

Uniwersytet Jagielloński
Collegium Medicum
Wydział Lekarski

Karolina Bukowska-Straková

OCENA PRZYDATNOŚCI KLINICZNEJ OZNACZANIA
WYBRANYCH PARAMETRÓW IMMUNOLOGICZNYCH W
RÓŻNYCH FORMACH HIPOGAMMAGLOBULINEMII U DZIECI

Praca doktorska

Promotor: **Dr hab. med. Danuta Kowalczyk**

Prace wykonano w Katedrze Immunologii Klinicznej i Transplantologii
Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego
Kierownik jednostki: **Prof. dr hab. med. Marek Zembala**

Kraków, 2010

*Pragnę szczególnie podziękować
Pani dr hab. med. Danucie Kowalczyk
za bezcenne rady i wskazówki
oraz za cierpliwość i motywację.*

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

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

Badania w niniejszej pracy wykonano w ramach realizacji projektu
badawczego promotorskiego pt.

“Poszukiwanie zaburzeń genetycznych u dzieci z
hipogammaglobulinemią o nieznannej etiologii” (N407 083134) oraz w
ramach projektu badawczego pt.

“Ekspresja receptorów cytokinowych na lifocytach T i fenotyp
limfocytów B w hipogammaglobulinemii wieku dziecięcego – implikacje
patogenetyczne i diagnostyczne” (3 PO5E 039 23).

Spis treści

1	WSTĘP	11
1.1	PIERWOTNE NIEDOBORY ODPORNOŚCI	11
1.2	NIEDOBORY ODPORNOŚCI Z PRZEWAGĄ ZABURZEŃ W PRODUKCJI PRZECIWCIAŁ I OBECNOŚCIĄ KRAŻĄCYCH LIMFOCYTÓW B	11
1.2.1	Pospolity zmienny niedobór odporności – CVID	11
1.2.2	Selektywny niedobór IgA – SIgAD	13
1.2.3	Przejściowa hipogammaglobulinemia wieku dziecięcego – THI	13
1.2.4	Diagnostyka różnicowa niedoborów odporności humoralnej z krążącymi limfocytami B	14
1.3	PRODUKCJA PRZECIWCIAŁ – KOMÓRKI ODPOWIEDZIALNE, MECHANIZM ORAZ REGULACJA	15
1.3.1	Subpopulacje krążących limfocytów B	16
1.3.2	Regulacja procesu przełączania izotypu	20
1.3.3	Wpływ Th1/Th2 na produkcję przeciwciał	21
1.4	DEFEKTY PRODUKCJI PRZECIWCIAŁ W NIEDOBORACH ODPORNOŚCI HUMORALNEJ Z KRAŻĄCYMI LIMFOCYTAMI B	24
1.4.1	Zaburzenia w obrębie subpopulacji krążących limfocytów B	24
1.4.2	Defekty genetyczne	26
1.4.3	Zaburzenia równowagi Th1/Th2	33
2	CELE I ZAŁOŻENIA PRACY	35
2.1	CELE OGÓLNE	35
2.2	CELE SZCZEGÓŁOWE	35
3	MATERIAŁY I METODY	36
3.1	PACJENCI I GRUPA KONTROLNA	36
3.2	OCENA STANU ODPORNOŚCI PACJENTÓW I GRUPY KONTROLNEJ	36
3.3	IZOLACJA KOMÓREK JEDNOJĄDRZASTYCH	37
3.4	OCENA IMMUNOFENOTYPU SUBPOPULACJI LIMFOCYTÓW	37
3.4.1	Ocena subpopulacji limfocytów B	38
3.4.2	Ocena ekspresji receptorów dla IL-12 i IL-18 na poszczególnych subpopulacjach limfocytów T	38
3.5	IDENTYFIKACJA MUTACJI W GENIE KODUJĄCYM TACI (<i>TNFRSF13B</i> , LOCUS 17P11.2)	39
3.5.1	Izolacja DNA	40

3.5.2	Testy przesiewowe wykrywające mutację w genie <i>TNFRSF13B</i>	41
3.5.3	Sekwencjonowanie genu <i>TNFRSF13B</i>	43
3.6	ANALIZA STATYSTYCZNA WYNIKÓW	48
4	WYNIKI	49
4.1	SUBPOPULACJE LIMFOCYTÓW B KRWI OBWODOWEJ	49
4.1.1	Limfocyty B naiwne CD19 ⁺ /CD27 ⁻ /IgM ⁺ /IgD ⁺	49
4.1.2	Limfocyty B pamięci CD19 ⁺ /CD27 ⁺ i ich subpopulacje	49
4.1.3	Limfocyty B niedojrzałe CD19 ⁺ /CD21 ^{low}	59
4.2	EKSPRESJA RECEPTORÓW DLA IL-12 I IL-18 NA SUBPOPULACJACH LIMFOCYTÓW T	59
4.2.1	Ekspresja receptorów dla IL-12 na subpopulacjach limfocytów T CD4 ⁺ i CD8 ⁺ dziewiczych i pamięci	59
4.2.2	Ekspresja receptorów dla IL-18 na subpopulacjach limfocytów T CD4 ⁺ i CD8 ⁺ dziewiczych i pamięci	64
4.3	ANALIZA SEKWENCJI GENU <i>TNFRSF13B</i>	68
4.3.1	Polimorfizmy genu <i>TNFRSF13B</i>	69
4.3.2	Mutacje w genie <i>TNFRSF13B</i>	75
5	OMÓWIENIE WYNIKÓW I DYSKUSJA	78
6	WNIOSKI	89
6.1	Wnioski wynikające z badań subpopulacji krążących limfocytów B	89
6.2	Wnioski wynikające z badań nad ekspresją receptorów cytokinowych dla IL-12 i IL-18 na limfocytów T CD4 ⁺ i CD8 ⁺ dziewiczych i pamięci	90
6.3	Wnioski wynikające z badań genetycznych struktury genu kodującego receptor TACI	90

