

T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

138292

IL-12 RESEPTÖR  $\beta$ 1 EKSPRESYONUNUN HÜCRE YÜZEYİNDE  
FLOW SİTOMETRİK OLARAK DEĞERLENDİRME YÖNTEMİ  
İLE HOMOZİGOT VE HETEROZİGOT EKSİKLİKLERİNİN  
TARANMASI

**Biyolog Çağman SUN**

Hacettepe Üniversitesi  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin  
İmmünoloji Programı için Öngördüğü  
BİLİM UZMANLIĞI TEZİ  
olarak hazırlanmıştır.

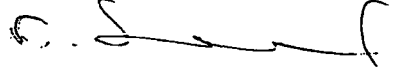
TEZ DANIŞMANI  
**Prof. Dr. Özden SANAL**

ANKARA  
2003

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne:

Bu çalışma jürimiz tarafından Çocuk İmmünoloji Programında Bilim Uzmanlığı Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Özden Sanal  
Hacettepe Üniversitesi



Üye : Prof. Dr. Fügen Ersoy  
Hacettepe Üniversitesi



Üye : Prof. Dr. İlhan Tezcan  
Hacettepe Üniversitesi



Üye : Doç. Dr. Duygu Uçkan  
Hacettepe Üniversitesi



Üye : Doc. Dr. Cemalettin Aybay  
Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi



ONAY:

Bu tez, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Yönetim Kurulu'nun kararıyla kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Hakan Orer

Enstitü Müdürü

## TEŞEKKÜR

Pediatric İmmünoloji alanında yüksek lisans öğreniminde beni teşvik eden ve yardımlarını esirgemeyen başta; sayın Prof. Dr. Özden SANAL olmak üzere, sayın Prof. Dr. Fügen ERSOY ve sayın Prof. Dr. İlhan TEZCAN 'a, tez yazımı aşamasındaki katkılarından dolayı, Uz.Dr. Tuba TURUL 'a, Dr. Yavuz Köker'e, laboratuvar çalışmalarında katkılarından dolayı ilgili laboratuvar çalışanlarına ve manevi desteği ile hep yanımda olan sevgili aileme teşekkürlerimi sunarım.



## ÖZET

**Sun,Ç.,IL-12 reseptör  $\beta$ 1 ekspresyonunun hücre yüzeyinde flow sitometrik olarak değerlendirme yöntemi ile homozigot ve heterozigot eksikliklerin taranması ,Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Çocuk İmmünoloji Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2003.** Bazı primer immün yetmezliklerin yaygın BCG ve non-tüberküloz mikobakteri enfeksiyonlarına yol açabildiği bilinmektedir. Ancak iyi tanımlanmış primer immün yetmezliklerden birisi bulunmayan kişilerde de bu ajanlarla yaygın enfeksiyonlar bildirilmiştir. Bu hastalıklar, ailevi geçiş göstermeleri nedeniyle Mikobakteriyel Hastalıklara Mendelian Eğilim (MSMD) olarak isimlendirilmiştir. MSMD çoğunlukla otozomal ressesif geçiş gösteren ancak X'e bağlı ve otozomal dominant formlarının da bulunduğu heterojen bir hastalık grubudur. Bugüne kadar BCG ve non-tüberküloz mikobakterilere hassasiyete yol açan lenfosit-makrofaj aktivasyon yolağında rol alan 5 ayrı genetik defekt gösterilmiştir. Bu defektler; IL-12p40, IL-12R $\beta$ 1, IFN $\gamma$ R1, IFN $\gamma$ R2, STAT1 eksikliğidir. Bu çalışmada in vitro olarak PHA ile uyarılmış lenfosit yüzeyinde IL-12R $\beta$ 1 ekspresyonu flow sitometri ile değerlendirildi. Hacettepe Üniversitesi Çocuk Hastalıkları İmmünoloji Ünitesine başvuran dissemine BCG enfeksiyonu veya non-tüberküloz mikobakteri enfeksiyonu olan 9 hasta ve aile fertlerinde (toplam 54 kişi) ve sağlıklı 20 kontrolde lenfosit yüzeyinde IL-12R $\beta$ 1 ekspresyonu çalışıldı. Sonuçlar bu reseptörü eksprese eden hücre yüzdesi olarak ifade edildi. IL-12R $\beta$ 1 eksprese eden hücre yüzdesi kontrollerde ortalama ve değişim sınırları olarak %85 (değişim sınırları %98-%71), 4 hastada IL12R $\beta$ 1 ekspresyonu normal iken, daha önce IL12R $\beta$ 1 eksikliği gösterilmiş olan 5 vakanın hepsinde ekspresyon değerleri %1'in altında taşıyıcı olduğu bilinen kişilerde (ebeveynlerde) %47 (değişim sınırları %18-%75) bulundu. İki hastanın aile fertlerinden birer kardeşte ekspresyon %20'nin (%14 ve %17) altında tespit edildi. Bu çocuklardan birisinde anti-mikobakteriyel tedaviye cevap veren submandibuler drene lenf nodu mevcutken, diğer çocuk sağlıklı

idi. Bu çocukların moleküler çalışma sonuçları IL12R $\beta$ 1 eksikliği yönünden heterozigot olduğunu gösterdi. IL12R $\beta$ 1 defekti olduğu bilinen bir hastanın kardeşinde yenidoğan döneminde yapılan çalışmada IL-12R $\beta$ 1 ekspresyonu kontrol düzeylerinde bulundu.

Sonuç olarak, bu yöntemin, taşıyıcıların küçük bir bölümünde IL-12R $\beta$ 1 eksprese eden hücre oranları kontrol değerleri ile örtüşmekle birlikte, IL-12R $\beta$ 1 eksikliği ve taşıyıcı olan bireylerin belirlenebilmesinde kullanılacak güvenilir ve ekonomik bir yol olduğu ve tarama çalışmalarında kullanılacağı belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Interlökin 12R(reseptör) eksikliği, IL-12R $\beta$ 1 ekspresyonu, heterozigot IL-12R $\beta$ 1 eksikliği, Flow sitometrik yöntem

**Destekleyen kurumlar :** Hacettepe Üniversitesi Araştırma Fonu

## ABSTRACT

**Sun Ç., Screening of homozygous and heterozygous IL-12 receptor  $\beta$ 1 deficiency by demonstration of IL-12R $\beta$ 1 expression on the surface of lymphocytes using flow cytometer, Hacettepe University Health Sciences Institute Ms Thesis in Pediatric Immunology, Ankara, 2003.** It is known that patients with disseminated BCG and non-tuberculous mycobacterial infections may develop in some primary immunodeficiency diseases . However, disseminated infections with these agents have also been described in patients without any well defined primary immunodeficiencies. These diseases are named as Mendelian Susceptibility to Mycobacterial Diseases (MSMD) as familial forms are frequent. MSMD are rather heterogenous and most of them are transmitted as autosomal recessive forms but occasional X-linked and autosomal dominant forms have been reported. Up to date, 5 different genetic defects leading to susceptibility to BCG and non-tuberculous mycobacterial infections are known. These defects are; IL-12p40, IL-12R $\beta$ 1, IFN $\gamma$ R1, IFN $\gamma$ R2 and STAT1 deficiencies. In this study, the detection of IL-12R $\beta$ 1 expression on surface of lymphocytes after in vitro stimulation with PHA by flow cytometer was established and studied in 9 patients with disseminated BCG or non-tuberculous mycobacterial infections who are being followed-up at Hacettepe University Children's Hospital Immunology Division and their family members (a total of 54 person) and 20 healthy controls . The results were expressed as the percentage of cells expressing this receptor. The mean percentages of lymphocytes expressing IL-12R $\beta$ 1 were found to be 85% and 47% with a range of 98%-71% and 18%-75% for the controls and carriers (parents) for IL-12R $\beta$ 1 deficiency, respectively. IL-12R $\beta$ 1 expression was normal in 4 patients whereas in 5 patients whose molecular studies showed homozygous IL-12R $\beta$ 1 deficiency , this value was lower than 1%. In two children from the latter families values were lower than 20% (14% and 17%). Although one of

these siblings experienced draining submandibular lymph node which responded to antimycobacterial therapy well, the other was healthy. Molecular studies revealed a heterozygous mutation in these siblings. IL-12R $\beta$ 1 expression value in a newborn sibling of another patient with IL-12R $\beta$ 1 deficiency was similar to the control values. In conclusion, although in a small group of carriers percentages of cells expressing IL-12R $\beta$ 1 overlap with control values, this method seems reliable and cost-effective that can be used both in detecting the patients with IL-12R $\beta$ 1 deficiency and carrier state and for screening purposes.

**Keywords:** Interleukin 12R (receptor) deficiency, IL-12R $\beta$ 1 expression, heterozygous IL-12R $\beta$ 1 deficiency, Flow cytometry method.

Supported by Hacettepe University Research Found.

## İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
KISALTMALAR	viii
ŞEKİLLER	ix
TABLolar	x
GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	
II.I Hücre içi bakterilere karşı immün mekanizma	2
II.II Mikobakteriyel İmmünite	3
II.II.Mikobakteriye Genetik Hassasiyetten Sorumlu Moleküller	
II.II.1a Doğal Dirençle İlişkili Makrofaj Proteini	5
II.II.1b Mannan Bağlayıcı Lektin	6
II.II.1c Vitamin D reseptörü	6
II.II.1d HLA Sistemi	6
II.III IL-12 ve reseptörleri	7
II.IV Interferon gama ve reseptörleri	8
II.V Mikobakteriye Hassasiyete Yol Açan Tip1 Sitokin Yolağındaki Gen Defektleri	
II.V.1 Interferon Gama Reseptör 1 Eksikliği	10
II.V.2 Interferon Gama Reseptör 2 Eksikliği	11
II.V.3 IL-12p40 Eksikliği	12
II.V.4 IL-12 ile STAT Aktivasyon Bozukluğu	13
BİREYLER,ARAÇ, GEREÇ VE YÖNTEMLER	
III.I YÖNTEMİN KURULMASI	14
III.II BİREYLER	14

III.III ALETLER	15
III.IV KİMYASAL BİLEŞİKLER	15
III.V YÖNTEMLER	
III.V.1 Lenfositlerin İzolasyonu	15
III.V.2 Hücrelerin kültürü	16
III.V.3 Lenfosit Yüzeyinde IL-12R $\beta$ 1 Ekspresyon Analizi	16
BULGULAR	18
TARTIŞMA	23
KAYNAKLAR	25



**KISALTMALAR**

<b>BCG</b>	: Bacille Calmette Guérin
<b>IL</b>	: İnterlökin
<b>IFN-</b>	: İnterferon
<b>TH1</b>	: T yardımcı hücresi 1
<b>NK</b>	: Doğal öldürücü
<b>SCID</b>	: Ağır kombine immün yetmezlik
<b>CGD</b>	: Kronik Granülomatöz Hastalık
<b>MSMD</b>	: Mendelian Susceptibility to Mycobacterial Disease
<b>PHA</b>	: Fitohemaglutinin
<b>R<math>\beta</math>1</b>	: Reseptör beta 1
<b>NTM</b>	: Non-tüberküloz mikobakteri
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	: Tümör nekrozis faktör alfa
<b>NRAMP</b>	: Makrofaj protein ile ilişkili doğal direnç proteini
<b>MBL</b>	: Mannan bağlayan lektin
<b>GM-CSF</b>	: Granülosit Makrofaj Stimule Edici Faktör
<b>HLA</b>	: İnsan Lökosit antijeni
<b>M.Leprae</b>	: Mikobakteriyum lepra
<b>L.monositogenez</b>	: Listeriya Monositogenez
<b>M.tuberculosis</b>	: Mikobakteriyum tuberkülozis
<b>PPD</b>	:Pürifiye protein derivesi
<b>NO</b>	: Nitrik oksit
$\gamma$	: Gama zinciri

**ŞEKİLLER**

<b>Şekil 2.1.</b> İnsanlar ve mikobakteriler arasındaki değişik etkileşim mekanizması	5
<b>Şekil 2.2.</b> IL-12 Sinyal Yolağı	8
<b>Şekil 2.3.</b> Interferon gama sinyal yolağı	9
<b>Şekil 2.4.</b> Mikobakteriyel enfeksiyonlarda MSMD'nin genetik etyolojisi	13
<b>Şekil 2.5.</b> Sağlıklı bireyde IL-12R $\beta$ 1 ekspresyonunun flow sitometrik görüntüsü	17
<b>Şekil 2.6.</b> Taşıyıcı bireyde IL-12R $\beta$ 1 ekspresyonunun flow sitometrik görüntüsü	17
<b>Şekil 2.7.</b> Hasta bireyde IL-12R $\beta$ 1 ekspresyonunun flow sitometrik görüntüsü	17

**TABLolar**

<b>Tablo1.</b> Sağlıklı kontrollerde IL-12R $\beta$ 1 ekspresyonu	20
<b>Tablo 2.</b> Moleküler düzeyde IL-12R $\beta$ 1 eksikliği gösterilmiş olan hastalarda IL-12R $\beta$ 1 ekspresyonu	21
<b>Tablo 3.</b> Moleküler düzeyde IL-12R $\beta$ 1 eksikliği gösterilmiş olan hastaların ebeveynlerinde IL-12R $\beta$ 1 ekspresyonu	21
<b>Tablo 4.</b> Moleküler düzeyde IL-12R $\beta$ 1 eksikliği gösterilmiş olan hastaların diğer aile fertlerinde IL-12R $\beta$ 1 ekspresyonu	22
<b>Tablo 5.</b> alıřma sũresince bũlũmũmũze başvuran IL-12R $\beta$ 1 defekti olmayan hasta ve ebeveynlerin IL-12R $\beta$ 1 ekspresyon yũzdeleri	23

## GİRİŞ VE AMAÇ

Mikobakteri ve Salmonella gibi hücre içi bakterilere karşı koruyucu immünite hücresel immünite aracılıdır. Hücresel immünitenin majör efektör mekanizmasının enfekte makrofajların özellikle IFN- $\gamma$  olmak üzere tip 1 sitokinler aracılığı ile aktivasyonu olduğu düşünülmektedir(1,2). T hücre yetmezliği bulunan hastalarda patojenitesi zayıf mikobakteriler ile enfeksiyonlara yatkınlık mevcuttur. Bu enfeksiyonlar yaygın ve fatal formda, primer ve sekonder immün yetmezlikler bulunmaksızın da görülebilmekte ve MSMD (*Mendelian susceptibility to Mycobacterial Disease*) olarak adlandırılmaktadır(3).

Bu hastalarda yapılan genetik analizler hastalığın farklı genetik defektlerle ortaya çıktığını göstermiştir. IL-12 - IFN $\gamma$  yolağında yer alan bu defektlerden bir tanesi, Interlökin 12 reseptör beta 1 (IL-12R $\beta$ 1) defektidir(4,5). Klinik bulguları ve fonksiyonel çalışmalar ile IL-12R $\beta$ 1 eksikliği olabileceği düşünülen hastalarda IL-12R $\beta$ 1 genindeki mutasyonunun gösterilmesi ile kesin tanı konulabilir (6). Ancak pahalı olması ve zaman alması nedeniyle IL-12R $\beta$ 1 eksikliği düşünülen bütün hastalara uygulanması pratik değildir. PHA (*Fitohemaglütinin*) ile uyarılan lenfositlerin yüzeyinde ortaya çıkan IL-12 reseptörleri flow sitometrik yöntem ile değerlendirilebilmektedir (7).

Klinik özellikleri lenfosit-makrofaj aksisinde defekt olabileceğini düşündüren hastalarda, bu yöntemin tarama testi olarak kullanılması zaman ve ekonomik yönden daha uygundur.

Bu çalışmanın amacı IL-12R $\beta$ 1 ekspresyonunun hücre yüzeyinde gösterilmesini sağlayan yöntemi kurmak ve bu yöntem aracılığı ile bugüne kadar IL-12R $\beta$ 1 eksikliği tanısı konulmuş hastaların aile fertlerinde bu eksiklik yönünden tarama yapmak ve lenfosit-makrofaj aksisinde defekt olabileceği düşünülen hastalarda tanı için kullanmaktır.

## GENEL BİLGİLER

### II. I Hücre İçi Bakterilere Karşı immün Mekanizma

Hücre içi bakterilere karşı major immün cevap hücrel immünite aracılığıdır (1,2). Hücrel immünitenin spesifikliğı T hücre ile sağlanır, ancak hücre içi bakterileri elimine etmekte önemli rolü; IFN- $\gamma$  gibi T hücre tarafından salınan tip 1 sitokinler ile aktive edilen makrofajlar oynamaktadır(2).

Hücre içi bakterilerin protein antijenleri T hücre cevaplarını kuvvetli bir şekilde stimule eder. Bu mikroorganizmaların çoğı hücre duvarında taşıdıkları unsurlarla makrofajları direk olarak aktive ederler ve böylece adjuvan gibi davranırlar. Adjuvanlardan biri olan muramil dipeptit mikobakterilerin hücre duvarında bulunur. Yapılan deneyler sonucunda hem CD4+ hem de CD8+ T hücrelerin hücre içi bakterilere karşı immüniteye katkıda bulunduğı gösterilmiştir. Bu T hücre alt grupları farklı antijen tiplerine karşı cevapta ve onları tanımada rol oynamaktadır. Mikobakteriyel enfeksiyonlarda PPD (purifiye edilmiş protein türevleri) gibi antijenler CD4 T hücrelerini stimüle ederler ve önceden enfekte olmuş kişilerde bu hücreler gecikmiş tipte hipersensitivite (DTH) reaksiyonlarını oluşturur. CD8+ T hücreler enfekte hücrelerde üretilen bakteriyel antijenleri tanıyabilirler. Hücrel immünitede her iki T hücre alt grubunun temel fonksiyonu özellikle IFN- $\gamma$  gibi sitokinlerin üretimidir (1,2,6).

