

Uniwersytet Jagielloński  
Collegium Medicum  
Wydział Lekarski

Marzena Lenart

ANALIZA SEKWENCJI GENU KODUJĄCEGO RECEPTOR  
CD16A W ASPEKCIE DEFEKTU EPITOPU B73.1/LEU11C  
U CHORYCH Z WYBRANYMI PIERWOTNYMI NIEDOBORAMI  
ODPORNOŚCI

*Praca doktorska*

Promotor: Dr hab. med. Maciej Siedlar, prof. UJ

Pracę wykonano w Zakładzie Immunologii Klinicznej Katedry  
Immunologii Klinicznej i Transplantologii Collegium Medicum  
Uniwersytetu Jagiellońskiego  
Kierownik jednostki: Dr hab. med. Maciej Siedlar, prof. UJ

Kraków 2011

*Badania w niniejszej pracy wykonano w ramach realizacji projektu badawczego MSWiN  
nr N407 082 32/3220.*

*Pragnę szczególnie podziękować  
Panu Profesorowi Maciejowi Siedlarowi  
za opiekę naukową, bezcenne rady i wskazówki  
oraz poświęcony czas.*

*Dziękuję również wszystkim pracownikom  
Katedry Immunologii Klinicznej i Transplantologii  
za okazana życzliwość w trakcie prowadzenia badań.*

*Dziękuję Rodzicom oraz Darkowi  
za miłość i wiarę we mnie.*

# Spis treści

<b>1 WPROWADZENIE .....</b>	<b>9</b>
1.1 RECEPTOR CD16 .....	9
1.1.1 Budowa receptora CD16.....	9
1.1.2 Przekazywanie sygnału z receptora CD16.....	10
1.1.3 Epitopy receptora CD16.....	11
1.1.4 Gen kodujący receptor CD16 oraz jego polimorfizmy.....	11
1.1.4.1 Polimorfizmy genu FcγRIIIa.....	12
1.1.4.2 Polimorfizmy genu FcγRIIIb .....	15
1.2 POLIMORFIZMY GENU KODUJĄCEGO CD16A O ZNACZENIU KLINICZNYM.....	17
1.2.1 Polimorfizm L48R/H.....	17
1.2.2 Polimorfizm F158V.....	18
1.3 SUBPOPULACJE LEUKOCYTÓW KRWI OBWODOWEJ WYKAZUJĄCE EKSPRESJĘ RECEPTORA CD16A .....	20
1.3.1 Komórki NK .....	20
1.3.2 Monocyty CD14 <sup>+</sup> CD16 <sup>++</sup> .....	21
1.4 ZABURZENIA DOTYCZĄCE LICZEBNOŚCI I/LUB FUNKCJI KOMÓREK NK ORAZ MONOCYTÓW CD14 <sup>+</sup> CD16 <sup>++</sup> W WYBRANYCH STANACH CHOROBYCH .....	22
1.4.1 Komórki NK .....	22
1.4.2 Monocyty CD14 <sup>+</sup> CD16 <sup>++</sup> .....	23
1.5 PIERWOTNE NIEDOBORY ODPORNOŚCI .....	24
1.5.1 Charakterystyka wybranych pierwotnych niedoborów odporności humoralnej .....	24
1.5.1.1 Agammaglobulinemia sprzężona z chromosomem X (X-linked agammaglobulinemia; XLA).....	24
1.5.1.2 Pospolity zmienny niedobór odporności (common variable immunodeficiency; CVID) .....	25
1.5.1.3 Hipogammaglobulinemia z grasiczakiem (zespół Good'a) .....	25
1.5.1.4 Izolowany niedobór IgA (selective IgA deficiency; SIgAD).....	26
1.5.1.5 Przejściowa hipogammaglobulinemia wieku dziecięcego (transient hypogammaglobulinemia of infancy; THI).....	26
1.5.1.6 Niedobór podklas IgG .....	26
1.5.1.7 Zespół hiper-IgM.....	27
1.5.1.8 Hipogammaglobulinemia o nieznannej etiologii.....	27
1.5.1.9 Zespół DiGeorge'a.....	28
1.5.2 Defekty komórek NK (CD16a <sup>+</sup> ) związane z pierwotnymi niedoborami odporności .....	28
1.6 PODSUMOWANIE .....	30
<b>2 CELE PRACY .....</b>	<b>32</b>
2.1 CELE OGÓLNE .....	32
2.2 CELE SZCZEGÓŁOWE.....	32

<b>3 MATERIAŁY I METODY .....</b>	<b>33</b>
3.1 PACJENCI I GRUPA KONTROLNA .....	33
3.2 OCENA OBECNOŚCI EPITOPU B73.1/LEU11C RECEPTORA CD16A NA KOMÓRKACH NK ORAZ MONOCYTACH KRWI OBWODOWEJ .....	36
3.3 ANALIZA SEKWENCJI GENU <i>FcγRIIIA</i> KODUJĄCEGO RECEPTOR CD16A .....	37
3.3.1 Izolacja DNA.....	37
3.3.2 Łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR) .....	37
3.3.3 Elektroforeza produktów reakcji PCR.....	40
3.3.4 Oczyszczanie produktów PCR.....	40
3.3.5 Sekwencyjny PCR .....	41
3.3.6 Precypitacja produktów sekwencyjnego PCR .....	42
3.3.7 Sekwencjonowanie DNA .....	42
3.3.8 Analiza statystyczna wyników .....	42
<b>4 WYNIKI .....</b>	<b>43</b>
4.1 ANALIZA EKSPRESJI CD16A I JEGO EPITOPÓW NA KOMÓRKACH NK ORAZ MONOCYTACH .....	43
4.2 ANALIZA SEKWENCJI GENU <i>FcγRIIIA</i> .....	49
4.2.1 Analiza polimorfizmu L48R/H i jego związku z defektem epitopu B73.1/Leu11c....	50
4.2.2 Inne wykryte polimorfizmy genu <i>FcγRIIIa</i> .....	51
4.2.2.1 Polimorfizm F158V .....	51
4.2.2.2 Polimorfizmy wykryte w obrębie egzonu 3 .....	52
4.2.2.2.1 Polimorfizm R18S.....	52
4.2.2.2.2 Polimorfizm L20L .....	53
4.2.2.2.3 Polimorfizm S47N .....	54
4.2.2.2.4 Polimorfizm D64N.....	55
4.2.2.2.5 Polimorfizm I88V .....	56
4.2.2.3 Polimorfizmy wykryte w obrębie egzonu 4 .....	57
4.2.2.3.1 Polimorfizm G129D.....	57
4.2.2.3.2 Polimorfizm Y137H .....	58
4.2.2.3.3 Polimorfizm D148D.....	59
<b>5 DYSKUSJA .....</b>	<b>61</b>
<b>6 WNIOSKI.....</b>	<b>71</b>
<b>7 STRESZCZENIE .....</b>	<b>73</b>
<b>8 ABSTRACT.....</b>	<b>74</b>
<b>9 PIŚMIENNICTWO .....</b>	<b>75</b>

## WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

ADCC	( <i>antibody dependent cellular cytotoxicity</i> ) – cytotoksyczność komórkowa zależna od przeciwciał
AID	( <i>activation-induced cytidine deaminase</i> ) – indukowana aktywacją deaminaza cytydyny
-APC	( <i>allophycocyanin</i> ) – alofikocyjanina, fluorofor
Btk	( <i>Bruton's tyrosine kinase</i> ) – kinaza tyrozynowa Brutona
CD	( <i>cluster of differentiation</i> ) – antygen różnicowania
CMV	( <i>cytomegalovirus</i> ) – wirus cytomegalii
CVID	( <i>common variable immunodeficiency</i> ) – pospolity zmienny niedobór odporności
dNTP	mieszanina trifosforanów deoksyrybonukleotydów (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)
EBV	( <i>Epstein-Barr virus</i> ) – wirus Epsteina-Barr
EDTA	( <i>ethylenediaminetetraacetate</i> ) – kwas etylenodiaminotetraoctowy
FcR	( <i>Fc receptor</i> ) – receptor dla fragmentu Fc immunoglobulin
-FITC	( <i>fluorescein isothiocyanate</i> ) – izotiocyjanian fluoresceiny, fluorofor
FSC	( <i>forward scatter</i> ) – przedni detektor światła rozproszonego, umożliwia analizę komórek pod względem ich wielkości
GPI	( <i>glycosylphosphatidylinositol</i> ) – glikozylofosfatydyloinozytol
HIV	( <i>human immunodeficiency virus</i> ) – ludzki wirus niedoboru odporności
HLA	( <i>human leukocyte antigen</i> ) – ludzki antygen leukocytarny
HSV	( <i>herpes simplex virus</i> ) – wirus opryszczki pospolitej
IFN- $\gamma$	interferon $\gamma$
IL	inteleukina
ITAM	( <i>immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i> ) – aktywujące motywy immunoreceptorowe oparte na tyrozynie
KIRs	( <i>killer Ig-like receptors</i> ) – receptory komórek NK z nadrodziny cząsteczek Ig-podobnych
mAb	( <i>monoclonal antibody</i> ) – przeciwciało monoklonalne
MHC	( <i>major histocompatibility complex</i> ) – główny układ zgodności tkankowej
MIP-1 $\alpha$	( <i>macrophage inflammatory protein 1<math>\alpha</math></i> ) – białko zapalne makrofagów 1 $\alpha$
NK	( <i>natural killer</i> ) – komórka NK, naturalna komórka cytotoksyczna
LPS	lipopolisacharyd
PBS	( <i>phosphate buffer saline</i> ) – bufor fosforanowy

-PE	( <i>phycoerythrin</i> ) – fikoerytryna, fluorofor
-PerCP	( <i>peridinin chlorophyll protein</i> ) – peridina-chlorofil, fluorofor
PI3K	( <i>phosphatidylinositol 3-kinases</i> ) – kinaza fosfatydyloinozytolu
PLC- $\gamma$	( <i>phospholipase C <math>\gamma</math></i> ) – fosfolipaza C $\gamma$
sIgAD	( <i>selective IgA deficiency</i> ) – izolowany niedobór IgA
SNP	( <i>single-nucleotide polymorphism</i> ) – polimorfizm pojedynczego nukleotydu
Src	kinaza tyrozynowa
SSC	( <i>side scatter</i> ) – boczny detektor światła rozproszonego, umożliwia analizę komórek pod względem ich ziarnistości
TAE	( <i>Tris-acetate-EDTA</i> ) – bufor octanowy
THI	( <i>transient hypogammaglobulinemia of infancy</i> ) – przejściowa hipogammaglobulinemia wieku dziecięcego
TLRs	( <i>Toll-like receptors</i> ) – receptory Toll-podobne
TNF- $\alpha$	( <i>tumor necrosis factor <math>\alpha</math></i> ) – czynnik martwicy nowotworów $\alpha$
TRAIL	( <i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i> ) – ligand czynnika martwicy nowotworu indukujący apoptozę
UNG	( <i>uracilo-DNA glycosylase</i> ) – glikozylaza uracylo-DNA
VZV	( <i>varicella zoster virus</i> ) – wirus ospy wietrznej i półpaśca
XHIM	( <i>X-linked hyper-IgM syndrome</i> ) – zespół hiper-IgM sprzężony z chromosomem X
XLA	( <i>X-linked agammaglobulinemia</i> ) – agammaglobulinemia sprzężona z chromosomem X



# 1 WPROWADZENIE

## 1.1 Receptor CD16

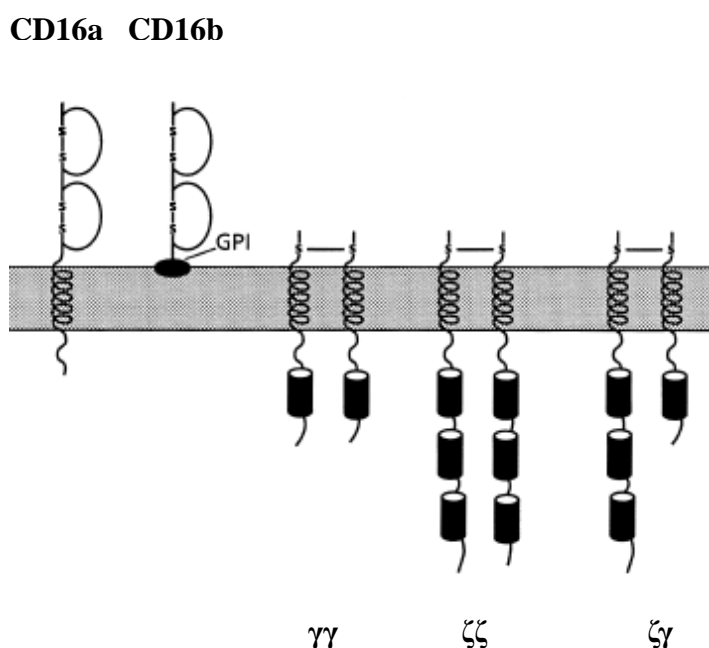
Receptory wiążące fragmenty Fc immunoglobulin (FcR) występują na powierzchni wszystkich komórek układu odpornościowego. Opisano receptory FcR swoiste względem wszystkich klas immunoglobulin: FcR wiążące fragmenty Fc immunoglobuliny IgA (FcαR), IgD (FcδR), IgE (FcεR), IgM (FcμG) oraz IgG (FcγR) [1].

Rodzina receptorów FcγR obejmuje trzy klasy: FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) oraz FcγRIII (CD16) różniące się pod względem powinowactwa do IgG oraz siły wiązania poszczególnych podklas IgG1-4 [2-4]. Receptor CD16 występuje w dwóch izoformach: CD16a (FcγRIIIa) na powierzchni komórek NK, monocytów i makrofagów oraz CD16b (FcγRIIIb) ulegający ekspresji na neutrofilach [5]. Różnorodność budowy cząsteczek receptorów FcγR jest odpowiedzialna za różnice w pełnionych przez nie funkcjach biologicznych. Funkcje te są często także zależne od typów komórek, na których występują poszczególne FcγR. Należy zaznaczyć, iż cząsteczka CD16 jest zasadniczym receptorem biorącym udział w procesie cytotoxyczności komórkowej zależnej od przeciwciał (antibody-dependent cell cytotoxicity, ADCC) [6-8].

### 1.1.1 Budowa receptora CD16

Cząsteczka CD16, FcγRIII, jest wysoko glikozylowanym białkiem powierzchniowym o masie cząsteczkowej 50-80 kDa, zbudowanym z jednego łańcucha aminokwasowego jednokrotnie przechodzącego przez błonę komórkową. Cząsteczka receptora składa się z części zewnątrzkomórkowej, transbłonowej i cytoplazmatycznej (CD16a), bądź jedynie z części zewnątrzkomórkowej (CD16b). Fragmenty zewnątrzkomórkowe obu podtypów receptorów są niemal identyczne, różniąc się jedynie pojedynczymi aminokwasami. Skutkuje to różnymi modyfikacjami posttranslacyjnymi, takimi jak N-glikozylacja, jakim ulegają cząsteczki tych białek [5]. Część zewnątrzkomórkowa receptora składa się z dwóch domen Ig-podobnych, proksymalnej i dystalnej względem błony komórkowej, z których każda zawiera siedem anty-równoległych harmonijek  $\beta$  połączonych pętlami [9]. Miejsce wiązania fragmentu Fc immunoglobulin znajduje się w obrębie domeny proksymalnej receptora [10,11]. Receptor CD16 wykazuje relatywnie niskie powinowactwo wobec swych ligandów, do których należą głównie immunoglobuliny podklas IgG1 oraz IgG3 [3].

Pomimo znacznego podobieństwa sekwencji białkowej receptorów CD16a i CD16b, sposób ich zakotwiczenia w błonie komórkowej jest różny. Część zewnątrzkomórkowa białka CD16b jest zakotwiczona w błonie poprzez połączenie z glikozylfosfatydyloinozytolem (GPI) z udziałem seryny 185. Połączenie białka z GPI ma miejsce w retikulum endoplazmatycznym, gdzie z prekursora łańcucha białkowego CD16b odcinany jest fragment transbłonowy oraz cytoplazmatyczny. Natomiast, obecność fenyloalaniny w pozycji 185 w cząsteczce CD16a powoduje, że receptor ten jest białkiem transbłonowym, z 25-aminokwasowym fragmentem cytoplazmatycznym [2,3,4]. Łańcuch ten do stabilnej ekspresji błonowej wymaga stworzenia kompleksu, w skład którego wchodzi ponadto dwa łańcuchy białek  $\gamma$  lub  $\zeta$ . Biorą one również udział w tworzeniu kompleksu CD3 receptora limfocytów T. Z białkiem Fc $\gamma$ RIIIa łączą się one w postaci homodimerów  $\gamma\gamma$  lub  $\zeta\zeta$ , rzadziej heterodimeru  $\gamma\zeta$  [2-4,12,13]. Budowę receptora CD16 przedstawiono na Rys1.



Rys.1. Budowa receptora CD16a oraz CD16b [14].

### 1.1.2 Przekazywanie sygnału z receptora CD16

Sposób ekspresji błonowej białek CD16a i CD16b ma wpływ na sposób przekazywania sygnału z tych receptorów do wnętrza komórki. Związane z receptorem CD16a łańcuchy  $\gamma$  i/lub  $\zeta$  zawierają sekwencje ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motives), które ulegają fosforylacji w następstwie jego aktywacji, po związaniu odpowiedniego ligandu.

Fosforylacja sekwencji ITAM prowadzi do aktywacji szeregu cytoplazmatycznych kinaz tyrozynowych, w tym kinaz z rodziny Src, PI3K, PLC- $\gamma$ , Btk [15-17].

Przekazywanie sygnału z receptora CD16b także jest związane z aktywacją kinaz tyrozynowych. Jednak z powodu zakotwiczenia w błonie poprzez połączenie z cząsteczką GPI, nie wiąże się on z wewnątrzkomórkowymi białkami zawierającymi motywy sygnałowe, lecz bezpośrednio asocjuje z kinazami Src zakotwiczonymi w błonie komórkowej [18].

### **1.1.3 Epitopy receptora CD16**

Dotychczas poznano wiele epitopów białka CD16. Ich znakowanie przy pomocy przeciwciał monoklonalnych (mAb) stosuje się do oceny poziomu ekspresji cząsteczki CD16 na powierzchni komórek układu odpornościowego. Nazwy epitopów pochodzą od poszczególnych klonów mAb, które je rozpoznają. Przeciwciała anti-CD16 mogą wiązać się do epitopów zlokalizowanych w obrębie domeny dystalnej receptora, np. B73.1/Leu11c (najczęściej używane w rutynowej diagnostyce immunologicznej), GRM1, PEN1, BW209/2; lub w obrębie domeny proksymalnej – 3G8, CLBFCRgran1, MEM-154 oraz NKP1/Leu11a [19,20].

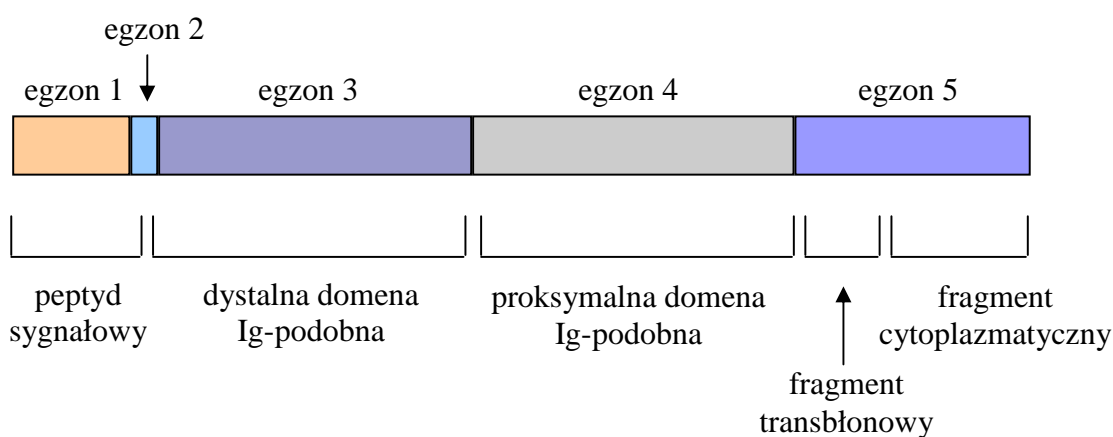
### **1.1.4 Gen kodujący receptor CD16 oraz jego polimorfizmy**

Geny dla receptorów CD16a i CD16b, odpowiednio *Fc $\gamma$ RIIIa* i *Fc $\gamma$ RIIIb*, położone są na długim ramieniu chromosomu 1, w relatywnie bliskiej od siebie odległości [21]. Sekwencje obu genów są identyczne w 97%, zarówno w zakresie sekwencji kodujących oba białka, jak i sekwencji flankujących [5,22]. Wysokie podobieństwo genów *Fc $\gamma$ RIIIa* i *Fc $\gamma$ RIIIb* spowodowane jest ich powstaniem w wyniku duplikacji genu wyjściowego [23,24]. Geny te wykazują także wariację liczby kopii (copy number variation, CNV), czyli mogą występować

w odmiennej liczbie kopii u różnych osób w populacji [24-28]. Najczęściej występują po dwie kopie każdego z genów [26].

Geny *Fc $\gamma$ RIIIa* i *Fc $\gamma$ RIIIb* składają się z pięciu egzonów [21]. Egzon 1 oraz fragment egzonu 2 kodują 17-sto aminokwasową sekwencję sygnałową oznaczającą, iż łańcuch ten jest „przewidziany” w aspekcie umiejscowienia, jako białko błonowe. Jest ona następnie odcinana

w świetle retikulum endoplazmatycznego. Egzony 3 i 4 kodują zewnątrzkomórkowe domeny Ig-podobne, natomiast egzon 5 koduje fragment transbłonowy oraz cytoplazmatyczny białkowego łańcucha receptora - w przypadku CD16a, lub fragment kotwiczący białko w błonie komórkowej – w przypadku CD16b [29]. Schemat genu *FcγRIIIa* przedstawiono na Rysunku 2. Stąd też, powszechnie stosuje się numerację nukleotydów oraz kodowanych przez nie aminokwasów, w której pierwszy nukleotyd kodonu kodującego pierwszy aminokwas pierwszej domeny zewnątrzkomórkowej ustala się jako nukleotyd numer 1.



Rys. 2. Schemat genu *FcγRIIIa* wraz z kodowanymi przez niego fragmentami białka.

#### 1.1.4.1 Polimorfizmy genu *FcγRIIIa*

Dotychczas opisano 19 polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (single-nucleotide polymorphism, SNP) genu *FcγRIIIa* (Entrez Gene; ID genu *FcγRIIIa* – 2214).

W obrębie egzonu 1 opisano jeden polimorfizm A9T zlokalizowany w kodonie 9 sekwencji sygnałowej i wynikający z zamiany nukleotydu 25 z G w kodonie GCT kodującym alaninę (A) na A tworząc kodon ACT kodujący treoninę (T).

W obrębie egzonu 2 nie opisano żadnych polimorfizmów.

W egzonie 3 kodującym dystalną domenę Ig-podobną receptora opisano dotychczas dziesięć polimorfizmów. Polimorfizmy te scharakteryzowano w Tabeli 1.

Tab. 1. Charakterystyka polimorfizmów egzonu 3.

Polimorfizm	Pozycja nukleotydowa	Zmiana nukleotydu	Zmiana aminokwasu
V9E	29	G <b>T</b> G → G <b>A</b> G	walina → glutamina
E13D	43	G <b>A</b> G → G <b>A</b> C	glutamina → kwas asparaginowy
R18S	107	A <b>G</b> G → A <b>G</b> C	arginina → seryna
L20L	114	C <b>T</b> C → C <b>T</b> T	brak zmiany (leucyna)
S47N	227	A <b>G</b> C → A <b>A</b> C	seryna → asparagina
L48R/H	230	C <b>T</b> C → C <b>A</b> C C <b>T</b> C → C <b>G</b> C	leucyna → histydyna leucyna → arginina
A60D	266	G <b>C</b> T → G <b>A</b> T	alanina → kwas asparaginowy
V63R	267	G <b>T</b> C → G <b>T</b> T	walina → arginina
D64N	274	G <b>A</b> C → A <b>A</b> C	kwas asparaginowy → asparagina
I88V	346	A <b>T</b> C → G <b>T</b> C	izoleucyna → walina

Najważniejszym i najczęściej opisywanym polimorfizmem występującym w obrębie egzonu 3 jest trialleliczny polimorfizm L48R/H polegający na substytucji nukleotydu T w miejscu 230 przez A lub G [30], skutkującej zamianą leucyny (L) na argininę (R) lub histydyne (H). Polimorfizm ten w wielu pracach określa się mianem mutacji (rzadko występującej zmiany) korelując obecność izoform FcγRIIIa-48R lub -48H z defektem funkcjonalnym komórek NK polegającym na zwiększonej podatności na nawracające zakażenia wirusowe [20,31-33]. Jednakże wiele prac opisuje wspomniany polimorfizm, jako naturalnie występujący SNP [30,34,35], występujący u zdrowych osób rasy kaukaskiej z częstotliwością 14% (48R – 6%, 48H – 8%). [30].

W obrębie egzonu 4, kodującego proksymalną domenę Ig-podobną receptora, opisano dotychczas cztery polimorfizmy, scharakteryzowane w Tabeli 2.

Tab. 2. Charakterystyka polimorfizmów egzonu 4.

Polimorfizm	Pozycja nukleotydowa	Zmiana nukleotydu	Zmiana aminokwasu
G129D	440	GGC → GAC	arginina → kwas asparaginowy
Y137H	472	TAC → CAC	tyrozyna → histydyna
D148D	498	GAC → GAT	brak zmiany (kwas asparaginowy)
F158V	526	TTT → GTT	fenyloalanina → walina

Najważniejszym polimorfizmem zlokalizowanym w egzonie 4 jest polimorfizm 526 nukleotydu, polegający na zmianie fenyloalaniny (F) na walinę (V), tj. polimorfizm F158V. Aminokwas 158 jest zlokalizowany w obrębie domeny receptora wiążącej ligand – IgG. Dowiedziono, że polimorfizm ten wpływa na zdolności wiązania cząsteczek IgG przez FcγR [10]. Korelowano asocjacje występowania aminokwasu 48 z aminokwasem 158 sugerując, iż izoforma 48L występuje wraz z aminokwasem 158F, natomiast 48R lub 48H z 158V [30,36]. W populacji ludzkiej wariant 158V/V opisuje się u 10-20%, 158F/F u 40-50%, a heterozygotyczny fenotyp 158F/V u około 45% osób [14,37-40].