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

- AID – Activation-induced Cytidine Deaminase
AP-1 – Czynn timer transkrypcyjny (Activation Protein 1)
APC – Allofikocyjanina
APC – Komórka prezentująca antygen (Antygen Presenting Cell)
APRIL – A Proliferation Inducing Ligand
BAFF – B-cell activating factor of the TNF family
BAFF-R – B-cell activating factor of the TNF family receptor
BCMA – B-cell Maturation Antigen
BCR – Receptor limfocytów B (B-cell receptor)
CAML – Calcium-modulating cyclophilin ligand
CD – Antygen różnicowania (Cluster of Differentiation)
CR – Complement receptor
CRDs – Domeny białka bogate w cysteinę (Cysteine-rich domains)
CSR – Zmiana klas syntezowanych przeciwciał (Class-switch Recombination)
CVID – Pospolity zmienny niedobór odporności (Common variable immunodeficiency)
ddNTP – Didezoksyrybonukleotydy
dNTP – mieszanina dezoksyrybonukleotydów (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
EDTA – Kwas etylenodiaminotetraoctowy (kwas wersenowy)
FCS – płodowa surowica cielęca (foetal calf serum)
FDC – komórki dendrytyczne grudek chłonnych (follicular dendritic cells)
FITC – Izotiocyanian fluoresceiny
FSC – Forward Scatter
GATA3 – Trans-acting T-cell-specific transcription factor
GC – Ośrodki różnicowania grudek chłonnych
GT – “sterylne” transkrypty (germline transcripts)
HET – Analiza hetero-dupleksów (Heteroduplex analysis)
HLA – Antygeny ludzkich leukocytów (Human Leukocyte Antigens)
ICOS – Częściczka ko-stymulująca (Inducible co-stimulator)
IL – Interleukina
INF – Interferon
JNK – N-końcowa kinaza c-Jun (c-Jun NH2-terminal kinase)
LPS – Lipopolisacharyd (składnik ścian drobnoustrojów gram-ujemnych)
mAbs – Przeciwciała monoklonalne (monoclonal antibodies)
MFI – Średnia intensywność fluorescencji (median of fluorescence intensity)

MHC – Główny układ zgodności tkankowej (Major Histocompatibility Complex)

MZ – Limfocyty B strefy brzeżnej (marginal zone B cells)

NF-AT – Czynn timer jądrowy w pobudzonych limfocytach T (Nuclear Factor of Activated T Cells)

NF- κ B – Jądrowy czynnik transkrypcyjny NF κ B (ang. Nuclear Factor κ B)

PBL – Limfocyty krwi obwodowej (peripheral blood lymphocytes)

PBMCs – Komórki jednojądrzaste krwi obwodowej (peripheral blood mononuclear cells)

PBS – Bufor fosforanowy (phosphate buffer saline)

PCR – Łańcuchowa reakcja polimerazy (Polimerase Chain Reaction)

PE – Fikoerytryna

PE-Cy5 – R-fikoerytryna związana kowalencyjnie z cyjaninem (cyanin R-phycoerythrin)

PHA – Fitohemaglutynina

PIDs – Pierwotne niedobory odporności (primary immunodeficiency diseases)

RPMI 1640 – Podłoże hodowlane

SHMs – Somatyczne hipermutacje (somatic hypermutations)

SIgAD – Izolowany niedobór IgA (Selective IgA Deficiency)

SSC – Side Scatter

STAT – Transduktory sygnału i aktywatory transkrypcji (Signal Transducers and Activators of Transcription)

TACI – Transmembrane activator and calcium-modulator and cyclophilin ligand interactor

TAE – Bufor do elektroforezy w żelu agarozowym

TCR – Receptor limfocytów T (T-cell receptor)

TGF – Transformujący czynnik wzrostu (transforming growth factor)

Th – Pomocnicze limfocyty T (T helper)

THI – Przejściowa hipogammaglobulinemia wieku dziecięcego (transient hypogammaglobulinemia of infancy)

TLR – Toll-like receptor

TNF – Czynn timer martwicy nowotworu (Tumor necrosis factor)

TNFRSF – Nadrodzina receptorów dla TNF (TNF receptor superfamily)

TNFRSF13B – gen kodujący receptor TACI

TRAF – TNF receptor-associated factor

V(D)J – Komplex genów kodujących części zmienne łańcuchów ciężkich i lekkich immunoglobulin (V – variable, D – diversity, J – joining)

