

Primer İmmün Yetersizliklerde Western Blot Yönteminin Önemi: İki Aile Olgusundan Örnekler

The significance of Western Blot in Primary Immunodeficiencies: Examples from two families

Sevil Oskay Halaçlı¹ , Deniz Çağdaş² , F. İlhan Tezcan² 

Öz

Giriş: Nadir genetik hastalıklar olarak ele alınan primer immün yetersizlikler (PİY), klinik spektrumu geniş, tanı ve tedavisi zor olan bir hastalık grubudur. Yeni nesil dizileme yöntemlerinin kullanımı ile birlikte, 300'den fazla gen PİY hastalığı ile ilişkilendirilmiştir ve PİY ilişkili yeni genler saptanmaya devam etmektedir. Ancak yeni nesil dizileme çalışmalarından elde edilen varyantlar her ne kadar kapsama alanı (coverage) yüksek, çeşitli veri bankalarında hastalık ilişkili olarak değerlendirilse de yeni varyantların hastalığın patojenik etmeni olup olmadığının değerlendirilmesinde protein ifadesinin araştırılması önem taşımaktadır. Western blot yöntemi, moleküler biyolojide hücre içi, hücre dışı proteinlerin dışsal uyaranlara karşı verdiği yanıtların araştırılmasında, protein ifadesinin var-yok, artmış-azalmış olarak değerlendirilmesinde, hücre spesifik protein izoformlarının belirlenmesinde ve özellikle genetik hastalıkların ortaya çıkışından sorumlu etkenlerden biri olan güdük proteinlerin belirlenmesinde kullanılan eski ve güvenilir bir yöntemdir. PİY hastalıklarından bilinen klinik fenotipin tanısında ve yeni bulunan varyantların hastalık ile ilişkisinin belirlenmesinde de kullanılabilir güvenilir bir araçtır.

Gereç ve Yöntemler: Bu çalışmada kliniğimizde takip edilen PİY hastalarında STK4 varyantları tespit edilen 2 aileden 3 hasta ve ebeveynlerinde, LRBA varyantı tespit edilen 1 hasta ve kardeşinde, STK4 ve LRBA protein ifadeleri western blot yöntemi ile değerlendirilmiştir.

Bulgular: Hasta bireylerde protein ifadelerinin olmadığı belirlendi.

Sonuç: Western blot ile protein ifadeleri araştırılan hastalardaki yeni varyantların hastalıkla ilişkili patojenik varyantlar olduğu tespit edildi.

Anahtar Kelimeler: protein ifadesi, western blot, patojenik varyant

Abstract

Introduction: Primary immunodeficiencies (PID) with extended clinical spectrum, evaluated in rare genetic disorders, are difficult to diagnose and treat. Utilization of the next generation sequencing more than 300 genes have been associated with PIDs and new genes are continued to be determined. Even though, variants identified by the next generation sequencing are described as pathogenic in silico, investigating their possible pathogenic roles by analysing protein expression is crucial in patients. Western blot method is an old and reliable method used in molecular biology to investigate the responses of intracellular and extracellular proteins to exogenous stimuli and evaluate protein expression as existing or lost, increased or decreased as well as determining cell-specific protein isoforms, and in particular truncated proteins responsible for occurrence of a disease.

Material and Methods: In this study, STK4 and LRBA protein expressions were evaluated with western blot in three patients from two families having STK4 variants and one patient having LRBA variant from a family.

Results: It was determined that protein expression was lost in patients.

Conclusions: New variants were evaluated as pathogenic due to lose of protein expressions in patients.

Keywords: protein expression, western blot, pathogenic variant

¹ Hacettepe Üniversitesi, Çocuk Sağlığı Enstitüsü, Pediatrik Temel Bilimler Anabilim Dalı, Pediatrik İmmünoloji Bilim Dalı, Ankara

² Hacettepe Üniversitesi, Çocuk Hastalıkları Anabilim Dalı, Pediatrik İmmünoloji Bilim Dalı, Ankara

Correspondence:

Sevil Oskay Halaçlı
Hacettepe Üniversitesi, Çocuk Sağlığı Enstitüsü, Pediatrik Temel Bilimler Anabilim Dalı, Pediatrik İmmünoloji Bilim Dalı, Ankara

E-mail: seviloskay@gmail.com

Received: Sep 27, 2019

Accepted: Dec 25, 2019

<https://doi.org/10.25002/tji.2019.1178>

©2019 Turkish Journal of Immunology. All rights reserved.