W obrębie egzonu 5, kodującego fragment transbłonowy oraz cytoplazmatyczny receptora, opisano dotychczas cztery polimorfizmy, scharakteryzowane w Tabeli 3.

Tab. 3. Charakterystyka polimorfizmów egzonu 5.

Polimorfizm	Pozycja nukleotydowa	Zmiana nukleotydu	Zmiana aminokwasu
A177S	584	GCA → TCA	alanina → seryna
F185S	609	TTT → TCT	fenyloalanina → seryna
R216*	702	CGA → TGA	arginina → kodon stop
F227L	735	TTT → CTT	fenyloalanina → leucyna

### 1.1.4.2 Polimorfizmy genu *FcγRIIb*

Sekwencja genu *FcγRIIb*, kodującego cząsteczkę CD16b, wykazuje wysokie podobieństwo do sekwencji genu *FcγRIIIa*. W obrębie sekwencji kodującej białko, różnią się one jedynie pojedynczymi nukleotydami. W odniesieniu do genu *FcγRIIb* opisano 11 SNP (Entrez Gene; ID genu *FcγRIIb* – 2215). Kilka z tych polimorfizmów jest dokładnie takich samych, jak w przypadku genu *FcγRIIIa* i polega na takiej samej zmianie nukleotydowej. Dotyczy to następujących polimorfizmów: L20L, A60D, I88V, A177S. Pozostałe 6 polimorfizmów genu *FcγRIIb* jest dokładną odwrotnością odpowiednich polimorfizmów genu *FcγRIIIa*. Polimorfizmy te przedstawiono w Tabeli 4, porównując je do polimorfizmów genu *FcγRIIIa*.

Tab. 4. Wybrane polimorfizmy genu *FcγRIIb* w porównaniu do polimorfizmów genu *FcγRIIIa*.

Polimorfizm genu <i>FcγRIIb</i> (pozycja nukleotydu i jego zmiana)	Polimorfizm genu <i>FcγRIIIa</i> (pozycja nukleotydu i jego zmiana)
S18R (107; AGC → AGG)	R18S (107; AGG → AGC)
N47S (227; AAC → AGC)	S47N (227; AGC → AAC)
N64D (274; AAC → GAC)	D64N (274; GAC → AAC)
D129G (440; GAC → GGC)	G129D (440; GGC → GAC)
H137Y (472; CAC → TAC)	Y137H (472; TAC → CAC)
D148D (498; GAT → GAC)	D148D (498; GAC → GAT)

Jedynie jeden polimorfizm genu *FcγRIIb* występuje w miejscu, w którym nie wykrywa się żadnej zmiany w genie *FcγRIIIa*. Polimorfizm ten, P139P, występuje w piątym egzonie i polega na zmianie nukleotydu 480 z A na G, nie zmienia to jednak kodowanego aminokwasu.

W przypadku kilku nukleotydów, które w genie *FcγRIIIa* są polimorficzne, w genie *FcγRIIb* nie wykrywa się żadnej zmiany. Dla przykładu, w miejscu nukleotydu 230, gdzie w genie

*FcγRIIIa* obserwuje się trialleliczny polimorfizm L48R/H, w genie *FcγRIIIb* obserwuje się obecność T, wchodzącej w skład kodonu dla L. Natomiast w miejscu 526 (polimorfizm F158V w genie *FcγRIIIa*) obserwuje się G, co w rezultacie powoduje ekspresję V, obecność której w białku CD16a jest wynikiem zmiany polimorficznej.



## 1.2 Polimorfizmy genu kodującego CD16a o znaczeniu klinicznym

Zmiany w budowie receptora CD16a mogą wpływać na jego właściwości i funkcje. Opisane dotychczas zmiany w budowie CD16a związane są z polimorfizmami genu *FcγRIIIa*. Polimorfizmy te mogą wpływać na podatność na infekcje lub przebieg zakażeń, predysponować do występowania niektórych chorób lub mieć wpływ na skuteczność terapii biologicznych.

### 1.2.1 Polimorfizm L48R/H

Trialleliczny polimorfizm *FcγRIIIa*-48L/R/H został powiązany ze zwiększoną podatnością na zakażenia wirusowe. Aminokwas 48 zlokalizowany jest w obrębie dystalnej domeny Ig-podobnej i nie uczestniczy w wiązaniu ligandu. Jednocześnie aminokwas ten wchodzi w skład epitopu rozpoznawanego przez mAb anti-CD16 klonu B73.1/Leu11c, stąd zmiana tego aminokwasu zaburza wiązanie mAb wspomnianego klonu uniemożliwiając detekcję receptora CD16 przy pomocy tego konkretnego mAb [19,20,30-33].

Defekt epitopu B73.1/Leu11c opisano łącznie u ośmiorga dzieci [20,31-33], u których obserwowano komórki NK o prawidłowej ekspresji cząsteczek CD16a potwierdzonej znakowaniem z zastosowaniem kilku innych rodzajów mAbs, jednak nie wykrywanych przez mAb klonu B73.1/Leu11c. Odsetek komórek NK, oznaczony z zastosowaniem innych klonów przeciwciał anti-CD16, był u wszystkich pacjentów prawidłowy. U dwojga z nich opisano obniżoną cytotoksyczność komórek NK względem komórek białaczkowych linii K562, przy jednoczesnej prawidłowej reakcji ADCC. Wspomniani pacjenci cierpieli na nawracające zakażenia wirusowe dróg oddechowych, jednakże charakterystyczne były nawracające i ciężkie infekcje wirusami z rodziny *Herpesviridae*, głównie wirusem ospy wietrznej i półpaśca (VZV), wirusem opryszczki pospolitej (HSV) oraz wirusem Epsteina-Barr (EBV). U pacjentów tych wykluczono znane pierwotne niedobory odporności. U jednego dziecka stwierdzono nieokreśloną hipogammaglobulinemię [32]. U pięciorga dzieci przeprowadzono analizę sekwencji genu *FcγRIIIa* [20,31] lub cDNA tego białka [32] stwierdzając substytucję leucyny histydyną w miejscu 48 białka CD16a (*FcγRIIIa*-48H/H). U pozostałych nie wykonano badań sekwencji genu kodującego *FcγRIIIa*. Doniesienia te sprawiły, iż defekt epitopu B73.1/Leu11c zdefiniowano jako niedobór odporności związany z defektem funkcjonalnym komórek NK, wspominając go w szeregu zestawień dotyczących pierwotnych niedoborów odporności [41-43].

Równolegle opublikowano szereg prac, w których zmianę aminokwasu 48 z L na H lub R uznano za naturalnie występujący w populacji ludzkiej SNP [30,34,35].

### **1.2.2 Polimorfizm F158V**

Najczęściej badanym polimorfizmem jest SNP F158V. Aminokwas 158 wchodzi w skład epitopu biorącego udział w wiązaniu IgG. Dowiedziono, że IgG-zależna cytotoksyczność komórek NK oraz monocytów jest inna u osób z fenotypem FcγRIIIa-158V/V, niż z FcγRIIIa-158F/F, w związku z wyższym powinowactwem izoformy V/V do wiązania podklas IgG1, IgG3 oraz IgG4 [44,45]. Dlatego też, polimorfizm F158V może pozostawać w związku z poziomem aktywacji komórek układu odpornościowego w różnorodnych schorzeniach, w których istotną rolę odgrywają oddziaływania FcγR z IgG, w tym na przebieg zakażeń lub skuteczność terapii biologicznych.

Polimorfizm ten może mieć wpływ na skuteczność terapii z zastosowaniem przeciwciał monoklonalnych. Dla przykładu, chorzy, u których występuje izoforma 158V/V (o wyższym powinowactwie wobec ligandu), ewentualnie heterozygotyczny wariant 158F/V, lepiej odpowiadają na terapię przeciwciałem monoklonalnym anti-CD20 niż osoby, u których wykryto izoformę 158F/F, o niższym powinowactwie [34,46,47].

Ponadto, różna zdolność do wiązania ligandów przez izoformy 158F lub V może predysponować do wystąpienia różnych chorób, głównie autoimmunizacyjnych. Występowanie F w miejscu 158, obniżające powinowactwo receptora wobec IgG, może wpływać na obniżenie wydajności usuwania krążących kompleksów immunologicznych, które odkładając się w tkankach mogą zapoczątkować lub nasilać miejscowy stan zapalny. Wariant o wysokim powinowactwie - 158V/V silniej aktywuje komórki wykazujące ekspresję receptora CD16a, co może prowadzić do przewlekłych stanów zapalnych [48,49,50]. Natomiast forma heterozygotyczna 158F/V wydaje się być funkcjonalnie bardziej zbliżona do wariantu homozygotycznego 158V/V [40].

Związek genotypu FcγRIIIa-158 z ryzykiem wystąpienia konkretnej choroby często zależy od badanej populacji ludzkiej. Zwiększoną częstotliwość występowania izoformy 158V/V obserwowano u osób rasy kaukaskiej z reumatoidalnym zapaleniem stawów [51,52], natomiast w populacji azjatyckiej nie opisano tej zależności [53]. Wariant 158V/V wiązano także, na podstawie badań prowadzonych pośród populacji duńskiej, z występowaniem miopatii autoimmunizacyjnych [54]. Izofornę 158F/F obserwowano natomiast częściej u osób z toczniem rumieniowatym układowym [36,45,55,56]. Heterozygotyczny wariant 158F/V wykrywano częściej u dzieci z immunologiczną płamicą małopłytkową [57].

Polimorfizm F158V, z racji bezpośredniego wpływu na funkcję receptora, może wiązać się także z różną podatnością na zakażenia. Zależność ta dotyczy zwłaszcza zakażeń wirusowych. Zaobserwowano, że obecność wariantu 158V/V zmniejsza ryzyko rozwoju ostrej fazy choroby Heinego-Medina, dzięki bardziej wydajnemu usuwaniu cząsteczek wirusa polio [58]. Obecność tego genotypu związana jest także z regresją zmian dysplastycznych nabłonka szyjki macicy spowodowanych zakażeniem ludzkim wirusem brodawczaka. Sugeruje się, że obecność wariantu 158V/V jest związana z indukcją apoptozy w zainfekowanych wirusem komórkach [59].

## 1.3 Subpopulacje leukocytów krwi obwodowej wykazujące ekspresję receptora CD16a

Spośród leukocytów krwi obwodowej ekspresję receptora CD16a wykazują komórki NK oraz subpopulacja monocytów o fenotypie CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup>.

### 1.3.1 Komórki NK

Komórki NK stanowią 5-20% populacji limfocytów krwi obwodowej. Definiuje się je jako duże ziarniste limfocyty o fenotypie CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> [60,61]. Obecnie wyróżnia się dwie główne subpopulacje komórek NK. Przeważającą większość (około 95%) krążących komórek NK charakteryzuje powierzchniowa ekspresja CD16a oraz relatywnie niska ekspresja CD56 (CD56<sup>dim</sup>) [62]. Komórki NK wspomnianej subpopulacji wywierają bezpośredni efekt cytotoksyczny na komórki docelowe lub biorą udział w reakcji ADCC. Bezpośredni efekt cytotoksyczny jest indukowany w następstwie braku rozpoznania poprzez receptory komórek NK (m.in. KIR - killer Ig-like receptors) ekspresji cząsteczek HLA klasy I na komórkach docelowych [63]. Efekt ten jest wywierany dzięki wydzielanym perforynom i granzymom, bądź także dzięki aktywacji „receptorów śmierci” na komórkach docelowych, takich jak np. Fas [63-66]. Wysoka ekspresja CD16a na powierzchni komórek NK umożliwia im udział w reakcji ADCC. Cząsteczka ta wiąże fragment Fc immunoglobulin (głównie IgG) opłaszczających komórki docelowe. Dochodzi wtedy do aktywacji i degranulacji komórek NK. Komórki NK produkują także prozapalne cytokiny, takie jak IFN- $\gamma$  lub TNF- $\alpha$  [67]. Ponadto, dzięki ekspresji takich cząsteczek, jak CD40L oraz OX40L, mogą aktywować limfocyty T i B [68,69].

Niewielką subpopulację krążących komórek NK (do 10%) stanowią komórki o wyższej ekspresji CD56 (CD56<sup>high</sup>), ale nie wykazujące ekspresji CD16a. Charakteryzują się one relatywnie niską produkcją perforyn, a tym samym niższym potencjałem cytotoksycznym, lecz produkują większe ilości cytokin i chemokin, w tym IFN- $\gamma$ . Stąd też uważa się, że pełnią istotną rolę w regulacji procesu zapalnego [62,63,70].

Głównym zadaniem komórek NK jest obrona gospodarza przed zakażeniami, szczególnie wirusowymi [71]. Zasadniczą ich funkcją jest niszczenie zakażonych wirusem komórek, a także produkcja IFN- $\gamma$  aktywującego komórkową odpowiedź przeciwwirusową. Ponadto, biorą udział w eliminacji komórek nowotworowych, szczególnie tych, które wykazują obniżoną ekspresję cząsteczek HLA klasy I [72].

### 1.3.2 Monocyty CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup>

W zależności od poziomu ekspresji powierzchniowej cząsteczki CD16a, monocyty dzieli się na dwie subpopulacje. Najliczniejszą (85-95% monocytów) stanowią komórki charakteryzujące się wysoką ekspresją cząsteczki CD14 (receptor dla LPS) i brakiem ekspresji CD16a, tzw. „klasyczne” monocyty o fenotypie CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>. Mniej liczną subpopulację (5-15% monocytów) stanowią komórki o niskiej ekspresji CD14, z koekspresją CD16a (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup>), tzw. monocyty „nie-klasyczne” lub „prozapalne” [73,74]. Monocyty CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup>, w porównaniu do monocytów CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>, charakteryzują się zwiększoną produkcją cytokin prozapalnych, w tym TNF- $\alpha$  i IL-12, brakiem lub niskim poziomem produkcji IL-10 o silnych właściwościach immunosupresyjnych, wyższą ekspresją antygenów HLA-DR na swej powierzchni oraz niższą ekspresją niektórych receptorów dla chemokin [75]. Uważa się je za komórki bardziej dojrzałe od „klasycznych” monocytów CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>, a tym samym zbliżone fenotypowo do makrofagów tkankowych. Mogą one również uzupełniać populację komórek dendrytycznych różnych tkanek [76,77]. Z racji wysokiej ekspresji antygenów zgodności tkankowej klasy II (głównie HLA-DR), komórki te wykazują wysoką zdolność do prezentacji obcych antygenów limfocytom gospodarza [78].

Znaczący wzrost liczebności monocytów nie-klasycznych podczas toczącego się stanu zapalnego oraz w odpowiedzi układu odpornościowego na zakażenia bakteryjne sugeruje, iż komórki CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup> odgrywają istotną rolę w immunopatogenezie tych procesów [79,80].

## 1.4 Zaburzenia dotyczące liczebności i/lub funkcji komórek NK oraz monocytów CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup> w wybranych stanach chorobowych

### 1.4.1 Komórki NK

Zaburzenia dotyczące komórek NK, zarówno ilościowe jak i funkcjonalne, najczęściej kojarzą się ze zwiększoną podatnością na nawracające zakażenia wirusowe, w szczególności wirusami z rodziny *Herpesviridae*. Część z tych zaburzeń powiązana jest z występowaniem relatywnie dobrze poznanych pierwotnych niedoborów odporności, których podłoże genetyczne ma wpływ na liczebność i/lub funkcje komórek NK (niektóre podtypy ciężkich złożonych niedoborów odporności z brakiem komórek NK). Jednakże, etiopatogeneza większości izolowanych niedoborów komórek NK nie jest znana. Całkowity brak komórek NK, przy nieobecności innych zaburzeń układu odpornościowego, opisano u dzieci z ciężkimi nawracającymi zakażeniami VZV, HSV oraz wirusem cytomegalii (CMV) [81-83]. Izolowany defekt funkcjonalny komórek NK może także polegać na zaburzonej cytotoksyczności, bezpośredniej i w mechanizmie ADCC, lub jej całkowitym braku, przy ich prawidłowej liczebności we krwi. Opisano przypadek tego rodzaju zaburzeń u czwórki rodzeństwa [84] oraz czworga pacjentów niespokrewnionych [85]. Pacjenci ci chorowali na ciężkie, rozsiane infekcje HSV oraz EBV.

Sugerowano także udział komórek NK w immunopatogenezie schorzeń autoimmunizacyjnych [86,87,88]. Obecność komórek NK wykazano w organach zajętych przez proces autoimmunizacyjny, np. w reumatoidalnym zapaleniu stawów komórki te wykrywano w błonie maziowej, natomiast w stwardnieniu rozsianym były obecne w zmianach zapalnych w mózgu [89]. U pacjentów z wieloma chorobami autoimmunizacyjnymi stwierdzono także obniżoną liczbę komórek NK krążących w krwi obwodowej (np. w reumatoidalnym zapaleniu stawów, stwardnieniu rozsianym, cukrzycy typu 1, zespole Sjörgena oraz łuszczycy) [90-92]. Nie jest jednak jasne dlaczego zmniejszenie liczebności komórek NK promuje rozwój chorób autoimmunizacyjnych. Postulowano, że komórki NK zabijają zmienione komórki organizmu, które mogłyby prowadzić do rozwoju choroby autoimmunizacyjnej. Z drugiej strony, tłumaczono, iż wspomniane choroby charakteryzują się przewagą syntezy przez określone komórki układu odpornościowego cytokin promujących odpowiedź typu Th1. Sugerowano zatem, iż obniżenie liczebności

komórek NK, które zdolne są do produkcji cytokin reakcji typu Th2, powoduje przewagę cytokin typu Th1 promując tym samym autoimmunizację.

Poza ochroną przeciwwirusową, komórki NK pełnią także ważną funkcję w odpowiedzi przeciw komórkom nowotworowym. Zaburzenia dotyczące liczebności i funkcji komórek NK obserwuje się u chorych z różnego typu schorzeniami nowotworowymi. Donoszono o istotnie obniżonych właściwościach cytotoksycznych komórek NK u pacjentów, m. in. z czerniakiem złośliwym, rakiem oskrzeli, trzustki, prostaty, piersi oraz przełyku [93-98]. Ponadto, niski poziom cytotoksyczności leukocytów krwi obwodowej korelowano ze zwiększonym ryzykiem rozwoju nowotworu [99]. Naciekanie tkanki nowotworowej przez komórki NK stanowi natomiast pozytywny marker prognostyczny w różnych typach nowotworzenia [100-102].

### **1.4.2 Monocyty CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup>**

Uważa się, iż monocyty subpopulacji CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup> odgrywają istotną rolę w patogenezie procesu zapalnego. Wzrost ich liczebności obserwuje się we krwi podczas zakażeń oraz w stanach zapalnych związanych z wieloma jednostkami chorobowymi. Ponad 10-krotny wzrost liczebności obserwowano u chorych z ciężką sepsą bakteryjną, zakażeniem HIV-1, astmą, miażdżycą [103-106], a także w chorobach autoimmunizacyjnych, takich jak reumatoidalne zapalenie stawów [107-109] oraz w chorobie Kawasaki [110]. Ostatnie doniesienia sugerują także, iż monocyty CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup> uczestniczą w odpowiedzi przeciwwirusowej produkując TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  oraz MIP-1 $\alpha$ , w wyniku aktywacji receptorów TLR7 i TLR8 przez kompleksy immunologiczne zawierające kwasy nukleinowe oraz cząsteczki wirusów [111]. Ponadto, obserwowano wzrost odsetka tych komórek u pacjentów z zaawansowaną chorobą nowotworową [112]. Terapia z zastosowaniem glikokortykosteroidów prowadzi do zmniejszenia liczebności krążących monocytów CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup> [113,114].

## **1.5 Pierwotne niedobory odporności**

Pierwotne niedobory odporności występują z częstością około 1 na 10.000 [115,116]. Manifestują się z reguły ciężkimi i/lub nawracającymi zakażeniami, a także niekiedy zwiększoną częstością występowania chorób autoimmunizacyjnych, alergicznych i nowotworowych.

Najczęstszymi niedoborami odporności są zaburzenia dotyczące produkcji immunoglobulin (około 60% pierwotnych niedoborów odporności). Wiele z nich uwarunkowanych jest genetycznie i znane są leżące u ich podłoża mutacje. W większości jednak, zidentyfikowano jedynie niektóre zaburzenia mechanizmów immunoregulacyjnych, aczkolwiek ciągle nie poznano podłoża molekularnego tych schorzeń.

### **1.5.1 Charakterystyka wybranych pierwotnych niedoborów odporności humoralnej**

#### **1.5.1.1 *Agammaglobulinemia sprzężona z chromosomem X (X-linked agammaglobulinemia; XLA)***

XLA jest pierwszym opisanym niedoborem odporności humoralnej. Choroba ta spowodowana jest mutacjami w genie dla kinazy tyrozynowej Brutona (Btk) [42]. XLA objawia się praktycznie całkowitym brakiem immunoglobulin, w tym IgG, IgM i IgA, co jest pochodną braku krążących dojrzałych limfocytów B [117]. Zespół ten występuje u około 1 na 190.000 żywo urodzonych chłopców. Objawy kliniczne u chorych z XLA pojawiają się już w ciągu pierwszych dwóch lat życia i należą do nich przede wszystkim nawracające zakażenia bakteryjne, głównie zapalenie ucha, zatok obocznych nosa oraz zapalenia płuc [118]. Donoszono także o zwiększonej częstości występowania młodzieńczego idiopatycznego zapalenia stawów oraz nowotworów jelita grubego [119,120], a także choroby Leśniowskiego-Crohn'a i cukrzycy typu I [42].



### **1.5.1.2 Pospolity zmienny niedobór odporności (*common variable immunodeficiency; CVID*)**

CVID jest relatywnie często występującym pierwotnym niedoborem odporności humoralnej notowanym u 1 na 25.000 osób rasy kauskaskiej [121,122]. Zespół ten charakteryzuje się obniżonym względem normy dla danego wieku poziomem immunoglobulin, głównie IgG, niekiedy także IgA oraz IgM [118,123,124]. Produkcja swoistych przeciwciał po szczepieniach jest często (choć nie zawsze) zaburzona. Jednocześnie, u chorych stwierdza się prawidłowy lub nieznacznie obniżony poziom limfocytów B w krwi obwodowej [124,125]. U części pacjentów obserwuje się również zaburzenia dotyczące liczby i funkcji limfocytów T [116]. Choroba najczęściej diagnozowana jest pomiędzy 5-10 rokiem, lub w trzeciej dekadzie życia. Głównymi objawami klinicznymi CVID są nawracające zakażenia bakteryjne górnych i/lub dolnych dróg oddechowych, rzadziej zakażenia wirusowe. U pacjentów z CVID często obserwuje się także choroby autoimmunizacyjne (u 20-30% chorych), limfoproliferacyjne, zapalne choroby układu pokarmowego oraz nowotwory. Do najczęstszych schorzeń towarzyszących niedoborowi należą: pierwotna małopłytkowość immunologiczna, autoimmunizacyjna anemia hemolityczna oraz reumatoidalne zapalenie stawów [124,126]. Pacjenci z CVID wykazują także zwiększone ryzyko wystąpienia chłoniaków nieziarniczych oraz raka żołądka [42]. Jednakże, u krewnych pacjentów z CVID nie wykazano zwiększonego ryzyka wystąpienia wspomnianych nowotworów sugerując, że właśnie niedobór odporności predysponuje chorych do ich pojawienia się [127].

### **1.5.1.3 Hipogammaglobulinemia z grasiczakiem (*zespół Good'a*)**

Niedobór odporności humoralnej z grasiczakiem, zwany także zespołem Good'a, najczęściej ujawnia się w dorosłym życiu i związany jest z hipogammaglobulinemią lub agammaglobulinemią występującą wraz z rozwijającym się nowotworem grasicy [128,129]. U pacjentów tych stwierdza się również znacznie obniżoną liczbę krążących limfocytów B [130]. Objawy kliniczne, szczególnie zakażenia, są podobne do opisywanych w przypadku CVID, jednakże zespół Good'a jest częściej związany z oportunistycznymi zakażeniami grzybiczymi (kandydozy) i wirusowymi, szczególnie VZV, CMV i HSV [42,131]. Podobnie, jak w przypadku CVID, chorzy często cierpią z powodu schorzeń autoimmunizacyjnych, zwłaszcza miastonii [42].

#### **1.5.1.4 Izolowany niedobór IgA (*selective IgA deficiency; SIgAD*)**

SIgAD jest najczęściej występującym pierwotnym niedoborem odporności (1 przypadek na 500-700 urodzeń) i związany jest z niewykrywalnym lub śladowym stężeniem IgA, przy jednocześnie prawidłowych poziomach immunoglobulin pozostałych klas [132]. Stwierdzono rodzinne występowanie SIgAD u ok. 20-25% chorych, a także zjawisko „przechodzenia” SIgAD w CVID [121]. U większości pacjentów z SIgAD choroba przebiega bezobjawowo [121,133]. Jednakże, u około jednej trzeciej chorych obserwuje się ciężkie, nawracające zakażenia bakteryjne oraz wirusowe, głównie górnych dróg oddechowych, ucha środkowego, zapalenia płuc oraz infekcje dróg moczowych i przewodu pokarmowego [42]. Pacjenci z SIgAD są także bardziej podatni na występowanie chorób autoimmunizacyjnych, w tym toczenia rumieniowatego układowego, reumatoidalnego zapalenia stawów [134] oraz schorzeń alergicznych, np. astmy oskrzelowej, atopowego zapalenia skóry lub alergicznego zapalenia śluzówek nosa. Stwierdzono także u nich zwiększoną częstość występowania chorób układu pokarmowego, takich jak choroba Leśniowskiego-Crohn’a, celiakia oraz nieswoiste zapalenia jelit. Ponadto, chorzy ci są bardziej narażeni na wystąpienie nowotworów przewodu pokarmowego oraz chłoniaków [135].

