alt gruba ayrılır. FXII gen mutasyonu bazı ailelerde tanımlanmakla birlikte patofizyolojisi aydınlatılamamıştır.

### **Laboratuvar Tanısı**

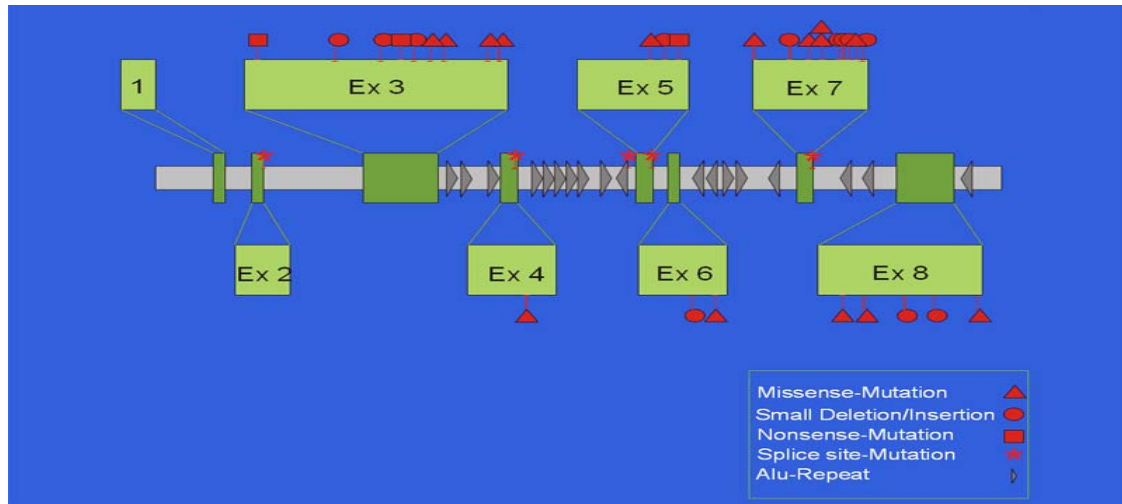
Serum C4, C1INH protein ve C1INH fonksiyonel aktivite ölçümü HAÖ tanısında kullanılan esas testlerdir. C1INH antijenik seviyesi HAÖ-1 düşük, HAÖ-2’de normaldir. Fonksiyonel aktivite HAÖ-1 ve 2 ile düşük bulunur. HAÖ 3 ‘ de ise her ikisi de normaldir.

Tablo 1: Anjiyoödem genetiği ve laboratuvar bulguları

Sendrom	Kalıtım Modeli	Patofizyoloji	C4 Konsantrasyonu	C1-INH Konsantrasyonu	C1-INH Fonksiyonu
Tip I HAÖ	Otozomal Dominant Yüksek penetrans	SERPING1 geninde C1 inhibitör eksikliğine neden olan mutasyonlar	Düşük	Düşük	Düşük
Tip II HAÖ	Otozomal Dominant Yüksek penetrans	SERPING1 geninde fonksiyonel C1 inhibitör eksikliğine neden olan mutasyonlar	Düşük	Normal/Yüksek	Düşük
Tip III HAÖ	Otozomal Dominant Değişken penetrans	F12, plazminojen ve anjiopietin genindeki mutasyonlar	Normal	Normal	Normal

### HAÖ’de Rol Alan Genetik Mekanizmalar

**HAÖ Tip I ve II:** C1-INH 11. kromozomda yer alan ve 8 ekzondan oluşan SERPING1 geninden kodlanır ve serin proteaz inhibitörleri ailesine aittir. İnhibitörün aminoasit sekansını değiştiren mutasyonlar kalıcı eksiklikle sonuçlanır. Bugüne kadar SERPING1 geninde 450’ den fazla mutasyon tanımlanmıştır. Bu mutasyonlar 5,6 ve 8. ekzonlarda yoğunluk gösterse de tüm gene yayılmıştır. Mutasyonların 34 %’ü missens, 31 %’i frameshift ve küçük insersiyon-delesyonlar, 17 % si gende yeniden yapılanmaya neden olan büyük delesyonlar, 10 %’u splay-bölge defektleri, 7 %’si nonsens mutasyonlar ve 1 %’i ise regülör bölge mutasyonlarıdır (Şekil 1). C1INH genindeki mutasyonlar protein ürününün sentezini engelleyebilir (Tip I HAÖ) ya da fonksiyonu bozuk olan protein sentezine (Tip II HAÖ) neden olur.