Spesifik T hücreler tarafından üretilen IFN- $\gamma$ 'nın en önemli fonksiyonlarından birisi makrofajların aktivasyonudur. IFN- $\gamma$  makrofajların fagositik ve degradasyon fonksiyonlarını stimule ederek bakterilerin öldürülmesine yol açmaktadır. Ancak bireylerde etkili hücrel immünite olmasına rağmen hücre içi mikroorganizmalar fagositlere karşı direnç geliştirebilir ve uzun süre hücre içinde kalabilirler (3,9). Kronik antijenik stimülasyon granuloma olarak adlandırılan aktive makrofajların bir bölgede toplanmasına yol açar ki histolojik görüntü granulomatöz inflamasyon şeklindedir. Bu tip inflamasyon doku nekrozisi ve yaygın fibrozis ile birlikte ve ciddi fonksiyonel

bozukluklara yol açar. Böylece bazı hücre içi bakteriler tarafından oluşturulan enfeksiyonlarda doku hasarının ve hastalığın temel nedeni konağın immün cevabıdır (2). Bunun en güzel örneği mikobakteriyel enfeksiyonlardır.

Hücre içi bakterilerin yaşamları için en önemli mekanizma fagositler tarafından eliminasyona direnç göstermektir. Bir çok mikroorganizma farklı mekanizmalar kullanmaktadır. Mikobakterilerin bunu , fagolizozom füzyonunu inhibe ederek , *M. Leprae'nin* glikolipidinin lizozom hareketini engelleyerek, *L.monositogenez* ise hemolizin proteinini üreterek yaptığı düşünülmektedir (2).

## II.II Mikobakteriyel İmmünite

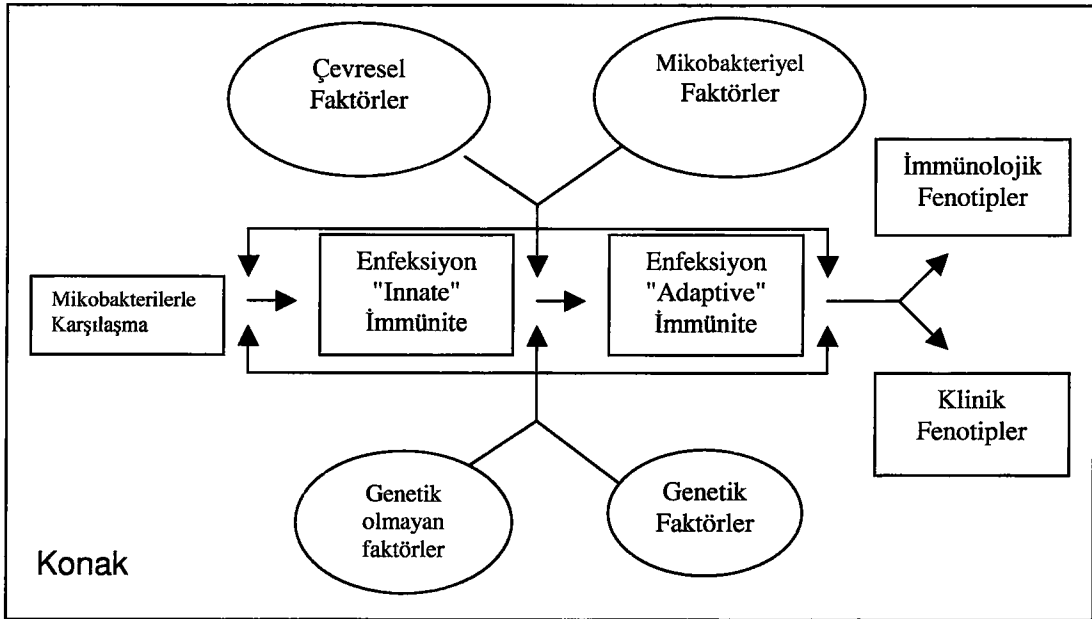
Daha önce de belirtildiği gibi mikobakteri,salmonella gibi hücre içi mikroorganizmalara karşı koruyucu immünite makrofaj ve T hücreler aracılığı ile olmaktadır. Enfekte makrofajların antijen spesifik T hücre ve doğal öldürücü (NK-Natural Killer) hücreleri ile etkileşimi hücre içi parazitlerin ortadan kaldırılması için gereklidir.

Monosit ve makrofajların hücre içi mikroorganizmalarla enfeksiyonu bu patojenlerin ölümü ile sonuçlanan aktivasyonu başlatır. Enfekte makrofajlardan sitokinler salınır. Bunlara cevap olarak lenfositler (başlıca CD4+ T hücreleri ve NK hücreleri) stimule olur. Aktive olmuş T hücreleri de hücre içi mikroorganizmaları öldürmek üzere makrofajları aktive eder. Hücre içine alınan bakteri makrofaj içinde mikroorganizmaları öldürmekte aracı olan reaktif oksijen ürünlerinin yapıldığı fagosomlarda kalır. Hücre içi mikroorganizmayı öldürmede önemli olan bir diğer metabolit de nitrik oksit (NO)'dir (2).

Mikobakteriler, bilinen herhangi bir toksin veya enzim üretmeden enfekte dokuları direk hasara uğrattırılar. *M. tuberkülozis'e* ilk maruz kalındığında lokal hücresel inflamasyon gelişir ve bakteriler başlangıçta fagositlerde proliferer olur. Bunlar, mikobakterinin patojenitesine ve makrofajın aktive olup olmamasına bağlı olarak daha sonra ölebilir veya sessiz bir şekilde

kalabilirler. Aynı zamanda spesifik T hücre immünitesi gelişir. İmmünitenin gelişmesinden sonra bakterilerin olduğu bölgede ağırlı granümatöz reaksiyonlar görülebilmektedir(11). Böylece spesifik immün cevabın her iki çeşidi olan koruyucu immünitede hipersensitivite reaksiyonu doku hasarına neden olmaktadır.

Hücre içi bakterilere karşı immün cevabın bireylerde farklı olması hastalığın ilerlemesi ve klinik seyirinde önemli role sahiptir (şekil 2.1). Örneğin *M. leprae*'nin neden olduğu lepra'nın iki polar (kutupsal) formu bulunmaktadır. Lepramatöz leprada hastalar yüksek spesifik antikor titrelerine sahiptir ancak *mikobakterium lepra* antijenlerine karşı hücresel cevaplar zayıftır. Zayıf hücresel immünite nedeniyle mikobakteriler makrofajlarda proliferasyon olurlar. Bakterilerin büyümesi ve makrofaj aktivasyonu sonucu deride yıkıcı lezyonlar meydana gelmektedir. Bunun aksine tüberküloid lepralı hastalarda kuvvetli hücresel immünite bulunmasına rağmen düşük antikor seviyeleri bulunmaktadır. Farklı bireylerde mikobakterium lepra stimülasyonu ile sitokinlerin üretimi, B hücrelerin yardımı veya makrofaj aktivasyonundaki farklılıklar klinik farklılıkların ortaya çıkma sebebi olarak düşünülmektedir. Lepramatöz lepralı hastalardaki T hücreler *M.lepra*'ya karşı düşük IL-2 ve IFN- $\gamma$  üretirken, tüberküloid lepralı hastalarda IL-2 ve IFN- $\gamma$  seviyeleri daha yüksektir (2,12,13).



**Şekil 2.1 İnsanlar ve mikobakteriler arasındaki değişik etkileşim basamakları(13)**

## II.II.2.Mikobakterilere Genetik Hassasiyetten Sorumlu Moleküller

### II.II.2.a. Doğal dirençle ilişkili Makrofaj proteini

#### (Natural Resistance Associated Makrophage Protein-NRAMP)

İnbred farede BCG, M.Avium kompleksi, M.Lepramurium, L.Donovani ve S.Typhimurium ile enfeksiyona rezistansın, Bcg (veya Lsh/lty) olarak adlandırılan bir gen ile kontrol edildiği gösterilmiştir(14). Bcg geni izole edilmiş ve doğal dirençle ilişkili makrofaj proteini (Nramp) olarak adlandırılmıştır(15). İnsanlarda Nramp homoloğu (NRAMP1) klonlanmıştır(16). NRAMP genindeki 2 polimorfizm ile tüberküloz arasında asosiyasyon gösterilmiş olup seyrek bulunan fenotipler en sık görülen NRAMP fenotipine göre tüberkülozlu hastalarda 4 kat fazla bulunmuştur. NRAMP1'in tüberküloza kişisel hassasiyette önemli bir gen olabileceği düşünülmektedir. Erişkinlerde pulmoner non-tüberküloz mikobakteri (NTM)

enfeksiyonunda NRAMP1 moleküler düzeyde bakılmış ancak mutasyon veya polimorfizm bulunamamıştır.(12)

### **II.II.2.b. Mannan Bağlayıcı Lektin (MBL)**

MBL, fagositozu arttıran ve komplemanı klasik yoldan aktive eden bir moleküldür(17). Kodon 52, 54 ve 57'de tek baz değişimi MBL konsantrasyonunda düşüklüğe yol açmaktadır. Yapılan bir çalışmada variant kodon 57'nin tüberkülozlu vakalarda nispeten daha az olduğu gösterilmiştir. MBL eksikliğinde tüberküloza direnç olabileceği düşünülmektedir(12).

### **II.II.2.c.Vitamin D reseptörü**

Vitamin D'nin aktif metaboliti 1,25 D3 aynı zamanda immünomodülatör bir hormondur.1,25 D3 monositleri aktive eder, hücrel immüniteyi stimüle eder, lenfosit proliferasyonunu, Ig yapımı ve sitokin sentezini baskılar. 1,25 D3 etkilerini vitamin D reseptör (VDR) aracılığı ile oluşturur. Yapılan çalışmalarda monosit, aktive T ve B lenfositlerde bulunan VDR genindeki polimorfizmin tüberküloza genetik hassasiyette rolü olabileceği düşünülmektedir(12).

