

Akım Sitometri ile IL-12Rβ1 Ekspresyon Analizinin IL-12Rβ1 Eksikliğinin Tanısındaki Rolü

The Role of IL-12Rβ1 Expression Analysis Using Flow Cytometry in the Diagnosis of IL-12Rβ1 Deficiency

Çağman Sun Tan, Deniz Çağdaş Ayvaz, İlhan Tezcan, Özden Sanal

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Pediatrik İmmünoloji Anabilim Dalı,
Ankara, Türkiye

İletişim adresi:

Dr. Çağman Sun Tan
Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Pediatrik İmmünoloji Anabilim Dalı,
06100 Sıhhiye, Ankara, Türkiye
Tel: +90 533 - 347 96 83
e-posta: cagmantan@gmail.com

©2013 Turkish Journal of Immunology.
All rights reserved.

doi: 10.5606/tji.2013.160

Geliş tarihi: 24 Mayıs 2012
Kabul tarihi: 12 Eylül 2012

Amaç: Bu çalışmada mikobakteri enfeksiyonlarına karşı mendelian duyarlılık (MSMD) olan hastaların taranması ve zorunlu taşıyıcıların belirlenmesinde akım sitometri ile interlökin (IL)-12Rβ1 ekspresyon analizinin rolü araştırıldı.

Hastalar ve yöntemler: Bu çalışmaya Ankara Hacettepe Üniversitesi Çocuk İmmünolojisi Bölümü'ne MSMD düşündürülen klinik bulgular ile başvuran, IL-12Rβ1 eksikliği mutasyon analizi ile kanıtlanmış altı çocuk hasta (2 kız, 4 erkek; ort. yaş 5 yıl; dağılım 2-10 yıl) ve 12 ebeveyn dahil edildi. Toplam 58 aile üyesi ve 20 sağlıklı kontrol de çalışmaya alındı. Katılımcılarda periferik kan lenfosit yüzeyinde fitohemaglutinin (PHA) ile *in vitro* stimülasyon sonrasında IL-12Rβ1 ekspresyonu akım sitometri ile tarandı.

Bulgular: MSMD benzeri klinik özellikleri taşıyan ve IL-12Rβ1 gen mutasyonu kanıtlanmış altı hastada IL-12Rβ1 ekspresyonu %1'in altında idi. IL-12Rβ1'i eksprese eden lenfosit yüzdeleri kontrol ve zorunlu taşıyıcı grubunda, %85 (%71-%98) ve %47 (%18-%75) olarak bulundu. ROC (alıcı işlem karakteristik eğrisi) analizi, IL-12Rβ1'i eksprese eden lenfosit oranının <%1, <%70, >%76 olan bireylerin bu defekt için sırasıyla homozigot IL-12Rβ1 eksikliği, taşıyıcılığı ve sağlıklı olarak değerlendirilebileceği belirlendi.

Sonuç: Elde edilen veriler, MSMD'de en sık görülen defekt olan IL-12Rβ1 eksikliği olan hastaların taranmasında IL-12Rβ1 ekspresyonunun akım sitometrik yöntemle değerlendirilmesinin etkili bir yöntem olduğunu göstermektedir.

Anahtar sözcükler: Akım sitometri; IL-12Rβ1 eksikliği; mikobakteriyel hastalığa mendelian duyarlılık.

Objectives: This study aims to investigate the role of IL-12Rβ1 expression analysis using flow cytometry for screening patients with mendelian susceptibility to mycobacterial disease (MSMD) and identification of the obligate carriers.

Patients and methods: Six pediatric patients (2 girls, 4 males; mean age 5 years; range 2 to 10 years) who were admitted to Hacettepe University, Department of Pediatric Immunology, Ankara with clinical signs of MSMD and with proven IL-12Rβ1 deficiency using mutation analysis and 12 parents (obligate carriers) were included in this study. A total of 58 family member and 20 healthy controls were also included. The subjects were screened for IL-12Rβ1 expression analysis using flow cytometry after *in vitro* stimulation with phytohemagglutinin (PHA) on the surface of peripheral blood lymphocytes.

Results: The IL-12Rβ1 expression was less than 1% in six patients with clinical signs of MSMD and proven IL-12Rβ1 gene mutation. The mean percentages of lymphocytes expressing IL-12Rβ1 were found to be 85% (71%-98%) and 47% (18%-75%) for the controls and obligate carriers, respectively. The ROC (receiver operating characteristics curve) analysis revealed the percentage of IL-12Rβ1 expressing cells of <1%, <70%, and >76% could be regarded as homozygous IL-12Rβ1 deficient, IL-12Rβ1 carrier and healthy individuals, respectively.