#### **1.5.1.5 Przejściowa hipogammaglobulinemia wieku dziecięcego (*transient hypogammaglobulinemia of infancy; THI*)**

THI charakteryzuje się opóźnionym rozpoczęciem produkcji własnych immunoglobulin, głównie klasy IgG i IgA (rzadziej IgM), po występującym fizjologicznie okresie hipogammaglobulinemii około 3-6 miesiąca życia. W wieku 2-5 lat następuje zwykle normalizacja poziomu wszystkich klas immunoglobulin [118,136]. THI może przebiegać bezobjawowo lub objawiać się nawracającymi zakażeniami, głównie górnych, rzadziej dolnych, dróg oddechowych [116].

#### **1.5.1.6 Niedobór podklas IgG**

Niedobór podklas IgG stwierdza się u pacjentów, u których wykryto obniżony poziom jednej lub więcej podklasy IgG (IgG1, IgG2, IgG3 lub IgG4) przy jednoczesnym prawidłowym poziomie całkowitej IgG oraz pozostałych klas immunoglobulin [42]. Jednakże, diagnoza niedoboru podklas IgG może być kontrowersyjna, gdyż obniżone poziomy jednej lub więcej podklas IgG obserwuje się u 2-20% zdrowych osób. Stąd też, u większości pacjentów,

choroba przebiega bezobjawowo. Natomiast, główną manifestacją kliniczną niedoboru podklas IgG są nawracające zakażenia bakteryjne dróg oddechowych [137-140]. U części pacjentów stwierdza się częste zakażenia wirusowe oraz upośledzoną produkcję swoistych przeciwciał po szczepieniach. Obserwuje się także alergię, atopię oraz choroby autoimmunizacyjne, podobnie jak u pacjentów z sIgAD [141].

#### **1.5.1.7 Zespół hiper-IgM**

Mianem zespołu hiper-IgM określa się zaburzenia związane z defektem przełączania klas immunoglobulin, charakteryzujące się podwyższonym lub prawidłowym poziomem IgM w surowicy, przy jednocześnie niskim poziomie IgG, IgA i IgE. Najlepiej poznanym zespołem spośród tej grupy schorzeń jest zespół hiper-IgM sprzężony z chromosomem X (XHIM), spowodowany mutacją w genie kodującym CD40L. Rzadziej forma autosomalna recesywna związana jest z mutacją genu kodującego CD40, AID (activation-induced cytidine deaminase) czy UNG (uracylo-DNA glycosylase) [116]. Niedobory spowodowane defektem CD40L i CD40 charakteryzują się mieszanym zaburzeniem odpowiedzi humoralnej i komórkowej. Pacjenci z zespołami hiper-IgM cierpią na ciężkie i nawracające bakteryjne zakażenia dróg oddechowych i układu pokarmowego, a także ciężkie zakażenia grzybicze oraz zakażenia wirusowe, głównie wirusem CMV i HSV. Stwierdza się także zwiększoną częstość występowania chorób autoimmunizacyjnych oraz nowotworów układu pokarmowego [142-146].

#### **1.5.1.8 Hipogammaglobulinemia o nieznannej etiologii**

Mianem hipogammaglobulinemii o nieznannej etiologii określa się zaburzenia odporności humoralnej występujące przy prawidłowej odporności komórkowej, nie spełniające kryteriów znanych i opisanych pierwotnych niedoborów odporności. U części pacjentów stwierdza się zwiększoną podatność na zakażenia, u innych choroba przebiega bezobjawowo [42].

### **1.5.1.9 Zespół DiGeorge'a**

Zespół/anomalia DiGeorge'a spowodowany jest zaburzeniami w rozwoju embrionalnym, których przyczyną są mikrodelecje w obrębie chromosomu 22 lub rzadziej 10 [42,147]. Delecje te zaburzają rozwój narządów wywodzących się z 3 i 4 kieszonki skrzelowej, co skutkuje obecnością wad serca i/lub dużych naczyń oraz różnego stopnia niedorozwojem grasicy i przytarczyc, z następowymi epizodami tężyczki. W związku z zaburzonym rozwojem grasicy, zespół DiGeorge'a wiąże się głównie z defektami odporności komórkowej, a zwłaszcza dotyczącymi funkcji i/lub liczebności limfocytów T [42,148,149]. Jednakże, u pacjentów często obserwuje się również zaburzenia związane z odpornością humoralną [147], w tym obniżony poziom IgA, IgM lub podklas IgG [150]. Stąd pewne trudności z odpowiednią klasyfikacją tego zespołu jako defektu jedynie komórkowego, lub z równoczesną obecnością defektu syntezy immunoglobulin. Chorzy cierpią z powodu nawracających zakażeń wirusowych, rzadziej bakteryjnych – szczególnie osoby wykazujące obniżony poziom immunoglobulin [147,150]. Zaburzone parametry układu odpornościowego niekiedy ulegają normalizacji wraz z wiekiem.

### **1.5.2 Defekty komórek NK (CD16a<sup>+</sup>) związane z pierwotnymi niedoborami odporności**

Wspomniane powyżej niedobory odporności humoralnej są związane z zaburzeniami produkcji immunoglobulin, natomiast odporność komórkowa u większości pacjentów (z wyłączeniem anomalii DiGeorge'a) z reguły jest prawidłowa. Jednakże, u pacjentów z defektami odporności humoralnej obserwuje się niekiedy zaburzenia dotyczące liczebności komórek NK i/lub ich funkcji. Zaburzenia takie opisano u pacjentów z XHIM. U chłopca z XHIM stwierdzono całkowity brak komórek o fenotypie CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> oraz zaburzenia związane z reakcją ADCC mediowaną przez komórki NK [151]. Podobnie, u pacjentów z XLA obserwowano zaburzenia cytotoksyczności komórek NK względem komórek linii K562 oraz nieprawidłowy przebieg reakcji ADCC [41,152,153]. U pacjentów z XLA stwierdzano jednakże prawidłową ich liczebność. Także u pacjentów z CVID opisywano obniżoną cytotoksyczność komórek NK względem komórek białaczkowych linii K562 [152-155]. Komórki NK były u tych chorych obecne, lecz często ich liczebność była istotnie obniżona [156]. Opisano również chorego z CVID z towarzyszącym defektem funkcjonalnym komórek NK oraz zakażeniem CMV o ciężkim przebiegu [155].

Ponadto, objawy kliniczne i powikłania wielu pierwotnych niedoborów odporności, są podobne do objawów związanych z defektami funkcjonalnymi komórek NK. Pacjenci z pierwotnymi niedoborami odporności są bardziej podatni za nawracające zakażenia wirusowe, w tym ciężkie i nawracające zakażenia wirusami z rodziny *Herpesviridae*. Zakażenia te obserwuje się u chorych z niektórymi niedoborami odporności humoralnej (zespoły hiper-IgM, zespół Good'a). Niska aktywność cytotoksyczna komórek NK jest często obserwowana w wielu typach nowotworów, także towarzyszących pierwotnym niedoborom odporności, np. w przypadku nowotworów jelita grubego [157,158].

## 1.6 Podsumowanie

Objawy kliniczne i powikłania chorobowe wielu pierwotnych niedoborów odporności, szczególnie odporności humoralnej, wykazują w pewnych aspektach podobieństwo do zaburzeń związanych z dysfunkcją komórek NK oraz dysfunkcją monocytów subpopulacji CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup>. Szczególnie zwiększona podatność na nawracające zakażenia wirusowe obserwowane u niektórych pacjentów z pierwotnymi niedoborami odporności humoralnej, w tym także wirusami z rodziny *Herpesviridae*, przypomina objawy opisywane u pacjentów z defektem epitopu B73.1/Leu11c receptora CD16a. Jednakże, u chorych z hipogammaglobulinemiami nie badano dotychczas częstości występowania defektu epitopu B73.1/Leu11c receptora CD16a na komórkach NK oraz monocytach krwi obwodowej. Przeprowadzone badania mogą pomóc w określeniu częstości występowania defektu epitopu B73.1/Leu11c na tychże komórkach pacjentów z wybranymi pierwotnymi niedoborami odporności (głównie humoralnej). Obecność tego defektu zostanie także zanalizowana w grupie pacjentów z nawracającymi i/lub ciężkimi zakażeniami herpetycznymi, co łącznie z analizą stanu klinicznego pacjentów, u których wykrywa się defekt epitopu B73.1/Leu11c, umożliwi zbadanie związku tego defektu z występowaniem zakażeń. Analiza defektu epitopu B73.1/Leu11c zostanie także przeprowadzona w grupie pacjentów z nowotworami przewodu pokarmowego. Obniżona aktywność komórek NK może podwyższać ryzyko rozwoju nowotworu [99,159], stąd też, także i w tak dobranej grupie pacjentów wydaje się istotne określenie częstości występowania defektu receptora CD16a.

Dodatkowo, otrzymane wyniki mogą przyczynić się do określenia, na relatywnie licznej grupie osób badanych, korelacji pomiędzy częstością występowania defektu epitopu B73.1/Leu11c a obecnością nawracających zakażeń wirusowych, szczególnie wirusami z rodziny *Herpesviridae*. Ponadto, analiza sekwencji genu *FcγRIIIa* u osób, u których wykryty zostanie defekt epitopu B73.1/Leu11c i osób z wykluczonym defektem, pozwoli na zbadanie korelacji pomiędzy częstością występowania defektu, a obecnością określonych mutacji i/lub polimorfizmów wspomnianego genu. Wydaje się to być o tyle istotne, iż w literaturze dostępne są sprzeczne ze sobą obserwacje sugerujące np., iż zmiana L48R/H jest bądź to chorobotwórczą mutacją, bądź jedynie polimorfizmem obserwowanym także u ludzi zdrowych.

Ponadto, rutynowa diagnostyka immunofenotypowa komórek NK opiera się na oznaczaniu komórek CD3<sup>-</sup>/CD56<sup>+</sup>/CD16<sup>+</sup>, przy czym w badaniu tym najczęściej stosuje się mAb anti-CD16 klonu B73.1/Leu11c. Przeciwnie do używanego jest także do oznaczania liczebności

krążących monocytów subpopulacji CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup>. Z racji wspomnianego wcześniej defektu epitopu B73.1/Leu11c zasadne wydaje się – z praktycznego punktu widzenia – określenie częstości jego występowania, co pomoże ustalić merytoryczne podstawy dla ewentualnego stosowania innych klonów anti-CD16 mAb w diagnostyce immunologicznej celem uniknięcia fałszywie ujemnych wyników oznaczeń.

## 2 CELE PRACY

### 2.1 Cele ogólne

Celem niniejszej pracy jest zbadanie częstości występowania defektu epitopu B73.1/Leu11c receptora CD16a u pacjentów z wybranymi pierwotnymi niedoborami odporności i korelacja występowania tego defektu ze stanem klinicznym pacjentów oraz obecnością określonych mutacji/polimorfizmów w genie *FcγRIIIa*, kodującym cząsteczkę CD16a.

### 2.2 Cele szczegółowe

1. Zbadanie częstości występowania defektu epitopu B73.1/Leu11c receptora CD16a na komórkach NK oraz monocytach krwi obwodowej u pacjentów z wybranymi pierwotnymi niedoborami odporności (głównie humoralnej), w porównaniu do pacjentów z nowotworami przewodu pokarmowego oraz osób zdrowych (w odpowiednio dobranych grupach wiekowych, u dzieci i osób dorosłych - powyżej 18-go roku życia).
2. Sprawdzenie, czy obecność defektu epitopu B73.1/Leu11c jest skojarzona z występowaniem określonych typów niedoborów odporności.
3. Sprawdzenie ewentualnego związku pomiędzy obecnością defektu epitopu B73.1/Leu11c, a występowaniem nawracających zakażeń herpetycznych, poprzez:  
i) analizę występowania tego defektu w grupie pacjentów z ciężkimi i/lub nawracającymi zakażeniami wirusami z rodziny *Herpesviridae*, a także ii) analizę stanu klinicznego pacjentów ze stwierdzonym defektem epitopu B73.1/Leu11c w aspekcie przebytych zakażeń herpetycznych.
4. Analiza sekwencji genu *FcγRIIIa* kodującego receptor CD16a, u pacjentów z wykrytym zaburzeniem wiązania anty-CD16 B73.1/Leu11c mAb, w porównaniu do osób grupy kontrolnej, u których obserwuje się wiązanie tego przeciwciała z receptorem CD16a.
5. Sprawdzenie związku pomiędzy występowaniem polimorfizmu L48R/H, a obecnością defektu epitopu B73.1/Leu11c, ewentualnie określenie związku tego defektu z występowaniem innych mutacji bądź polimorfizmów genu *FcγRIIIa*.



## 3 MATERIAŁY I METODY

### 3.1 Pacjenci i grupa kontrolna

Badania objęły następujące grupy osób (Tabela 5): 152 dzieci z pierwotnymi niedoborami odporności, ze szczególnym uwzględnieniem niedoborów odporności humoralnej i 14 dzieci z ciężkimi i/lub nawracającymi zakażeniami wirusami z rodziny *Herpesviridae* (Tabela 6), diagnozowanych i leczonych w Poradni i Oddziale Immunologicznym Uniwersyteckiego Szpitala Dziecięcego w Krakowie oraz 13 pacjentów dorosłych z CVID leczonych w Poradni Immunologicznej i Oddziale Klinicznym Kliniki Chorób Wewnętrznych i Geriatrii Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie, a także 91 pacjentów ze zdiagnozowanymi nowotworami przewodu pokarmowego (rak żołądka, rak jelita grubego, rak trzustki) leczonych w Oddziale Klinicznym Kliniki Chirurgii Ogólnej i Gastroenterologicznej Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie. Grupa kontrolna objęła 112 zdrowych osób (w tym 60 dzieci oraz 52 osoby dorosłe), u których po planowej klinicznej i laboratoryjnej diagnostyce układu odpornościowego nie rozpoznano niedoboru odporności. Na przeprowadzenie badań wydana została zgoda Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego nr KBET/207/B/2000 oraz KBET/107/B/2006. Badaniami objęto jedynie te dzieci, których Rodzice bądź Opiekunowie, poinformowani o celu i rodzaju badań, wyrazili pisemną zgodę na udział dziecka w badaniach.

Tab. 5. Zestawienie badanych grup pacjentów.

	<b>Diagnoza</b>	<b>Liczba osób badanych</b>	<b>Płeć [K/M]</b>	<b>Wiek (lata) i odchylenie standardowe</b>
<b>Dzieci</b>	XLA	11	11 M	9 ± 4
	CVID	38	26 M / 13 K	10 ± 3
	sIgAD	41	21 M / 20 K	7 ± 4
	THI	31	18 M / 13 K	2 ± 1
	Niedobór podklas IgG	7	5 M / 2 K	6 ± 3
	Zespół hiper-IgM	3	3 M	7 ± 5
	Anemia aplastyczna z agammaglobulinemią	1	1 M	11
	Hipogammaglobulinemia z grasiczakiem (zespół Good'a)	1	1 M	17
	Hipogammaglobulinemia o niejasnej etiologii	13	8 M / 5 K	5 ± 3
	Zespół DiGeorge'a	4	2 M / 2 K	7 ± 5
	Zaburzenie odporności komórkowej (obniżony poziom limfocytów CD4 <sup>+</sup> )	1	1 M	13
	Nieokreślony defekt odporności komórkowej	1	1 K	13
	Dzieci z nawracającymi zakażeniami wirusami z rodziny <i>Herpesviridae</i>	16	6 M / 10 K	8 ± 4
Grupa kontrolna	60	29 M / 31 K	7 ± 4	
<b>Dorośli</b>	CVID	13	5 M / 8 K	30 ± 7
	<b>Nowotwory przewodu pokarmowego:</b>			
	Rak żołądka	31	20 M / 11 K	58 ± 15
	Rak jelita grubego	46	29 M / 17 K	69 ± 10
	Rak trzustki	14	8 M / 6 K	65 ± 17
	Grupa kontrolna	52	25 M / 27 K	40 ± 11

Tab.6. Charakterystyka pacjentów cierpiących na ciężkie i/lub nawracające zakażenia herpetyczne.

<b>Lp.</b>	<b>Wiek [lata] / płeć [K/M]</b>	<b>Charakterystyka kliniczna</b>	<b>Odsetek i liczba bezwzględna komórek NK w kolejnych oznaczeniach diagnostycznych</b>
1	14 / K	Ciężkie i nawracające opryszczkowe zapalenia rogówki	prawidłowy
2	6 / M	Nawracające opryszczki wargowe	prawidłowy
3	9 / K	Nawracające opryszczki wargowe	prawidłowy
4	6 / K	Ropne zakażenia skóry twarzy, nawracająca opryszczka wargowa	prawidłowy
5	11 / K	Nawracające opryszczki wargowe	prawidłowy
6	12 / K	Nawracające opryszczki wargowe	prawidłowy
7	7 / M	Nawracająca opryszczkowe zakażenia warg, jamy ustnej i krtani	prawidłowy
8	2 / K	Nawracające opryszczkowe zakażenia jamy ustnej	prawidłowy
9	7 / M	Nawracające opryszczki wargowe	prawidłowy
10	6 / K	Nawracająca infekcja VZV(dwa epizody ospy wietrznej i jeden półpaśca)	podwyższony
11	13 / M	Nawracająca infekcja VZV(pięć epizodów półpaśca w ciągu ostatniego roku)	prawidłowy
12	4 / K	Nawracające opryszczki wargowe	prawidłowy
13	16 / K	Ciężkie i nawracające opryszczkowe zapalenia rogówki	prawidłowy
14	5 / M	Nawracające opryszczki skóry twarzy i warg	prawidłowy
15	8 / M	Nawracająca infekcja VZV(trzy epizody ospy wietrznej)	prawidłowy
16	6 / K	Nawracająca opryszczkowe zakażenia warg i jamy ustnej	prawidłowy

### **3.2 Ocena obecności epitopu B73.1/Leu11c receptora CD16a na komórkach NK oraz monocytach krwi obwodowej**

W celu sprawdzenia obecności wybranych epitopów receptora CD16a na komórkach NK oraz monocytach, dwie próbki krwi obwodowej zdrowej osoby kontrolnej (100 µl) pobranej na EDTA inkubowano z mAbs: anty-CD16: klonu B73.1/Leu11c-PE (BD Biosciences, San Jose, CA) oraz klonu 3G8-FITC (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA). Do próbki, w której sprawdzano ekspresję epitopów CD16a na komórkach NK, dodawano także mAbs anty-CD3-PerCP (klon SK7, BD Biosciences) oraz anty-CD19-PerCP (klon 4G7, BD Biosciences). Natomiast do próbki, w której sprawdzano obecność obu epitopów na monocytach, dodawano mAb anty-CD14-APC (BD Biosciences Pharmingen). Jako kontroli izotypowych używano przeciwciał IgG1-PE i IgG1-FITC (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA). Inkubację próbek krwi z przeciwciałami prowadzono przez 20 minut w temperaturze 4°C, po czym lizowano erytrocyty stosując 1 ml buforu lizującego (FACS Lysing Solution, BD), dwukrotnie płukano komórki w 1 ml buforu PBS i zawieszano w 200 µl buforu PBS. Próbki analizowano za pomocą cytofluorymetru przepływowego FACSCanto (BD) oraz oprogramowania FACSDiva Software (BD). Komórki NK określano jako komórki CD3<sup>+</sup>/CD19<sup>-</sup> w bramce limfocytarnej, natomiast monocyty oznaczano na podstawie parametrów FSC oraz SSC oraz obecności białka CD14. Po sprawdzeniu ekspresji obu epitopów białka CD16, tj. B73.1/Leu11c oraz 3G8 na komórkach NK oraz monocytach, próbki krwi badanych osób inkubowano jedynie z oboma klonami anty-CD16 mAb, oznaczając komórki NK oraz monocyty na podstawie parametrów FSC i SSC. U każdej z badanych osób przygotowywano próbki z następującą kombinacją mAbs:

1. CD16-FITC (klon 3G8)/CD16-PE (klon B73.1/Leu11c)
2. CD16-FITC (klon 3G8)/IgG1-PE
3. IgG1-FITC/CD16-PE (klon B73.1/Leu11c).

### **3.3 Analiza sekwencji genu *FcyRIIIa* kodującego receptor CD16a**

Analizę sekwencji genu *FcyRIIIa* przeprowadzano metodą bezpośredniego sekwencjonowania DNA całego regionu kodującego. Badania te przeprowadzano u osób z wykrytym defektem epitopu B73.1/Leu11c oraz u losowo wybranych osób z grup kontrolnych, których monocyty oraz komórki NK wiązały mAb anti-CD16 klonu B73.1/Leu11c.

#### **3.3.1 Izolacja DNA**

W celu przeprowadzenia analizy sekwencji kodującej genu *FcyRIIIa* izolowano genomowe DNA z próbek krwi pełnej wybranych 12 pacjentów z defektem epitopu B73.1/Leu11c oraz 25 zdrowych osób stanowiących grupę kontrolną. Izolację DNA prowadzono z użyciem zestawu QIAmp DNA Mini Kit (Qiagen, Niemcy), zgodnie z instrukcją producenta. W skrócie: krew pełną (200  $\mu$ l) odbiałczano przy pomocy proteiny K oraz lizowano buforem lizującym, a następnie tak otrzymaną mieszaninę inkubowano w 56°C przez 10 minut. Do próbek dodawano etanol (POCH S.A. Gliwice), po czym przenoszono próbki na kolumny wiążące DNA. Kolumny przemywano buforami myjącymi i następnie wmywano DNA buforem eluującym. Stężenie wyizolowanego DNA określano metodą spektrofotometryczną (DU 640B Spectrophotometer UV/VIS, Beckman Coulter, CA), poprzez pomiar absorbancji przy długości fali 260 nm. Czystość DNA określano na podstawie ilorazu absorbancji przy długości fali 260 i 280 nm.

#### **3.3.2 Łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR)**

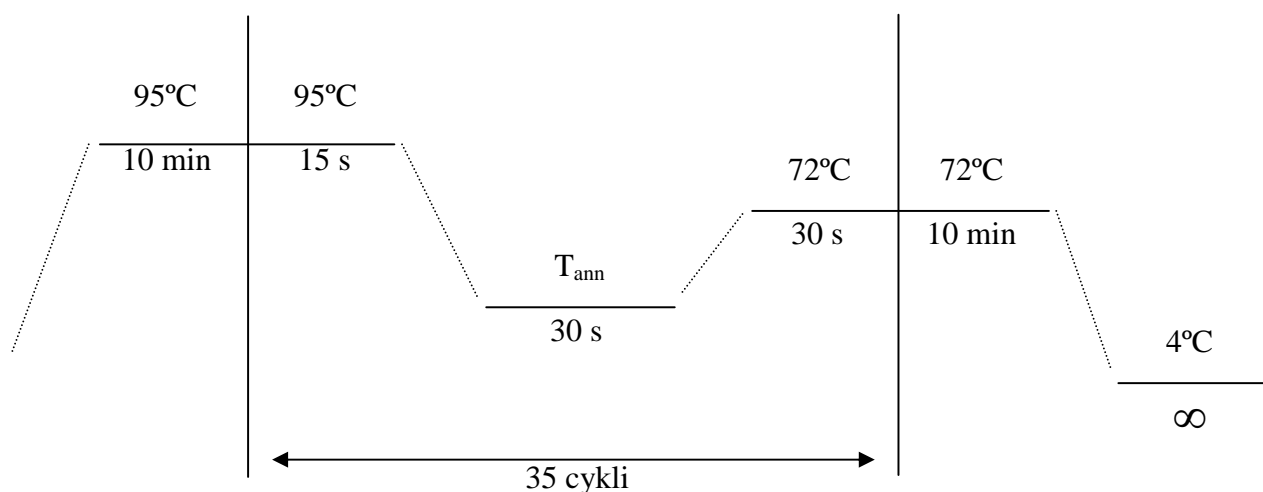
Reakcję PCR prowadzono w celu amplifikacji wszystkich pięciu egzonów genu *FcyRIIIa*, stosując jako matrycę wyizolowane od badanych osób genomowe DNA. Dla każdego z egzonów reakcję prowadzono w osobnych próbkach. W skład mieszaniny reakcyjnej, o końcowej objętości 20  $\mu$ l, wchodziło DNA, cztery deoksynukleotydy: dATP, dGTP, dCTP, dTTP (Invitrogen, Carlsbad, USA), polimeraza DNA AmpliTaq Gold, odpowiedni bufor, roztwór MgCl<sub>2</sub> (Applied Biosystems, CA, USA) oraz para staterów specyficznych dla poszczególnych pięciu egzonów genu (Tib MolBiol, Poznań) (Tabela 7). Skład mieszaniny reakcyjnej przedstawiono w Tabeli 8. Reakcje PCR prowadzono w próbkach typu Eppendorf w termocyklerze GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems) według dobranych dla poszczególnych par starterów warunków cieplnych (Rysunek 3).

Tab. 7. Sekwencje stosowanych starterów [34].

<b>Stater</b>	<b>Sekwencja startera</b>	<b>Długość produktu</b>
<b>Egzon 1</b> -sensowny -antysensowny	5'-GGC TGG GGA AAG GCT GTT TAC TT-3' 5'-CTG AAC CCA AGG CAT CTC AAA-3'	190 pz
<b>Egzon 2</b> -sensowny -antysensowny	5'-GCA AGA GGC ATG AAC AGT GGA G-3' 5'-CTG CTA ACC CCA CAT CAG CAT TT-3'	328 pz
<b>Egzon 3</b> -sensowny -antysensowny	5'-CAC CAA GCA TGG GTT TGC AAT-3' 5'-AGT GGG ACC ACA CAT CAT CTC AT-3'	500 pz
<b>Egzon 4</b> -sensowny -antysensowny	5'-TGC AGG GTT GAC TCC CAA TCT-3' 5'-CCA ACT CAA CTT CCC AGT GTG ATT-3'	458 pz
<b>Egzon 5</b> -sensowny -antysensowny	5'-GGT GAG CTG TCC TCT GCT CAG ATA-3' 5'-GAA ATG TTC AGA GAT GCT GCT GCT-3'	453 pz

Tab. 8. Skład mieszaniny reakcyjnej do PCR.

Składnik	Stężenie wyjściowe	Stężenie końcowe	Objętość na próbkę
DNA	1-2,5 ng	0,1 ng/μl	3 μl
Startery:			
- sensowny	10 μM	0,5 μM	1 μl
- antysensowny	10 μM	0,5 μM	1 μl
Bufor dla polimerazy AmpliTaq Gold	10x	1x	2 μl
MgCl <sub>2</sub>	-	-	1,2 μl
Polimeraza AmpliTaq Gold	2 U/μl	0,015 U/μl	0,15 μl
Nukleotydy:			
- dATP	10 mM	0,5 mM	0,1 μl
- dTTP	10 mM	0,5 mM	0,1 μl
- dGTP	10 mM	0,5 mM	0,1 μl
- dCTP	10 mM	0,5 mM	0,1 μl
H <sub>2</sub> O	-	-	10,8 μl



Rys. 3. Warunki cieplne reakcji PCR.