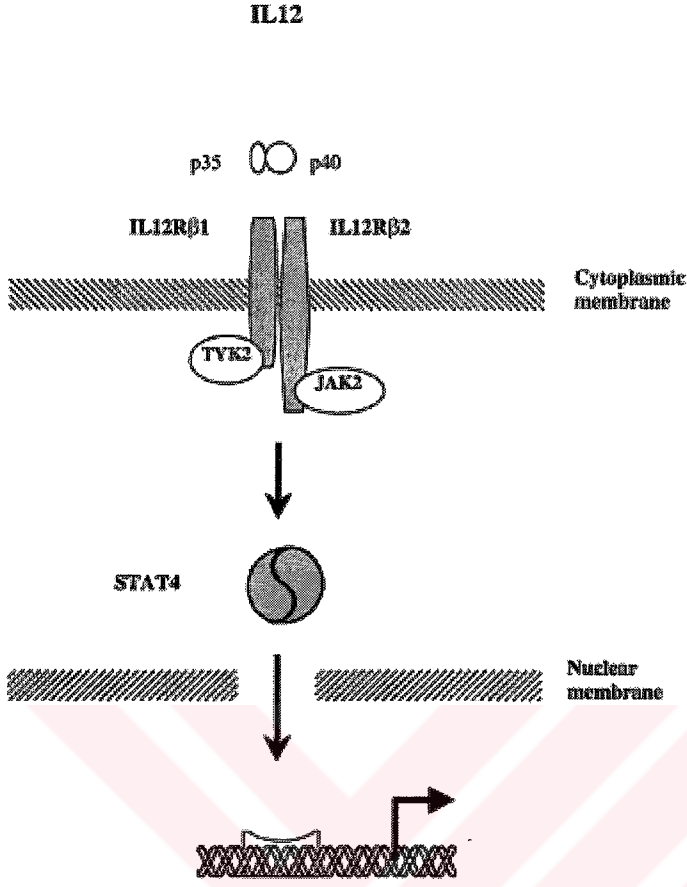
### **II.II.2.d.HLA Sistemi**

Çeşitli çalışmalarda lepra ve tüberküloza hassasiyetin HLA sınıf II ile assosiyasyon gösterdiği bildirilmekle birlikte ilişki bulunmayan çalışmalar da mevcuttur(18,19). TNF- $\alpha$  geninin promotor polimorfizmi (HLA-DR2 assosiyasyonundan bağımsız) ile de ilişkili olduğu gösterilmiştir(20,21). MHC bölgesindeki diğer immünomodülatör genler HLA antijenleri ve enfeksiyon hastalıkları arasındaki assosiyasyonlardan sorumlu olabileceği düşünülmektedir(12,19,22).

### II.III.1.IL-12 ve reseptörleri

Makrofaj ve nötrofiller tarafından yapılmaktadır. İki genetik komponentten oluşur: p35 (kromozom 3) ve p40 (kromozom 5). İkisi bir arada bioaktif heterodimer oluşturmaktadır (1,10). IL-12 reseptörünün iki zinciri ( $\beta 1$  ve  $\beta 2$ ) IL-12 ile bağlandığında kendi kinazlarına bağlanarak (Tyk2 ve JAK 2) başlıca STAT4 ile sinyal iletilmektedir(9,23) (Şekil 2.2). IL-12, T ve NK hücrelerinden IFN- $\gamma$  yapımını sağlarken, IL-12 yapımı IFN- $\gamma$  ve TNF- $\alpha$  uyarımı ile artmaktadır. Mikobakteriye dirençte IL-12'nin santral rolü muhtemelen IFN- $\gamma$ ,GM-CSF ve TNF- $\alpha$  yapılmasını stimule etmesi ile ilgilidir. Ancak IL-12'nin antimikobakteriyel diğer final mediatörleri tam bilinmemekle birlikte önemli ölçüde IFN- $\gamma$  gibi görünmektedir. IFN- $\gamma$ ; TH1 hücrelerinin gelişim ve değişiminde kritik bir faktör olarak rol oynamaktadır.TH1 aynı zamanda NK hücrelerini aktive eder,sitotoksik T hücre değişimini indükler (24).

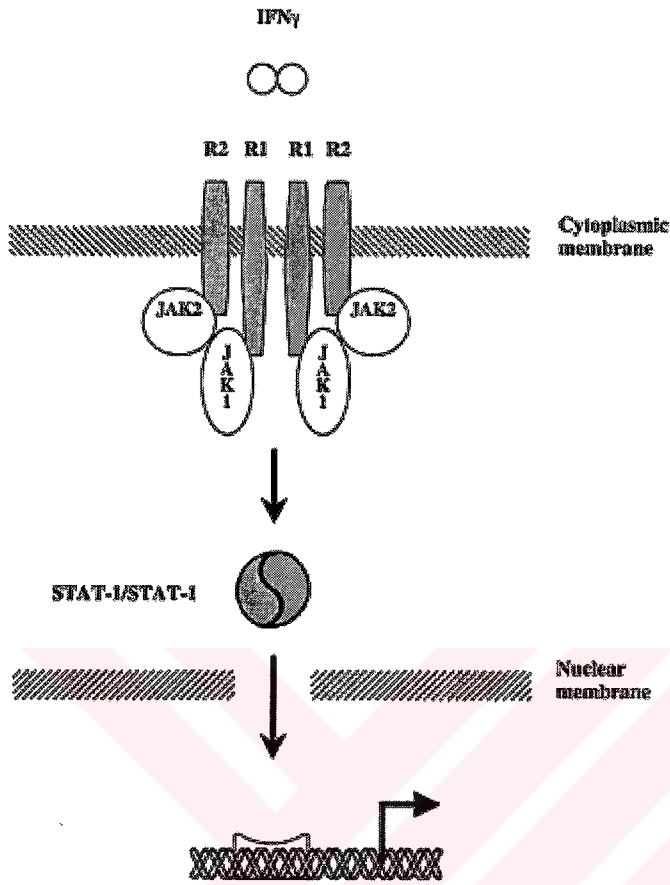
IL-18,IL-23 ve IL-27 ;IL-12 ile benzer aktivitelere sahiptir (25).



**Şekil 2.2 IL-12 Sinyal Yolağı (9)**

### I.II.1 IFN- $\gamma$ ve reseptörleri

Deneyisel çalışmalar BCG enfeksiyonunun başlıca, mononükleer fagosit ve CD4 helper T lenfositlerinin etkileşimi ile kontrol altına alındığını ve IFN- $\gamma$  ve daha az derecede TNF- $\alpha$ 'nın santral bir rol oynadığını göstermiştir(26). IFN- $\gamma$ 'nın diğer bir etkisi, nötrofil ve makrofajları süperoksit ve nitrik oksit üretmek üzere aktive etmektir. IFN- $\gamma$  başlıca NK, CD4 ve CD8 hücreleri tarafından antijenik uyarım ile yapılırken, IL-12 etkisi ile yapımı artmaktadır. IL-12 ve IFN- $\gamma$ 'yı içeren bir dizi reaksiyon hücre içi mikroorganizmalara karşı hücrel immün cevapta santral rol oynamaktadır. IFN $\gamma$  hücrel aktivasyonunu en az 2 reseptör kompleksine bağlanarak gerçekleştirmektedir(27,28,9) (Şekil2.3).



**Şekil:2.3. Interferon Gama Sinyal Yolağı (9)**

IFN $\gamma$ R1 6.kromozomun kısa kolunda, IFN $\gamma$ R2 ise 21.kromozomda kodlanmaktadır(5,29). IFN $\gamma$ , IFN $\gamma$ R1 ile bağlandığında IFN $\gamma$ R2 ile dimerize olmakta ve dimerizasyon sırasında IFN $\gamma$  her iki reseptörle birlikte etkileşime girmektedir. IFN $\gamma$ - reseptör kompleksi oluştuğunda IFN $\gamma$ R1 ve IFN $\gamma$ R2'nin intraselüler domainleri ile asosiye Janus protein kinazlar ( Jak1 ve Jak2) fosforilasyonu aktive etmektedirler. Bu fosforilasyon ile STAT1 (sinyal iletimi ve transkripsiyon aktivasyon proteini) için bağlanma bölgesi oluşmaktadır (26,28).

### **II.II.3 Mikobakteriye hassasiyete yol açan genetik defektler**

#### **II.II.3a. IFN $\gamma$ R1 eksikliği:**

##### **-Tam IFN $\gamma$ R1 Eksikliği:**

Hastalarda hücre yüzeyinde, IFN- $\gamma$ R1 ekspres edilememekte dolayısıyla IFN $\gamma$  sinyal iletiminde bozukluk bulunmaktadır(30). Tam IFN $\gamma$ R1 eksikliği bulunan hastalarda BCG, NTM (M.avium, fortüitum, chelonae, smegmatis) enfeksiyonları ve Salmonella enfeksiyonu hastaların yaklaşık % 50 sine kadar görülebilmektedir. Mikobakteriyel hastalık erken çocuklukta ortaya çıkmakta ve vakaların çoğunluğunda ölümlerle sonuçlanan hastalık gelişmektedir(31). Histopatolojik özelliği iyi sınırlanmış tuberkuloid granülom bulunmaması ile belirlenebilmektedir. CMV, RSV, VZV, parainfluenza virüs ve L. Monositogenez'e karşı hassasiyet bildirmiştir (9,32).