STRESZCZENIE

Pospolity zmienny niedobór odporności (CVID), selektywny niedobór IgA (SIgAD) i przejściowa hipogammaglobulinemia u dzieci (THI) to niedobory odporności humoralnej charakteryzujące się zaburzoną produkcją przeciwciał pomimo obecności limfocytów B. Obserwacje prospektywne i parokrotne badania poziomów limfocytów B pamięci i ich subpopulacji u dzieci z hipogammaglobulinemią o niejasnej etiologii pozwoliły na stwierdzenie, że utrzymujący się w kolejnych badaniach niski poziom tych komórek przemawia za CVID, a ich wzrost za THI, co sugeruje przydatność tych badań w różnicowaniu THI i CVID u dzieci poniżej 5 roku życia. U dzieci z SIgAD wykazano pewne odchylenia w zakresie subpopulacji limfocytów B pamięci, częściowo zbliżone do obserwowanych u dzieci z CVID, co stanowi kolejny dowód łączący CVID i SIgAD. Wyniki uzyskane w badaniach nad ekspresją receptorów cytokinowych wykazały, że wyższa ekspresja IL-12R w grupie dzieci z CVID w porównaniu do THI może być przydatna w różnicowaniu THI i CVID. Znaczenie wykrytych mutacji w genie *TNFRSF13B* u dzieci z SIgAD i THI, wymaga obserwacji, czy obecność mutacji predysponuje do rozwinięcia CVID w późniejszym wieku, jednak wyniki tych badań sugerują, że oznaczanie mutacji w genie *TNFRSF13B* u dzieci z hipogammaglobulinemią o niejasnej etiologii ma ograniczone znaczenie w diagnostyce i różnicowaniu różnych form hipogammaglobulinemii u dzieci.

ABSTRACT

Common variable immunodeficiency (CVID), selective IgA deficiency (SIgAD) and transient hypogammaglobulinemia of infancy (THI) are humoral immunodeficiencies characterized by the presence of peripheral B cells. Prospective observation and follow-up studies on memory B-cell subsets in children with hypogammaglobulinemia of unknown etiology revealed that the persistence of low levels of these cells in some children may suggest the CVID diagnosis, but not THI. Hence, determination of memory B-cell subsets might be useful in differential diagnosis of THI and CVID, especially in children younger than 5 years. In SIgAD children it was revealed some shifts in memory B-cell compartment, similar to those observed in CVID children, suggesting additional evidence of a linkage between these entities. Studies on cytokine receptors expression on T-cell subsets revealed that high level of IL-12R expression in CVID children, but not in THI and control group, might be helpful in differential diagnosis of these diseases. The clinical relevance of mutations found in *TNFRSF13B* gene in children with SIgAD and THI needs to be assessed, whether those mutations predispose to CVID development in later life. Yet, the results of genetic studies on *TNFRSF13B* gene suggest that determination of mutations in this gene is of limited use in diagnosis and differentiating different types of hypogammaglobulinemia in children.

1 WSTĘP

1.1 PIERWOTNE NIEDOBORY ODPORNOŚCI

Pierwotne niedobory odporności (primary immunodeficiency diseases – PIDs), biorąc pod uwagę wszystkie ich rodzaje, występują z częstością około 1 na 10,000 [134, 163]. Manifestują się ciężkimi, nawracającymi zakażeniami, a także zwiększoną częstością występowania schorzeń autoimmunizacyjnych, alergicznych i nowotworowych z powodu zaburzeń mechanizmów immunologicznych.

Najczęstszymi postaciami PIDs są zaburzenia dotyczące produkcji przeciwciał. Występują one zarówno u dzieci jak i u dorosłych. Wiele z nich jest uwarunkowana genetycznie i znana jest lokalizacja nieprawidłowych genów. W innych, zidentyfikowano jedynie dysfunkcje różnych komórek układu immunologicznego, aczkolwiek ciągle nie poznano patomechanizmu tych schorzeń. Pierwotne niedobory odporności humoralnej charakteryzują się obniżonym poziomem immunoglobulin w surowicy krwi, co może być spowodowane brakiem limfocytów B we krwi obwodowej, bądź też wynikiem upośledzonej funkcji tych komórek. U większości pacjentów, u których limfocyty B obecne są we krwi obwodowej, patogenezą niedoboru wciąż jest nieznana. Brak jasnych kryteriów diagnostycznych powoduje, że ich rozpoznanie często opiera się na wykluczeniu innych, dobrze zdefiniowanych form niedoborów przeciwciał.

1.2 NIEDOBORY ODPORNOŚCI Z PRZEWAGĄ ZABURZEŃ W PRODUKCJI PRZECIWCIAŁ I OBECNOŚCIĄ KRAŻĄCYCH LIMFOCYTÓW B

Do niedoborów odporności charakteryzujących się upośledzoną syntezą immunoglobulin oraz obecnymi krążącymi limfocytami B należy pospolity zmienny niedobór odporności (common variable immunodeficiency – CVID), selektywny niedobór IgA (selective IgA deficiency – SIgAD), oraz przejściowa hipogammaglobulinemia wieku dziecięcego (transient hypogammaglobulinemia of infancy – THI).

1.2.1 Pospolity zmienny niedobór odporności – CVID

Pospolity zmienny niedobór odporności (CVID) jest stosunkowo częstym pierwotnym niedoborem odporności humoralnej. Występuje u rasy kaukaskiej z częstością około 1:25000 zarówno u kobiet jak i u mężczyzn [53, 61]. CVID cechuje skłonność do nawracających zakażeń bakteryjnych, schorzeń autoimmunizacyjnych (około 20% przypadków) oraz limfoproliferacji ze splenomegalią (około $\frac{1}{3}$ chorych) [156]. Często obserwuje się małopłytkowość, niedokrwistość hemolityczną i/lub neutropenię. Ponadto, w zespole tym obserwuje się zwiększone ryzyko

wystąpienia chłoniaków [31] i zwiększoną zapadalność na nowotwory przewodu pokarmowego [75, 149]. U większości chorych z CVID stwierdza się prawidłowy lub nieznacznie obniżony poziom limfocytów B w krwi obwodowej [117]. Niski poziom limfocytów B, stwierdzany u nieznacznej części chorych, wiąże się z agresywnym przebiegiem choroby i gorszym rokowaniem [32]. Podstawą tzw. prawdopodobnej lub możliwej diagnozy CVID jest stwierdzenie obniżonego poziomu immunoglobulin w surowicy poniżej 2SD dla normy wiekowej (IgG oraz IgA lub jednego z głównych izotypów IgG, IgA i IgM), upośledzonej produkcji specyficznych przeciwciał po szczepieniach oraz wykluczenie innych przyczyn niedoboru przeciwciał [29].