Temperatura przyłączania starterów ( $T_{ann}$ ) była różna dla poszczególnych egzonów genu *FcyRIIIa* i wynosiła: 55°C dla egzonu 1 i 2; 56°C dla egzonu 3; 54°C dla egzonu 4 oraz 58°C dla egzonu 5.

### **3.3.3 Elektroforeza produktów reakcji PCR**

#### ***Przygotowanie 1,5% żelu agarozowego***

W celu sprawdzenia poprawności reakcji PCR produkty reakcji rozdzielano elektroforetycznie w 1,5% żelu agarozowym. Przygotowywano 50 ml żelu poprzez rozpuszczenie 0,75 g agarozy (Sigma) w buforze 1xTAE o składzie: 2 M Tris (Trizma Base, Sigma), 1 M kwas octowy (Sigma), 5 M EDTA (Sigma), pH 8,5. Mieszaninę podgrzewano do całkowitego rozpuszczenia agarozy, następnie dodawano 20  $\mu$ l roztworu bromku etydyny o stężeniu 1mg/ml (Sigma, St. Louis, MO), wylewano na saneczki z grzebieniami i pozostawiano do zastygnięcia. Saneczki z żelem umieszczano w aparacie do elektroforezy (Biotec-Fischer) i zalewano buforem 1xTAE.

#### ***Przygotowanie próbek do elektroforezy***

Próbki do rozdziału przygotowywano poprzez zmieszanie 3  $\mu$ l produktu PCR, 2  $\mu$ l buforu obciążającego (Sigma) oraz 10  $\mu$ l wody. Próbki nakładano do poszczególnych studzienek w żelu, do osobnej studzienki nakładano 3  $\mu$ l markera masowego (Gen Ladder 100, Inno-train Diagnostik GmbH). Elektroforezę prowadzono przez 30 minut przy napięciu 90V. Po zakończeniu rozdziału żel umieszczano na transiluminatorze w celu uwidocznienia w świetle UV rozdzielonych produktów PCR.

### **3.3.4 Oczyszczanie produktów PCR**

Produkty reakcji PCR były oczyszczane z pozostałości odczynników użytych do sporządzenia mieszaniny reakcyjnej (wolnych nukleotydów, jonów). Oczyszczanie prowadzono z użyciem zestawu QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen). Procedura polegała na związaniu DNA na kolumnie silikonowej w obecności wysokiego stężenia soli przy odpowiednim pH. Kolumnę następnie przemywano odpowiednimi buforami, po czym oczyszczone DNA wymywano z kolumny za pomocą buforu o niskim stężeniu soli.

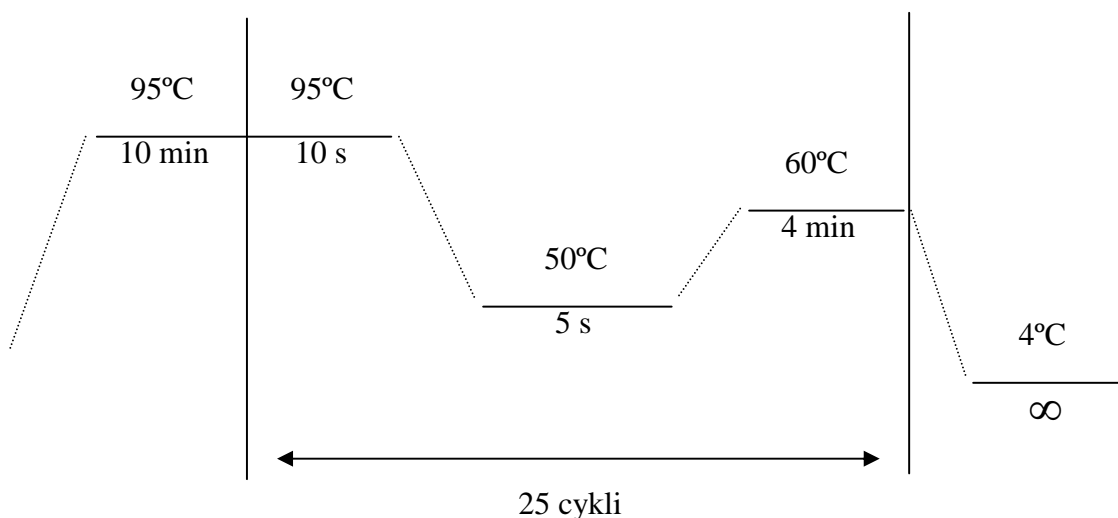


### 3.3.5 Sekwencyjny PCR

Reakcję sekwencyjnego PCR prowadzono metodą Sangera z użyciem dideoksynukleotydów. Mieszaninę reakcyjną przygotowano dla każdego z namnożonych wcześniej egzonów, w objętości końcowej 20  $\mu\text{l}$ , stosując oczyszczone DNA, zestaw Terminator Ready Reaction Mix (Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems, CA, USA) oraz jeden ze starterów użytych wcześniej do reakcji PCR. Skład mieszaniny reakcyjnej przedstawiono w Tabeli 9. W celu przeprowadzenia dwukierunkowego sekwencjonowania każdego z fragmentów DNA, przygotowano po dwie mieszaniny reakcyjne dla jednego produktu PCR, stosując do jednej mieszaniny starter sensowny, do drugiej antysensowny. Reakcje prowadzono w termocyklerze GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems) według programu cieplnego BigDye® dostarczonego przez producenta (Rys. 4).

Tab. 9. Skład mieszaniny reakcyjnej do PCR sekwencyjnego.

Składnik	Stężenie wyjściowe	Stężenie końcowe	Objętość na próbkę
DNA	-	-	10 $\mu\text{l}$
Starter	1 $\mu\text{M}$	0,32 $\mu\text{M}$	3,2 $\mu\text{l}$
Bufor Big Dye Sequencing Buffer	5x	0,5x	2 $\mu\text{l}$
Ready Reaction Premix	2,5x	0,5x	4 $\mu\text{l}$
H <sub>2</sub> O	-	-	0,8 $\mu\text{l}$



Rys. 4. Warunki cieplne reakcji PCR sekwencyjnego.

### **3.3.6 Precypitacja produktów sekwencyjnego PCR**

Precypitację produktów sekwencyjnego PCR prowadzono z wykorzystaniem roztworu EDTA i etanolu. Produkty PCR mieszano z 5 µl roztworu 125 mM EDTA (Sigma) i 60 µl etanolu bezwodnego (POCH S.A.), inkubowano w ciemności przez 15 min, po czym wirowano przez 30 min przy 3000 g w temperaturze 4°C. Następnie usuwano nadsącz, dodawano 60 µl roztworu 70% etanolu i wirowano przez 15 min przy 1650 g w temperaturze 4°C. Po usunięciu nadsączu, peletkę rozpuszczano w 25 µl dejonizowanego formamidu (Applied Biosystems), po czym denaturowano próbki w temperaturze 95°C przez 3 min i przenoszono na lód na około 10 minut.

### **3.3.7 Sekwencjonowanie DNA**

Próbki DNA umieszczano w sekwenatorze Applied Biosystems 310, rozdziału elektroforetycznego produktów sekwencyjnego PCR dokonywano z użyciem polimeru POP-6 oraz kapilary o długości 47 cm, średnicy 50 µm (PE Applied Biosystems, Rotkreuz, Szwajcaria). Rozdział prowadzono w temperaturze 60°C. Wyniki rozdziału analizowano za pomocą programu Sequencing Analysis Software (Applied Biosystems). Otrzymane sekwencje DNA analizowano przy pomocy programów Ridom TraceEdit (Ridom Bioinformatics) oraz CLC Sequence Viewer 6 (CLC bio) uliniawiając otrzymane sekwencje z referencyjną sekwencją genu *FcγRIIIa* zamieszczoną w internetowej bazie Entrez Gene (ID genu *FcγRIIIa* – 2214). Pierwszy nukleotyd kodonu kodującego pierwszy aminokwas pierwszej domeny zewnątrzkomórkowej ustalono jako nukleotyd numer 1.

### **3.3.8 Analiza statystyczna wyników**

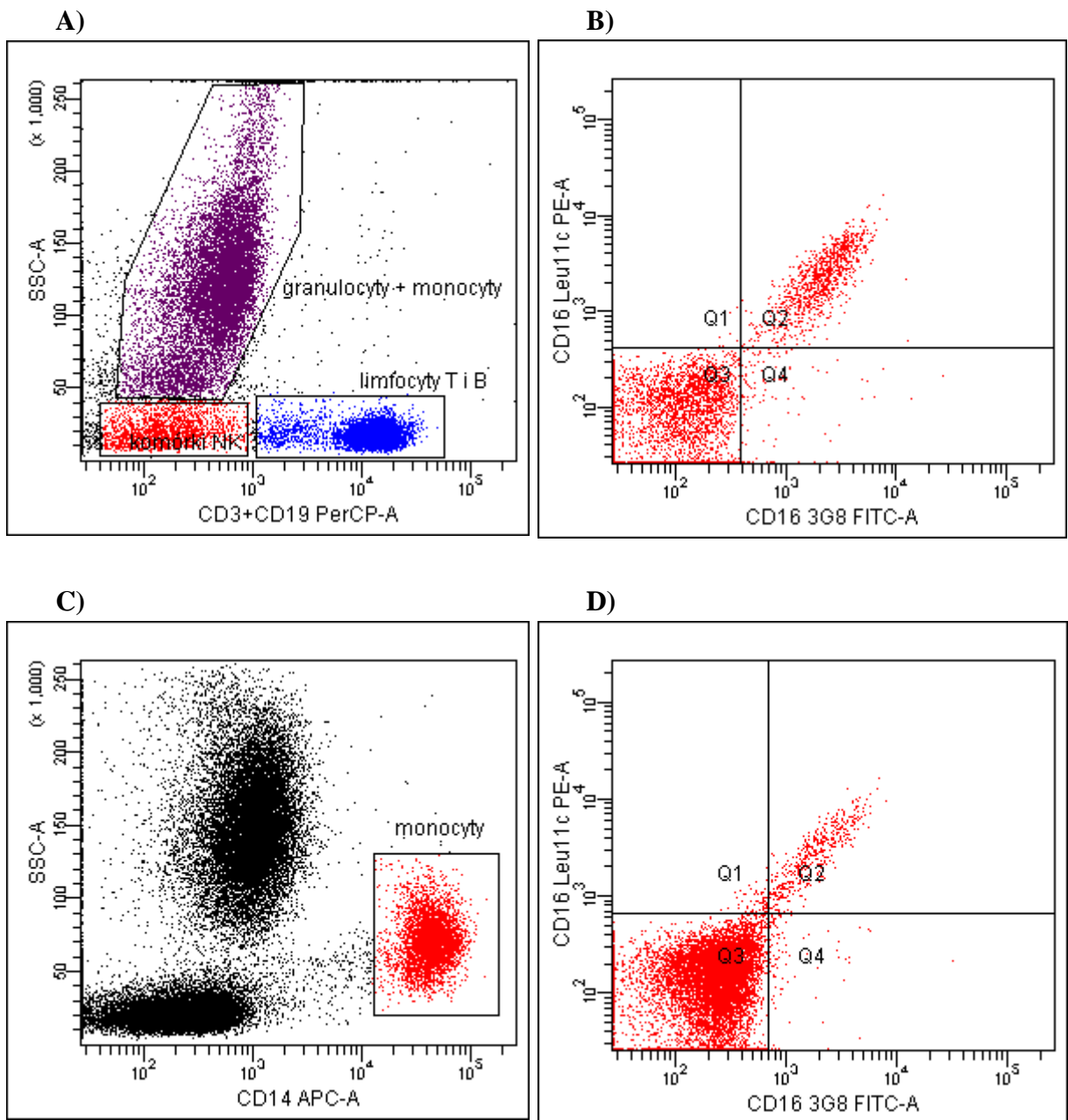
Wyniki przeprowadzonych badań stanowiły cechy jakościowe. Zależności między tymi cechami analizowano dokładnym testem Fishera. Zależności uznawano za istotne statystycznie, gdy ich poziom istotności (p) był równy lub mniejszy od 0,05.

## 4 WYNIKI

### 4.1 Analiza ekspresji CD16a i jego epitopów na komórkach NK oraz monocytach

Ekspresję epitopu B73.1/Leu11c receptora CD16a na komórkach NK oraz monocytach krwi obwodowej oceniano u pacjentów z wrodzonymi niedoborami odporności, nawracającymi zakażeniami herpetycznymi oraz u osób z nowotworami przewodu pokarmowego i zdrowych dawców krwi. Wstępnie badano ekspresję wybranych epitopów białka CD16a - B73.1/Leu11c oraz 3G8, na komórkach NK oraz monocytach krwi obwodowej zdrowych dawców krwi (przykładowa analiza - Rysunek 5). Otrzymane wyniki potwierdziły ekspresję obu epitopów cząsteczki CD16a zarówno na komórkach NK, jak i na monocytach, co tym samym umożliwiło dalszą identyfikację komórek CD16<sup>+</sup> (3G8<sup>+</sup>) u osób niewykazujących wiązania przeciwciał monoklonalnych do epitopu B73.1/Leu11c. W dalszych analizach oznaczano ekspresję obu epitopów receptora CD16a na komórkach NK oraz monocytach w jednej próbówce, identyfikując te komórki łącznie na podstawie parametrów FSC i SSC.

Defekt epitopu B73.1/Leu11c białka CD16a (wyrażający się jako brak wiązania mAb anti-CD16 klonu B73.1/Leu11c), przy jednoczesnej obecności prawidłowego epitopu 3G8, wykryto u 12 dzieci, spośród których u 8 zdiagnozowano pierwotne niedobory odporności humoralnej, u dwojga z nich zespół Di George'a, a u dwóch pozostałych zaburzenia odporności komórkowej – jedno z obniżonym poziomem limfocytów CD4<sup>+</sup>, drugie z nieokreślonym rodzajem niedoboru. Dane kliniczne pacjentów z defektem epitopu B73.1/Leu11c przedstawiono w Tabeli 10.



Rys. 5. Analiza cytometryczna ekspresji epitopów B73.1/Leu11c oraz 3G8 pochodzących od zdrowego dawcy na: komórkach NK (A i B) i monocytach (C i D) krwi obwodowej. Komórki NK identyfikowano na podstawie parametru ziarnistości (SSC) oraz poziomu powierzchniowej ekspresji białek CD3 i CD19 – tj. jako komórki  $CD3^+CD19^+$ , o wartościach SSC odpowiadających SSC limfocytów (A). Monocyty identyfikowano natomiast na podstawie powierzchniowej ekspresji białka CD14 – jako komórki  $CD14^+$  o wartościach SSC pośrednich pomiędzy SSC charakterystycznym dla granulocytów i limfocytów (C). Potwierdzono następnie wiązanie obu klonów przeciwciał anti-CD16 do komórek NK (B) i monocytów (D).

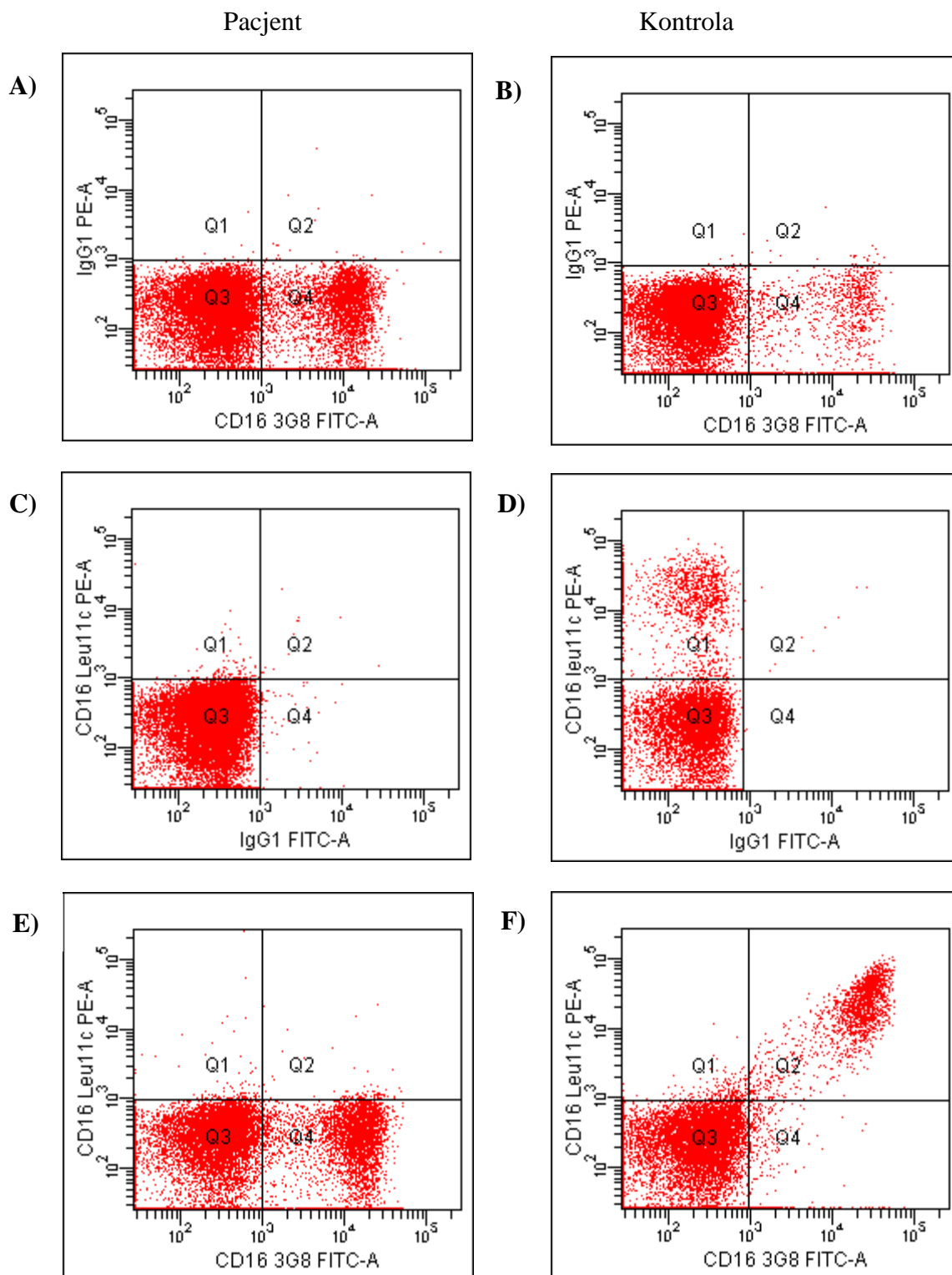
Tabela. 10. Charakterystyka pacjentów z wykrytym defektem epitopu B73.1/Leu11c.

Pacjenci	Wiek [lata] / płeć [K/M]	Diagnoza	Charakterystyka kliniczna	Odsetek i liczba bezwzględna komórek NK w kolejnych oznaczeniach diagnostycznych
P1	10 / M	XLA	Nawracające zakażenia górnych i dolnych dróg oddechowych (zapalenie gardła, zatok, oskrzeli i płuc)	niewykrywalne (<1%)
P2	9 / K	CVID	Nawracające zapalenia gardła i nieżyt nosa, atopowe zapalenie skóry	prawidłowy
P3	7 / M	CVID	Nawracające zakażenia górnych dróg oddechowych (zapalenia gardła i krtani), astma oskrzelowa	prawidłowy
P4	15 / M	CVID	Nawracające zakażenia <i>Herpes simplex</i> , leukopenia, chroniczne zapalenie zatok	prawidłowy
P5	17 / M	Hipogammaglobulinemia z grasiczakiem	Zapalenie wątroby typu C, nawracające zakażenia dróg oddechowych, miastenia, poliendokrynopatia, celiaklia, nawracające zakażenia grzybicze skóry i błon śluzowych	prawidłowy
P6	7 / M	SIgAD	Nawracające zakażenia górnych i dolnych dróg oddechowych (12 razy zapalenie płuc)	prawidłowy
P7	2 / K	THI	Nawracające zakażenia górnych i dolnych dróg oddechowych (zapalenia gardła, krtani, ucha, oskrzeli i płuc)	prawidłowy
P8	2 / M	Zespół DiGeorge'a	Nawracające zapalenia oskrzeli	odsetek prawidłowy, liczba bezwzględna w kilku badaniach obniżona

P9	13 / M	Zespół DiGeorge'a	Nawracające zakażenia górnych dróg oddechowych (zapalenia gardła i krtani) oraz układu moczowego	prawidłowy
P10	11 / M	Anemia aplastyczna z agammaglobulinemią	Nawracające zakażenia górnych dróg oddechowych (zapalenia gardła, krtani, ucha i oskrzeli), zakwalifikowany do przeszczepu szpiku	niewykrywalne (<1%)
P11	7 / M	Zaburzenie odporności komórkowej (obniżona liczba limfocytów T CD4 <sup>+</sup> )	Nawracające zapalenia oskrzeli i płuc, układu moczowego, guz śródpiersia, mózgowe porażenie dziecięce, HIV-1 ujemny	prawidłowy
P12	13 / K	Nieokreślony defekt odporności komórkowej	Nawracające zapalenia migdałków i zatok	prawidłowy

Defektu epitopu nie wykryto natomiast u żadnego pacjenta z grupy osób cierpiących na ciężkie i/lub nawracające zakażenia herpetyczne. Zakażenia tego typu, o łagodnym przebiegu, stwierdzono jedynie u jednego dziecka z defektem epitopu B73.1/Leu11c (P4). Defektu tego nie stwierdzono także w grupie pacjentów z nowotworami przewodu pokarmowego oraz w grupie kontrolnej. Na Rysunku 6 przedstawiono przykładowy wynik analizy cytometrycznej ekspresji epitopu B73.1/Leu11c receptora CD16a na komórkach NK oraz monocytach pacjenta (P2) z obserwowanym defektem tego epitopu, w porównaniu do analizy komórek osoby zdrowej.

Analiza częstości występowania defektu epitopu B73.1/Leu11c w badanych grupach osób wykazała statystycznie istotną zależność pomiędzy występowaniem tego defektu u osób z pierwotnymi niedoborami odporności, w porównaniu do zdrowych osób kontrolnych ( $p=0,0041$ ) oraz między osobami z niedoborami odporności a pacjentami z nowotworami przewodu pokarmowego ( $p=0,0097$ ).

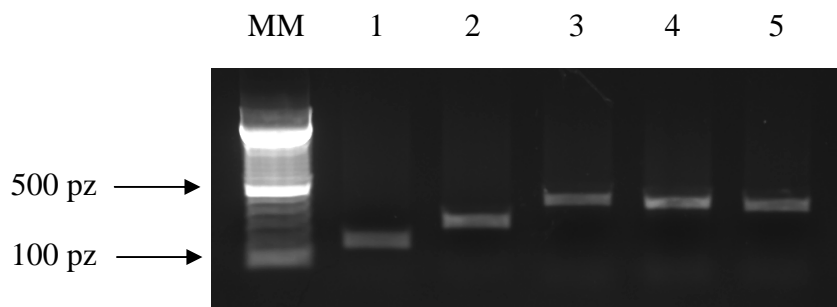


Rys. 6. Analiza cytometryczna badanych epitopów receptora CD16a na komórkach NK i monocytach pacjenta (P2) z defektem epitopu B73.1/Leu11c oraz osoby zdrowej. Na rysunkach A,B,C i D pokazano wiązanie obu klonów przeciwciał anti-CD16 u pacjenta i osoby kontrolnej względem odpowiednich kontroli izotypowych. Na rysunkach E i F pokazano analizę z zastosowaniem obu klonów mAbs. U zdrowej osoby kontrolnej komórki  $CD16^+$  wiązały oba zastosowane do oznaczeń klony przeciwciała anti-CD16 (B,D,F), natomiast do komórek pacjenta z defektem epitopu B73.1/Leu11c wiązało się jedynie przeciwciała klonu 3G8 (A,E). Zastosowanie u pacjenta P2 znakowania z wykorzystaniem mAb wyłącznie klonu B73.1/Leu11c uniemożliwiło wykrycie komórek  $CD16^+$  (C).



## 4.2 Analiza sekwencji genu *FcyRIIIa*

Analiza sekwencji genu *FcyRIIIa* została przeprowadzona u 12 pacjentów, u których wykryto defekt epitopu B73.1/Leu11c oraz u 25 osób z dobranej wiekowo grupy kontrolnej, u których potwierdzono obecność obu prawidłowych epitopów białka CD16a. Sekwencjonowano cały region kodujący genu *FcyRIIIa*, składający się z pięciu egzonów. W tym celu każdy z egzonów amplifikowano metodą PCR. Poprawność przebiegu reakcji PCR sprawdzano wykonując elektroforezę produktów reakcji w żelu agarozowym, porównując położenie prążków pochodzących od produktów PCR względem prążków markera masowego (Rysunek 7).

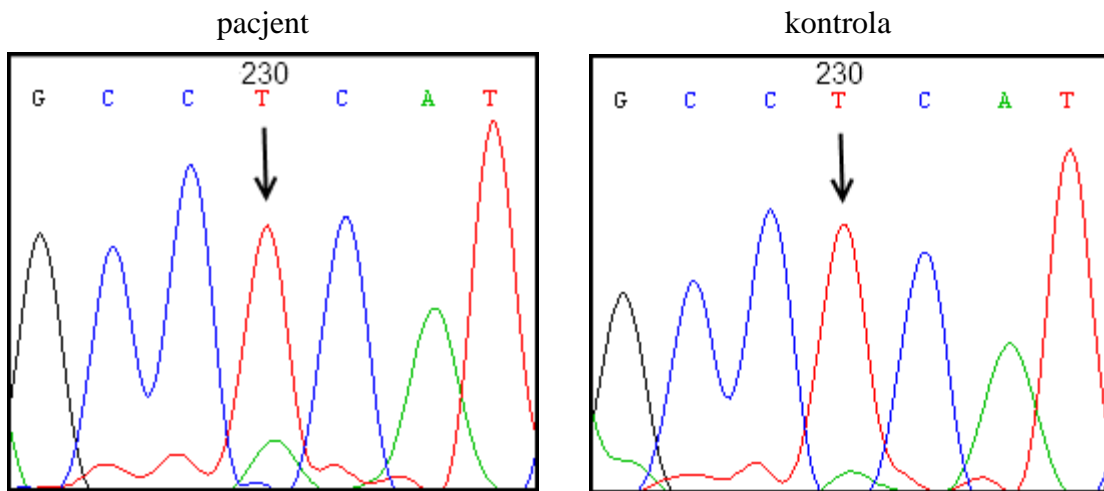


Rys. 7. Wynik elektroforezy produktów PCR pięciu egzonów genu *FcyRIIIa*. MM – marker masowy, 1-5 – numery kolejnych egzonów, pz – par zasad.