Conclusion: Our study results suggest that IL-12Rβ1 expression analysis with flow cytometry is an effective method for the screening of the patients with IL-12Rβ1 deficiency, the most common defect of MSMD.

Key words: Flow cytometry; IL-12Rβ1 deficiency; mendelian susceptibility to mycobacterial disease.

Mikobakteri enfeksiyonlarına karşı mendelian yatkınlık (MSMD) 1990'lı yılların sonunda tanımlanmış olan nadir bir hastalıktır. Bu hastalığa beş otozomal genden birindeki (IFNGR1, IFNGR2, IL-12R β 1, IL-12B, CYBB, IRF8, IGS15 ve STAT1) defekt neden olmaktadır. Ayrıca NEMO, TYK2 genleri de bu hastalığa neden olan gruba dahil edilmiştir.^[1-8] Hastalar, BCG (Bacilli Calmette-Guérin) aşısı ve tüberküloz olmayan çevresel mikobakteri (EM) gibi virülansı zayıf mikobakterilerle olduğu gibi Salmonella suşları ile oluşan enfeksiyonlara karşı da yatkınlık göstermektedir. Az sayıda hastada *Mycobacterium tuberculosis* enfeksiyonu gösterilmiştir.^[7] Klasik immün yetmezliği olan hastaların aksine bu hastalar diğer mikroorganizmalara karşı direnç göstermektedir.^[7] Ancak hastalarda *Paracoccidioides brasiliensis*, Leishmania enfeksiyonları da bildirilmiştir.^[7] Hastalık spektrumu, bölgesel BCG enfeksiyonundan yaygın BCG enfeksiyonuna kadar değişmektedir, nadiren de olsa BCG enfeksiyonuna tam direnç bildirilmiştir.^[7] IL-12R β 1 eksikliği MSMD'de en sık görülen genetik eksikliklerdir. Bugüne kadar MSMD ile ilgili en geniş olgu çalışması 30 ülkeden 141 hastayı kapsayan IL-12/23R β 1 eksikliklerini içeren çalışmadır.^[7-10]

Bu çalışmanın amacı, MSMD hastalarının taranmasında ve heterozigot taşıyıcıların belirlenmesinde akım sitometrik yöntem olarak IL-12R β 1 ekspresyon analizinin kullanımının yerinin saptanmasıdır.

HASTALAR VE YÖNTEMLER

Hastalar ve kontroller

Hacettepe Üniversitesi Çocuk Hastanesi İmmünoloji Ünitesi'ne MSMD düşündüren klinik bulgular ile başvuran, IL-12R β 1 eksikliği mutasyon analizi ile kanıtlanmış hastaların, bu hastaların anne-babalarının, aile üyelerinin ve sağlıklı kontrollerin lenfositleri fitohemaglutinin (PHA) ile *in vitro* olarak uyarıldıktan sonra lenfosit yüzeyindeki IL-12R β 1 ekspresyonu uygun monoklonal antikorlar ile (phycoerythrin-labelled IL-12R β 1-specific monoclonal antibody: Mouse anti-human CD212 (2.4E6) from BD Biosciences/Franklin Lakes, NJ, USA) değerlendirildi.

Çalışmanın örnekleme altı hasta, (2 kız, 4 erkek; ort. yaş 5 yıl; dağılım 2-10 yıl), 12 ebeveyn (zorunlu taşıyıcı), 58 aile üyesi ve 20 sağlıklı kontrolden oluşturuldu. Araştırma projesinin protokolünde Helsinki Deklarasyonu (2000) imzalanmış ve Hacettepe Üniversitesi Etik Kurullardan izin alınmıştır.

FACS analizi ile IL-12R β 1 yüzey ekspresyonunun saptanması

Heparinli tam kandan yoğunluk gradiyent yöntemiyle elde edilen periferik kan mononükleer hücre

(PBMC). RPMI 1640, 2 mM glutamin, 20 mM HEPES, 0.01 mg/ml penisilin ve %20 fetal calf serum (FCS) içeren medyuma konsantrasyonu 1x10⁶ hücre/ml olacak şekilde hazırlandı. Hücreler %1 PHA ile 37 °C'de 72 saat %10 CO₂ varlığında inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında hücreler phycoerythrin anti-human IL-12R β 1 PharMingen ile boyanarak akım sitometride değerlendirildi.^[7,11] Blast popülasyonunda antikor ile işaretlenen hücreler sayıldı ve sonuçlar bu reseptörü ekspresyon eden hücre yüzdeleri olarak verildi. Testin duyarlılığı ve özgüllüğü ROC (receiver operating characteristic) analizi ile değerlendirildi.