Choroba najczęściej ujawnia się w drugiej lub trzeciej dekadzie życia, ale jako pierwszy szczyt zachorowań podaje się ostatnio między 5 a 10 rokiem życia. Częstość zachorowań między 1 a 5 rokiem życia jest przedmiotem wielu kontrowersji (niektórzy właśnie ten przedział wiekowy podają za pierwszy szczyt częstości) z uwagi na trudności z różnicowaniem innych form hipogammaglobulinemii występujących w tym wieku.

Patomechanizm CVID pozostaje wciąż niejasny, pomimo, że zespół ten został po raz pierwszy opisany w 1953 roku i poświęcono mu wiele badań. Opisywano zmiany wielu różnych parametrów immunologicznych, jednak zdecydowana większość doniesień dotyczy CVID u dorosłych. Wykazano między innymi zaburzenia funkcjonalne i/lub immunofenotypowe limfocytów T, limfocytów B oraz/lub komórek prezentujących antygen (APC) [117]. U części pacjentów z CVID stwierdzono zmniejszoną liczbę komórek dendrytycznych, zaburzenia w ich dojrzewaniu oraz wydzielaniu cytokin [6, 33, 117, 125]. Stwierdzono również nieprawidłową sekrecję cytokin uczestniczących w dojrzewaniu i aktywacji limfocytów T i B [45, 48, 64, 65, 78, 80, 103]. Wykazano zmniejszoną ekspresję CD40-ligandu i L-selektyny na limfocytach T [42, 102, 111], zmiany ekspresji cząsteczki CD40 na monocytach [81] czy zmniejszoną ekspresję CD70 i CD86 na limfocytach B [35, 57]. Jednak najczęstszym defektem opisywanym w CVID jest zaburzenie końcowego różnicowania limfocytów B po kontakcie z antygenem [117]. Analiza fenotypowa limfocytów krwi obwodowej wykazała znaczną redukcję limfocytów B pamięci ($CD19^+/CD27^+$) oraz ich subpopulacji tzw. "class-switched" limfocytów B ($CD19^+/CD27^+/IgD^-/IgM^-$) [11]. Badania histologiczne wykazały zmniejszoną liczbę komórek plazmatycznych w obwodowych narządach limfatycznych [137].

U części pacjentów z CVID wykryto mutacje genów kodujących cząsteczki uczestniczące w przekazywaniu sygnałów w limfocycie B, w dojrzewaniu limfocytów B czy cząsteczek uczestniczących w przekazywaniu sygnału do syntezy przeciwciał tj; CD19, BAFF-R (B cell activating factor receptor), ICOS (inducible costimulatory molecule) i TACI (Transmembrane activator and calcium-modulating cyclophilin-ligand (CAML) interactor). Najczęściej stwierdza się mutację genu kodującego TACI (około 10-15% pacjentów). Rzadziej opisywana mutacja,

stwierdzana w genie kodującym cząsteczkę ICOS, występuje endemicznie. Mutację tego genu stwierdzono jedynie u kilku chorych pochodzących ze spokrewnionych rodzin [119].

1.2.2 Selektyny niedobór IgA – SIgAD

Selektywny niedobór IgA (Selective IgA Deficiency - SIgAD) jest najczęstszym pierwotnym niedoborem odporności humoralnej (1 na 300 do 700 osób). W niedobrze tym, poza skłonnością do nawracających zakażeń bakteryjnych, stwierdza się również zwiększoną zapadalność na schorzenia autoimmunizacyjne oraz na schorzenia alergiczne, jednak u większości osób niedobór IgA może przebiegać bezobjawowo [79]. We krwi obwodowej stwierdza się prawidłowy poziom limfocytów B i T. Podstawą definitywnej diagnozy SIgAD jest stwierdzenie braku ($<0,05$ g/L) lub obniżenia (2SD poniżej normy wiekowej) IgA w surowicy, przy prawidłowym poziomie pozostałych immunoglobulin oraz wykluczenie innych przyczyn niedoboru przeciwciał [29]. Produkcja specyficznych przeciwciał po szczepieniach jest prawidłowa.

Stwierdzono rodzinne występowanie SIgAD i CVID u 20-25% chorych [61, 84, 144] oraz przypadki przechodzenia niedoboru IgA w CVID [61], oraz, znacznie rzadziej, przechodzenie CVID w SIgAD [41], co sugeruje związek między tymi dwoma niedoborami.

Patomechanizm upośledzonej produkcji IgA pozostaje wciąż niejasny. Wskazywano różne mechanizmy mogące prowadzić do SIgAD, takie jak nieprawidłowa funkcja limfocytów T pomocniczych (Th), defekt limfocytów B [87] czy zmniejszona ekspresja cząsteczki CD40 na monocytach [81]. Wydaje się, że niedostateczna produkcja IgA w SIgAD oraz upośledzona synteza innych klas immunoglobulin w CVID, jest przede wszystkim wynikiem defektu końcowego różnicowania limfocytów B [26]. Przypuszcza się, że zaburzenie powstaje na etapie zmiany izotypu syntezowanych przeciwciał (CSR – class switch recombination), który zachodzi po aktywacji spoczynkowego limfocytu B.