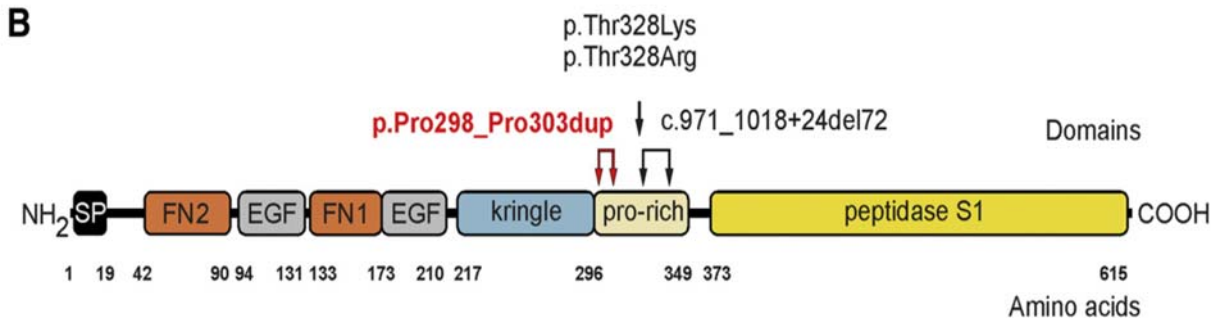


Şekil 1. SERPING1 Geninin yapısı ve mutasyonların dağılımı.

### HAÖ TİP III :

#### FXII Mutasyonları

İlk kez 2006 yılında Bork ve arkadaşları tarafından FXII geninin 9. Ekzonunda 2 farklı missense mutasyon tanımlanmıştır; c.983 CNA (p.Thr328Lys) ve c.983 CNG (p.Thr328Arg) (Dewald G, Bork K. 2006, Bork K. Et al., 2009). Bu mutasyonlar daha sonra İspanyol ve Fransız Tip III HAÖ vakalarında da gösterilmiştir. 2011 yılında aynı ekzonda bir Türk ailede yeni bir delesyon olan c.971\_1018+24del72 değişimi saptanmıştır (Bork K, et al., 2011). 2013'te tekrarlayan anjioödemleri olan bir hastada FXII 9. ekzonda prolinden zengin bölgede dublikasyon (p.Pro298\_Pro303dup) tanımlanmıştır (Kiss N, 2013). Şekil 2'de mutasyonlar toplu olarak gösterilmiştir.

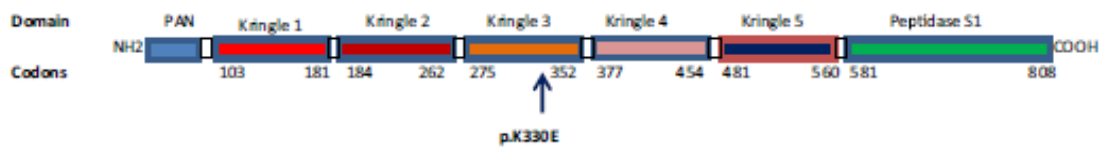


**Şekil 2.** Tip III HAÖde tanımlanmış FXII mutasyonları

Tip III HAÖde FXII mutasyonlarının “gain-of-function” mutasyon olduğu düşünülür. Artmış FXII biyoaktivitesi prekallikreinden artmış kallikrein yapımına ve pozitif “feedback” ile daha fazla artmış FXII aktivitesine yol açar. Aktive FXII, yüksek molekül ağırlıklı kininojenden güçlü vazodilatör olan bradikinin sentezini sağlar ve klinikte anjioödem görülür.