Produkty sekwencyjnego PCR poddawano elektroforezie kapilarnej, której wyniki przedstawiano następnie w postaci elektroferogramu, z którego odczytywano sekwencje analizowanego fragmentu DNA.

#### 4.2.1 Analiza polimorfizmu L48R/H i jego związku z defektem epitopu B73.1/Leu11c

Przeprowadzone badania pozwoliły określić występowanie polimorfizmu L48R/H, korelowanego w literaturze z obecnością defektu epitopu B73.1/Leu11c. Polimorfizm L48R/H zlokalizowany jest w obrębie egzonu 3 i polega na substytucji T w miejscu 230, w kodonie CTC kodującym leucynę, przez A, tworząc kodon CAC, kodujący histydynę, lub przez G, tworząc kodon CGC, kodujący argininę. Zmianę 48 aminokwasu uznawano w literaturze za odpowiedzialną za brak wiązania mAb klonu B73.1/Leu11c przez komórki CD16<sup>+</sup>. W niniejszych badaniach nie stwierdzono obecności tego polimorfizmu u żadnego z 12 pacjentów z defektem epitopu B73.1/Leu11c, ani u osób zdrowych. U wszystkich badanych osób wykryto jedynie T w miejscu nukleotydowym 230 (postać homozygotyczna 230T/T), tym samym stwierdzając obecność leucyny w miejscu 20 (fenotypowo 48L/L). Otrzymane wyniki wskazują zatem na brak istotnego związku polimorfizmu L48R/H z obecnością defektu epitopu B73.1/Leu11c białka CD16a. Rysunek 8 przedstawia fragment sekwencji DNA jednego z pacjentów (P2) oraz osoby kontrolnej, zawierający nukleotyd 230.



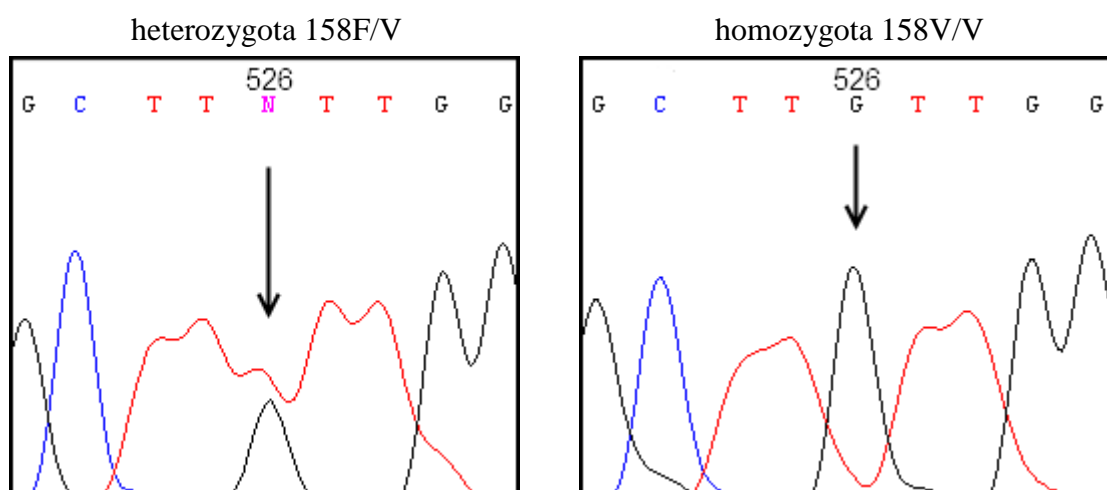
Rys. 8. Fragment sekwencji egzonu 3 obejmujący nukleotyd 230 pacjenta ze stwierdzonym defektem epitopu B73.1/Leu11c oraz osoby kontrolnej, u której nie stwierdzono defektu. U obu osób obecny jest prawidłowy wariant 48L/L (230T/T).

## 4.2.2 Inne wykryte polimorfizmy genu *FcγRIIIa*

Przeprowadzone badania ujawniły także obecność 8 z 19 opisywanych wcześniej polimorfizmów genu *FcγRIIIa*, tj. R18S, L20L, S47N, D64N, I88V, G129D, Y137H, D148D oraz F158V - najczęściej obecnie badanego polimorfizmu. Wszystkie wykryte polimorfizmy znajdowały się w obrębie egzonów 3 i 4. Analiza całego regionu kodującego genu *FcγRIIIa* nie ujawniła innych, nieznanych dotychczas zmian nukleotydowych.

### 4.2.2.1 Polimorfizm F158V

Polimorfizm F158V, zlokalizowany w egzonie 4, wynika z zamiany nukleotydu 526 z T w kodonie TTT kodującym fenyloalaninę na G tworząc kodon GTT kodujący walinę. Aminokwas 158 uczestniczy w wiązaniu IgG do receptora CD16a, co sprawia, że polimorfizm F158V może mieć wpływ na przebieg chorób związanych z odpowiedzią immunologiczną zależną od wiązania IgG. Obecność tego polimorfizmu wykryto u wszystkich badanych osób; w postaci formy heterozygotycznej 526T/G (fenotypowo 158F/V) u 1 pacjenta (8%) oraz u 11 osób kontrolnych (44%), oraz w formie homozygotycznej 526G/G (fenotypowo 158V/V) u 11 pacjentów (92%) i 14 osób (56%) z grupy kontrolnej. Wśród wszystkich badanych osób częstotliwość wariantu 158F/V wyniosła 32,4%, a wariantu 158V/V 67,6%. Rysunek 9 przedstawia polimorfizm F158V w formie homozygotycznej oraz heterozygotycznej.



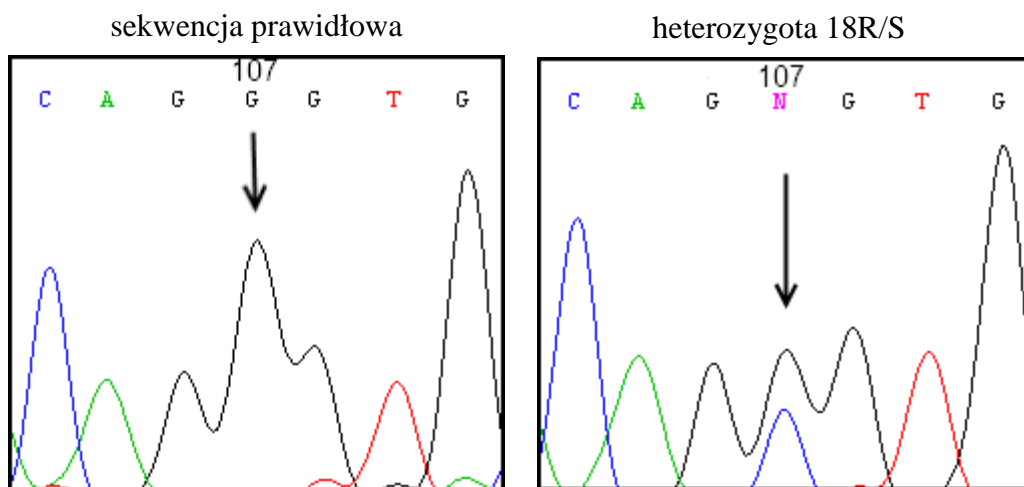
Rys. 9. Wykryte u badanych osób warianty polimorfizmu F158V, heterozygotyczny 158F/V (526T/G) i homozygotyczny 158V/V (526G/G).

#### 4.2.2.2 Polimorfizmy wykryte w obrębie egzonu 3

W obrębie egzonu 3 u badanych osób stwierdzono występowanie pięciu polimorfizmów genu *FcγRIIIa*, tj. R18S, L20L, S47N, D64N, I88V.

##### 4.2.2.2.1 Polimorfizm R18S

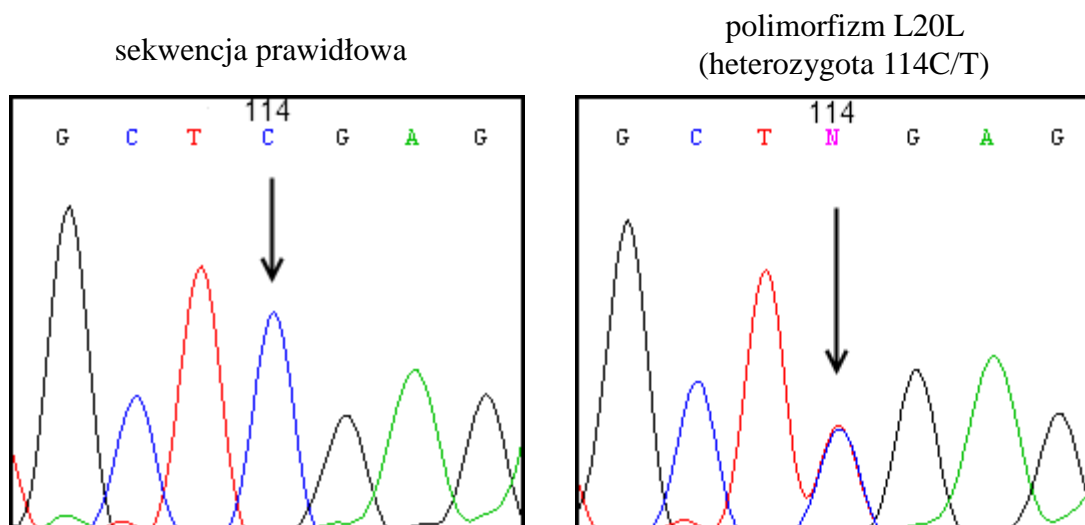
Polimorfizm R18S wynika z zamiany nukleotydu 107 z G w kodonie AGG kodującym argininę na C tworząc kodon AGC kodujący serynę. Obecność tego polimorfizmu wykryto w postaci heterozygotycznej 107G/C, kodującej fenotyp 18R/S, u 7 pacjentów (58%) oraz u 6 osób (24%) z grupy kontrolnej. U pozostałych osób stwierdzono formę homozygotyczną 107G/G. Rysunek 10 przedstawia fragment sekwencji bez polimorfizmu oraz fragment z polimorfizmem R18S.



Rys. 10. Wykryte u badanych osób warianty polimorfizmu R18S, wariant prawidłowy 18R/R (107G/G) oraz heterozygotyczny 18R/S (107G/C).

#### 4.2.2.2 Polimorfizm L20L

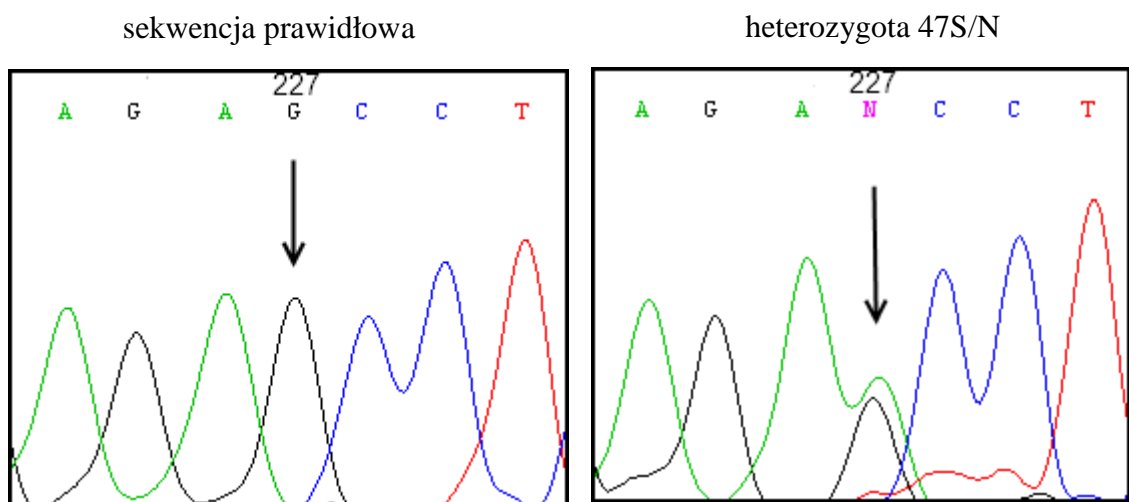
Polimorfizm L20L polega na substytucji G w miejscu 114, w kodonie CTC, przez T tworząc kodon CTT. Zamiana ta nie powoduje zmiany aminokwasu 20, gdyż oba wspomniane kodony kodują leucynę. Polimorfizm L20L w postaci heterozygotycznej 114C/T wykryto u 8 pacjentów (67%) oraz u 7 osób (28%) z grupy kontrolnej. Na Rysunku 11 przedstawiono fragment sekwencji bez i z polimorfizmem L20L.



Rys.11. Wykryte u badanych osób warianty polimorfizmu L20L, wariant prawidłowy 114C/C oraz heterozygotyczny 114C/T, oba kodujące fenotyp 20L/L.

#### 4.2.2.2.3 Polimorfizm S47N

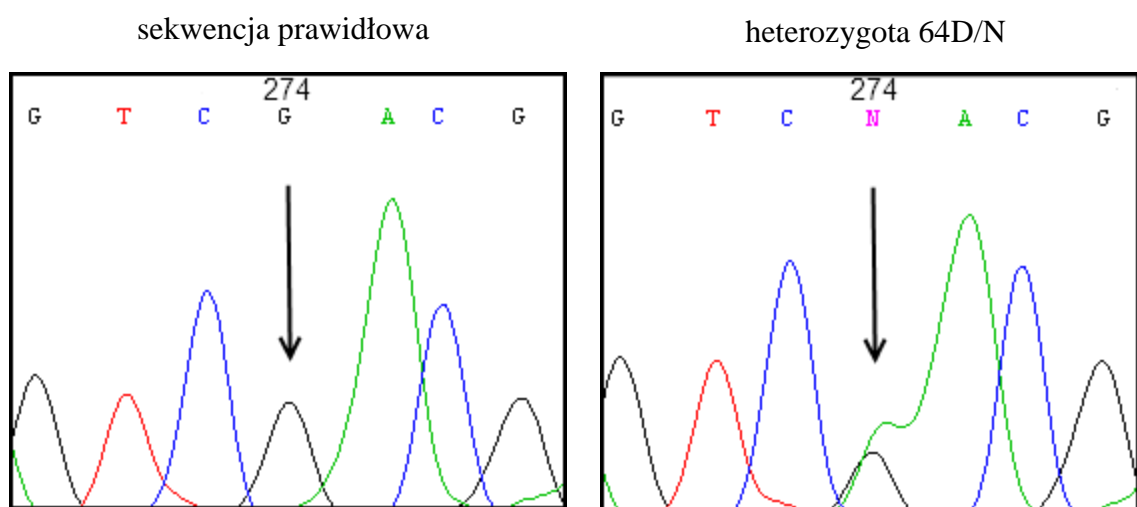
Polimorfizm S47N wynika ze zamiany nukleotydu 227 z G w kodonie AGC kodującym serynę na A tworząc kodon AAC kodujący asparaginę. Obecność tego polimorfizmu wykryto w postaci formy heterozygotycznej 227G/A, kodującej fenotyp 47S/N, u 7 osób (28%) z grupy kontrolnej. W grupie pacjentów oraz u pozostałych osób kontrolnych nie wykryto polimorfizmu, oznaczając jedynie formę heterozygotyczną 227G/G (fenotypowo 47S/S). Rysunek 12 przedstawia fragment sekwencji bez polimorfizmu oraz fragment z polimorfizmem S47N.



Rys. 12. Wykryte u badanych osób warianty polimorfizmu S47N, wariant prawidłowy 47S/S (227G/G) oraz heterozygotyczny 47S/N (227G/A).

#### 4.2.2.2.4 Polimorfizm D64N

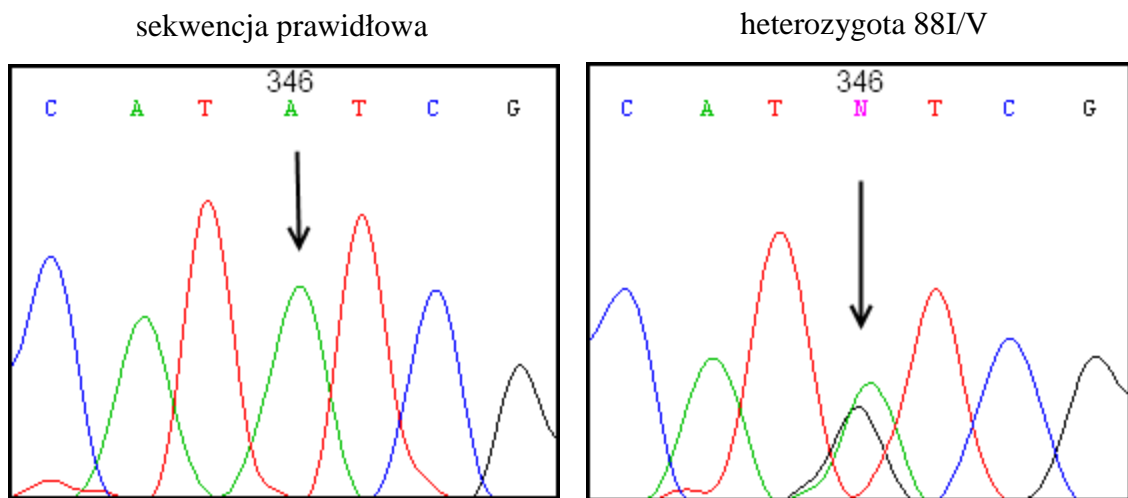
Polimorfizm D64N polega na substytucji G w miejscu 274, w kodonie **GAC** kodującym kwas asparaginowy, przez **A** tworząc kodon **AAC** kodujący asparaginę. Obecność tego polimorfizmu wykryto w postaci formy heterozygotycznej 274G/A, kodującej fenotyp 64D/N, u 3 pacjentów (25%) oraz jednej osoby (4%) z grupy kontrolnej. U pozostałych badanych osób nie wykryto polimorfizmu, oznaczając jedynie formę heterozygotyczną 274G/G (fenotypowo 64D/D). Na Rysunku 13 przedstawiono fragment sekwencji bez i z polimorfizmem D64N.



Rys.13. Wykryte u badanych osób warianty polimorfizmu D64N, wariant prawidłowy 64D/D(274G/G) oraz 64D/N (274G/A).

#### 4.2.2.2.5 Polimorfizm I88V

Polimorfizm I88V wynika z zamiany nukleotydu 346 z A w kodonie ATC kodującym izoleucynę na G tworząc kodon GTC kodujący walinę. Obecność tego polimorfizmu wykryto w postaci formy heterozygotycznej 346A/G, kodującej fenotyp 88I/V, u 2 pacjentów (17%) oraz u 5 osób (20%) z grupy kontrolnej. U pozostałych osób stwierdzono formę homozygotyczną 346A/A. Rysunek 14 przedstawia fragment sekwencji bez polimorfizmu oraz fragment z polimorfizmem I88V.



Rys. 14. Wykryte u badanych osób warianty polimorfizmu I88V, wariant prawidłowy 88I/I (346A/A) oraz heterozygotyczny 88I/V (A/G).

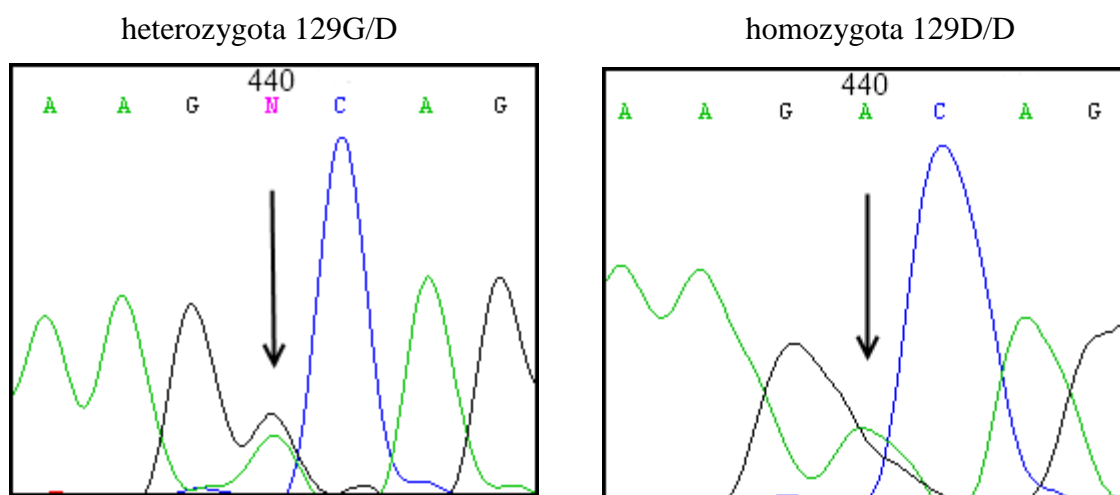


### 4.2.2.3 Polimorfizmy wykryte w obrębie egzonu 4

W obrębie egzonu 4 stwierdzono występowanie, poza opisanym już wcześniej polimorfizmem F158V, trzy polimorfizmy genu *FcγRIIIa*, tj. G129D, Y137H, D148D.

#### 4.2.2.3.1 Polimorfizm G129D

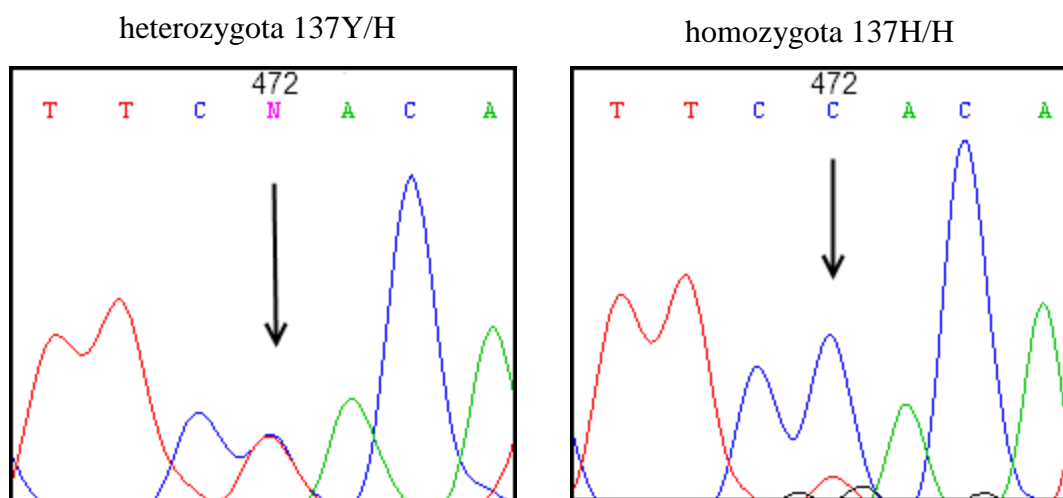
Polimorfizm G129D wynika z zamiany nukleotydu 440 z G w kodonie GGC kodującym argininę na A tworząc kodon GAC kodujący kwas asparaginowy. Obecność tego polimorfizmu wykryto w postaci formy homozygotycznej 440A/A (fenotypowo 129D/D) u 1 pacjenta (8%), oraz w formie heterozygotycznej 440G/A (fenotypowo 129G/D) u 11 pacjentów (92%) i u wszystkich 25 osób (100%) z grupy kontrolnej. Rysunek 15 przedstawia fragment sekwencji z polimorfizmem G129D w formie homozygotycznej oraz heterozygotycznej.



Rys. 15. Wykryte u badanych osób warianty polimorfizmu G129D, heterozygotyczny 129G/D (440G/A) oraz homozygotyczny 129D/D (440 A/A).

#### 4.2.2.3.2 Polimorfizm Y137H

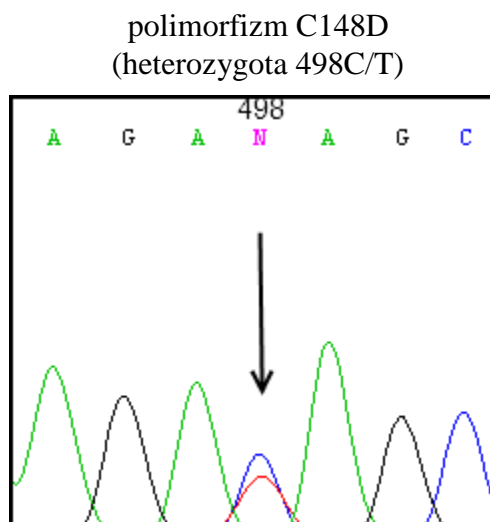
Polimorfizm Y137H polega na substytucji T w miejscu 472 w kodonie TAC kodującym tyrozynę, przez C, tworząc kodon CAC kodujący histydynę. Obecność tego polimorfizmu wykryto w postaci formy homozygotycznej 472C/C (fenotypowo 137H/H) u 3 pacjentów (25%) oraz u 1 osoby kontrolnej (4%), a także w formie heterozygotycznej 472T/C (137Y/H) u 9 pacjentów (75%) oraz u 24 osób (96%) z grupy kontrolnej. Rysunek 16 przedstawia fragment sekwencji z polimorfizmem G129D w formie homozygotycznej oraz heterozygotycznej.



Rys. 16. Wykryte u badanych osób warianty polimorfizmu Y137H, heterozygotyczny 137Y/H (472T/C) oraz homozygotyczny 137H/H (472C/C).

#### 4.2.2.3.3 Polimorfizm D148D

Polimorfizm D148D polega na substytucji C w miejscu 498, w kodonie GAC, przez T tworząc kodon GAT. Zamiana ta nie powoduje zmiany aminokwasu 148, gdyż oba wspomniane kodony kodują kwas asparaginowy. Obecność tego polimorfizmu wykryto w postaci formy heterozygotycznej 498C/T u wszystkich badanych osób. Rysunek 17 przedstawia polimorfizm D148D w formie heterozygotycznej.