Giriş

İmmün blotlama (immunoblotting) elektriksel ortamda jel üzerinde göç ettirilen ve fraksiyonlarına ayrılan protein veya nükleik asitlerin bir tabakaya aktarıldıktan sonra özgül olarak belirlenmesine dayanan bir protein tespit metodudur. 1979 yılında ilk kez Towbin ve ark. tarafından geliştirilmiş, poliakrilamid jel elektroforez (PAGE) yardımı ile proteinler elektroforetik olarak ayrılarak nitroselüloz bir membrana transfer edilmiştir.^[1] Daha sonra Burnette WN., Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) içeren bir PAGE hazırlamış ve

jelde proteinlerin negatif elektrik yükü ile yüklenmesini sağlayarak büyüklüklerine göre ayrılmasını sağlamıştır ve yöntem DNA parçacıklarının analizinde kullanılan Southern Blot ve ardından RNA parçacıklarının analizinde kullanılan Northern Blot yöntemlerinden yola çıkarak Western Blot adını vermiştir.^[2] Bundan sonra yöntem SDS-PAGE, Western blot olarak anılmaya başlanmış ve moleküler biyoloji araştırmalarından klinik uygulamalara kadar birçok alanda protein tayininde güçlü bir teknik haline gelmiştir. Bugün bu yöntem, proteinin tanımlanması, miktar tayini ve proteinin büyüklüğünü belirlemek amacıyla kullanılmaktadır.^[3]

Hücre ve moleküler biyoloji alanında tanımlandığı günden beri oldukça sık kullanılmaktadır. Örneğin hücre sinyal yollarının araştırılmasında, büyüme faktörü ilişkili etkilerin hücre sinyali üzerine etkilerinin araştırılmasında çok sayıda çalışma buna örnek olarak verilebilir.^[4] Bunun yanı sıra, yöntem klinik uygulamalarda da yerini almıştır. Örneğin HIV-1 virüsünün kanda ELISA yöntemi ile tayininde ortaya çıkan yalancı pozitiflik durumlarında 'Western blot' yöntemine başvurulmuştur.^[4] Çünkü bu yöntemde monoklonal antikorlar ile hedef protein işaretlenmekte, bu durum yalancı pozitiflik olmaksızın hastalığa kesin sonuç verilebilmektedir. Böylece Western blot doğrulayıcı bir deneysel metod olarak kullanılmaktadır.^[4] Ayrıca, otoimmünite ve allerjide de Western Blot uygulamaları doğru ve hassas çalışması bakımından tercih edilmiştir. Örnek olarak, sistemik lupus eritematozis (SLE) hastalığında nükleer antijen, düz kas antijeni ve DNA'ya karşı üretilen antikorlar Western blot ile daha özgül olarak tespit edilebilmiştir.^[5] Düşük serum düzeylerine rağmen antijen spesifik immünglobulin E (IgE) analizinin gerçekleştirilmesinde de bu yöntem kullanılmıştır.^[6]

Bir serin treoinin kinaz olan STK4'ün eksikliğinde kombine immün yetmezlik ortaya çıkmaktadır. STK4 eksikliği literatürde çok nadir bildirilmiştir. Bu hastalardan ikisi bölümümüzden bildirilmiş ve homozigot haritalaması ve sanger sekanslama sonucu hastalıkla ilişkili olası yeni mutasyon belirlenmesinin ardından protein ifadesinin araştırılması ile, genotip-fenotip ilişkisinin kurulması gerçekleştirilebilmiştir. STK4 eksikliğinde ilişkili yeni varyantın ve bunun sonucunda ortaya çıkan protein ürününün ifadesinin araştırılmasında ve olası güdük protein tayininde western blot yönteminin kullanılması genotip-fenotip ilişkisinin kurulması klinik tanının konulmasında önem taşımaktadır.