#### Plazminojen Geni Mutasyonu

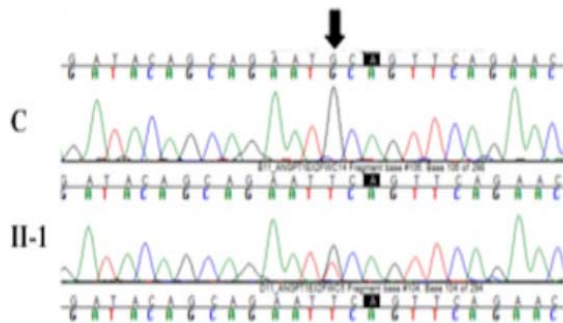
F 12 genindeki mutasyonların tip III hastaların sadece %25’inde görülmesi nedeni ile bu hastalarda yeni bir gen bulmak için F12 mutasyonu taşımayan ve HAEnCI olan 7 ailede yeni nesil dizileme (next-generation sequencing) tekniği kullanılarak tüm ekzom dizileme ile genom taraması yapılmış ve bu 7 aileden 4’üne ait 14 hastada Plazminojen geninin 9. ekzonunda, mRNA da c.9886A>G değişimi heterozigot olarak tespit edilmiştir (Bork et al., 2017). Plazminojen geninin 9. Ekzonunda yer alan bu değişim protein yapısında kringle 3 domaininde yer alan p.Lys330Glu (K330E) değişimine neden olmaktadır (Şekil 3). Aile bireylerinin incelenmesi sonucunda mutasyonun otozomal dominant olarak kalıtıldığı belirlenmiştir. Ayrıca akraba olmayan 38 indeks hasta bireyin PCR-DNA dizi analizi ile taranması sonucunda da 9 ‘unda bu yeni mutasyon tespit edilmiştir.



**Şekil 3.** Plazminojen protein yapısı ve mutasyonun lokalizasyonu.

## Anjiopoietin Geni Mutasyonu

Bafunno ve arkadaşları genetik nedeni bilinmeyen İtalyan HAÖ hastalarında yaptıkları ve akraba olmayan 10 aileye ait 25 birey ve 22 indeks vakayı dahil ettikleri çalışma sonucunda Anjiopietin 1 geninde yer alan c.807G>T, p.A119S mutasyonunun hastalıkla ilişkili olduğunu göstermişlerdir. Hastaların plazmasının protein analizi sonucunda, multimerik formların azaldığını ve ANGPT1 p.A119S varyantının doğal reseptör tunika interna endotel hücre kinazının 2 (TIE2) bağlanma kabiliyetinin azaldığını gösterilmiştir. ANGPT1'in bradikinin ile indüklenen plazma sızıntısını azalttığı gösterilmiştir; bu nedenle araştırmacılar ANGPT1 mutant p.A119S'nin reseptörü ile bağlanması azaldığından endotel geçirgenliğinde artışa, böylece diğer HAE'lerde olduğu gibi bradikinin aracılığını tekrarlayan anjiyoödemlere neden olduğunu öne sürmüşlerdir.



**Şekil 4.** *ANGPT1* A119S değişiminin DNA dizi analizi ile gösterilmesi.

## Mastositozis ve c-Kit Mutasyonu

Mastositöz mast hücrelerinin anormal proliferasyonu ve dokuları infiltrate etmesi ile karakterize bir hastalıktır. Çocukluk çağındaki hastaların yaklaşık %80'inde hayatın ilk bir yılında ortaya çıkmakta ve sıklıkla deride sınırlı olmaktadır. Çocuklarda prognozu iyi seyretmekte ve çoğunlukla adolesanda gerilemektedir. Aksine erişkinlerde kemik iliği tutulumu görülmekte ve persistan bir seyir izlemektedir. Erişkinlerde sistemik mastositöz daha sık rastlanmaktadır. Erişkinlerde görülen mastositöz vakalarının %80' den fazlasında c-Kit geninde mutasyona rastlanmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda c-KIT genin yanı sıra TET2, SRSF2, ASXL1, RUNX1, JAK2, ve/veya RAS genindeki mutasyonların da mastositöz ilişkili olduğu bildirilmiştir. En sık görülen mutasyon ise c-KIT D816V mutasyonudur. Diğer daha az sık görülen mutasyonlar, reseptörün hücre dışı veya transmembran kısımlarını kodlayan ekzonlar 2, 8, 9 ve 10'u veya kinaz kısmını kodlayan ekzonlar 13, 14 ve 17'yi etkiler. Bu atipik mutasyonlar çocuklukta başlayan kutanöz mastositöz veya ileri sistemik hastalıklarda tanımlanmıştır.