##### **-Parsiyel IFN $\gamma$ R1 Eksikliği**

Parsiyel IFN $\gamma$ R1 eksikliğinin otozomal resesif ve otozomal dominant olmak üzere 2 formu bulunmaktadır.

##### **Otozomal Resesif Form**

Otozomal resesif parsiyel IFN $\gamma$ R1 eksikliğinin olduğu hastalar missens mutasyona sahiptir. Hücre yüzeyinde reseptör mevcut olmasına rağmen fonksiyon gösterememektedir. IFN- $\gamma$  cevabı ancak normalin 100 kat kadar yüksek konsantrasyonlarda alınabilmektedir. Granülomlar iyi sınırlanmış ve iyi diferansiyedir. Hastalarda BCG ve salmonella enteriditis enfeksiyonu görülmektedir (33,34).

## Otozomal Dominant Form

Bu hastalarda ağır lokalize veya dissemine BCG veya NTM enfeksiyonları, histoplazmozis veya salmonellozis görülmektedir. Klinik prezentasyon komple forma göre daha geç çocuklukta olmaktadır. Bu hastalarda IFN- $\gamma$ R1 dansitesi normalden 3-5 kat daha yüksek bulunmuştur. STAT1 fosforilasyonu için bu hastalarda sağlıklı çocuklara göre 100-1000 kat daha fazla IFN $\gamma$  konsantrasyonu gerekmektedir. Hastalar antimikobakteriyel ajanlara iyi cevap vermektedir ve reziduel IFN $\gamma$  cevabı bulunan hastalarda IFN $\gamma$  verilmesi antimikobakteriyel ajanların etkisini arttırmaktadır (35).

### II.II.3b. IFN $\gamma$ R2 eksikliği:

#### -Tam IFN $\gamma$ R2 Eksikliği

Klinik prezentasyon olarak tam IFN $\gamma$ R1 eksikliğine benzemektedir. *M.fortuitum* ve *M.avium* ile enfeksiyon bildirilmiştir. Granuloma formasyonu bu hastalarda bozuk olabilmektedir. Ancak IFN $\gamma$ ya hücrel cevap bulunmaktadır (5,36).

#### -Parsiyel IFN $\gamma$ R2 Eksikliği

Bu hastalarda homozigot missens mutasyon bulunmaktadır. IFN $\gamma$ R1 ve IFN $\gamma$ R2 ekspresyonu olmakla birlikte fonksiyonu önemli derecede bozuk olarak görülmektedir. Mutant IFN $\gamma$ R2 molekülünün IFN $\gamma$  molekülü ile asosiyasyonu dolayısıyla fonksiyonel kompleks sayısı düşük olmakta bu nedenle IFN $\gamma$ ya hücrel cevap bozuktur (5,36).

**II.II.3c. IL-12p40 eksikliği:**

Bu hastaların lenfositleri, sağlıklı kişilerin lenfositlerine göre daha düşük düzeyde IFN $\gamma$  yapmaktadır. Dissemine BCG ve S.enteritidis sepsisi görülebilmektedir. Bu hastalarda IL-12 bağımsız reziduel IFN $\gamma$  yapımına bağlı olarak tam IFN $\gamma$ R1 ve IFN $\gamma$ R2 eksikliklerinden daha ılımlı bir fenotip gözlenmektedir (3).

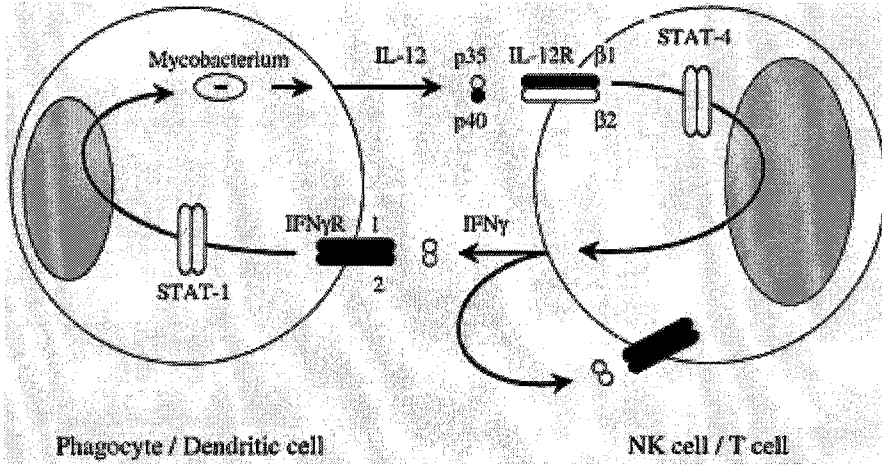
**II.II.3d. IL-12 R $\beta$ 1 eksikliği:**

Tekrarlayan dissemine salmonella ve NTM veya BCG enfeksiyonları ile ortaya çıkmaktadır. Bu hastalarda iyi sınırlı, iyi organize olmuş granuloimler bulunmaktadır. Hücre yüzeyinde IL-12R $\beta$ 1 ekspresyonu edilmemektedir ve IL-12 sinyal iletimi bozuk olduğundan IFN $\gamma$  yapımı düşük olmaktadır. Tüm hastalar IL-12R $\beta$ 1 ekspresyonu yönünden homozigot resesif mutasyonlara sahiptir (4,37).

**II.II.3e. IL-12 ile STAT aktivasyon bozukluğu:**

Bu aktivasyon bozukluğun bulunduğu hastalarda atipik mikobakteriyel enfeksiyon, tekrarlayan stafilokoksik sinüzit, multipl ilaç reaksiyonları görülmektedir. Parsiyel resesif IFN- $\gamma$  eksikliğine benzemektedir (3).

Hastalıklara özgü tanımlanmış mutasyonlar.(IFN- $\gamma$ R1-R2,IL-12p40,IL-12R $\beta$ 1) Şekil 2.4'de gösterilmiştir. Koyu renli alanlar mutasyon tespit edilen molekülleri temsil etmektedir. (9)



**Şekil 2.4. Mikobakteriyel enfeksiyonlara hassasiyetin genetik etyolojisi (9)**

## **BİREYLER, ARAÇ, GEREÇ VE YÖNTEMLER**

### **III.I YÖNTEMİN KURULMASI**

PHA ile uyarılmış lenfosit yüzeyinde IL-12R $\beta$ 1'in ekspresyonunun değerlendirilmesi yöntemini kurarken ;Uzel ve arkadaşlarının tarif ettiği yöntemle göre, Hacettepe Üniversitesi Çocuk Hastanesi İmmünoloji ünitesinde çalışan bireyler sağlıklı kontrol olarak alındı. Bu çalışmada 10cc prezervatifsiz heparinli periferik kan kullanıldı. Lenfositler izole edildikten sonra hücrelere kültür medyumu ve PHA eklenerek inkübe edildi.Çeşitli dozlarda PHA ve hücre konsantrasyonları ve inkübasyon süreleri denenerek sistem optimize edilmeye çalışıldı. İki kontrol farklı günlerde iki defa çalışılarak değerlerin birbirine çok yakın olduğu görüldü. Yöntemin optimize edilmesinden sonra daha önceden IL-12R $\beta$ 1 eksikliği tanısı almış hastalar ve aile bireyleri çalışıldı .

### **III.II BİREYLER**

Çalışmaya Hacettepe Üniversitesi İhsan Doğramacı Çocuk Hastanesi İmmünoloji Bölümü'ne daha önce dissemine BCG enfeksiyonu ve diğer mikobakteri enfeksiyonu ile başvurmuş ve IL-12R $\beta$ 1 eksikliği tanısı almış olan 5 hasta ve bu hastaların aile fertleri , Şubat-Ağustos 2003 döneminde dissemine BCG enfeksiyonu veya diğer non-tüberküloz mikobakteri enfeksiyonu ile başvuran 4 hasta ve bunlardan 2 hastanın aile fertleri olmak üzere toplam 54 kişi dahil edildi. Kontrol sayısı 20 idi.

### III.III ALETLER

Çalışmada kullanılan aletler; Becton Dickinson Facs Calibur Fluorescence Activated Cell Sorter seri no:E2810(Becton Dickinson Immunocytometry Systems 2350 Qume Drive San Jose,California 95131-1807) Hermler Z 383K Soğutmalı Santrifüj Cihazı, FASTER Bio 48 hava akımlı kültür kabini, Alfa-Gamma voltaj regülatörü, Wild Heerbrugg Inverted Mikroskop(İsviçre)' tur.