LRBA eksikliği, tekrarlayan solunum yolu enfeksiyonları, hipogamaglobulinemi ve mutasyonun etkilediği protein bölgesine göre hafif formlu otoimmüniteden ağır formlu çoklu otoimmüniteye uzanan bir hastalıktır. LRBA eksikliğinin etkilediği organ sistemlerinin hastalıkları ile ilgili farkındalığın artması (örneğin gastrointestinal sistem ile ilgili olan enflamatuvar barsak hastalıkları) hastalığın sıklığının bilinenden daha fazla olduğunu düşündürmektedir. Bu nedenle oldukça büyük bir gen olan LRBA ile ilişkili yeni varyantların belirlenmesi, eksikliği ile ilişkili protein ürünü aracılı klinik fenotipin ortaya koyulması bakımından önemlidir. Western Blot, yeni varyant ilişkili protein ifadelerinin belirlenmesinde önem taşımaktadır.

Bu çalışmada, klinik fenotipleri STK4 ve LRBA eksiklikleri ile uyumlu hastalarda sırasıyla STK4 ve LRBA proteinlerinin, Western blot yöntemi ile değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntemler

Cell Lysing Buffer 10X, (CST), Quick-start Protein Protein Assay, PVDF membran (Bio-Rad), Anti-STK4 antikor (CST), Anti-LRBA antikor, Anti rabbit HRP-konjüge sekonder antikor, West femto kemilüminesan kit

Hasta ve kontrol bireylerinden EDTA'lı tüpe alınan 3–4 mL kandan yoğunluk gradiyent yöntemine göre periferik kan mononükleer hücreleri ayrıldı. Ardından yeni bir tüpe alınan hücreler soğuk fosfat tampon tuzu (PBS) çözeltisi ile yıkanıp tekrar santrifüj edildi. Yıkanan hücreler 1X hücre lizis tamponu ile soğuk ortamda muamele edilip, +4°C, 14,000 rpm, 15 dk santrifüj edildikten sonra, elde edilen protein ekstraktı temiz bir tüpe alındı. Protein örnekleri protein yürütme tamponu ile karıştırılıp, lineerize edildikten sonra %6 toparlayıcı, %9 ayırıcı jelde 60 Voltta 2 saat yürütüldü. STK4 proteini için yarı kuru transfer sistemi, LRBA için ıslak transfer yöntemi (100 Volt, 2 saat) kullanıldı. Transfer sonrası membran %5 oranında BSA içeren TBS-T (Tris Buffer Saline-Tween 20 (1/1000)) ile 1 saat muamele edildi. Primer antikorla 1 gece soğuk ortamda muamele, ertesi gün sekonder antikorla oda ısısında 1 saat inkübasyonun ardından membran ECL kemilüminesan görüntüleme kiti ile 5 dk muamele edilerek soğutmalı kameraya sahip olan görüntüleme sisteminde görüntülendi.