W SIgAD nie ustalono dotąd molekularnych przyczyn upośledzonej produkcji IgA [26], jednak wydaje się, iż defekt w produkcji IgA u pacjentów z SIgAD wynika raczej z defektu zmiany klas syntezowanych przeciwciał lub zaburzeń ekspresji genów dla łańcuchów ciężkich IgA, niż z defektu samych genów dla łańcuchów ciężkich C α [61]. U nielicznych pacjentów opisano defekty molekularne genu kodującego receptor TACI, co dodatkowo potwierdza związek SIgAD oraz CVID.

1.2.3 Przejściowa hipogammaglobulinemia wieku dziecięcego – THI

Rzeczywista częstość występowania przejściowej hipogammaglobulinemii dzieci (transient hypogammaglobulinemia of infancy – THI) jest ciągle przedmiotem kontrowersji, ze względu na rozbieżne dane pochodzące z różnych ośrodków [39, 59, 63, 140, 146]. THI charakteryzuje się

opóźnieniem w rozpoczęciu syntezy IgG poza okres fizjologicznej hipogammaglobulinemii [94], a następnie samoistną normalizacją poziomu immunoglobulin między drugim a piątym rokiem życia [18]. THI może przebiegać bezobjawowo, lecz pełnoobjawowa postać może być klinicznie podobna do CVID. Podobne również mogą być laboratoryjne parametry immunologiczne w obu schorzeniach. Problemem związanym z tymi niedoborami jest brak jasno sprecyzowanych kryteriów diagnostycznych dla THI [159]. Opisuje się, że u dzieci z THI poziom IgG w surowicy jest obniżony poniżej 2SD dla normy wiekowej, poziom IgA jest obniżony u 80% pacjentów, a poziom IgM jest zazwyczaj prawidłowy. Uważa się, że produkcja specyficznych przeciwciał po szczepieniach jest prawidłowa. Diagnoza może być postawiona jedynie retrospektywnie, po stwierdzeniu normalizacji poziomu immunoglobulin.

Przyczyny opóźnionej syntezy immunoglobulin w THI pozostają nieznane, pomimo że zespół ten opisano po raz pierwszy w 1956 [146]. Postulowano nieprawidłową funkcję limfocytów T pomocniczych, przy zachowanej funkcji limfocytów B [129]. Opisano również istotne zaburzenia w produkcji cytokin. Stwierdzono preferencyjne generowanie komórek produkujących cytokiny charakterystyczne dla odpowiedzi typu Th1 (względem Th2), co skutkuje zahamowaniem syntezy IgG i IgA przez limfocyty B. Opisano, że normalizacji poziomów IgG towarzyszy spadek produkcji tych cytokin. [78, 80].

Żadne defekty genetyczne nie zostały jak dotąd opisane u pacjentów z THI.

1.2.4 Diagnostyka różnicowa niedoborów odporności humoralnej z krążącymi limfocytami B

U około dwóch trzecich osób z SIgAD i części dzieci z THI nie obserwuje się objawów klinicznych. Jednak pełnoobjawowe formy obu tych niedoborów mogą mieć podobny obraz kliniczny jak CVID. Dodatkowo, wszystkie te niedobory może cechować podobny typ odchyień parametrów immunologicznych, w związku z czym diagnostyka różnicowa oraz interpretacja kryteriów diagnostycznych tych zespołów chorobowych może być niezwykle trudna, zwłaszcza u dzieci poniżej 5 roku życia. Na przykład, kryterium upośledzonej produkcji specyficznych przeciwciał po szczepieniach kwestionuje się ostatnio jako kryterium diagnostyczne różnicujące CVID i THI. Udowodniono bowiem, że część pacjentów z CVID wykazuje prawidłową odpowiedź na szczepienia - zatem prawidłowa odpowiedź nie wyklucza rozpoznania CVID [54, 120], z drugiej strony upośledzona produkcja specyficznych przeciwciał nie wyklucza rozpoznania przejściowej hipogammaglobulinemii, ponieważ wykazano, że część dzieci z THI odpowiada na szczepienia w stopniu niewystarczającym [38, 155]. Ponadto, u dzieci z THI poziom IgG zwykle normalizuje się wcześniej niż IgA, dlatego u części dzieci z THI można obserwować utrzymujące się niskie poziomy IgA przy prawidłowych poziomach pozostałych typów immunoglobulin [94], co może sugerować izolowany niedobór IgA. W praktyce, w wielu przypadkach

prawidłowe rozpoznanie możliwe jest dopiero retrospektywnie po długotrwałej obserwacji w oparciu o zmiany poziomu immunoglobulin. THI jest rozpoznawana po stwierdzeniu normalizacji poziomu immunoglobulin. Utrzymywanie się niskich poziomów immunoglobulin powyżej 4-5 roku życia przemawia za rozpoznaniem CVID. Dodatkowym problemem jest brak kryteriów, które umożliwiłyby wskazanie pacjentów z SIgAD, u których ryzyko przejścia selektywnego niedoboru IgA w postaci CVID jest zwiększone.

Wczesna prawidłowa diagnoza ma istotne znaczenie dla wyboru leczenia – CVID wymaga terapii substytucyjnej dożylnymi preparatami immunoglobulin, podczas gdy pacjenci z THI i SIgAD leczeni są jedynie objawowo. Według danych z Wielkiej Brytanii, opóźnienie w rozpoznaniu CVID wynosi około 3 lat u dzieci [53], a u dorosłych około 6 lat. W Polsce opóźnienie to jest prawdopodobnie jeszcze większe. W wyniku braku prawidłowej diagnozy pacjenci z CVID są od kilku do nawet kilkunastu lat leczeni jedynie objawowo, bez zadowalających efektów. Brak właściwego rozpoznania i w konsekwencji niepodjęcie odpowiedniego leczenia u pacjentów z CVID może być przyczyną ciężkich, zagrażających życiu zakażeń, nieodwracalnych zmian narządowych, a nawet inwalidztwa.