### III.IV KİMYASAL BİLEŞİKLER

Fitohemagglutinin(PHA-M Biological Industries Bio-Medical,UK), "Ficoll Separating Solution Density 1,077" (Biochrom KG,leonorenstr,Berlin) ve kloroform, fosfat ile tamponlanmış tuzlu çözelti (Phosphate buffered saline, PBS), RPMI 1640 Kültür Solusyonu(Sigma,USA), HEPES Tamponu (Sigma,USA),Penisilin+Streptomisin (Sigma,USA) , L-Glutamin (Biochrom, Berlin), Isı ile İnaktive edilmiş Fetal Bovine Serum (Biochrom,Berlin), PE anti-human IL-12R $\beta$ 1 (Pharmingen Becton Dickinson),PE mouse IgG1k (Pharmingen, Becton Dickinson) olarak kullanılmıştır.

### III.V YÖNTEMLER

#### III.V.1 Lenfositlerin İzolasyonu

Mononükleer hücreler "Histopaque 1077 Ficoll" dansite gradienti yöntemi ile elde edildi. Heparinli enjektöre veya Sodyum heparinli tüpe alınan 10 ml periferik kan örnekleri 15 ml lik falkon tüpe konuldu. Üzerine 3:1 oranında olacak şekilde, PBS ilave edilerek, seyreltili. Diğer bir falkon tüpe 4 ml "Ficoll Separating Solution 1077 " konuldu. PBS ile seyreltilen örnek steril pastör pipet kullanılarak "Ficoll Separating Solution'un üzerine yavaşça yayıldı ve +4 °C de, 2000 rpm de 20 dakika santrifüj edildi. Mononükleer hücreler steril pastör pipeti ile interfazdan toplanarak bir başka tüpe aktarıldı,

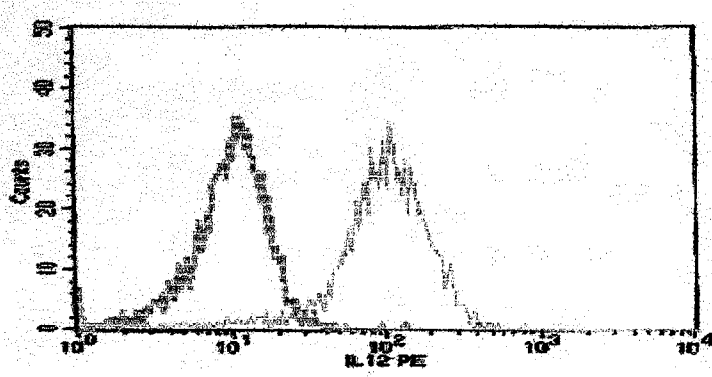
üzerine 10 ml PBS ilave edildi ve +4 °C de 1500 rpm de 10 dakika santrifüj edilerek üst kısımdaki süpernatant atıldı. PBS ile yıkama işlemi iki kez tekrarlandı ve kültür solüsyonu hücreler mililitrede (ml)  $1 \times 10^6$  olacak şekilde hazırlandı kültür için hazır hale getirildi.

### **III.V.2 Hücrelerin Kültüre Edilmesi**

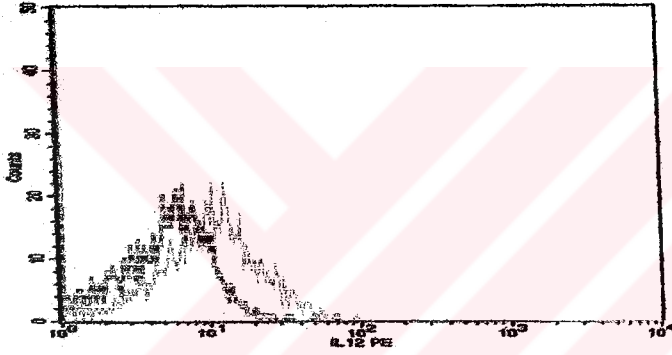
Hücreler 25 cm<sup>2</sup>lik steril flasklara alındı. Her flaska 1/100 fitohemaglutinin (PHA) eklendi. Hücreler 72 saat %5 CO<sub>2</sub> içeren 37°C sıcaklıktaki ortamda inkübe edildikten sonra 2 defa 10 dakika 1500 rpm'de santrifüj edildi.  $2 \times 10^6$  / 100 mikrolitre( $\mu$ l) konsantrasyona ayarlanan hücrelere IL-12R $\beta$ 1 için 20 $\mu$ l PE anti-human IL-12R $\beta$ 1, isotip için 20 $\mu$ l PE anti-mouse IgG<sub>1</sub> $\kappa$  eklenerek oda sıcaklığında 15 dakika karanlıkta bekletildi ve inkübasyon sonunda 2 defa 1 ml PBS ile 1050 rpm'de 5 dakika yıkandı .

### **III.V.3 Lenfosit Yüzeyinde IL-12R $\beta$ 1 Ekspresyon Analizi**

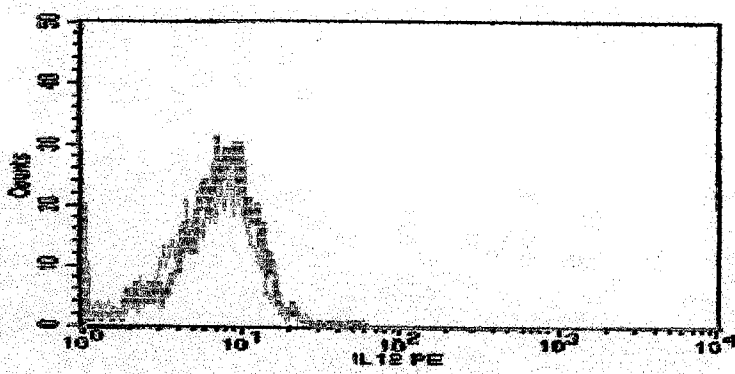
PHA ile uyarılmış lenfosit yüzeyinde IL-12R $\beta$ 1'in ekspresyonu Flow sitometri yöntemiyle değerlendirildi. IL-12R $\beta$ 1 ekspresyonu bu reseptörleri taşıyan lenfosit yüzdesi olarak belirtildi. Değerler aynı günün kontrolü ile birlikte verildi. Şekil 2.5'de sağlıklı kişilerde, şekil 2.6'da taşıyıcılarda ve şekil 2.7'de hastalarda IL-12R $\beta$ 1 ekspresyonunun flow sitometrik görüntüleri verilmiştir.



**Şekil 2.5 Sağlıklı bireyde Flow sitometride IL-12R $\beta$ 1 görüntüsü**



**Şekil 2.6 Taşıyıcı Bireyde Flow sitometride IL-12R $\beta$ 1 görüntüsü**



**Şekil.2.7 Hasta bireyde Flow sitometride IL-12R $\beta$ 1 görüntüsü**

## **BULGULAR**

Lenfosit yüzeyinde IL-12 reseptör  $\beta$ 1 ekspresyonunun flow sitometri yöntemi ile gösterilebilme yönteminin kurulmasında ünitemizde çalışmakta olan sağlıklı kişiler kontrol olarak alınarak daha önce tarif edilen yöntemde çeşitli modifikasyonlar uygulanarak tekrar edildiğinde benzer değerlerin elde edildiği güvenilir sonuçların elde edildiği güvenilir sonuçlar alınan forma ulaşılmıştır.

Sağlıklı kontrollerimizde ortalama değer % 85 (değişim sınırları %71-%98) olarak bulunmuştur. (tablo 1)



Kontrol No	IL-12R $\beta$ 1 Ekspresyon Yüzdesi(%)
1	90
2	88
3	85
4	88
5	91
6	81
7	82
8	89
9	88
10	71
11	71
12	92
13	86
14	98
15	83
16	74
17	77
18	85
19	92
20	78

**Tablo:1 Sağlıklı kontrollerde IL-12R $\beta$ 1 ekspresyonu**

Çalışmaya alınan ve daha önce dissemine BCG enfeksiyonu veya diğer non-tüberküloz mikobakteri enfeksiyonu ile başvurmuş ve IL-12R $\beta$ 1 defekti tanısı almış olan 5 hastanın sonuçları tablo 2'de, bu hastaların ebeveynlerine ait çalışma sonuçları ise tablo 3'de verilmiştir.

Hasta No	IL-12R $\beta$ 1 Ekspresyon Yüzdesi(%)
H1	0,51
H2	0,24
H3	0,17
H4	0,65
H5	0,36

**Tablo:2 Moleküler düzeyde IL-12R $\beta$ 1 eksikliği gösterilmiş olan Hastalarda IL-12R $\beta$ 1 ekspresyonu**

Hastaların hepsinde IL-12R $\beta$ 1 ekspresyon yüzdeleri 1'in altında iken bu değerler mutlak taşıyıcı olması beklenen ebeveynlerde ortalama %47 (Değişim sınırları %18-%75) (tablo 3) olarak bulunmuştur.

Ebeveyn No	IL-12R $\beta$ 1 Ekspresyon Yüzdesi (%)
H1 Anne-Baba	65-75
H2 Anne-Baba	19-17
H3 Anne-Baba	66-34
H4 Anne-Baba	22-55
H5 Anne-Baba	63-56

**Tablo:3 Moleküler düzeyde IL-12R $\beta$ 1 eksikliği gösterilmiş olan hastaların ebeveynlerinde IL-12R $\beta$ 1 ekspresyonu**

Mutlak taşıyıcılardaki değerler göz önüne alınarak yapılan ROC eğrisine göre yapılan analizde %76'nın altındaki değerlerin taşıyıcıları belirleyebileceği düşünülmüştür. %70 -%76 arasındaki değerler şüpheli taşıyıcı olarak kabul edilmiştir. Diğer aile bireylerinde elde edilen değerler %14-%96 olup bunlardan 19 kişi taşıyıcı, 10 kişi sağlıklı olarak değerlendirilmiştir.