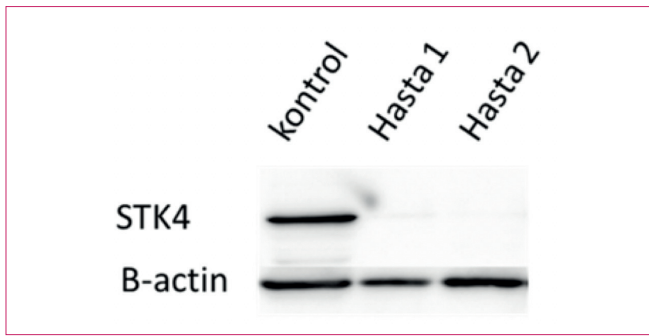
Bulgular

STK4 protein ifadesi

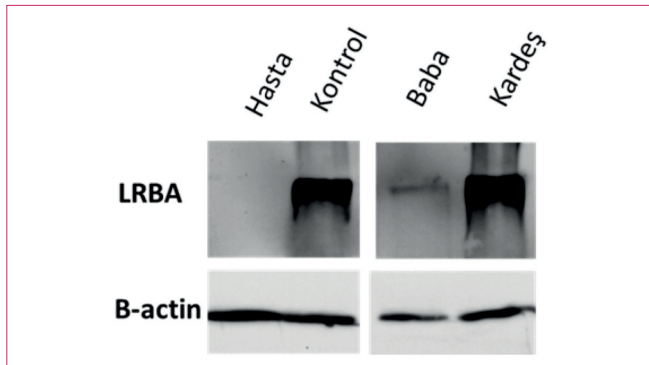
Homozigotluk haritalandırma yöntemi ile STK4 genini içeren alanda homozigot alanlar tespit edilmiş, bu nedenle hastalarda Sanger sekanslama yöntemi ile STK4 geninde bir mutasyon tespit edilemedi. STK4 geni tarafından kodlanan STK4 proteini Western blot yöntemi ile değerlendirildiğinde ve mutasyona sahip iki hasta kardeşte STK4 protein ifadesinin olmadığı görüldü (Şekil 1).

LRBA protein ifadesi

Indel mutasyon, erken stop kodona neden olduğu için güdük protein oluşturabileceği düşünülerek LRBA protein ifadesi Western blot yöntemi ile incelendiğinde, sağlıklı kontrol ile mutasyonu bulunmayan hastanın ablasında protein ifadeleri normal düzeyde görülürken, mutasyonun heterozigot taşıyıcısı olan babada protein ifadesi yarı yarıya düşük bulunmuş, hastada ise LRBA proteini gözlenmedi. Hem babada hem de hasta çocukta güdük bir protein gözlenmemiş olup mutasyonun protein ifade kaybına neden olan bir mutasyon olduğu görüldü (Şekil 2).



Şekil 1. İki hasta kardeşte ve bir sağlıklı kontrol bireyinde STK4 proteini ifadesi



Şekil 2. Sağlıklı kontrol, baba, kardeş ve hasta çocukta LRBA proteini ifadeleri

Tartışma

Günümüzde yeni nesil dizileme yöntemlerinin ve klinikte uygulamalarının artmasıyla birlikte hastalık ilişkili yeni genlerin sayısı gün geçtikçe artmaktadır.^[7] Yeni nesil dizileme sonucunda birçok patojenik varyant saptanabilmekte ancak bu mutasyonların hastalıkla ilişkili olup olmadığının belirlenmesi birkaç önemli basamağı içermektedir.^[8] Günümüzde kullanılan yeni nesil dizileme ile elde edilen daha önce tanımlanmayan farklı gen varyantlarının Sanger dizileme yöntemi ile doğrulanması, ailesel olup olmadığının saptanması, o toplumdaki sıklığının belirlenmesi, DNA dizisi üzerinde hangi bölgede olduğunun belirlenerek mRNA sentezi ve/veya protein sentezi üzerine etkisinin olup olmadığının deneysel olarak gösterimi gerekebilmektedir.^[9-11] Varyasyonun mRNA ve/veya protein sentezini negatif yönde etkilemesi hastalıkla gen ilişkisini ispatlamaktadır.^[11-15] Çünkü işlevi gerçekleştirecek mRNA ve bunun sonucunda proteinin hücrede bulunmayışı, o gen ürünü proteinin eksikliğine yol açacak, dolayısıyla o protein ilişkili bir hastalığa yol açacaktır. Bu nedenle öncelikli olarak mRNA ve protein eksikliğinin laboratuvarında gösterilmesi hastalıkla ilişkinin belirlenmesinin temelini oluşturmaktadır. Bununla birlikte saptanan varyantın protein ifade düzeyine etki etmeksizin fonksiyonel bozukluğa yol açması da muhtemel sonuçlardan biridir. Bu durumda protein ifadesinin western blot veya diğer tekniklerle gösterimi, bu proteinin hastalık etmeni olması durumunu ortadan kaldırmaz. Bu durumda, proteinin fonksiyonunu uygun yöntemlerle araştırmak gereklidir. Örneğin, ilgili protein bir transkripsiyon faktörü ise hedef genlerin ifadelerini gösteren eş-zamanlı PCR, dual lusiferaz raportör gen incelemesi gibi yöntemler ya da sinyalden sorumlu bir kinaz ise aşağı yöndeki protein düzeyleri yine western blot yöntemi ile incelenebilir.