BULGULAR

Lenfositlerde IL-12R β 1 ekspresyonu hasta bireylerde %1'in altında idi. IL-12R β 1 ekspresyonu, zorunlu taşıyıcılarda ortalama %47 (dağılım; %18-75) ve kontrol grubunda ortalama %85 (dağılım; %71-98) olarak bulundu (Figure 1-3). Ebeveynler dışındaki 29 aile bireyinin 16'sında lenfosit IL12R β 1 ekspresyonu değerleri, %70'in üstünde (dağılım; %14-92) bulundu. Üç hastanın moleküler çalışma ile heterozigot olduğu belirlenen birer kardeşinde değerler %14, %17 ve %58 olarak bulundu. IL-12R β 1 ekspresyonu değeri %84 bulunan hastanın yeni doğan kardeşinin mutasyon analizi her iki allelinde de mutasyon bulunmadığını gösterdi.

Hasta ve taşıyıcılar için ROC analizi ile elde edilen kesim (*cut-off*) değerleri ile bu değerlerin duyarlılık ve özgüllükleri hesaplandığında kesim değeri %76 olarak alındığında homozigotlar için duyarlılık ve özgüllük %100, heterozigotlar için ise %83 olarak bulundu. Ancak kesim değeri %70 olarak alındığında genetik defekt bulunmayan hastalar için duyarlılık %100 ve özgüllük %87 bulundu. Diğer taraftan %70 ve %76 arasındaki kesim değerlerinde heterozigosite gösteren bireylerle genetik defekti olmayan hastalar arasında ayırım yapılamamaktadır.

TARTIŞMA

IL-12R β 1 eksikliği, zayıf patojenik Mikobakteri ve Salmonella suşlarına duyarlılık ile seyrederek. Bu hastalık, BCG ve çevresel mikobakteri suşları ile enfeksiyonlar, olguların yaklaşık yarısında non-tifoidal Salmonellozis ve nadiren tüberküloz enfeksiyonları ile ortaya çıkabilir. Hastalar nadiren asemptomatik de olabilmektedir. IL-12R β 1 eksikliği MSMD'den sorumlu en sık görülen defektlerdir. Literatürdeki en geniş çalışma 30 ülkeden 141 hastanın bildirildiği bir çalışma olup Türk hastalar da bu grubun %26'sını (n=37) oluşturmaktadır.^[5,7-10,12-18]

IL-12B defekti olan hastalarda enfeksiyon tedavisinin daha etkin ve daha uzun süre yapılması ve erken

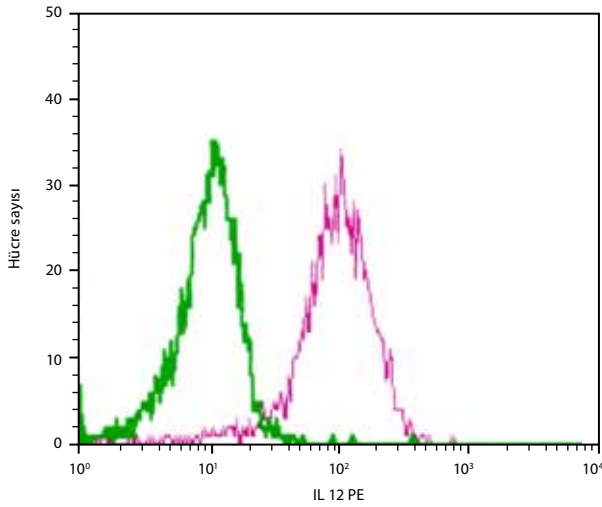


Figure 1. Sağlıklı bireyde IL-12Rβ1 ekspresyonunun flow sitometrik görüntüsü.

başlanmasının, bazı olgularda interferon gamma (IFN- γ) ve profilaktik tedavi gerekmesi nedeni ile tanı yaşamsal önem taşımaktadır. Nadir de olsa hücre yüzeyinde IL-12Rβ1 molekülünün saptanabildiği IL-12Rβ1 eksikliğinin tanımlanmış olması ve hastalığın farklı genetik defektlerle ortaya çıkabilmesi hastalığın kuvvetle düşündürülen özellikleri olan hastalarda tanı için mutasyon analizini de gerekli kılmaktadır. Mikobakteri enfeksiyonlarına karşı mendelian yakınlık olabileceğini düşündürülen klinik bulguları olan hastalarda çalışılacak gen sayısı fazla olmasına karşın IL-12Rβ1 eksikliğinin en sık görülen defekt olması ve tarama için IL-12Rβ1 ekspresyonunun akım sitometri ile analizinin pratik ve ekonomik olması nedeni ile bu yöntem tercih edilmektedir. Bizim MSMD hasta gru-