Hasta No	Kardeş	Annenin Annesi	Annenin Babası	Babanın Annesi	Babanın Babası	Dayı	Teyze	Hala	Amca
H1	17	63	76	66	53	92	29	72 52 96	92
H2	TE	TE	TE	58	23	TE	TE	TE	TE
H3	87	23	42	55	TE	TE	91	49	69 78 23
H4	84	89	33	90	TE	42	71	92	TE
H5	14 68	71	TE	79	48	TE	TE	TE	TE

**Tablo:4 Moleküler düzeyde IL-12R $\beta$ 1 eksikliği gösterilmiş olan Hastaların Diğer Aile Bireylerinde IL-12R $\beta$ 1 Ekspresyonu (%)**

TE: Test Edilmedi

Çalışma süresince bölümümüze dissemine BCG enfeksiyonu ile başvuran 4 hasta ve bu hastalardan 2 kişinin ebeveynlerine ait IL-12R $\beta$ 1 ekspresyon düzey sonuçları tablo 5'te verilmiştir.

	I	II	III	IV
Hasta	84	41	73	91
Anne	NT	NT	NT	86
Baba	90	NT	NT	89

**Tablo:5 Çalışma süresince bölümümüze başvuran IL-12R $\beta$ 1 Defekli olmayan hasta ve ebeveynlerin IL-12R $\beta$ 1 ekspresyon yüzdeleri**

Sağlıklı kontroller çalışılırken farklı günlerde aynı kişilerin değerleri ortalama %93 (%90-%96),%84 (%83-%85) bulunmuştur.

## TARTIŞMA:

Mikobakteriyel enfeksiyonlarda spesifik antijenlerle aktive olmuş T lenfositler ile bu hücrelerin uyardığı makrofajlar arasındaki karşılıklı etkileşim sonucu hücre içi bakterinin ortadan kaldırılması sağlanır. Mikobakteriyel enfeksiyonlara karşı konakçı cevabında bireyler arasındaki farklılığın oluşum mekanizmaları henüz tam olarak bilinmemektedir(2). Ancak IFN $\gamma$  - IL12 makrofaj aktivasyon yolağındaki defektlerin nonpatojen mikobakteriler ve hücre içi mikroorganizmalarla oluşan enfeksiyonlara karşı yatkınlığa yol açtığı gösterilmiştir(5,10).

Bu defektlerden biri IL-12R $\beta$ 1 eksikliğidir . Bu eksiklik IL-12 reseptör düzeyinde cevapsızlığa yol açan, iyi sınırlı granülomlarla karakterize NTM, Salmonella ve BCG enfeksiyonları ile seyreden otozomal resesif geçişli bir hastalıktır(6). Klinik bulguları ve fonksiyonel çalışmalar ile IL12R $\beta$ 1 eksikliği şüphesi olan hastalarda IL12R $\beta$ 1 genindeki mutasyonun gösterilmesi ile kesin tanı konulabilir(12). Ancak pahalı olması, zaman alması nedeniyle tarama testi olarak kullanılması pratik değildir. Klinik özellikleri lenfosit-makrofaj aksisinde defekt olabileceğini düşündüren hastalarda flow sitometrik yöntemin tarama testi olarak kullanılması zaman ve ekonomik yönden daha uygundur.

Bu çalışmada Hacettepe Üniversitesi Çocuk Hastanesi İmmünoloji Ünitesi Laboratuvarı'nda bu yöntemi kurarak IL-12R $\beta$ 1 eksikliği olabilecek hastaları ve aile bireylerini tarama imkanına kavuştuk. Bugüne kadar hücre yüzeyinde IL-12R $\beta$ 1 ekspresyonu olduğu halde bu gende mutasyon bulunan hasta bildirilmemiştir. Bu yöntemle bu grup hastaların tarandığı bir çalışmaya rastlamadık. Çalıştığımız hastalardan beşi *Leiden University Medical Center*'da yapılan fonksiyonel çalışmalar ve mutasyon analizi ile IL-12R $\beta$ 1 eksikliği tanısı almıştı. Çalışmamızda bu hastaların hepsinde flow sitometrik yöntemle IL-12R $\beta$ 1 yüzey ekspresyonunu %1'in altında bulduk. Bu değerler kontrollerde ortalama %71-%98 olarak, mutlak taşıyıcı olması gereken bu hastaların ebeveynlerinde %18-%75 bulunmuştur.

Klinik özellikleri yönünden IL-12R $\beta$ 1 eksikliği düşünülen 4 hasta ve bunlardan ikisinin ebeveynlerinde IL-12R $\beta$ 1 ekspresyon değerleri bir hasta hariç kontrollerde elde edilen değerlerle aynı aralıkta bulundu. Bu hastanın IL-12R $\beta$ 1 değeri (%41) heterozigot aralığında olduğu için daha ileri çalışmalar yapılması planlandı.

Bir kardeşi daha önce homozigot IL-12R $\beta$ 1 eksikliği tanısı almış bir yenidoğanda IL-12R $\beta$ 1 ekspresyonu %84 bulundu. Diğer iki vakanın kardeşlerinde ise bu değer %17 ve %14 olarak bulundu. Böylece birinci çocuk sağlıklı diğer iki çocuğun taşıyıcı olduğu düşünüldü. Yapılan mutasyon analizlerinde de taşıyıcı olduğu düşünülen iki vakanın heterozigot olduğu gösterildi.

Çalışmamızda elde ettiğimiz değerler ROC(*Receiver operating characteristics curve*) eğrisi ile incelendi. Bu analizde IL-12R $\beta$ 1'i taşıyan hücre yüzdesi %1'in altında ise hasta,%76'nın üzerinde ise sağlıklı olarak kabul edilirken;%70'in altında bulunan değerler taşıyıcı olarak kabul edildi. Mutlak taşıyıcı olarak kabul ettiğimiz ebeveynlerden bazılarının değerleri kontrol değerleri ile overlapping gösterdi. Yapılan istatistik analize göre %70-76 arasında olan değerler IL-12R $\beta$ 1 taşıyıcılığı yönünden şüpheli olarak kabul edildi.

Kullandığımız flow sitometrik yöntemde ROC eğrisine göre elde ettiğimiz istatistiksel sonuçlara göre seçicilik(spesifite) %83 iken duyarlılık (sensitivite) %100 bulundu.

IL-12R $\beta$ 1 eksikliği olabileceği düşünülen hastaların tanısı için kullanılabilecek fonksiyonel testler ve mutasyon analizi oldukça pahalı ve zaman alan yöntemler olup, çalışmamızın sonuçları ile hızlı sonuç veren ve maliyeti düşük olan flow sitometrik yöntem duyarlılığı ve seçiciliği yüksek hastaların ve büyük oranda da taşıyıcıların saptanmasında kullanılabilecek bir tarama testi olduğu sonucuna varılmıştır.

## KAYNAKLAR

- 1- Ottenhoff THM, Verreck F, Lichtenauer-Kaligis E, Hoeve MA, Sanal O and van Dissel J.T. Genetics, cytokines and human infectious disease: lessons from weakly pathogenic mycobacteria and salmonellae. *Nat. Genet.* 2002;32:97-105.
- 2- Abbas KA, Lichtman AH and Pober JS. Immunity to Intracellular Bacteria. In: Cellular and Molecular Immunology Abbas KA, Lichtman AH and Pober JS. W.B. Saunders Company: Pennsylvania 1991; ss 305-309.
- 3- Casanova JL. Mendelian susceptibility to mycobacterial infection in man. *Swiss Med Wkly.* 2001;131:445-454
- 4- Lichtenauer-Kaligis E, Boer T, Verreck F, van Voorden S, Hoeve MA, Ersoy F, Tezcan I, van Dissel JT, Sanal O and Ottenhoff THM. Severe *Mycobacterium bovis* BCG infections in a large series of novel IL-12 receptor  $\beta$ 1 deficient patients and evidence for the existence of partial IL-12 receptor  $\beta$ 1 deficiency. *Eur. J. Immunol.* 2003;33:59-69
- 5- Dorman SE, Holland SM. Interferon-Gamma IL-12 Pathway Defects and Human Disease. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2000;11:321-333
- 6- Verhangen C.E, de Boer T, Smits HH, Verreck FAW, Wierenga EA, Kurimoto M, Sanal O, Kroon FP, van Dissel JT, Sinigaglia F and Ottenhoff T.H.M. Residual Type 1 Immunity in Patients Genetically Deficient for Interleukin 12 Receptor  $\beta$ 1 (IL-12R $\beta$ 1): Evidence for an IL-12R $\beta$ 1-independent Pathway of IL-12R Responsiveness in Human T Cells. *J. Exp. Med.* 2000 192;4:517-528
- 7- Uzel G, Frucht DM, Fleisher TA and Holland SM. Detection of Intracellular Phosphorylated STAT-4 by Flow Cytometry. *Clin Immunol* 2001;100:270-276
- 8- Altare F, Durandy A, Lammas D, Emile JF, Lamhamedi S, Le Deist F, Drysdale P, Jouanguy E, Doffinger R, Bernaudin F, Jeppsson O, Gollob JA, Meinel E, Segal AW, Fischer A, Kumararatne D and