Primer immün yetersizliklerin tanısında akan hücre ölçer yöntemi en önemli ve pratik araçlardan biridir.^[16] Ancak ticari olarak satılan antikorların, tespit edilen yeni gen ürünleri olan proteinler için monoklonal antikor bulunamamakta, bulunsa bile spesifik laboratuvar yöntemi için kullanımı her zaman uygun olmamaktadır. Ticari olarak üretilen bazı antikorlar sadece lineer protein üzerindeki lineer epitoplara tanımaktadır. Proteinlerin lineer epitoplarını tanıyan antikor yelpazesi ise oldukça geniştir. Western blot yönteminde çalışılacak olan proteinler lineer hale getirildikten ve negatif yükle yüklendikten sonra büyüklüklerine göre ayrılırlar.^[2] PİY'de en çok kullanılan yöntemlerden biri olan akan hücre ölçer yönteminde ise

Tablo 1. Western blot yönteminin PİY tanısında kullanılan diğer yöntemlerle karşılaştırılması

| Avantaj/dezavantaj | Western Blot | Akan hücre ölçer | İmmüsitokimya |
|------------------------------------|------------------|----------------------------------------------|------------------|
| Kantitatif | + | + | -/semikantitatif |
| Güçük protein tayini | + | - | |
| Çalışma süresi | Genellikle 2 gün | Proteinin hücredeki yerleşimine göre ½-1 gün | ½-1 gün |
| Uygulamadaki güçlük | +++ | + | ++ |
| Saklanan örneklerde çalışma | +++ | Genellikle taze örnek | +++ |
| Spesifik hücrelerde protein tayini | - | +++ | + |

antikorların 3 boyutlu antijenik determinanta bağlanması gerekmektedir. Bu nedenle WB için kullanılan ticari antikolar kimi zaman akan hücre ölçer yöntemi için kullanıma uygun olmamaktadır ve bu nedenle çalışmayı kısıtlamaktadır. PİY ilişkili olduğu düşünülen yeni gen ilişkili protein ürününün spesifik antikolar kullanılarak western blot yöntemi ile tespiti, spesifik proteinin hassas bir şekilde tayinine olanak vermektedir. Ancak, tespit edilen genin ürünü olan protein için ticari bir antikor mevcut değilse proteinin istenilen bölgesine özgü yeni antikorun ürettirilmesi gerekmektedir. Bu yeni spesifik antikorun üretimi ve saflaştırılmasının ardından elde edilen yeni antikorun laboratuvar ortamında farklı doku ve hücrelerde dilüsyonlarının farklı teknikler kullanılarak test edilmesi antikorun spesifitesi, sensitivitesi ve güvenilirliğinin saptanması bakımından önem taşımaktadır. Western blot ile yeni antikorun bağlandığı proteinin büyüklüğünün belirlenebilmesi sayesinde antikorun spesifitesinin belirlenmesi önemli bir avantajdır.

Western blot yönteminde hazırlanan protein örneklerinin uzun süre saklanarak daha sonra araştırma imkanı sunması büyük bir avantajdır. Protein araştırmalarında poliklonal antikor kullanımında çapraz-reaksiyon önemli bir problemdir. Bu durum benzer büyüklükteki bir protein ile yalancı pozitifliğin oluşmasına neden olabilir. Araştırılan proteine özgü kullanılan spesifik antikorun bağlanma bölgelerinin veri bankaları kullanılarak taranması çapraz-reaksiyon, yalancı pozitiflik durumlarını ortadan kaldıracaktır. Western blot yönteminde protein büyüklüğünü gösteren belirteçler (*ladder*) kullanıldığından elde edilen protein bandının araştırılan proteine ait olup olmadığı çalışmanın güvenilirliğini artırmaktadır.^[17] Eğer ilgilenilen protein ilişkili bant elde edilemiyor ise bazı durumlarda yalancı negatiflik söz konusu olabilir. Bunun birkaç sebebi olabilir. Örneğin, aslında çok yüksek düzeyde ifade edilen bir proteinin membranda kemiluminesan görüntüleme için kullanılan substrat ile maruziyeti sonrası