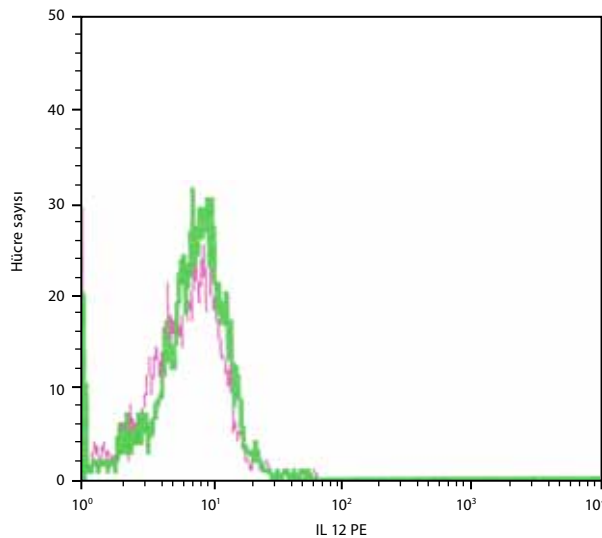


Figure 3. Hasta bireyde IL-12Rβ1 ekspresyonunun flow sitometrik görüntüsü.

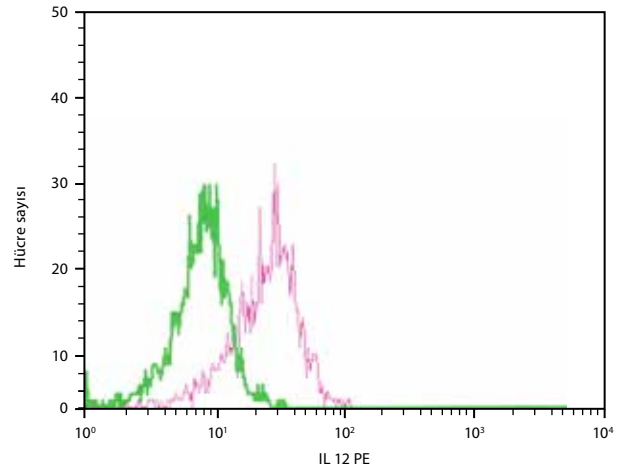


Figure 2. Taşıyıcı bireyde IL-12Rβ1 ekspresyonunun flow sitometrik görüntüsü.

bumuzun da büyük çoğunluğunu IL-12Rβ1 eksikliği bulunan hastalar oluşturmaktadır (%2).

Sonuç olarak, MSMD klinik bulguları olan hastalara başlangıçta akım sitometre ile yapılan IL-12Rβ1 ekspresyon analizi, hastalarda en sık görülen bu eksikliğin ilk adımda saptanmasını sağlamakla birlikte, IL-12Rβ1 ekspresyon defekti olduğu bilinen olguların ailelerinin taranmasında da hızlı sonuç veren, ekonomik ve güvenilir bir yöntemdir.

Teşekkür

Bu yazının hazırlanmasında istatistik analizler için Sayın Dr. Erdem Karabulut'a (Hacettepe Üniversitesi Biyoistatistik Bölümü), akım sitometrik analizlerde yardımlarını esirgemeyen kimyager Sayın Gürsel Söylemezoğlu ve Selma Erdel'e (Hacettepe Üniversitesi Pediatrik Hematoloji Bölümü) teşekkürlerimizi sunarız.

Çıkar çakışması beyanı

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

Finansman

Bu çalışma Hacettepe Üniversitesi Araştırma Birimi (Proje numarası: FON 02/27) tarafından desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

1. Alcaïs A, Abel L, Casanova JL. Human genetics of infectious diseases: between proof of principle and paradigm. *J Clin Invest* 2009;119:2506-14. doi: 10.1172/JCI38111.
2. van de Vosse E, van Dissel JT, Ottenhoff TH. Genetic deficiencies of innate immune signalling in human infectious disease. *Lancet Infect Dis* 2009;9:688-98. doi: 10.1016/S1473-3099(09)70255-5.