1.3 PRODUKCJA PRZECIWCIAŁ – KOMÓRKI ODPOWIEDZIALNE, MECHANIZM ORAZ REGULACJA

Odporność humoralna opiera się głównie na obecnych we krwi, limfie, płynach tkankowych i wydzielinach śluzowo-surowiczych przeciwciałach, produkowanych przez limfocyty B i komórki plazmatyczne. Przeciwciała, poza postacią rozpuszczalną, występują również jako receptory immunoglobulinowe w błonie limfocytów (B-cell receptor – BCR). Ze względu na nieograniczoną liczbę antygenów z którymi organizm może się zetknąć, limfocyty B mają potencjał by wytwarzać ok. 10^{11} przeciwciał o różnej swoistości antygenowej [55]. Jest to możliwe dzięki szczególnej strukturze genów kodujących immunoglobuliny oraz procesom ich rekombinacji. Geny te po raz pierwszy są rekombinowane podczas dojrzewania limfocytów B w szpiku kostnym, a po opuszczeniu szpiku przez dojrzałe limfocyty B, do ponownej rearanżacji tych genów dochodzi po kontakcie z antygenem. Wówczas różnorodność przeciwciał jest zwiększana dzięki somatycznym hipermutacjom (somatic hypermutations – SHMs) zachodzącym w rekombinowanym genie. Dzięki nim dochodzi do dojrzewania powinowactwa przeciwciał do antygeny – powstające w efekcie receptory BCR precyzyjniej rozpoznają antygeny, co umożliwia skuteczniejszą eliminację patogenu. Następnie może dojść do przełączenia klas syntezowanych przeciwciał (Class-switch recombination – CSR), czyli do zmiany izotypu wytwarzanych przez limfocyty B przeciwciał bez zmiany ich swoistości antygenowej. CSR odbywa się głównie w ośrodkach różnicowania (germinal centers – GC) grudek chłonnych, w wyniku kooperacji z limfocytami T i dzięki odpowiednim cytokinom. W trakcie przebiegu

odpowiedzi immunologicznej limfocyty B różnicują się w komórki intensywnie wytwarzające i uwalniające przeciwciała. Poszczególne subpopulacje limfocytów B, w zależności od stopnia zróżnicowania produkują różne klasy przeciwciał.

1.3.1 Subpopulacje krążących limfocytów B

Krążące limfocyty B wykazują znaczną heterogenność w zakresie funkcji oraz ekspresji powierzchniowych determinant. Najnowsza literatura wyróżnia 6 odrębnych subpopulacji krążących limfocytów B. Podział ten uwzględnia odmienną funkcję i różnicowanie się komórek zależnie bądź niezależnie od limfocytów T w centralnych i obwodowych narządach limfatycznych. Na całą populację limfocytów B krwi obwodowej składają się następujące subpopulacje:

1. dojrzałe, dziewicze limfocyty B (mature-naive) $CD19^+/CD27^-/IgD^+/IgM^+$,
2. krążące limfocyty B strefy brzeżnej (MZ – marginal zone B cells) $CD19^+/CD27^+/IgD^+/IgM^+$; norma 7.2-30.8%,
3. limfocyty B pamięci po przełączeniu klas (class-switched memory B cells) $CD19^+/CD27^+/IgD^-/IgM^-$; norma 6.5-29.2%,
4. limfocyty B $CD19^+/CD21^{low}/CD38^{low}$; norma 1.1-6.9%,
5. przejściowe limfocyty B (transitional B cells) $CD19^+/CD38^{high}/IgM^{high}$; norma 0.6-3.5%,
6. tzw: “class-switched plasmablasts” $CD19^+/CD38^{+++}/IgM^-$; norma 0.4-3.6% [151].

Zakresy wartości referencyjnych są podane jako odsetek całej populacji limfocytów B i dotyczą osób dorosłych, a wartości te [151].