- Casanova JL. Impairment of Mycobacterial Immunity in Human Interleukin-12 Receptor Deficiency. *Science*;1998;280:1432-1435.
- 9- Remus N, Reichenbach J, Picard C, Rietschel C, Wood P, Lammas D, Kumararatne D, and Casanova JL. Impaired Interferon Gamma-Mediated Immunity and Susceptibility to Mycobacterial Infection in Childhood. *Pediatr. Res.* 2001;50:8-13
  - 10- Lammas DA, Casanova JL, Kumararatne D. Clinical consequences of Defects in the IL-12-dependent Interferon-Gamma (IFN-gamma) pathway. *Clin Exp Immunol* 2000;121:417-425
  - 11- Emile JF, Patey N, Altere F, Lamhamedi S, Jouanguet E, Boman F, Quillard J, Lecomte-Houcke M, Verola O, Mousnier JF, Dijoud F, Blanche S, Fischer A, Brousse N, Casanova JL. Correlation of Granuloma Structure with Clinical Outcome Defines Two Types of Idiopathic Disseminated BCG Infection. *J Pathol* 1997;181:25-30
  - 12- Marquet S, Schurr E. Genetics of Susceptibility to Infectious Diseases: Tuberculosis and leprosy as Examples. *Drug Metab. Dispos.* 2001;29:479-483
  - 13- Casanova JL and Abel L. Genetic Dissection of Immunity to Mycobacteria: The Human Model. *Annu. Rev. Immunol.* 2002.20:581-620
  - 14- Brown IN, Glynn AA, Plant J. Inbred Mouse Strain Resistance to Mycobacterium Lepraemurium Follows Ity/Lsh Pattern. *Immunology* 1982;47:149-156.
  - 15- Vidal SM, Malo D, Vogan K, Skamene E, Gros P. Natural Resistance to Infection with Intracellular Parasites: Isolation of a Candidate for Bcg. 1993 *Cell* 73:469-456.
  - 16- Cellier M, Gonovani G, Vidal S, Kwan T, Groulx N, Liu J, Sanchez F, Skamene E, Schurr E, Gros P. Human natural resistance-associated macrofaj protein: c DNA cloning, chromosomal mapping, genomic organization, and tissue-specific expression. *J. Exp. Med.* 1994;180:1741-1752.

- 17-Garred P,Harboe M,Oettinger T,Koch C,Svejgaard A. Dual Role of Mannan-Binding Protein in Infections:another case of heterosis? *Eur. J. Immunogenet.* 1994;21:125-131.
- 18-De Vries RR,Mehra NK,Vaidya MC,Gupte MD,Meera Khan P, Van Rood JJ. HLA-linked Control of Susceptibility to tuberculoid Leprosy and Association with HLA-DR types. *Tissue Antigens* 1980;16:294-304.
- 19-Meyer CG,May J,Stark K. Human Leucocyte Antigens in Tuberculosis and Leprosy. *Trends Microbiol.* 1998;6:148-154.
- 20-Roy S,McGuire W,Mascie-Taylor CG,Saha B,Hazra SK,Hill AV,Kwiatkowski D.Tumor Necrosis Factor Promoter Polymorfism and Susceptibility to Lepramatous Leprosy. *J. Infect. Dis.* 1997;176:530-532
- 21-Kindler V,Sappino AP, Grau GE,Piquet PF,Vassalli P. The Inducing Role of Tumor Necrosis Factor in the Development of Bactericidal Granulomas During BCG Infection. *Cell.* 1989;56:731-740
- 22-Goldfeld AE,Delgado JC, Thim S,Bozon MV,Ugliodoro AM,Turbay D,Cohen C.,Yunis EJ. Association of HLA-DQ allele with Clinical Tuberculosis. *JAMA* 1998;279:226-228
- 23- Bacon CM,Petricoin EF 3rd,Ortaldo JR,Rees RC, Lerner AC, Johnston JA,O'Shea JJ. Interleukin 12 Induces Tyrosine Phosphorylation and Activation of STAT4 in Human Lymphocytes. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 1995;92:7307-7311
- 24-Presky DH,Yang HA,Minetti LJ,Chua AO,Nabavi N,Wu CY,Gately MK,Gubler U. Functional Interleukin 12 Receptor Coplex is Composed of Two Beta Type Cytokine Receptor Units. *Proc.Natl.Acad. Sci.USA.* 1996;93:14002-14007
- 25-Trinchieri G.Interleukin 12 and the regulation of IL-12 receptor complex. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1999;238:57-78
- 26- Newport MJ, Huxley CM, Huston BSc,Hawrylowicz CM,Oostra BA,Williamson R,Levin M. A Mutation in the Interferon- $\gamma$ -Receptor

- Gene and Susceptibility to Mycobacterial Infection. *N Engl J Med* 1996; 335:1941-1949.
- 27- Farrar MA, Schreiber RD. The Molecular Cell Biology of Interferon- $\gamma$  and Its Receptor. *Annu Rev Immunol* 1993;11:571-611
- 28- Kotenko SV, Izotava Ls, Pollack BP, Mariano TM, Donnelly RJ, Muthukumaran G, Cook JR, Garotta G, Silvennoinen O, Ihle JN, Pestka S. Interaction Between the Components of the Interferon-gamma and Its Receptor. *J Biol Chem* 1995;270:20915-20921
- 29- Soh J, Donnelly RJ, Kotenko S, Mariano TM, Cook JR, Wang N, Emanuel S, Schwartz B, Miki T, Pestka S. Identification and Sequence of an Accessory Factor Required for Activation of the Human Interferon- $\gamma$  Receptor. *Cell*. 1994;76:793-802
- 30- Allende LM, Lopez-Goyanes A, Paz-Artal E, Corell A, Garcia-Perez MA, Varela P, Scarpellini A, Negreira S. A Point mutation in a Domain of Gamma Interferon Receptor 1 Provokes Severe Immunodeficiency. *Clin. Dagn. Lab. Immunol.* 2001;8:133-137
- 31- Jouanguy E., Altare F., Lamhamedi-Cherradi S., Casanova JL., Infections in IFNGR-1 deficient children. *J. Interferon. Cytokine Res.* 1997 17:583-87.
- 32- Jouanguy E, Dupuis S, Pallier A, Doffinger R, Fondaneche MC, Fieschi C, Lamhamedi-Cherradi S, Altare F, Emile JF, Lutz P, Bordigoni P, Cokugras H, Akcakaya N, Landman-Parker J, Donnadieu J, Camcioğlu Y, Casanova JL. In a Novel Form of Complete IFN $\gamma$ R1 Deficiency, Cell-Surface Receptors Fail to Bind IFN $\gamma$ . *J. Clin. Invest.* 2000;105:1429-1436
- 33- Jouanguy E, Lamhamedi-Cherradi S, Altare F, Fondaneche MC, Tuerlinckx D, Blanche S, Emile JF, Gaillard JL, Schreiber R, Levin M, Fischer A, Hivroz C and Casanova JL. Partial Interferon-Gamma receptor Deficiency in a Child with Tuberculoid Bacillus Calmette-Guérin Infection and a Sibling with Clinical Tuberculosis. *J Clin Invest.* 1997;100:2658-2664

- 34-Doffinger R,Jouanguy E,Dupuis S,Fondaneche MC,Stephan JL, Emile JF,Lamhamedi-Cherradi S,Altare F,Pallier A, Barcenas-Morales G,Meinl E,Krause C,Pestka S,Sreiber RD,Novelli F, Casanova JL. Partial Interferon Gamma Receptor Signalling Chain Deficiency in a Patient with Bacille Calmette- Guérin and Mycobacterium abscessus Infection. *J Infect Dis.* 2000;181:379-384
- 35-Jouanguy E,Lamhamedi-Cherradi S,Lammas D, Dorman SE, Fondaneche MC, Dupuis S,Doffinger R,Altare F,Girdlestone J, Emile JF,Ducoulombier H,Edgar D, Clarke J,Oxelius VA, Brai M,Novelli V,Heyne K,Fischer A,Holland SM, Kumararatne DS, Schreiber RD,Casanova JL. A human IFNGR1 Small Deletion Hotspot Associated with Dominant Susceptibility to Mycobacterial Infection. *Nat.Genet.* 1999;21:370-378
- 36- Dupuis S, Doffinger R,Picard C,Fieschi C,Altare F,Jouanguy E, Abel L, Casanova JL. Human Interferon-Gamma-Mediated Immunity is a Genetically Controlled Continuous Trait that Determines the Outcome of mycobacterial Invasion. *Immunol Rev.* 2000;178:129-137
- 37-Altare F, Lammas D, Revy P, Jouanguy E, Doffinger R, Lamhamedi S, Drysdale P, Scheel-Toellner D, Girdlestone J, Darbyshire P, Wadhwa M, Dockrell H, Salmon M, Fischer A, Durandy A, Casanova JL, Kumararatne DS. Inherited Interleukin 12 Deficiency in a Child with Bacille Calmette-Guérin and Salmonella enteritidis Disseminated Infection. *J Clin Invest* 1998;102:2035-2040.