Rys. 17. Wykryty u wszystkich badanych osób wariant heterozygotyczny 498C/T polimorfizmu D148D, kodujący fenotyp 148D/D.

Wykryte polimorfizmy, celem podsumowania otrzymanych wyników, zestawiono w Tabeli 11.

Tab. 11. Zestawienie wariantów polimorfizmów wykrytych u pacjentów z defektem epitopu B73.1/Leu11c oraz w grupie kontrolnej.

Numer egzonu genu <i>FcγRIIIa</i>	Polimorfizm	Wersja polimorfizmu	Liczba osób z wykrytą daną formą polimorfizmu	
			Pacjenci z defektem epitopu B73.1/Leu11c n = 12	Grupa kontrolna n = 25
3	R18S	18R/R (107G/G)	5	19
		18R/S (107G/C)	7	6
	L20L	20L/L (114C/C)	2	18
		20L/L (114C/T)	8	7
	S47N	47S/S (227G/G)	12	18
		47S/N (227G/A)	0	7
	L48H/R	48L/L (230T/T)	12	25
	D64N	64D/D (274G/G)	9	24
		64D/N (274G/A)	3	1
	I88V	88I/I (346A/A)	10	20
88I/V (346A/G)		2	5	
4	G129D	129G/D (440G/A)	11	25
		129D/D (440A/A)	1	0
	Y137H	137Y/H (472T/C)	9	24
		137H/H (472C/C)	3	1
	D148D	148D/D (498C/T)	12	25
	F158V	158F/V (526T/G)	1	11
		158V/V (526G/G)	11	14

## 5 DYSKUSJA

Zaburzenia dotyczące liczby i/lub funkcji leukocytów krwi obwodowej, mających na swojej powierzchni receptor CD16a, tj. komórek NK oraz subpopulacji monocytów CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup>, są związane z szerokim spektrum objawów klinicznych. Obserwuje się je u pacjentów z ciężkimi zakażeniami wirusowymi, różnego typu nowotworami lub chorobami autoimmunizacyjnymi. Choroby te często współwystępują z niektórymi pierwotnymi niedoborami odporności.

Jednym z opisywanych zaburzeń związanych z komórkami posiadającymi za swojej powierzchni receptor CD16a, jest defekt epitopu B73.1/Leu11c. Defekt ten opisano na przestrzeni ostatnich kilkunastu lat u kilkorga dzieci [20,31-33]. Charakterystycznym objawem tego zaburzenia, według autorów, były ciężkie i nawracające infekcje wirusami z rodziny *Herpesviridae*. Co więcej, u dzieci tych wykluczono znane pierwotne niedobory odporności.

Defekt epitopu B73.1/Leu11c powiązano, jak się wydaje – arbitralnie, ze zmianą nukleotyd 230 w genie *FcyRIIIa*, kodującym CD16a, co skutkowało zmianą aminokwasu 48 z L na H lub R. Zmianę tą stwierdzono u wspomnianych pacjentów wykazujących ciężkie zakażenia herpetyczne. Pozwoliło to autorom badań stwierdzić, iż jest to mutacja odpowiedzialna za tego rodzaju manifestację kliniczną. Jednocześnie, inne doniesienia wskazują, iż zmiana ta jest jedynie polimorfizmem obserwowanym także u zdrowych osób [30,34,35].

Spośród grupy osób przebadanych w prezentowanych badaniach, defekt epitopu B73.1/Leu11c receptora CD16a wykryto u 12 pacjentów pediatrycznych, spośród których u 11 zdiagnozowano określone pierwotne niedobory odporności. U jednego z tych pacjentów nie zdefiniowano konkretnego rodzaju niedoboru odporności, choć dziecko to, podobnie jak pozostałe, cierpiało na nawracające zakażenia układu oddechowego. Nie wykryto natomiast defektu tegoż epitopu ani u zdrowych osób kontrolnych, ani u pacjentów z nowotworami przewodu pokarmowego. Obserwacje te sugerują, iż defekt epitopu B73.1/Leu11c może być wybiórczo związany z pierwotnymi niedoborami odporności. W literaturze nie istnieją jednak dane dotyczące związku występowania defektu epitopu B73.1/Leu11c z wrodzonymi, zdefiniowanymi zaburzeniami dotyczącymi funkcjonowania układu odpornościowego. Prezentowane w niniejszej pracy obserwacje przeczą więc wcześniejszym doniesieniom opisującym powyższy defekt jako izolowane zaburzenie związane jedynie z komórkami NK

[20,31-33]. W cytowanych, wcześniejszych badaniach, hipogammaglobulinemię stwierdzono tylko u jednego dziecka [32]. W kontekście historycznych doniesień opisujących zaburzenia funkcjonowania komórek NK i monocytów CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup> u chorych z nowotworami [93-98] wydaje się, iż również nie były one związane z obecnością defektu epitopu B73.1/Leu11c, albowiem w niniejszych badaniach nie wykazano obecności defektu epitopu u żadnego z 91 pacjentów z nowotworami układu pokarmowego.

Opisywani w literaturze nieliczni (jedynie ośmioro) chorzy z defektem epitopu B73.1/Leu11c cierpieli na ciężkie, nawracające zakażenia wirusami z rodziny *Herpesviridae*, w tym VZV, HSV i EBV [20,31-33]. Sugerowano, iż to właśnie defekt epitopu receptora CD16a wiążącego mAb klonu B73.1/Leu11c odpowiada za tego rodzaju zaburzenia odporności przeciwwirusowej. W opublikowanych pracach defekt epitopu B73.1/Leu11c uznano za jeden z izolowanych niedoborów odporności związanych z nieprawidłowym funkcjonowaniem komórek NK, wspominając go zresztą w klasyfikacjach niedoborów odporności [41-43]. Jednakże, u pacjentów z tym samym defektem, prezentowanych w niniejszej pracy, nie stwierdzono ciężkich i/lub nawracających zakażeń herpetycznych. Jedynie u jednego dziecka obserwowano miernie nasilone, nawracające zakażenie HSV. Natomiast w grupie 9 dzieci z rzeczywiście ciężkimi klinicznie i/lub nawracającymi zakażeniami herpetycznymi nie obserwowano zjawiska zaburzonego wiązania mAbs klonu B73.1/Leu11c do cząsteczek CD16a. Prezentowane obserwacje leżą w jawnej sprzeczności z wcześniejszymi doniesieniami sugerując, iż obecność defektu epitopu B73.1/Leu11c nie wykazuje jednoznacznego związku z ciężkimi infekcjami herpetycznymi. W poprzednich doniesieniach [20,31-33] nie tłumaczono zresztą, w jaki sposób wspomniany defekt może determinować zaburzenia komórkowej odporności przeciwwirusowej. Receptor CD16a występuje na komórkach zaangażowanych w odpowiedź przeciwwirusową (komórki NK, monocyty) biorąc udział w reakcji ADCC. Jednakże, epitop B73.1/Leu11c nie wiąże fragmentu Fc IgG – jest zlokalizowany w obrębie dystalnej domenie Ig-podobnej, innej niż miejsce wiązania fragmentów Fc [11,20]. Stąd też, u pacjentów tych nie znajdowano defektów dotyczących reakcji ADCC [20,31-33]. U części z nich obserwowano jednak obniżoną cytotoksyczność komórek NK względem referencyjnej linii komórkowej K562. U wszystkich jednak stwierdzano prawidłową liczbę komórek NK. Podobnie, u większości dzieci z naszej grupy pacjentów z defektem epitopu B73.1/Leu11c, w rutynowych badaniach immunodiagnostycznych wykazywano prawidłowy odsetek i liczebność komórek NK. Natomiast w trakcie prowadzonych badań własnych nie przeprowadzono testów funkcjonalnych komórek NK. Można zatem jedynie sugerować, iż za zwiększoną podatność

na obserwowane przez innych badaczy zakażenia herpetyczne może odpowiadać odrębny defekt/defekty funkcjonalne komórek wykazujących ekspresję receptora CD16a, związane raczej z ich bezpośrednią cytotoksycznością niż z procesem ADCC.

Defekt epitopu B73.1/Leu11c wiązano ze zmianą nukleotydu 230 w genie *FcγRIIIa*, kodującym CD16a, skutkującą zmianą aminokwasu w pozycji 48 z L na H lub R [20,30-33]. U opisywanych pacjentów z ciężkimi, nawracającymi zakażeniami herpetycznymi i defektem epitopu B73.1/Leu11c stwierdzano genotyp odpowiedni dla fenotyp *FcγRIIIa*-48H/H, sugerując tym samym, iż zmiana nukleotydu 230 jest chorobotwórczą mutacją odpowiedzialną za obserwowane objawy kliniczne [20,31,32]. Wbrew oczekiwaniom, niniejsze badania wykazały, zarówno u wszystkich dzieci z defektem epitopu B73.1/Leu11c, jak i osób kontrolnych, jedynie obecność leucyny w miejscu 48 (*FcγRIIIa*-48L/L). Wynik ten sugeruje, iż zmiana 48 aminokwasu nie ma w istocie związku z defektem epitopu B73.1/Leu11c oraz zakażeniami herpetycznymi, tym bardziej, że u badanych dzieci cierpiących na zakażenia herpetyczne nie stwierdzono defektu tego epitopu.

Niewielka liczba opisanych wcześniej pacjentów z przedmiotowym defektem wskazywałaby, iż zarówno defekt epitopu B73.1/Leu11c, jak i wariant *FcγRIIIa*-48H/H, występują niezwykle rzadko. Dane literaturowe wskazują jednak, że polimorfizm L48R/H występuje u zdrowych osób rasy kaukaskiej z częstotliwością 14% (48R – 6%, 48H – 8%) [30]. Wartość ta wskazuje, iż powyższy defekt powinien być wykrywany u około 14% osób rasy kaukaskiej zakładając, iż do znakowania komórek używa się przeciwciał anti-CD16 klonu B73.1/Leu11c [30]. Wskazywałoby to, że defekt epitopu B73.1/Leu11c, a tym samym związana z nim zwiększona podatność na zakażenia herpetyczne, powinny być relatywnie częste. Wśród przebadanej w niniejszej pracy grupy pacjentów z niedoborami odporności, częstość ta wyniosła 7,3%, a biorąc pod uwagę wszystkie badane osoby (pacjentów z pierwotnymi niedoborami odporności, zakażeniami herpetycznymi, nowotworami układu pokarmowego oraz zdrowe osoby kontrolne) – około 3,1%. Różnicę tą można tłumaczyć specyfiką grupy badanej, której odsetek pacjentów z niedoborami odporności, zakażeniami czy nowotworami wynosił 71% wszystkich przebadanych metodą cytometryczną osób. Jednakże, w grupie zdrowych osób kontrolnych, odpowiadającej grupie przebadanej przez *de Haas i wsp.* [30], defektu nie stwierdzono u nikogo, pomimo, iż powinno się go wykryć szacunkowo u kilkunastu osób. Wyniki te mogą sugerować, iż częstość występowania defektu epitopu B73.1/Leu11c oparta na częstości zmiany nukleotydu 230 może nie być poprawna.

Ponadto, obserwowana niska częstotliwość tego defektu wydaje się sugerować, iż jest on raczej rzadki, co potwierdza wcześniejsze doniesienia [20,31-33] opisujące łącznie jedynie ośmioro pacjentów z zaburzeniami znakowania komórek NK przy pomocy mAb klonu B73.1/Leu11c. Niemniej jednak, pomimo, iż wnioski *de Haas i wsp.* są najczęściej przytaczane w literaturze, zostały one wysnute jedynie w oparciu o wykryte warianty heterozygotyczne 48L/R i 48L/H, gdyż u nikogo z badanych osób nie stwierdzono homozygotycznego fenotypu 48H/H. W innych natomiast badaniach [35], fenotyp ten wykryto u 2% przebadanych zdrowych osób. Stwierdzenie występowania izoformy 48H/H u zdrowych osób, podobnie jak uzyskane w niniejszej pracy wyniki (brak związku defektu epitopu B73.1/Leu11c z zakażeniami herpetycznymi oraz stwierdzenie u pacjentów z tym defektem izoformy 48L/L), może wskazywać na brak związku pomiędzy zmianą aminokwasu w pozycji 48 a zaburzeniami odporności przeciwwirusowej. Może także potwierdzać inne doniesienia, w których zmianę aminokwasu 48L na 48H lub 48R uważano za naturalnie występujący polimorfizm [30,34,35]. Tym samym, niniejsza praca po raz pierwszy porównuje przeciwstawne doniesienia podające, iż zmiana aminokwasu 48 jest wynikiem albo chorobotwórczej mutacji, albo naturalnie występującym polimorfizmem. Zmiana aminokwasu L48R/H wydaje się być naturalnie występującym polimorfizmem, nie chorobotwórczą mutacją.

Analiza całego regionu kodującego genu *FcyRIIIa* nie wykazała obecności innej zmiany nukleotydowej, która mogłaby być odpowiedzialna za obserwowany defekt epitopu B73.1/Leu11c. Może to oznaczać, że za zmianę struktury białka CD16a, powodującej brak wiązania mAb klonu B73.1/Leu11c, mogą odpowiadać np. zmiany potranslacyjne łańcucha białkowego. W związku z faktem, iż receptor CD16 jest białkiem o wysokim stopniu glikozylacji [5], można domniemywać, iż to zmieniony wzór glikozylacji może skutkować brakiem wiązania tegoż klonu mAb. Możliwe także, że za defekt epitopu B73.1/Leu11c odpowiada zmiana w obrębie genu *FcyRIIIa* niewykrywalna metodą bezpośredniego sekwencjonowania. Pacjenci z tym defektem mogliby zamiast genu *FcyRIIIa* posiadać gen fuzyjny powstały podczas rearanzacji z połączenia genów *FcyRIIIa* oraz *FcyRIIIb*, posiadający początkowy fragment genu *FcyRIIIb* i końcowy fragment *FcyRIIIa*. Gen ten wykazywałby ekspresję podobną do genu *FcyRIIIa*, czyli w komórkach NK oraz monocytach CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup>. Obecność N-końcowego fragmentu podobnego do CD16b w tak powstałym łańcuchu białka CD16a powodowałaby ekspresję leucyny w miejscu 48, skutkując prawidłowym wiązaniem mAb klonu B73.1/Leu11c. Hipoteza ta może być prawdopodobna z racji wysokiego podobieństwa genów *FcyRIIIa* i *FcyRIIIb* [5,22] oraz ich występowania



u różnych osób w różnej liczbie kopii [24-27]. Postawione hipotezy wymagają jednak dalszych badań.

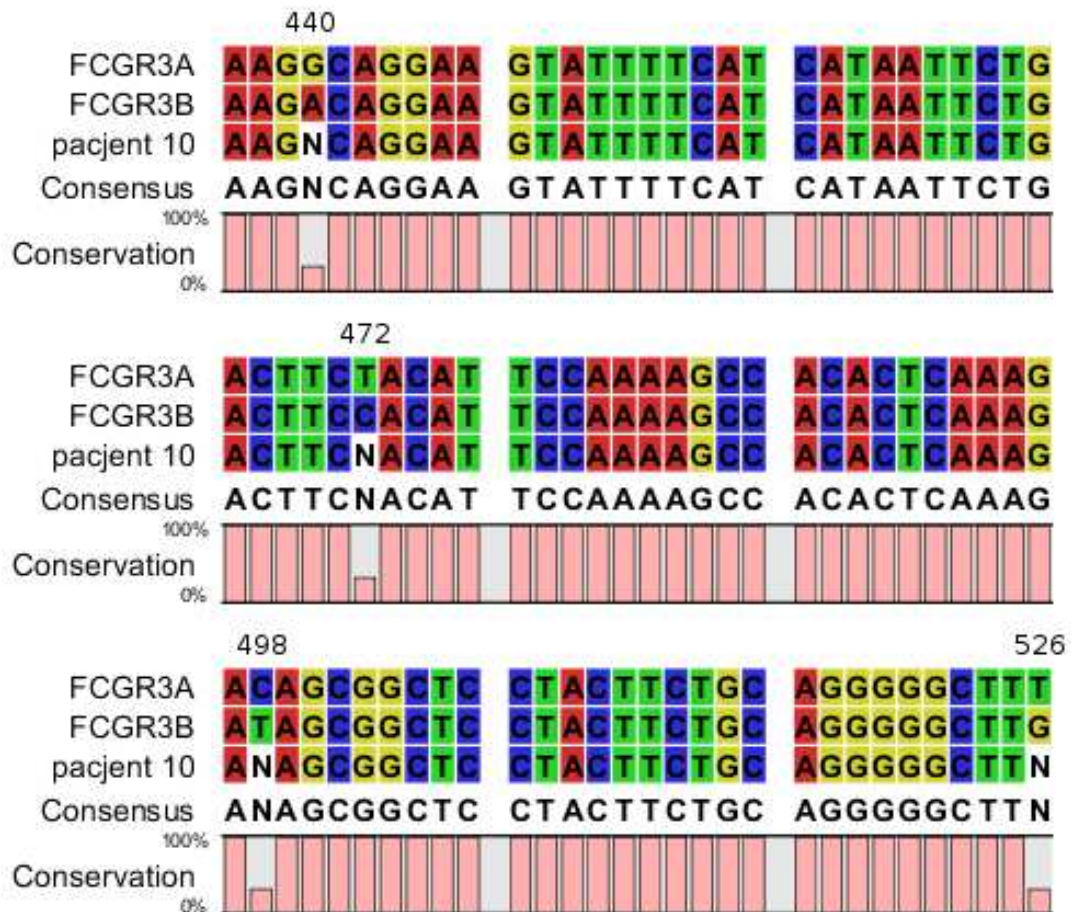
Przeprowadzone badania genetyczne ujawniły także obecność 8 z 19 opisywanych wcześniej polimorfizmów genu *FcyRIIIa*, tj.: R18S, L20L, S47N, D64N, I88V, G129D, Y137H, D148D oraz F158V.

Spośród wykrytych polimorfizmów, jedynie F158V (będący jednocześnie najczęściej badanym polimorfizmem genu kodującego CD16a), wedle danych literaturowych, może predysponować do wystąpienia różnego rodzaju chorób, wpływać na przebieg zakażeń, czy też na skuteczność terapii biologicznych [34,36,45-47,51,52,54-57]. Aminokwas 158 uczestniczy w wiązaniu ligandu, przy czym izoforma V/V ma wyższe powinowactwo do wiązania fragmentów Fc immunoglobulin niż forma F/F, natomiast forma heterozygotyczna F/V jest funkcjonalnie bardziej zbliżona do V/V. Polimorfizm ten wykryto u wszystkich zbadanych osób, wśród których heterozygotyczną postać F/V stwierdzono u 32,4%, a homozygotyczną postać V/V u 67,6% badanych. Wyniki te odbiegają od danych literaturowych, które wariant V/V opisują u 10-20%, a F/V u około 45% światowej populacji [14,37-40]. Różnice te można tłumaczyć niewielką liczbą zanalizowanych w niniejszej pracy osób, jednakże, zwiększona częstotliwość wykrytego wariantu V/V może mieć także związek z charakterystyką badanej grupy. Wśród zbadanych pacjentów z defektem epitopu B73.1/Leu11c, którzy jak wspomniano wcześniej, cierpią z powodu pierwotnych niedoborów odporności, częstość wariantu V/V była szczególnie wysoka (92%). Wynik ten może mieć zatem związek z ich stanem klinicznym. Zarówno opisane u tych pacjentów niedobory odporności, jak i występowanie izoformy V/V, wiąże się ze zwiększoną podatnością na choroby autoimmunizacyjne, np. reumatoidalne zapalenie stawów. Jednakże, inne warianty polimorfizmu F158V także są powiązane ze zwiększoną podatnością na występowanie chorób autoimmunizacyjnych, choć każdy z wariantów predysponuje do innej choroby. Pomimo, iż u żadnego z pacjentów dotychczas nie wykryto chorób autoimmunizacyjnych korelowanych z izoformą 158V/V [51,52], nie jest jednak wykluczone, iż pacjenci ci mogą w przyszłości je rozwinąć.

Ponadto, otrzymane wyniki nie potwierdzają opisywanego wcześniej sprzężenia polimorfizmów L48R/H i F158V. Opisano wcześniej korelację występowania izoformy 48L wraz z 158F, natomiast 48R lub 48H z 158V [30,36]. Przeprowadzone badania, ujawniając jedynie fenotyp 48L/L u wszystkich przebadanych osób oraz 158V/V lub 158F/V, pozostają w opozycji do wcześniejszych danych literaturowych. Wynik ten może sugerować, iż populacja polska jest być może – w pewnym stopniu – odmienna genetycznie od innych populacji kaukaskich.

Pozostałe wykryte podczas prowadzonych badań polimorfizmy opisane są w referencyjnych bazach sekwencji genów, takich jak Entrez GenBank, jednak w literaturze nie poświęcono im szczególnej uwagi. Stąd też, nieznana jest częstość ich występowania. Można jednak zaobserwować, iż polimorfizmy te występują jedynie w obrębie trzeciego i czwartego egzonu genu *FcγRIIIa* kodujących zewnątrzkomórkowe domeny Ig-podobne, odpowiednio: dystalną i proksymalną [9]. Nie wykryto natomiast polimorfizmów opisywanych w obrębie egzonów 1 oraz 5. Otrzymane wyniki mogą wskazywać, iż region genu kodujący fragment zewnątrzkomórkowy białka CD16a jest najbardziej polimorficzny. Jednocześnie, fragmenty białka kodowane przez egzony 1 i 5 - odpowiednio, peptyd sygnałowy oraz fragment transbłonowy i cytoplazmatyczny - wydają się być mało zmienne. Może być to związane z funkcją pełnioną przez te fragmenty białka, gdyż są odpowiedzialne za ekspresję błonową receptora. Fragment łańcucha białkowego kodowany przez egzon 1 odpowiada za ukierunkowanie łańcucha receptora jako białka błonowego, natomiast egzon 5 za jego zakotwiczenie w błonie oraz asocjacje z cytoplazmatycznymi kinazami. Konserwatywne zachowanie sekwencji tych fragmentów może być zatem istotne dla zachowania ich prawidłowej funkcji, stąd obserwowana niska zmienność genetyczna kodujących je egzonów.

Zaobserwowano ponadto wysoką częstotliwość występowania wariantów heterozygotycznych wykrytych polimorfizmów u większość badanych osób. Dotyczy to szczególnie polimorfizmów egzonu 4 (G129D, Y137H, D148D), w przypadku których u większości przebadanych osób wykrywano formy heterozygotyczne. W celu wizualizacji tego spostrzeżenia wykonano przykładowe uliniowanie otrzymanej sekwencji czwartego egzonu genu pacjenta 10, u którego wykryto w formie heterozygotycznej wszystkie cztery polimorfizmy opisane w obrębie tego egzonu, z prawidłowymi sekwencjami genów *FcγRIIIa* i *FcγRIIIb*. Wynik uliniowania przedstawiono na Rysunku 18. Podobne obserwacje odnotowano w obrębie egzonu 3, choć częstotliwość form heterozygotycznych wykrywanych w tym egzonie była niższa niż w egzonie 4.



Rys. 18. Uliniowanie sekwencji czwartego egzonu genu pacjenta 10 z prawidłowymi sekwencjami genów *FcγRIIIa* i *FcγRIIIb*.

Porównanie sekwencji egzonu 4 genu *FcγRIIIa* oraz *FcγRIIIb* wskazuje, iż polimorfizmy te są odwrotnością występujących w tych samych miejscach polimorfizmów genu *FcγRIIIb* (D129G, H137Y oraz D148D). Obserwacja ta może sugerować, iż stwierdzone formy heterozygotyczne mogą być związane z obecnością dwóch różnych nukleotydów występujących w analogicznym miejscu, lecz w dwóch różnych genach. Podobnie, wysoką częstotliwość form heterozygotycznych zaobserwowano w przypadku polimorfizmu F158V. Polimorfizm ten opisywany jest jednak jedynie w genie kodującym CD16a, natomiast w białku CD16b, w miejscu 158, opisuje się konstytutywną ekspresję V. Może to sugerować, że wykryte izoformy 158F/V wynikają z detekcji nukleotydu T z genu *FcγRIIIa* (kodującego 158F) oraz G z genu *FcγRIIIb* (kodującego 158V). Mogłoby to oznaczać, że osoby, u których wykryto wariant 158F/V, w rzeczywistości posiadają fenotyp *FcγRIIIa*-158F/F oraz *FcγRIIIb*-158V/V. Znaczne podobieństwo sekwencji obu genów może sprawiać, iż stosowane do amplifikacji oraz sekwencjonowania kolejnych egzonów startery przyłączają się do sekwencji obu genów. Jednakże, metoda bezpośredniego sekwencjonowania genu *FcγRIIIa* zastosowana

w niniejszej pracy oparta była na standardowo używanej metodzie *Treona i wsp.* [34], będącej jednocześnie metodą szeroko rozpowszechnioną [20,31,34,36,160,161]. W pracach bazujących na jej wykorzystaniu nie sugerowano jednak, że metoda ta może być nieodpowiednia do analizy sekwencji genu *FcγRIIIa*. Nie wskazywano także na wysoką częstotliwość występowania form heterozygotycznych wykrywanych polimorfizmów. Dla przykładu, *Treon i wsp.* wykryli w badanej przez siebie grupie osób obecność wszystkich trzech wersji polimorfizmu F158V (158F/F, F/V oraz V/V), natomiast w niniejszych badaniach, u nikogo nie stwierdzono wariantu 158F/F. Podobnie, z racji konstytutywnej ekspresji leucyny w miejscu 48 w genie *FcγRIIIb*, oraz obecności polimorfizmu w tym samym miejscu genu *FcγRIIIa* (L48R/H), możliwe było by zafałszowanie detekcji nukleotydu kodującego R lub H przez nukleotyd kodujący L. Jednakże, w cytowanych badaniach [34] wykryto u prawie 30% przebadanych osób formy heterozygotyczne 48L/R oraz 48L/H, nie obserwowane w prezentowanych badaniach.