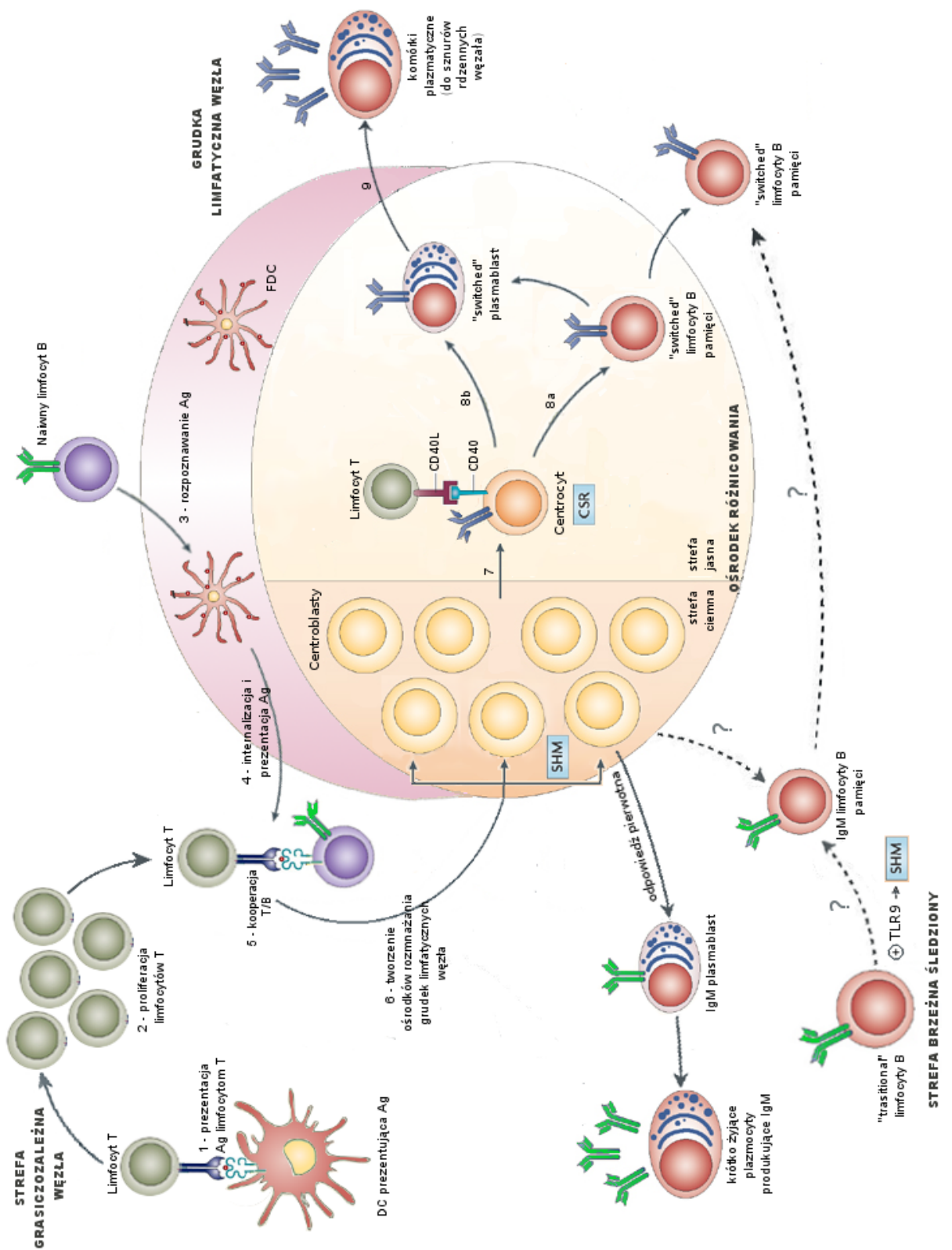
Dziewicze limfocyty B ($CD19^+/CD27^-/IgD^+/IgM^+$) rozpoznają antygeny i ulega aktywacji w guzkach limfatycznych. W guzkach, antygeny są prezentowane limfocytom B przez komórki dendrytyczne guzka (follicular dendritic cells – FDC). Do dalszych podziałów tych komórek i przełączania klas produkowanych przeciwciał niezbędne są sygnały wspomagające, dostarczane przez rozpoznające ten sam antygen pomocnicze limfocyty T (T helper – Th). Najważniejszą rolę pełnią pary cząsteczek: CD40 na limfocycie B i jej ligand (CD40L) na limfocycie T oraz CD80/86 na limfocycie B i CD28 na limfocycie T [66, 96]. Limfocyty T wspomagają odpowiedź humoralną także poprzez produkcję odpowiednich cytokiny [14]. Po aktywacji limfocyty B różnicują się w krótko żyjące komórki plazmatyczne wytwarzające głównie IgM, bądź dzielą się, tworząc ośrodki rozmnażania (germinal centers – GC) guzka limfatycznego. W ośrodkach rozmnażania geny kodujące immunoglobuliny ulegają częstym hipermutacjom somatycznym (somatic hypermutations – SHMs) i dodatkowym rearanżacjom

(tzw. redagowanie receptorów) [37] oraz przechodzą rekombinację umożliwiającą wytwarzanie przeciwciał różnych klas (Class switch recombination – CSR) co pozwala na przełączanie izotypu produkowanych przeciwciał z IgM i IgD na IgG, IgA lub IgE. Ostatecznie limfocyty te różnicują się w komórki plazmatyczne lub “class-switched” limfocyty B pamięci o immunofenotypie $CD19^+/CD27^+/IgD^-/IgM^-$, syntetyzujące przeciwciała klasy IgG, IgA lub IgE o wysokim powinowactwie do antygeny Fig. 1 [46]. “Class-switched” limfocyty B pamięci immunologicznej są komórkami długo żyjącymi (nawet przez czas życia osobniczego), krążą we krwi i po ponownym rozpoznaniu antygeny ulegają aktywacji, inicjując szybką odpowiedź wtórną. Ich próg aktywacji jest niski (wystarczy mała ilość antygeny) [37, 96, 160]. Po kolejnym kontakcie ze specyficznym antygenem “class-switched” limfocyty B pamięci mogą różnicować się do tzw; “Class-switched plasmablasts” lub plazmocytołów Fig. 1 [136].