Mastositoz mutasyonlarının çoğu, mast hücre progenitörlerini etkileyen somatik mutasyonlardır ve germ hücrelerinde bulunmaz. Mast hücreleri dokularda bulunduğu ve normal şartlar altında periferik dolaşımda mast hücreleri olmadığından, c-kit mutasyonları için periferik kan analizi düşük pozitif sonuç verimine sahiptir. Mutasyonun kemik iliği ve cilt gibi lezyonlu dokularda tespit edilebilmesi daha olasıdır. Mutasyon tespitinin hassasiyeti ayrıca kullanılan tekniğe de bağlıdır. D816V c-kit mutasyonu, genin mutasyona uğramış bölgesinin PCR amplifikasyonu, DNA dizi analizi veya RFLP analizi, alel spesifik PCR, peptit-nükleik asit aracılı PCR hibridizasyon problemleri ile bağlama ve tek hücre PCR'ı ile tespit edilebilmektedir. Bu teknikler arasında dizileme en az hassastır ve bu nedenle rutin bir tarama yöntemi

olarak önerilmez. Bir parça daha hassas olan RFLP analizi, kolaylığı ve düşük maliyeti nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır. Lezyonlu dokudan ekstrakte edilen RNA'nın RT-PCR ile analizi (kemik iliği mononükleer hücreleri gibi), yukarıda belirtilen uygulamalarda genomik DNA kullanılmasından daha hassastır.

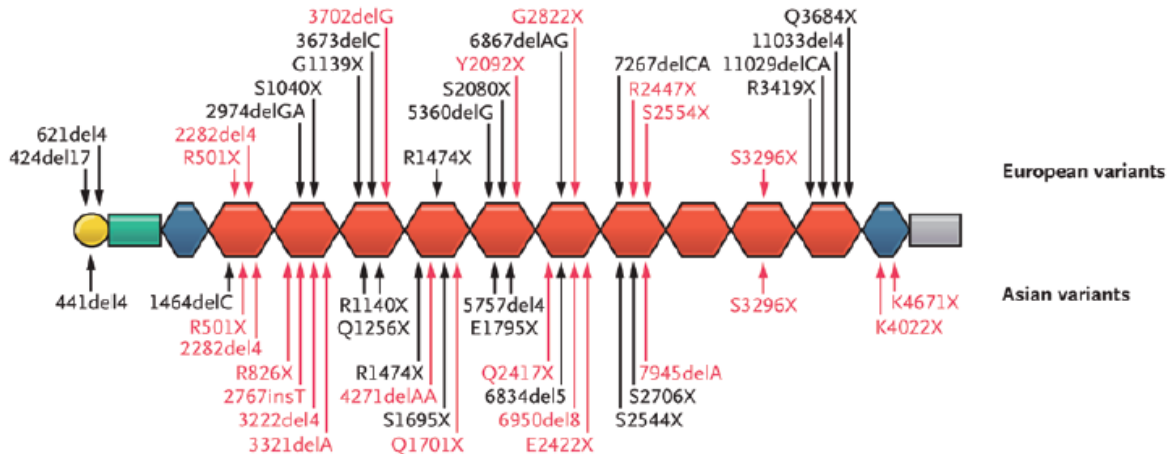
### Hiper Eozinofili

Eozinofiller bağışıklık sistemimizin elemanlarından biridir ve alerjik reaksiyonların gelişmesinde çok önemli rol oynarlar. Bu hastaların kanlarında eozinofil sayıları oldukça yüksektir ( $>1500/\text{mm}^3$ ). Hipereozinofilik sendrom tanısının konulmadan önce eozinofili yapacak nedenlerin araştırılması gereklidir. Bunlardan birisi de PDGFRA füzyon geninin varlığında eozinofilinin eşlik ettiği myeloproliferatif neoplazmlardır. 4. kromozomda (4q12) mikrolezyon sonucu ortaya çıkan FIPL1-PDGFR gen füzyonu sonucu olarak PDGFRA proteinini kodlayan gende yeniden düzenlenmeye bağlı eozinofilik bozukluklar ortaya çıkar. Bu mutasyonun teşhisi için hastalardan kanda eozinofilisi yüksek olduğu dönemde priferal kan örneklerinden hücreler göstermek için FIPL1-PDGFR genlerine ait primerler aracılığı ile füzyon gen bölgesi çoğaltılır. Amplifikasyon sonucu PCR bandının eldesi mutasyonun varlığını belirtmektedir. Pozitif kontrol olarak mutasyonu taşıyan EOL-1 hücre hattı kullanılır.

### Atopik Dermatit ve Filaggrin Geni Bozuklukları

Atopik dermatit (AD) genetik olarak yatkın olan kişilerde epitelyal bariyerin bozulması ve buna bağlı olarak immün disregülasyon sonucu gelişen kronik ve tekrarlayan oldukça pürütik bir deri hastalığıdır. AD genellikle çocukluk çağında gelişen ve çoğunlukla IgE yüksekliği, eozinofili ve diğer alerjik hastalıklarla ilişkili bir hastalıktır.