soğutmalı kamera ile çekimi sırasında substratın çabuk tüketimine bağlı bant görülemeyebilir. Yüksek moleküler ağırlıklı proteinlerin transferinin başarılı bir şekilde gerçekleştirilememesi de yalancı negatifliğin önemli nedenlerindedir. Bu nedenlerle western blot yöntemi ile protein tayininin gerçekleştirilmesi öncesi yöntemde kullanılacak olan antikor ve proteinin özelliklerinin araştırılması araştırmacının sağlıklı yürütülmesi bakımından önem taşımaktadır.^[18]

İmmüsitokimya, akan hücre ölçer kadar olmasa da yeni varyantların sebep olduğu PİY hastalıklarının kesin tanı ve araştırmasında kullanılan spesifik protein tespit yöntemlerinde biridir. Bu yöntemle spesifik bir doku ya da hücre örneklerinde araştırılan proteinin ifadesi incelenebilir. Akan hücre ölçer yönteminde olduğu gibi sadece var-yok analizinin gerçekleştirilmesinde görsel olarak koyu boyanan hücrelerin sayılması ile yarı-kantitatif bir sonuç elde edilmektedir. Ancak western blot daha uzun süre alan ve daha emek isteyen bir yöntem olmasına rağmen protein büyüklüğünün belirlenebilmesi nedeniyle daha avantajlıdır (Tablo 1). Ayrıca, hücrelerde az miktarda ifade edilen proteinlerde, immün presipitasyon yöntemi ile protein örneğinin zenginleştirilerek western blot ile araştırılması kirlilik yaratan bir arkaplan sorunu olmadan istenilen çalışma sonuçlarının elde edilmesini sağlar. Bu nedenle özellikle moleküler biyoloji alanlarında oldukça sık kullanılan bir yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır.

Teşekkür: Emekli öğretim üyemiz Prof. Dr. Ş. Özden Sanal'a değerli katkılarından dolayı içten teşekkürlerimizi sunarız. Ayrıca Jeffrey Modell Vakfına çalışmada kullanılan deneysel ekipmanın temininde maddi destek verdiği için teşekkür ederiz. Soğutmalı santrifüj, çalkalayıcı ve soğutmalı kamera sistemlerinin kullanımına izin vererek çalışmamıza destek olan değerli öğretim üyesi Doç. Dr. Burcu Balcı Hayta nezdinde Hacettepe Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'na teşekkürü borç biliriz.

Etik Komite Onayı: Hacettepe Üniversitesi, Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan (GO13228 ve 12FON1230) alınmıştır.

Hasta Onamı: Bilgilendirilmiş hasta onamları alınmıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Dış Bağsız

Finansal destek: Çalışmamız, Hacettepe Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 013 D08103 001-341, 11/19-23 ve 010 01 101 010 numaralı projelerle desteklenmiştir.

Çıkar çatışması: Yazarlar arasında hiçbir konuda çıkar çatışması bulunmamaktadır.

Yazar Katkıları: SOH; Çalışmanın gerçekleştirilmesi, sonuçların değerlendirilmesi, makalenin yazılması. DÇ; Çalışmaya dahil edilecek hastaların belirlenmesi, Sonuçların değerlendirilmesi, makalenin yazılması. İT; Çalışmaya dahil edilecek hastaların belirlenmesi, Sonuçların değerlendirilmesi, makalenin yazılması.

Ethics Committee Approval: Approval was obtained from the Non-Interventional Clinical Research Ethics Committee of Hacettepe University (GO13228 and 12FON1230).

Informed Consent: Informed consent was obtained.

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Conflict of Interest: There is no conflict of interest among the authors.

Financial Disclosure: Our study was supported by Hacettepe University Scientific Research Projects Coordination Unit with projects 013 D08103 001-341, 11 / 19-23 and 010 01 101 010.

Author Contributions: SOH; Realization of the study, evaluation of results, article writing. DÇ; Determination of patients to be included in the study, evaluation of results, article writing. İT; Determination of patients to be included in the study, evaluation of results, article writing.