3. Zhang SY, Boisson-Dupuis S, Chappier A, Yang K, Bustamante J, Puel A, et al. Inborn errors of interferon (IFN)-mediated immunity in humans: insights into the respective roles of IFN-alpha/beta, IFN-gamma, and IFN-lambda in host defense. *Immunol Rev* 2008;226:29-40. doi: 10.1111/j.1600-065X.2008.00698.x.
4. Minegishi Y, Saito M, Morio T, Watanabe K, Agematsu K, Tsuchiya S, et al. Human tyrosine kinase 2 deficiency reveals its requisite roles in multiple cytokine signals involved in innate and acquired immunity. *Immunity* 2006;25:745-55.
5. Ottenhoff TH, Verreck FA, Lichtenauer-Kaligis EG, Hoeve MA, Sanal O, van Dissel JT. Genetics, cytokines and human infectious disease: lessons from weakly pathogenic mycobacteria and salmonellae. *Nat Genet* 2002;32:97-105.
6. Abbas KA, Lichtman AH, Pober JS. Immunity to intracellular bacteria. In: Abbas KA, Lichtman AH, Pober JS, editors. *Cellular and molecular immunology*. Pennsylvania: W. B. Saunders Company; 1991. p. 305-9.
7. de Beaucoudrey L, Samarina A, Bustamante J, Cobat A, Boisson-Dupuis S, Feinberg J, et al. Revisiting human IL-12R β 1 deficiency: a survey of 141 patients from 30 countries. *Medicine (Baltimore)* 2010;89:381-402. doi: 10.1097/MD.0b013e3181fdd832.
8. Bogunovic D, Byun M, Durfee LA, Abhyankar A, Sanal O, Mansouri D, et al. Mycobacterial disease and impaired IFN- γ immunity in humans with inherited ISG15 deficiency. *Science*. 2012;337:1684-8.
9. Al-Muhsen S, Casanova JL. The genetic heterogeneity of mendelian susceptibility to mycobacterial diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2008;122:1043-51; doi: 10.1016/j.jaci.2008.10.037.
10. Fieschi C, Bosticardo M, de Beaucoudrey L, Boisson-Dupuis S, Feinberg J, Santos OF, et al. A novel form of complete IL-12/IL-23 receptor β 1 deficiency with cell surface-expressed nonfunctional receptors. *Blood* 2004;104:2095-101.
11. Uzel G, Frucht DM, Fleisher TA, Holland SM. Detection of intracellular phosphorylated STAT-4 by flow cytometry. *Clin Immunol* 2001;100:270-6.
12. Dorman SE, Holland SM. Interferon-gamma and interleukin-12 pathway defects and human disease. *Cytokine Growth Factor Rev* 2000;11:321-33.
13. Verhagen CE, de Boer T, Smits HH, Verreck FA, Wierenga EA, Kurimoto M, et al. Residual type 1 immunity in patients genetically deficient for interleukin 12 receptor β 1 (IL-12R β 1): evidence for an IL-12R β 1-independent pathway of IL-12 responsiveness in human T cells. *J Exp Med* 2000;192:517-28.
14. Sanal O, Turul T, De Boer T, Van de Vosse E, Yalcin I, Tezcan I, et al. Presentation of interleukin-12/-23 receptor β 1 deficiency with various clinical symptoms of Salmonella infections. *J Clin Immunol* 2006;26:1-6.
15. Sanal O, Morgan G, Göçmen A, Novelli V, Klein N, Tezcan I, et al. Isolated cutaneous response to granulocyte-monocyte colony stimulating factor in fatal idiopathic disseminated Bacillus-Calmette-Guerin infection. *Eur J Pediatr* 2000;159:149-52.
16. Lichtenauer-Kaligis EG, de Boer T, Verreck FA, van Voorden S, Hoeve MA, van de Vosse E, et al. Severe Mycobacterium bovis BCG infections in a large series of novel IL-12 receptor β 1 deficient patients and evidence for the existence of partial IL-12 receptor β 1 deficiency. *Eur J Immunol* 2003;33:59-69.
17. van de Vosse E, Hoeve MA, Ottenhoff TH. Human genetics of intracellular infectious diseases: molecular and cellular immunity against mycobacteria and salmonellae. *Lancet Infect Dis* 2004;4:739-49.
18. Lichtenauer-Kaligis EG, de Boer T, Verreck FA, van Voorden S, Hoeve MA, van de Vosse E, et al. Severe Mycobacterium bovis BCG infections in a large series of novel IL-12 receptor β 1 deficient patients and evidence for the existence of partial IL-12 receptor β 1 deficiency. *Eur J Immunol* 2003;33:59-69.