Filaggrin geni adını "filament-aggregating protein," den alır ve keratin filamentlerine bağlanır ve stratum korneumdaki diğer yapıların bağlanması için iskelet yapısını oluşturur. Profilaggrin  $>400\text{KD}$ , oldukça fosforile ve histidine zengin bir proteindir. Oldukça yüksek homoloji gösteren 10-12 tandem monomerden oluşuyor. Filaggrin geninde oldukça fazla sayıda tanımlanmış mutasyon vardır (Şekil 5). Filaggrin geninde fonksiyon kaybına neden olan null mutasyonlardan R501X ve 2282del4 mutasyonları atopik dermatit için en fazla tekrar edilmiş olan genetik risk faktörüdür.



Şekil 5. Filaggrin genindeki mutasyonların dağılımı

## **Netherton Sendromu ve SPINK5 geni mutasyonu**

NS hastalarında SPINK5 geninde bugüne kadar 70 mutasyon saptanmıştır. SPINK5 geni oldukça polimorfik bir genidir. Bunlar arasında E420K çeşitli çalışmalarda atopik dermatit ile ilişkili bulunmuştur ve bu mutasyonun LEKTI'nin proteolitik olarak kesiminde ve aktivitesinde etkili olduğu gösterilmiştir. Bu mutasyonun tespiti için PCR-RFLP tekniği kullanılmaktadır. PCR ile çoğaltılan gen bölgesinin Hin f I enzimi ile kesimi sonucunda mutant allelin varlığı tespit edilmektedir.

## **Kaynaklar :**

- [1] Bork K, Wulff K, Meinke P, Wagner N, Hardt J, Witzke G. 2011. A novel mutation in the coagulation factor 12 gene in subjects with hereditary angioedema and normal C1-inhibitor. Clin Immunol,141:31–35.
- [2] Bork K, Wulff K., Hardt J., Witzke G., Staubach P.. 2009. Hereditary angioedema caused by missense mutations in the factor XII gene: clinical features, trigger factors, and therapy, J. Allergy Clin. Immunol. 124 129–134.
- [3] Dewald G, Bork K. 2006. Missense mutations in the coagulation factor XII (Hageman factor) gene in hereditary angioedema with normal C1 inhibitor. Biochem Biophys Res Commun 343:1286–1289
- [4] Farkas H. 2010. Pediatric hereditary angioedema due to C1-inhibitor deficiency. Allergy Asthma Clin Immunol.6:18.
- [5] Kiss N, Barabas E, Varnai K, Halasz A, Varga LA, Prohaszka Z et al. 2013. Novel duplication in the F12 gene in a patient with recurrent angioedema. Clin Immunol,149:142–145.
- [6] Bork K, Wulff K, Steinmüller-Magin L, Braenne I, Staubach-Renz P, Witzke G, Hardt J. Hereditary angioedema with a mutation in the plasminogen gene. Allergy. 2017 Aug 10. doi: 10.1111/all.13270.
- [7] Akin C. Molecular diagnosis of mast cell disorders: a paper from the 2005 William Beaumont Hospital Symposium on Molecular Pathology. J Mol Diagn. 2006;8(4):412-9. Review.
- [8] Loules G, Kalala F, Giannakoulas N, Papadakis E, Matsouka P, Speletas M. FIP1L1-PDGFRα molecular analysis in the differential diagnosis of eosinophilia. BMC Blood Disord. 2009; 2;9:1.
- [9] O'Regan GM, Sandilands A, McLean WHI, Irvine AD. Filaggrin in atopic dermatitis. J Allergy Clin Immunol. 2008;122(4):689-693.
- [10] Fortugno P, Furio L, Teson M, Berretti M, El Hachem M, Zambruno G, Hovnanian A, D'Alessio M. The 420K LEKTI variant alters LEKTI proteolytic activation and results in protease deregulation: implications for atopic dermatitis. Hum Mol Genet. 2012;21(19):4187-200.
- [11] Liu Q, Xia Y, Zhang W, Li J, Wang P, Li H, Wei C, Gong Y. A functional polymorphism in the SPINK5 gene is associated with asthma in a Chinese Han Population. BMC Med Genet. 2009;10:59.