Kaynaklar

- Towbin H, Staehelin T, Gordon J., Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979;76:4350–4. [CrossRef]
- Burnette WN. “Western blotting”: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* 1981;112:195–203. [CrossRef]
- Gavini K, Parameshwaran K. *Western Blot (Protein Immunoblot) Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2019.*
- Gallo D, George JR, Fitchen JH, Goldstein AS, Hindahl MS. Evaluation of a System Using Oral Mucosal Transudate for HIV-1 Antibody Screening and Confirmatory Testing. *JAMA* 1997;277:254–8. [CrossRef]
- Navarro E, Palau J. Anti-Sm sera are misdetected by counterimmunoelectrophoresis. A critical analysis of CIE and Western blotting on the detection of human antinuclear antibodies. *J Autoimmun* 1991;4:213–22. [CrossRef]
- Zollner TM, Spengler K, Podda M, Ergezinger K, Kaufmann R, Boehncke WH. The Western blot is a highly sensitive and efficient technique in diagnosing allergy to wasp venom. *Clin Exp Allergy* 2001;31:1754–61. [CrossRef]
- Yska HAF, Elsink K, Kuijpers TW, Frederix GWJ, van Gijn ME, van Montfrans JM. Diagnostic Yield of Next Generation Sequencing in Genetically Undiagnosed Patients with Primary Immunodeficiencies: a Systematic Review. *J Clin Immunol* 2019;39:577–91. [CrossRef]
- van den Akker J, Mishne G, Zimmer AD, Zhou AY. A machine learning model to determine the accuracy of variant calls in capture-based next generation sequencing. *BMC Genomics* 2018;19:263. [CrossRef]
- Muzzey D, Kash S, Johnson JI, Melroy LM, Kaleta P, Pierce KA, et al. Software-Assisted Manual Review of Clinical Next-Generation Sequencing Data: An Alternative to Routine Sanger Sequencing Confirmation with Equivalent Results in >15,000 Germline DNA Screens. *J Mol Diagn* 2019;21:296–306. [CrossRef]
- Mu W, Lu HM, Chen J, Li S, Elliott AM. Sanger Confirmation Is Required to Achieve Optimal Sensitivity and Specificity in Next-Generation Sequencing Panel Testing. *J Mol Diagn* 2016;18:923–32. [CrossRef]
- Pandey RV, Pabinger S, Kriegner A, Weinhäusel A. ClinQC: a tool for quality control and cleaning of Sanger and NGS data in clinical research. *BMC Bioinformatics* 2016;17:56. [CrossRef]
- Niroula A, Vihinen M. How good are pathogenicity predictors in detecting benign variants? *Plos Comput Biol* 2019;15:e1006481. [CrossRef]
- Sun H, Yu G. New insights into the pathogenicity of non-synonymous variants through multi-level analysis. *Sci Rep* 2019;9:1667. [CrossRef]
- Hassan MS, Shaalan AA, Dessouky MI, Abdelnaim AE, ElHefnawi A. Evaluation of computational techniques for predicting non-synonymous single nucleotide variants pathogenicity. *Genomics* 2019;111:869–82. [CrossRef]
- Li J, Zhao T, Zhang Y, Zhang K, Shi L, Chen Y, et al. Performance evaluation of pathogenicity-computation methods for missense variants. *Nucleic Acids Res* 2018;46:7793–804. [CrossRef]
- Kanegane H, Hoshino A, Okano T, Yasumi T, Wada T, Takada H, et al. Flow cytometry-based diagnosis of primary immunodeficiency diseases. *Allergol Int* 2018;67:43–54. [CrossRef]
- Mahmood T, Yang PC. *Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting.* *N Am J Med Sci* 2012;4:429–34. [CrossRef]
- Alangari A, Alsultan A, Adly N, Massaad MJ, Kiani IS, Aljebreen A, et al. LPS-responsive beige-like anchor (LRBA) gene mutation in a family with inflammatory bowel disease and combined immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol* 2012;130:481–8.e2. [CrossRef]