Istnieją także doniesienia wskazujące na problemy z analizą sekwencji genów *FcγRIIIa* i *FcγRIIIb* tradycyjnymi metodami sekwencjonowania [35,162,163]. Prace te sugerują zastosowanie innych metod wykrywania polimorfizmów genu *FcγRIIIa*, tj. metody oparte na reakcji PCR w czasie rzeczywistym [163], lub modyfikacji tradycyjnych metod, np. zastosowanie starterów, które dzięki jednonukleotydowej różnicy od sekwencji genu dla CD16b, umożliwią zwiększenie ich specyficzności wobec genu CD16a [162,164,165]. Wydaje się jednak, iż taka modyfikacja starterów nie powinna znacząco wpłynąć na specyficzność metody względem wybranego genu, tym bardziej, iż podobne, niewielkie modyfikacje starterów stosuje się w inżynierii genetycznej do wprowadzania mutacji punktowych w namnażanym odcinku DNA [166-168]. Możliwe jest jednak, iż w przypadku genów o tak znacznym podobieństwie jak *FcγRIIIa* oraz *FcγRIIIb*, proponowane metody mogą pozwolić na dokładniejsze oznaczanie polimorfizmów badanych genów. Aby mieć pewność, że sekwencjonuje się gen kodujący CD16a a nie CD16b, można by hipotetycznie określać sekwencje cDNA, uzyskanego na matrycy mRNA, izolowanego z komórek NK i/lub monocytów CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup>. Jednakże, izolację tych komórek metodą sortowania z wykorzystaniem cytometru przepływowego należałoby przeprowadzić z dość znacznych objętości krwi badanych osób (z ok. 50 ml), co utrudniałoby przeprowadzenie badań u pacjentów, a tym bardziej u dzieci.

Dane literaturowe wskazują także, iż obecność defektu epitopu B73.1/Leu11c może mieć implikacje diagnostyczne [33]. Stosowanie przeciwciała monoklonalnego anty-CD16 klonu B73.1/Leu11c jest szeroko rozpowszechnione w rutynowej diagnostyce immunologicznej, w tym w immunofenotypowaniu komórek NK. Komórki NK rutynowo wykrywa się oznaczając fenotyp o charakterystyce:  $CD3^-/CD56^+/CD16^+$ . Jednakże, z powodu niskiej ekspresji CD56 i CD16 na komórkach NK, stosuje się przeciwciała skierowane przeciwko obu białkom wyznakowane tym samym barwnikiem fluorescencyjnym. Stąd też postulowano, iż pacjenci z defektem epitopu B73.1/Leu11c podczas rutynowej immunodiagnostyki mogą zostać przeoczeni. *Forbes i wsp.* [30] sugerowali zatem dodatkowe badanie, podobne do zastosowanego w niniejszej pracy, polegające za sprawdzeniu wiązania mAb anty-CD16 klonu B73.1/Leu11c i innego klonu tegoż mAb (np. 3G8), celem wykrycia ewentualnego defektu epitopu B73.1/Leu11c. Badanie to miałyby objąć szczególnie osoby z nawracającymi zakażeniami herpetycznymi umożliwiając wczesne rozpoczęcie leczenia przeciwwirusowego. Wyniki prezentowane w niniejszej pracy potwierdzają, że znakowanie białka CD56 kompensuje brak wiązania mAb anty-CD16 i defekt epitopu B73.1/Leu11c nie jest wykrywany podczas rutynowego oznaczania komórek NK. Jak wspomniano wcześniej, u większości pacjentów ze stwierdzonym defektem epitopu B73.1/Leu11c podczas rutynowych badań laboratoryjnych wykrywano prawidłowy odsetek i liczbę komórek NK. Jedynie dodatkowe badanie z równoległym zastosowaniem mAbs klonów B73.1/Leu11c i 3G8 umożliwiło wykrycie wspomnianego defektu.

W rutynowej immunodiagnostyce nie oznacza się natomiast poszczególnych subpopulacji monocytów. Jednakże, w wielu jednostkach chorobowych, szczególnie związanych ze stanem zapalnym wywołanym infekcją bakteryjną, liczebność monocytów subpopulacji  $CD14^+CD16^{++}$  jest znacznie podwyższona [103-110]. Stąd też, oznaczanie tych komórek może mieć implikacje diagnostyczne. Monocyty subpopulacji  $CD14^+CD16^{++}$  można odróżnić od monocytów klasycznych  $CD14^{++}CD16^-$  kierując się jedynie poziomem powierzchniowej ekspresji receptora CD16. Wyniki przedstawionych badań sugerują, iż rutynowe użycie przeciwciał anty-CD16 klonu B73.1/Leu11c może uniemożliwić detekcję monocytów subpopulacji  $CD14^+CD16^{++}$ . Prezentowane obserwacje potwierdzają ostatnie dane literaturowe sugerujące stosowanie wystandaryzowanej metody badania subpopulacji monocytów z użyciem mAb klonu 3G8 [169].

Podsumowując, przedstawione w niniejszej pracy badania wskazują, że występowanie defektu epitopu B73.1/Leu11c receptora CD16a jest wybiórczo związane z pierwotnymi niedoborami odporności. Defekt ten nie ma jednak związku z podatnością na ciężkie

zakażenia wirusami z rodziny *Herpesviridae* ani z polimorfizmem L48R/H genu *FcγRIIIa*. Oznaczanie tego defektu wydaje się mieć zatem ograniczone znaczenie diagnostyczne w przewidywaniu przebiegu klinicznego zakażeń herpetycznych.

## 6 WNIOSKI

- U żadnej ze zdrowych osób, ani u pacjentów z nowotworami układu pokarmowego, nie wykryto defektu epitopu B73.1/Leu11c receptora CD16a, stwierdzając go jedynie u 12 pacjentów pediatrycznych z pierwotnymi niedoborami odporności. Zależność ta (istotna statystycznie) wskazuje na bezpośrednią asocjację występowania wspomnianego defektu z pierwotnymi niedoborami odporności, głównie humoralnej.
- U żadnego z pacjentów z defektem epitopu B73.1/Leu11c nie stwierdzono zakażeń herpetycznych, poza jednym dzieckiem z nawracającą, miernie nasiloną, infekcją HSV. Jednocześnie, u żadnego z pacjentów z ciężkimi i/lub nawracającymi zakażeniami herpetycznymi nie stwierdzono zaburzeń dotyczących wiązania mAb klonu B73.1/Leu11c z cząsteczką CD16a. Sugeruje to brak istotnego statystycznie powiązania defektu z występowaniem ciężkich i nawracających zakażeń wirusami z rodziny *Herpesviridae*. Oznaczanie tegoż defektu nie wydaje się mieć zatem istotnych implikacji diagnostycznych u pacjentów z zakażeniami herpetycznymi.
- Częstość występowania defektu epitopu B73.1/Leu11c w badanej grupie osób z pierwotnymi niedoborami odporności wyniosła ponad 7% (a łącznie wśród wszystkich badanych metodą cytofluorometryczną grup pacjentów i osób kontrolnych – około 3%), sugerując, iż defekt ten jest relatywnie rzadki. Częstość ta zasadniczo odbiega od podawanej w literaturze, a wynoszącej ok. 14%.
- Defekt epitopu B73.1/Leu11c nie ma związku z obecnością wariantu L48R/H genu kodującego CD16a. U wszystkich dzieci z powyższym defektem stwierdzono bowiem jedynie obecność fenotypu FcγRIIIa-48L/L, nie wykrywając zmiany nukleotydowej powodujących ekspresję H. Otrzymane wyniki analizy sekwencji całego regionu kodującego białko CD16a nie wykazały innej mutacji lub polimorfizmu odpowiedzialnego za wspomniany defekt.
- Zmiana aminokwasu L48R/H wydaje się być naturalnie występującym polimorfizmem i nie jest odpowiedzialna za defekt epitopu B73.1/Leu11c, a także zwiększoną podatność na ciężkie zakażenia herpetyczne.

- W badanych grupach pacjentów i osób kontrolnych stwierdzono występowanie 8 z 19 opisanych polimorfizmów (R18S, L20L, S47N, D64N, I88V, G129D, Y137H, D148D, F158V), zlokalizowanych w obrębie trzeciego i czwartego egzonu genu *FcγRIIIa*. Sugeruje to, że region genu kodujący fragment zewnątrzkomórkowy receptora obejmujący obie domeny Ig-podobne wykazuje najwyższą zmienność pośród całej sekwencji kodującej receptor CD16a.
- Polimorfizm F158V (w postaci F/V lub V/V) wykryto u wszystkich badanych osób. Częstość występowania wariantu homozygotycznego 158V/V wynosiła w całej grupie badanej około 70%, a w grupie pacjentów z pierwotnymi niedoborami odporności ponad 90%. Wyniki te znacząco odbiegają od danych literaturowych opisujących występowanie tego polimorfizmu z częstością około 10-20%.
- Otrzymane wyniki nie potwierdzają sprzężenia polimorfizmów L48R/H i F158V, tj. aminokwasu 158F z 48L oraz 158V z 48R lub 48H. U wszystkich badanych osób stwierdzono fenotyp 48L/L oraz 158V/V lub 158F/V.
- Defekt epitopu B73.1/Leu11c nie wpływa na rutynowe diagnostyczne immunofenotypowanie komórek NK, mimo szeroko rozpowszechnionego zastosowania mAb klonu B73.1/Leu11c. U większości pacjentów ze stwierdzonym defektem epitopu B73.1/Leu11c podczas rutynowych badań laboratoryjnych wykrywano prawidłowy odsetek i liczbę komórek NK. Wynika to z jednoczesnego zastosowania anty-CD16 i anty-CD56 mAbs. Natomiast, stosowanie mAb anty-CD16 klonu B73.1/Leu11c w badaniach subpopulacji monocytów uniemożliwia detekcję monocytów CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup> u pacjentów z defektem tegoż epitopu.



## 7 STRESZCZENIE

Defekt epitopu B73.1/Leu11c receptora CD16a (FcγRIIIa), wykrywany za pomocą przeciwciała monoklonalnego powszechnie stosowanego w rutynowym immunofenotypowaniu komórek NK oraz subpopulacji monocytów CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup>, został opisany u kilkorga dzieci cierpiących na ciężkie i nawracające zakażenia wirusami z rodziny *Herpesviridae* oraz powiązany z polimorfizmem L48R/H. Niniejsze badania wykazały statystycznie istotną korelację pomiędzy defektem epitopu B73.1/Leu11c a pierwotnymi niedoborami odporności, natomiast nie wykryto go u żadnego z pacjentów z nowotworami układu pokarmowego ani u zdrowych osób kontrolnych. Nie stwierdzono także związku tego defektu z zakażeniami herpetycznymi. Pacjenci u których stwierdzono defekt epitopu B73.1/Leu11c nie cierpieli na ciężkie zakażenia herpetyczne, jedynie u jednego dziecka obserwowano miernie nasilone zakażenie wirusem opryszczki. Natomiast w grupie dzieci z faktycznie ciężkimi i nawracającymi zakażeniami herpetycznymi defektu nie stwierdzono. Stąd też, defekt epitopu B73.1/Leu11c wydaje się nie być izolowanym niedoborem odporności związanym z komórkami NK, a jego oznaczanie ma ograniczone znaczenie w przewidywaniu przebiegu klinicznego zakażeń herpetycznych. Przeprowadzona analiza genu *FcγRIIIa* sugeruje, że defekt epitopu B73.1/Leu11c nie ma związku z polimorfizmem L48R/H, gdyż u wszystkich badanych osób stwierdzono fenotyp FcγRIIIa-L/L. Zmiana aminokwasu 48 wydaje się zatem być naturalnie występującym polimorfizmem, a nie chorobotwórczą mutacją.

## 8 ABSTRACT

The loss of the B73.1/Leu11c epitope of CD16a (FcγRIIIa) receptor, detected by a monoclonal antibody commonly used in routine immunophenotyping of NK cells and CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup> monocytes subpopulation, has been previously observed in several children suffering from severe recurrent infections with *Herpesviridae* and was associated with L48R/H polymorphism. Presented studies revealed statistically significant correlation between the B73.1/Leu11c epitope loss and primary immunodeficiencies, while it was not detected in patients with gastrointestinal malignancies or healthy controls. Also, no linkage between the defect and herpesviral infections was observed. Patients with the epitope loss did not suffer from any herpesviral infections, apart from one child with mild herpes simplex virus infection, while none of the children suffering from severe herpesviral infections had the epitope loss detected. Thus, the B73.1/Leu11c epitope loss seems not to be an isolated NK cells deficiency and its analysis is of limited use in predicting severity of clinical course of herpesviral infections. The genetic analysis of *FcγRIIIa* gene suggests that the epitope loss is not connected with L48R/H polymorphism, as all of analyzed individuals had FcγRIIIa-L/L coding genotype. This indicate that the change of amino acid 48 is rather a naturally occurring polymorphism that a disease-causing mutation.

## 9 PIŚMIENICTWO

1. Gessner JE, Heiken H, Tamm A, Schmidt RE. The IgG Fc receptor family. *Ann Hematol.* 1998;76(6):231-248.
2. Ravetch JV, Kinet JP. Fc receptors. *Annu Rev Immunol.* 1991;9:457-492.
3. van de Winkel JG, Capel PJ. Human IgG Fc receptor heterogeneity: molecular aspects and clinical implications. *Immunol Today.* 1993;14(5):215-221.
4. Hulett MD, Hogarth PM. Molecular basis of Fc receptor function. *Adv Immunol.* 1994;57:1-127.
5. Ravetch JV, Perussia P. Alternative membrane forms of FcγRIII (CD16) on human NK cells and neutrophils: celltype-specific expression of two genes which differ in single-nucleotide substitutions. *J Exp Med.* 1989;170(2):481-497.
6. Robertson MJ, Ritz J. Biology and clinical relevance of human natural killer cells. *Blood.* 1990;76(12):2421-2438.
7. van de Winkel JG, Anderson CL. Biology of human immunoglobulin G Fc receptors. *J Leukoc Biol.* 1991;49(5):511-524.
8. Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol.* 2001;22(11):633-640.
9. Williams AF, Barclay AN. The immunoglobulin superfamily-domains for cell surfacerecognition. *Annu Rev Immunol.* 1988;6:381-405.
10. Hibbs ML, Tolvanen M, Carpen O. Membrane-proximal Ig-like domain of FcγRIII (CD16) contains residues critical for ligand binding. *J Immunol.* 1994;152(9):4466-4474.
11. Tamm A, Schmidt RE. IgG binding sites on human Fcγ receptors. *Int Rev Immunol.* 1997;16(1-2):57-85.
12. Hibbs ML, Selvaraj P, Carpen O, Springer TA, Kuster H, Jouvin MH, Kinet JP. Mechanisms for regulating expression of membrane isoforms of Fc gamma RIII (CD16). *Science.* 1989;246(4937):1608-1611.
13. Orloff DG, Ra CS, Frank SJ, Klausner RD, Kinet JP. Family of disulfide-linked dimers containing the ζ and η chains of the T-cell receptor and the γ chain of Fc receptors. *Nature.* 1990;347(6289):189-191.
14. van der Pol WL, Jansen MD, Sluiter WJ, van de Sluis B, Leppers-van de Straat FG, Kobayashi T, Westendorp RG, Huizinga TW, van de Winkel JG. Evidence for non-random distribution of Fcγ receptor genotype combinations. *Immunogenetics.* 2003;55(4):240-246.
15. Leibson PJ. Signal transduction during natural killervcell activation: inside the mind of a killer. *Immunity.* 1997;6(6):655-661.
16. Ravetch JV, Bolland S. IgG Fc receptors. *Annu Rev Immunol.* 2001;19:275-290.
17. Billadeau DD, Leibson PJ. ITAMs versus ITIMs: striking a balance during cell regulation. *J Clin Invest.* 2002;109(2):161-168.
18. Kono H, Suzuki T, Yamamoto K, Okada M, Yamamoto T, Honda Z. Spatial raft coalescence represents an initial step in Fc gamma R signaling. *J Immunol.* 2002;169(1):193-203.

19. Tamm A, Schmidt RE. The binding epitopes of human CD16 (Fc gamma RIII) monoclonal antibodies. Implications for ligand binding. *J Immunol.* 1996;157(4):1576-1581.
20. de Vries E, Koene HR, Vossen JM, Gratama JW, von dem Borne AE, Waaijer JL, Haraldsson A, de Haas M, van Tol MJ. Identification of an unusual Fc $\gamma$  receptor IIIa (CD16) on natural killer cells in a patient with recurrent infections. *Blood.* 1996;88(8):3022-3027.
21. Peltz GA, Grundy HO, Lebo RV, Yssel H, Barsh GS and Moore KW. Human Fc $\gamma$ RIII: Cloning, expression and identification on of the chromosomal locus of two Fc receptors for IgG. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86(3):1013-1017.
22. Gessner JE, Grussenmeyer T, Kolanus W, Schmidt RE. The human low-affinity immunoglobulin G Fc receptor III-A and III-B genes: molecular characterization of the promoter regions. *J Biol Chem.* 1995;270(3):1350-1361.
23. Warmerdam PA, Nabben NM, van de Graaf SA, van de Winkel JG, Capel PJ. The human low affinity immunoglobulin G Fc receptor IIC gene is a result of an unequal crossover event. *J Biol Chem.* 1993;268(10):7346-7349.
24. Fanciulli M, Vyse TJ, Aitman TJ. Copy number variation of Fc gamma receptor genes and disease predisposition. *Cytogenet Genome Res.* 2008;123(1-4):161-168.
25. Breunis WB, van Mirre E, Geissler J, Laddach N, Wolbink G, van der Schoot E, de Haas M, de Boer M, Roos D, Kuijpers TW. Copy number variation at the FCGR locus includes FCGR3A, FCGR2C and FCGR3B but not FCGR2A and FCGR2B. *Hum Mutat.* 2009;30(5):E640-650.
26. Hollox EJ, Detering JC, Dehnugara T. An integrated approach for measuring copy number variation at the FCGR3 (CD16) locus. *Hum Mutat.* 2009;30(3):477-784.
27. Zhou XJ, Lv JC, Bu DF, Yu L, Yang YR, Zhao J, Cui Z, Yang R, Zhao MH, Zhang H. Copy number variation of FCGR3A rather than FCGR3B and FCGR2B is associated with susceptibility to anti-GBM disease. *Int Immunol.* 2010;22(1):45-51.
28. Niederer HA, Willcocks LC, Rayner TF, Yang W, Lau YL, Williams TN, Scott JA, Urban BC, Peshu N, Dunstan SJ, Hien TT, Phu NH, Padyukov L, Gunnarsson I, Svenungsson E, Savage CO, Watts RA, Lyons PA, Clayton DG, Smith KG. Copy number, linkage disequilibrium and disease association in the FCGR locus. *Hum Mol Genet.* 2010;19(16):3282-3294.
29. Daeron, M. Fc receptor biology. *Annu Rev Immunol.* 1997;15:203-234.
30. de Haas M, Koene HR, Kleijer M, de Vries E, Simsek S, van Tol MJ, Roos D, von dem Borne AE. A triallelic Fc $\gamma$  receptor type IIIA polymorphism influences the binding of human IgG by NK cell Fc-gamma-RIIIA. *J Immunol.* 1996;156(8):2948-2955.
31. Jawahar S, Moody C, Chan M, Finberg R, Geha R, Chatila T. Natural killer (NK) cell deficiency associated with an epitope-deficient Fc receptor type IIIA (CD16-II). *Clin Exp Immunol.* 1996;103(3):408-413.
32. Kankirawatana S, Dai Y and Atkinson P. A six year old girl with recurrent varicella infections associated with a mutation in CD16 (FCGR3A, Fc $\gamma$ RIIIa). *World Allergy Organization Journal* 2007;134:abstract 420.
33. Forbes LR, Paessler M, Orange JS. CD16 deficiency discovered in a cohort of patients with severe herpesviral infections using a new diagnostic test. *J Allergy Clin Immunol.* 2009;123(2):abstract 245.

34. Treon SP, Hansen M, Branagan AR, Verselis S, Emmanouilides C, Kimby E, Frankel SR, Touroutoglou N, Turnbull B, Anderson KC, Maloney DG, Fox EA. Polymorphisms in Fc $\gamma$ R11A (CD16) receptor expression are associated with clinical response to rituximab in Waldenström's macroglobulinemia. *J Clin Oncol*. 2005;23(3):474-481.
35. Hatjiharissi E, Hansen M, Santos DD, Xu L, Leleu X, Dimmock EW, Ho AW, Hunter ZR, Branagan AR, Patterson CJ, Kortsaris A, Verselis S, Fox E, Treon SP. Genetic linkage of Fc gamma R11a and Fc gamma R111a and implications for their use in predicting clinical responses to CD20-directed monoclonal antibody therapy. *Clin Lymphoma Myeloma*. 2007;7(4):286-290.
36. Koene HR, Kleijer M, Swaak AJ, Sullivan KE, Bijl M, Petri MA, Kallenberg CG, Roos D, von dem Borne AE, de Haas M. The Fc-gamma-R111A-158F allele is a risk factor for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 1998;41(10):1813-1818.
37. van den Berg L, Myhr KM, Kluge B, Vedeler CA. Fc gamma receptor polymorphisms in populations in Ethiopia and Norway. *Immunology*. 2001;104(1):87-91.
38. Kyogoku C, Tsuchiya N, Matsuta K, Tokunaga K. Studies on the association of Fc gamma receptor 11A, 11B, 111A and 111B polymorphisms with rheumatoid arthritis in the Japanese: evidence for a genetic interaction between HLA-DRB1 and FCGR3A. *Genes Immun*. 2002;3(8):488-93.
39. Sullivan KE, Jawad AF, Piliero LM, Kim N, Luan X, Goldman D, Petri M. Analysis of polymorphisms affecting immune complex handling in systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)*. 2003;42(3):446-452.
40. Dechant M, Poellot T, Kunzendorf U, Valerius T. Heterogeneous Expression of the 158V and 158F Alleles in Fc $\gamma$ R111A Heterozygous Donors. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)*. 2004;104:abstract 1362.
41. Orange JS. Human natural killer cell deficiencies and susceptibility to infection. *Microbes Infect*. 2002;4(15):1545-58.
42. Bonilla FA, Bernstein IL, Khan DA, Ballas ZK, Chinen J, Frank MM, Kobrynski LJ, Levinson AI, Mazer B, Nelson RP Jr, Orange JS, Routes JM, Shearer WT, Sorensen RU. Practice parameter for the diagnosis and management of primary immunodeficiency. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2005;94(5 Suppl 1):1-63.
43. Orange JS. Human natural killer cell deficiencies. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2006;6(6):399-409.
44. Koene HR, Kleijer M, Algra J, Roos D, von dem Borne AE, de Haas M. Fc gamma R111a-158V/F polymorphism influences the binding of IgG by natural killer cell Fc gamma R111a, independently of the Fc gamma R111a-48L/R/H phenotype. *Blood*. 1997;90(3):1109-1114.
45. Wu J, Edberg JC, Redecha PB, Bansal V, Guyre PM, Coleman K, Salmon JE, Kimberly RP. A novel polymorphism of Fc-gamma-R111A (CD16) alters receptor function and predisposes to autoimmune disease. *J Clin Invest*. 1997;100(5):1059-1070.
46. Cartron G, Dacheux L, Salles G, Solal-Celigny P, Bardos P, Colombat P, Watier H. Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor Fc gamma R111a gene. *Blood*. 2002;99(3):754-758.
47. Weng WK, Levy R. Two immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms independently predict response to rituximab in patients with follicular lymphoma. *J Clin Oncol*. 2003;21(21):3940-3947.
48. Dijstelbloem HM, Scheepers RH, Oost WW, Stegeman CA, van der Pol WL, Sluiter WJ, Kallenberg CG, van de Winkel JG, Tervaert JW. Fc receptor polymorphisms in Wegener's

- granulomatosis: risk factors for disease relapse. *Arthritis Rheum.* 1999;42(9):1823-1827.
49. Gavasso S, Nygard O, Pedersen ER, Aarseth JH, Bleie O, Myhr KM, Vedeler CA. A Fcγ receptor IIIA polymorphism as a risk-factor for coronary artery disease. *Atherosclerosis.* 2005;180(2):277-282.
  50. Thabet MM, Huizinga TW, Marques RB, Stoeken-Rijsbergen G, Bakker AM, Kurreeman FA, White SJ, Toes RE, van der Helm-van Mil AH. Contribution of Fcγ receptor IIIA gene 158V/F polymorphism and copy number variation to the risk of ACPA-positive rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases. Ann Rheum Dis.* 2009;68(11):1775-1780.
  51. Morgan AW, Keyte VH, Babbage SJ, Robinson JI, Ponchel F, Barrett JH, Bhakta BB, Bingham SJ, Buch MH, Conaghan PG, Gough A, Green M, Lawson CA, Pease CT, Markham AF, Ollier WE, Emery P, Worthington J, Isaacs JD. FcγRIIIA-158V and rheumatoid arthritis: a confirmation study. *Rheumatology (Oxford).* 2003;42(4):528-533.
  52. Kastbom A, Ahmadi A, Soderkvist P, Skogh T. The 158V polymorphism of Fc gamma receptor type IIIA in early rheumatoid arthritis: increased susceptibility and severity in male patients (the Swedish TIRA project). *Rheumatology (Oxford).* 2005;44(10):1294-1298.
  53. Lee YH, Ji JD, Song GG. Associations between FCGR3A polymorphisms and susceptibility to rheumatoid arthritis: a metaanalysis. *J Rheumatol.* 2008;35(11):2129-2135.
  54. Bronner IM, Hoogendijk E, De Visser M, Van De Vlekkert J, Badrising UA, Wintzen AR, Uitdehaag BMJ, Blokland-Fromme M, J. Leusen HW, Van Der Pol WL. Association of the leukocyte immunoglobulin G (Fcγ) receptor IIIa-158V/F polymorphism with inflammatory myopathies in Dutch patients. *Tissue Antigens.* 2009;73(6):586-589.
  55. Seligman VA, Suarez C, Lum R, Inda SE, Lin D, Li H, Olson JL, Seldin MF, Criswell LA. The Fcγ receptor IIIA-158F allele is a major risk factor for the development of lupus nephritis among Caucasians but not non-Caucasians. *Arthritis Rheum.* 2001;44(3):618-625.
  56. Zuniga R, Ng S, Peterson MGE, Reveille JD, Baethge BA, Alarcon GS, Salmon JE. Low-binding alleles of Fcγ receptor types IIA and IIIA are inherited independently and are associated with systemic lupus erythematosus in Hispanic patients. *Arthritis Rheum.* 2001;44(2):361-367.
  57. Ivan E, Colovai AI. Human Fc receptors: critical targets in the treatment of autoimmune diseases and transplant rejections. *Hum Immunol.* 2006;67(7):479-491.
  58. Rekand T, Langeland N, Aarli JA, Vedeler CA. Fcγ receptor IIIA polymorphism as a risk factor for acute poliomyelitis. *J Infect Dis.* 2002;186(12):1840-1843.
  59. Conesa-Zamora P, Santaclara V, Gadea-Ninoles E, Ortiz-Reina S, Perez-Guillermo M. Association of polymorphism in *FcGR3A* gene and progression of low-grade precursor lesions of cervical carcinoma. *Hum Immunol.* 2010;71(3):314-317.
  60. Mandelboim O, Lieberman N, Lev M, Paul L, Arnon TI, Bushkin Y, Davis DM, Strominger JL, Yewdell JW, Porgador A. Recognition of haemagglutinins on virus-infected cells by Nkp46 activates lysis by human NK cells. *Nature.* 2001;409(6823):1055-1060.
  61. Arase H, Mocarski ES, Campbell AE, Hill AB, Lanier LL. Direct recognition of cytomegalovirus by activating and inhibitory NK cell receptors. *Science* 2002;296(5571):1323-1326.
  62. Cooper MA, Fehniger TA, Turner SC, Chen KS, Ghaheri BA, Ghayur T, Carson WE,

- Caligiuri MA. Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset. *Blood*. 2001;97(10):3146-3151.
63. Orange JS, Ballas ZK. Natural killer cells in human health and disease. *Clin Immunol*. 2006;118(1):1-10.
64. Berke G. The CTL's kiss of death. *Cell*. 1995;81(1):9-12.
65. Kim S, Iizuka K, Aguila HL, Weissman IL, Yokoyama WM. In vivo natural killer cell activities revealed by natural killer cell-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97(6):2731-2736.
66. Smyth MJ, Cretney E, Kelly JM, Westwood JA, Street SE, Yagita H, Takeda K, van Dommelen SL, Degli-Esposti MA, Hayakawa Y. Activation of NK cell cytotoxicity. *Mol Immunol*. 2005;42(4):501-510.
67. Caligiuri MA. Human natural killer cells. *Blood*. 2008;112(3):461-469.
68. Blanca IR, Bere EW, Young HA, Ortaldo JR. Human B cell activation by autologous NK cells is regulated by CD40-CD40 ligand interaction: role of memory B cells and CD5+ B cells. *J Immunol*. 2001;167(11):6132-6139.
69. Zingoni A, Sornasse T, Cocks BG, Tanaka Y, Santoni A, Lanier LL. Cross-talk between activated human NK cells and CD4+ T cells via OX40-OX40 ligand interactions. *J Immunol*. 2004;173(6):3716-3724.
70. Fehniger TA, Cooper MA, Nuovo GJ, Cella M, Facchetti F, Colonna M, Caligiuri MA. CD56bright natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell-derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity. *Blood*. 2003;101(8):3052-3057.
71. Biron CA, Nguyen KB, Pien GC, Cousens LP, Salazar-Mather TP. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu Rev Immunol*. 1999;17:189-220.
72. Khong HT, Restifo NP. Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes. *Nat Immunol*. 2002;3(11):999-1005.
73. Ziegler-Heitbrock HW. Heterogeneity of human blood monocytes: the CD14+CD16+ subpopulation. *Immunol Today*. 1996;17(9):424-428.
74. Grage-Griebenow E, Flad HD, Ernst M. Heterogeneity of human peripheral blood monocyte subsets. *J Leukoc Biol*. 2001;69(1):11-20.
75. Frankenberger M, Sternsdorf T, Pechumer H, Pforte A, Ziegler-Heitbrock HW. Differential cytokine expression in human blood monocyte subpopulations: a polymerase chain reaction analysis. *Blood*. 1996;87(1):373-377.
76. Weber C, Belge KU, Hundelshausen P, Draude G, Steppich B, Mack M, Frankenberger M, Weber KS, Ziegler-Heitbrock HW. Differential chemokine receptor expression and function in human monocyte subpopulations. *J Leukoc Biol*. 2000;67(5):699-704.
77. Belge KU, Dayyani F, Horelt A, Siedlar M, Frankenberger M, Frankenberger B, Espevik T, Ziegler-Heitbrock HW. The proinflammatory CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>DR<sup>++</sup> monocytes are a major source of TNF. *J Immunol*. 2002;168(7):3536-3542.
78. Passlick B, Flieger D, Ziegler-Heitbrock HW. Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood* 1989;74(7):2527-2534.
79. Patino R, Ibarra J, Rodriguez A, Yague MR, Pintor E, Fernandez-Cruz A, Figueredo A. Circulating monocytes in patients with diabetes mellitus, arterial disease, and increased

- CD14 expression. *Am J Cardiol.* 2000;85(11):1288-1291.
80. Skrzeczynska J, Kobylarz K, Hartwich Z, Zembala M, Pryjma J. CD14 CD16 monocytes in the course of sepsis in neonates and small children: monitoring and functional studies. *Scand J Immunol.* 2002;55(6):629-638.
  81. Biron CA, Byron KS, Sullivan JL. Severe herpesvirus infections in an adolescent without natural killer cells. *N Engl J Med.* 1989;320(26):1731-1735.
  82. Wendland T, Herren S, Yawalkar N, Cerny A, Pichler WJ. Strong  $\alpha\beta$  and  $\gamma\delta$  TCR response in a patient with disseminated *Mycobacterium avium* infection and lack of NK cells and monocytopenia. *Immunol Lett.* 2000;72(2):75-82.
  83. Etzioni A, Eidenschenk C, Katz R, Beck R, Casanova JL, Pollack S. Fatal varicella associated with selective natural killer cell deficiency. *J Pediatr.* 2005;146(3):423-425.
  84. Fleisher G, Starr S, Koven N, Kamiya H, Douglas SD, Henle W. A non-X-linked syndrome with susceptibility to severe Epstein-Barr virus infections. *J Pediatr.* 1982;100(5):727-30.
  85. Lopez C, Kirkpatrick D, Read SE, Fitzgerald PA, Pitt J, Pahwa S, Ching CY, Smithwick EM. Correlation between low natural killing of fibroblasts infected with herpes simplex virus type 1 and susceptibility to herpesvirus infections. *J Infect Dis.* 1983;147(6):1030-1035.
  86. Flodström M, Shi FD, Sarvetnick N, Ljunggren HG. The natural killer cell - friend or foe in autoimmune disease? *Scand J Immunol.* 2002;55(5):432-441.
  87. Pazmany L. Do NK cells regulate human autoimmunity? *Cytokine.* 2005;32(2):76-80.
  88. Perricone R, Perricone C, De Carolis C, Shoenfeld Y. NK cells in autoimmunity: a two-edged weapon of the immune system. *Autoimmun Rev.* 2008;7(5):384-390.
  89. Kastrukoff LF, Morgan NG, Zecchini D, White R, Petkau AJ, Satoh J, Paty DW. A role for natural killer cells in the immunopathogenesis of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 1998;86(2):123-133.
  90. Sibbitt WL Jr, Bankhurst AD. Natural killer cells in connective tissue disorders. *Clin Rheum Dis.* 1985;11(3):507-521.
  91. Majewski S, Wasik M, Jabłońska S, Kamiński M, Fraczykowska M. Defective natural-killer- and killer-cell activity associated with increased polymorphonuclear leukocyte adherence in psoriasis. *Arch Dermatol Res.* 1986;278(4):264-269.
  92. Negishi K, Waldeck N, Chandy G, Buckingham B, Kershner A, Fisher L, Gupta S, Charles MA. Natural killer cell and islet killer cell activities in type 1 (insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia.* 1986;29(6):352-357.
  93. Cunningham-Rundles S, Flippa DA, Braun DW, Antonelli P, Ashikari H. Natural cytotoxicity of peripheral blood lymphocytes and regional lymph node cells of breast cancer in women. *J Natl Cancer Inst.* 1981;67(3):585-90.
  94. Funa K, Nilsson B, Jacobson G, Alm GV. Decreased natural killer cell activity and interferon production by leucocytes in patients with adenocarcinoma of the pancreas. *Br J Cancer.* 1984;50(2):231-233.
  95. Sibbitt WL, Bankhurst AD, Jumonville AJ, Saki JH, Saiers JH, Doberneck RC. Defects in natural killer cell activity and interferon response in human lung carcinoma and malignant melanoma. *Cancer Res.* 1984;44(2):852-856.
  96. Lahat N, Alexander B, Levin DR, Moskovitz B. The relationship between clinical stage,



- natural killer activity and related immunological parameters in adenocarcinoma of the prostate. *Cancer Immunol Immunother.* 1989;28(3):208-212.
97. LeFever AV, Funahashi A. Phenotype and function of natural killer cells in patients with bronchogenic carcinoma. *Cancer Res.* 1991;51(20):5596-5601.
  98. Tsutsi S, Moirita M, Kuwano H, Matsuda H, Mori M, Okamura S, Sugimachi K. Influence of preoperative treatment and surgical operation on immune function of patients with oesophageal carcinoma. *J Surg Oncol.* 1992;49(3):176-181.
  99. Imai K, Matsuyama S, Miyake S, Suga K, Nakachi K. Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: an 11-year follow-up study of a general population. *Lancet.* 2000;356(9244):1795-1799.
  100. Coca S, Perez-Piqueras J, Martinez D, Colmenarejo A, Saez MA, Vallejo C, Martos JA, Moreno M. The prognostic significance of intratumoral natural killer cells in patients with colorectal carcinoma. *Cancer.* 1997;79(12):2320-2328.
  101. Ishigami S, Natsugoe S, Tokuda K, Nakajo A, Che X, Iwashige H, Aridome K, Hokita S, Aikou T. Prognostic value of intratumoral natural killer cells in gastric carcinoma. *Cancer.* 2000;88(3):577-583.
  102. Villegas FR, Coca S, Villarrubia VG, Jimenez R, Chillon MJ, Jareno J, Zuñil M, Callol L. Prognostic significance of tumor infiltrating natural killer cells subset CD57 in patients with squamous cell lung cancer. *Lung Cancer.* 2002;35(1):23-28.
  103. Fingerle G, Pforte A, Passlick B, Blumenstein M, Strobel M, Ziegler-Heitbrock HW. The novel subset of CD14<sup>+</sup>/CD16<sup>+</sup> blood monocytes is expanded in sepsis patients. *Blood.* 1993;82(10):3170-3176.
  104. Pulliam L, Gascon R, Stubblebine M, McGuire D, McGrath MS. Unique monocyte subset in patients with AIDS dementia. *Lancet.* 1997;349(9053):692-695.
  105. Amirayan-Chevillard N, Tissot-Dupont H, Capo C, Brunet C, Dignat-George F, Obadia Y, Gallais H, Mege JL. Impact of highly active anti-retroviral therapy (HAART) on cytokine production and monocyte subsets in HIV-infected patients. *Clin Exp Immunol.* 2000;120(1):107-112.
  106. Ziegler-Heitbrock L. The CD14<sup>+</sup> CD16<sup>+</sup> blood monocytes: their role in infection and inflammation. *J Leukoc Biol.* 2007;81(3):584-592.
  107. Kawanaka N, Yamamura M, Aita T, Morita Y, Okamoto A, Kawashima M, Iwahashi M, Ueno A, Ohmoto Y, Makino H. CD14<sup>+</sup>,CD16<sup>+</sup> blood monocytes and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2002;46(10):2578-2586.
  108. Hepburn AL, Mason JC, Davies KA. Expression of Fc and complement receptors on peripheral blood monocytes in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford).* 2004;43(5):547-554.
  109. Wijngaarden S, van Roon JA, Bijlsma JW, van de Winkel JG, Lafeber FP. Fcγ receptor expression levels on monocytes are elevated in rheumatoid arthritis patients with high erythrocyte sedimentation rate who do not use anti-rheumatic drugs. *Rheumatology (Oxford).* 2003;42(5):681-688.
  110. Katayama K, Matsubara T, Fujiwara M, Koga M, Furukawa S. CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> monocyte subpopulation in Kawasaki disease. *Clin Exp Immunol.* 2000;121(3):566-570.
  111. Cros J, Cagnard N, Woollard K, Patey N, Zhang SY, Senechal B, Puel A, Biswas SK, Moshous D, Picard C, Jais JP, D'Cruz D, Casanova JL, Trouillet C, Geissmann F. Human CD14<sup>dim</sup> monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8

- receptors. *Immunity*. 2010;33(3):375-386.
112. Saleh MN, Goldman SJ, LoBuglio AF, Beall AC, Sabio H, McCord MC, Minasian L, Alpaugh RK, Weiner LM, Munn DH. CD16+ monocytes in patients with cancer: spontaneous elevation and pharmacologic induction by recombinant human macrophage colony-stimulating factor. *Blood*. 1995;85(10):2910-2917.
  113. Fingerle-Rowson G, Angstwurm M, Andreesen R, Ziegler-Heitbrock HW. Selective depletion of CD14+ CD16+ monocytes by glucocorticoid therapy. *Clin Exp Immunol*. 1998;112(3):501-506.
  114. Dayyani F, Belge KU, Frankenberger M, Mack M, Berki T, Ziegler-Heitbrock L. Mechanism of glucocorticoid-induced depletion of human CD14+CD16+ monocytes. *J Leukoc Biol*. 2003;74(1):33-39.
  115. Stray-Pedersen A, Abrahamsen TG, Froland SS. Primary immunodeficiency diseases in Norway. *J Clin Immunol*. 2000;20(6):477-485.
  116. Fried AJ, Bonilla FA. Pathogenesis, diagnosis, and management of primary antibody deficiencies and infections. *Clin Microbiol Rev*. 2009;22(3):396-414.
  117. Conley M, Rohrer J, Minegishi Y. X-linked agammaglobulinemia. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2000;19(2):183-204.
  118. Conley ME, Nortarangelo LD, Etzioni A. Diagnostic criteria for primary immunodeficiencies. *Clin Immunol*. 1999;93(3):190-197.
  119. Lee AH, Levinson AI, Schumacher HR Jr. Hypogammaglobulinemia and rheumatic disease. *Semin Arthritis Rheum*. 1993;22(4):252-264.
  120. Brosens LA, Tytgat KM, Morsink FH, Sinke RJ, Ten Berge IJ, Giardiello FM, Offerhaus GJ, Keller JJ. Multiple colorectal neoplasms in X-linked agammaglobulinemia. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2008;6(1):115-119.
  121. Hammarstrom L, Vorechovsky I, Webster D. Selective IgA deficiency (SIgAD) and common variable immunodeficiency (CVID). *Clin Exp Immunol*. 2000;120(2):225-231.
  122. Geha RS, Notarangelo LD, Casanova JL, Chapel H, Conley ME, Fischer A, Hammarstrom L, Nonoyama S, Ochs HD, Puck JM, Roifman C, Seger R, Wedgwood J. Primary immunodeficiency diseases: an update from the International Union of Immunological Societies Primary Immunodeficiency Diseases Classification Committee. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;120(4):776-794.
  123. Hermaszewski, RA, Webster, AD. Primary hypogammaglobulinaemia: a survey of clinical manifestations and complications. *Q J Med*. 1993;86(1):31-42.
  124. Cunningham-Rundles C, Bodian C. Common variable immunodeficiency: clinical and immunological features of 248 patients. *Clin Immunol*. 1999;92(1):34-48.
  125. Cunningham-Rundles C. Clinical and immunologic analyses of 103 patients with common variable immunodeficiency. *J Clin Immunol*. 1989;9(1):22-33.
  126. Quinti I, Soresina A, Spadaro G, Martino S, Donnanno S, Agostini C, Claudio P, Franco D, Pesce MA, Borghese F, Guerra A, Rondelli R, Plebani A Long-term follow-up and outcome of a large cohort of patients with common variable immunodeficiency. *J Clin Immunol*. 2007;27(3):308-316.
  127. Mellekjaer L, Hammarstrom L, Andersen V, Yuen J, Heilmann C, Barington T, Bjorkander J, Olsen JH. Cancer risk among patients with IgA deficiency or common variable immunodeficiency and their relatives: a combined Danish and Swedish study. *Clin Exp Immunol*. 2002;130(3):495-500.

128. Good RA. Agammaglobulinemia: a provocative experiment of nature. *Bull Univ Minn Hosp Med Found.* 1954;26:1-19.
129. Tarr PE, Sneller MC, Mechanic LJ, Economides A, Eger CM, Strober W, Cunningham-Rundles C, Lucey DR. Infections in patients with immunodeficiency with thymoma (Good Syndrome): report of 5 cases and review of the literature. *Medicine (Baltimore).* 2001;80(2):123-133.
130. Kelleher P, Misbah SA. What is Good's syndrome? Immunological abnormalities in patients with thymoma. *J Clin Pathol.* 2003;56(1):12-16.
131. Popiela M, Varikkara M, Koshy Z. Cytomegalovirus retinitis in Good syndrome: case report and review of literature. *BMJ Case Reports* 2009.
132. Johnson ML, Keeton LG, Zhu ZB, Volanakis JE, Cooper MD, Schroeder HW Jr. Age-related changes in serum immunoglobulins in patients with familial IgA deficiency and common variable immunodeficiency (CVID). *Clin Exp Immunol.* 1997;108(3):477-483.
133. Vorechovsky I, Cullen M, Carrington M, Hammarstrom L, Webster AD. Fine mapping of IGAD1 in IgA deficiency and common variable immunodeficiency: identification and characterization of haplotypes shared by affected members of 101 multiple-case families. *J Immunol.* 2000;164(8):4408-4416.
134. Alaswad B, Brosnan P. The association of celiac disease, diabetes mellitus type 1, hypothyroidism, chronic liver disease, and selective IgA deficiency. *Clin Pediatr.* 2000;9(4):229-231.
135. Lilic D, Sewell WA. IgA deficiency: what we should-or should not-be doing. *J Clin Pathol.* 2001;54(5):337-338.
136. Dalal I, Roifman CM. Hypogammaglobulinemia of infancy. *Immunol Allergy Clin North Am.* 2001;21:129-139.
137. Plebani A, Duse M, Monafo V. Recurrent infections with IgG2 deficiency. *Arch Dis Child.* 1985;60(7):670-672.
138. Umetsu DT, Ambrosino DM, Quinti I, Siber GR, Geha RS. Recurrent sinopulmonary infection and impaired antibody response to bacterial capsular polysaccharide antigen in children with selective IgG subclass deficiency. *N Engl J Med.* 1985;313(20):1247-1251.
139. Umetsu DT, Ambrosino DM, Geha RS. Children with selective IgG subclass deficiency and recurrent sinopulmonary infection: impaired response to bacterial capsular polysaccharide antigens. *Monogr Allergy.* 1986;20:57-61.
140. Shield JP, Strobel S, Levinsky RJ, Morgan G. Immunodeficiency presenting as hypergamma-globulinaemia with IgG2 subclass deficiency. *Lancet.* 1992;340(8817):448-450.
141. Lacombe C, Aucouturier P, Preud'homme JL. Selective IgG1 deficiency. *Clin Immunol Immunopathol.* 1997;84(2):194-201.
142. Levy J, Espanol-Boren T, Thomas C, Fischer A, Tovo P, Bordigoni P, Resnick I, Fasth A, Baer M, Gomez L, Sanders EA, Tabone MD, Plantaz D, Etzioni A, Monafo V, Abinun M, Hammarstrom L, Abrahamsen T, Jones A, Finn A, Klemola T, DeVries E, Sanal O, Peitsch MC, Notarangelo LD. Clinical spectrum of X-linked hyper-IgM syndrome. *J Pediatr.* 1997;131(1):47-54.
143. Notarangelo LD, Lanzi G, Peron S, Durandy A. Defects of class-switch recombination. *J Allergy Clin Immunol.* 2006;117(4):855-864.

144. Imai K, Slupphaug G, Lee WI, Revy P, Nonoyama S, Catalan N, Yel L, Forveille M, Kavli B, Krokan HE, Ochs HD, Fischer A, Durandy A. Human uracil-DNA glycosylase deficiency associated with profoundly impaired immunoglobulin class-switch recombination. *Nat Immunol.* 2003;4(10):1023-1028.
145. Winkelstein JA, Marino MC, Ochs H, Fuleihan R, Scholl PR, Geha R, Stiehm ER, Conley ME. The X-linked hyper-IgM syndrome: clinical and immunologic features of 79 patients. *Medicine (Baltimore).* 2003;82(6):373-384.
146. Quartier P, Bustamante J, Sanal O, Plebani A, Debre M, Deville A, Litzman J, Levy J, Fermanand JP, Lane P, Horneff G, Aksu G, Yalcin I, Davies G, Tezcan I, Ersoy F, Catalan N, Imai K, Fischer A, Durandy A. Clinical, immunologic and genetic analysis of 29 patients with autosomal recessive hyper-IgM syndrome due to activation-induced cytidine deaminase deficiency. *Clin Immunol.* 2004;110(1):22-29.
147. Perez E, Sullivan KE. Chromosome 22q11.2 deletion syndrome (DiGeorge and velocardiofacial syndromes). *Curr Opin Pediatr.* 2002;14(6):678-683.
148. Buckley RH. Primary cellular immunodeficiencies. *J Allergy Clin Immunol.* 2002;109(5):747-757.
149. Sediva A, Bartunkova J, Zachova R, Polouckova A, Hrusak O, Janda A, Kocarek E, Novotna D, Novotna K, Klein T. Early development of immunity in DiGeorge syndrome. *Med Sci Monit.* 2005;11(4):CR182-187.
150. Finocchi A, Di Cesare S, Romiti ML, Capponi C, Rossi P, Carsetti R, Cancrini C. Humoral immune responses and CD27+ B cells in children with DiGeorge syndrome (22q11.2 deletion syndrome). *Pediatr Allergy Immunol.* 2006;17(5):382-388.
151. Ostenstad B, Giliani S, Mellbye OJ, Nilsen BR, Abrahamsen T. A boy with X-linked hyper-IgM syndrome and natural killer cell deficiency. *Clin Exp Immunol.* 1997;107(2):230-234.
152. Koren HS, Amos DB, Buckley RH. Natural killing in immunodeficient patients. *J Immunol.* 1978;120(3):796-769.
153. Lipinski M, Virelizier JL, Tursz T, Griscelli C. Natural killer and killer cell activities in patients with primary immunodeficiencies or defects in immune interferon production. *Eur J Immunol.* 1980;10(4):246-249.
154. Sanal SO, Buckley RH. Antibody-dependent cellular cytotoxicity in primary immunodeficiency diseases and with normal leukocyte subpopulations. Importance of the type of target. *J Clin Invest.* 1978;61(1):1-10.
155. Witte T, Werwitzke S, Schmidt RE. CMV complications in common variable immunodeficiency. *Immunobiology.* 2000;202(2):194-198.
156. Aspalter RM, Sewell WA, Dolman, Farrant KJ, Webster AD. Deficiency in circulating natural killer (NK) cell subsets in common variable immunodeficiency and X-linked agammaglobulinaemia. *Clin Exp Immunol.* 2000;121(3):506-514.
157. Tartter PI, Steinberg B, Barron DM, Martinelli G. The prognostic significance of natural killer cytotoxicity in patients with colorectal cancer. *Arch Surg.* 1987;122(11):1264-1268.
158. Koda K, Saito N, Takiguchi N, Oda K, Nunomura M, Nakajima N. Preoperative natural killer cell activity: correlation with distant metastases in curatively resected colorectal carcinomas. *Int Surg.* 1997;82(2):190-193.
159. Strayer DR, Carter WA, Brodsky I. Familial occurrence of breast cancer is associated with reduced natural killer cytotoxicity. *Breast Cancer Res Treat.* 1986;7(3):187-192.

160. Morgan AW, Griffiths B, Ponchel F, Montague BM, Ali M, Gardner PP, Gooi HC, Situnayake RD, Markham AF, Emery P, Isaacs JD. Fc gamma receptor type IIIA is associated with rheumatoid arthritis in two distinct ethnic groups. *Arthritis Rheum.* 2000;43(10):2328-34.
161. Biezeveld M, Geissler J, Merkus M, Kuipers IM, Ottenkamp J, Kuijpers JT. The involvement of Fc gamma receptor gene polymorphisms in Kawasaki disease. *Clin Exp Immunol.* 2007;147(1):106-111.
162. Leppers-van de Straat FG, van der Pol WL, Jansen MD, Sugita N, Yoshie H, Kobayashi T, van de Winkel JG. A novel PCR-based method for direct Fc gamma receptor IIIa (CD16) allotyping. *J Immunol Methods.* 2000;242(1-2):127-132.
163. Dall'Ozzo S, Andres C, Bardos P, Watier H, Thibault G. Rapid single-step FCGR3A genotyping based on SYBR Green I fluorescence in real-time multiplex allele-specific PCR. *J Immunol Methods.* 2003;277(1-2):185-92.
164. Edberg JC, Langefeld CD, Wu J, Moser KL, Kaufman KM, Kelly J, Bansal V, Brown WM, Salmon JE, Rich SS, Harley JB, Kimberly RP, Robert P, Kimberly. Genetic linkage and association of Fc $\gamma$  receptor IIIA (CD16A) on chromosome 1q23 with human systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2002;46(8):2132-2140.
165. Zhang W, Wang X, Li J, Duan MH, Zhou DB. Fc $\gamma$  receptor IIIA polymorphisms and efficacy of rituximab therapy on Chinese diffuse large B-cell lymphoma. *Chin Med J (Engl).* 2010;123(2):198-202.
166. Jones DH. PCR mutagenesis and recombination in vivo. *PCR Methods Appl.* 1994;3(6):141-148.
167. Baretino D, Feigenbutz M, Valcarcel R, Stunnenberg HG. Improved method for PCR-mediated site-directed mutagenesis. *Nucleic Acids Res.* 1994;22(3):541-542.
168. Carrigan PE, Ballar P, Tuzmen S. Site-directed mutagenesis. *Methods Mol Biol.* 2011;700:107-124.
169. Heimbeck I, Hofer TP, Eder C, Wright AK, Frankenberger M, Marei A, Boghdadi G, Scherberich J, Ziegler-Heitbrock L. Standardized single-platform assay for human monocyte subpopulations: Lower CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup> monocytes in females. *Cytometry A.* 2010;77(9):823-30.