Drugą populację limfocytów B pamięci ($CD27^+$) stanowią “IgM komórki B pamięci” $CD27^+IgM^+IgD^+$, zwane również naturalnymi limfocytami B pamięci, ponieważ mogą produkować przeciwciała naturalne. W ostatnim czasie wykazano, że subpopulacja ta jest frakcją limfocytów B strefy brzeżnej śledziony (marginal zone – MZ) krążącą we krwi obwodowej [82, 153]. Uważa się, że komórki te uczestniczą w T-niezależnej odpowiedzi przeciwko antygenom np. polisacharydowym oraz we wstępnej obronie przeciw patogenom otoczkowym, które dostały się do krwi [58, 92, 153, 162], produkują głównie immunoglobuliny typu IgM o dużym powinowactwie. Wydaje się, że udział “class-switched” limfocytów B pamięci we wstępnej obronie przeciwko infekcjom bakteriami otoczkowymi jest niewielki [22, 82]. Ostatnie badania wskazują, że aktywacja krążących MZ limfocytów B, w odróżnieniu od limfocytów B aktywowanych w grudkach, jest niezależna od bezpośredniej pomocy limfocytów Th. Jednak wciąż nie jest jasne kiedy oraz gdzie dojrzewają MZ limfocyty B. Najnowsze badania wykazały, że komórki te powstają z przejściowych limfocytów B (transitional B cells $CD19^+/CD38^{high}/IgM^{high}$) [19]. Przejściowe limfocyty B, w odpowiedzi na stymulację receptorów TLR9 (Toll-like receptor 9), np. bakteryjnym DNA, przechodzą SHMs genów immunoglobulinowych i dojrzewają w kierunku MZ limfocytów B. Jednak w porównaniu z “class-switched” limfocytami B pamięci, MZ limfocyty B przechodzą ograniczone somatyczne hipermutacje (SHMs) [40, 76, 127, 153]. Ostatecznie różnicują się one w komórki plazmatyczne wydzielające IgM, oraz w niewielkim stopniu IgG [19]. Indukcja w MZ limfocytach B somatycznych hipermutacji poprzez stymulację receptorów TLR9 (prowadzącą do produkcji swoistych przeciwciał) jest nowo opisanym mechanizmem wskazującym krzyżowanie się wrodzonej (TLR9) i nabytej odporności [19]. Ostatnio wykazano, że w czasie dojrzewania MZ limfocytów B, przed zapoczątkowaniem SHMs usuwane są limfocyty produkujące autoreaktywne przeciwciała IgM (nowy, trzeci punkt kontrolny przeciw autoreaktywnym IgM) [141]. Uważa się, że dojrzewanie MZ limfocytów B jest związane ze śledzioną [82]. Po drugim roku

życia rośnie liczebność tej populacji we krwi obwodowej, jak również rośnie częstość somatycznym hipermutacji w genach kodujących ich receptory BCR, co wiąże się z pojawieniem struktur anatomicznych strefy brzeżnej śledziony oraz lepszą odpowiedzią humoralną przeciwko antygenom T niezależnym i antygenom polisacharydowym [153, 161]. U pacjentów z asplenią lub po splenektomii poziom przejściowych limfocytów B w krążeniu jest wysoki, a krążące MZ limfocyty B są niewykrywalne [19, 139, 153]. T-niezależne różnicowanie i wzbudzenie SHMs w MZ limfocytach B potwierdza fakt, że u pacjentów, u których stwierdza się mutację CD40 lub CD40L, liczebność tej populacji komórkowej jak i częstość SHMs w jej receptorach BCR, jest prawidłowe [122]. U pacjentów tych brak jest natomiast “class-switched” limfocytów B pamięci oraz nie ma GC w guzłach limfatycznych (w ośrodkach rozmnażania SHMs i CSR są indukowane w drodze zależnej od limfocytów T) [154]. Powyższe obserwacje (rozwój oraz indukcja SHMs w MZ limfocytach B niezależne od limfocytów T oraz udział mechanizmów odpowiedzi wrodzonej (TLR9) w ich różnicowaniu i dojrzewaniu) wskazują, że MZ limfocyty B oraz klasyczne “class-switched” limfocyty B pamięci dojrzewają na zupełnie innej drodze [122]. Uważa się, że tylko “class-switched” limfocyty B pamięci reprezentują pulę “prawdziwych” limfocytów pamięci, jako że, tylko te komórki pochodzą z ośrodków rozmnażania guzłków limfatycznych [82]. Jednak istnieją prace kwestionujące odmienną tych dwóch populacji limfocytów B pamięci. Prace te sugerują inne wyjaśnienie powstawania IgM komórek B pamięci – mianowicie, że komórki te powstają w GC guzłków limfatycznych, jednak we wczesnej fazie różnicowania się tych struktur – wtedy limfocyty te mogą przechodzić SHMs, ale nie uczestniczą już w dalszym różnicowaniu, czyli nie przechodzą przełączanie klas, które zachodzi w późniejszym etapie formułowania ośrodków różnicowania [136] Fig. 1. Powierzchniowa glikoproteina CD21 (complement receptor type 2 – CR2) jest receptorem dla fragmentu C3d dopełniacza C3 [89]. Część ta, na powierzchni limfocytów B, tworzy kompleksy ko-stymulujące z CD19 i CD81, lub z CD35 (CR1), wzmacniające sygnały i obniżające próg czułości sygnałowania z receptora BCR [28, 138]. CD21 jest niezbędna przy generacji silnej odpowiedzi humoralnej na antygeny T-zależne [89, 91], oraz odgrywa istotną rolę w przeżyciu limfocytów B zarówno w pierwotnych guzłkach, jak i w ośrodkach różnicowania (GC) guzłków [47, 21]. Brak ekspresji kompleksu CD21/CD35 na komórkach dendrytycznych guzłków powoduje znaczny spadek żywotności limfocytów B pamięci [114]. Glikoproteina ta w okresie limfopoezy pojawia się prawie równocześnie z powierzchnią IgD i jest obecna na powierzchni wszystkich dojrzałych limfocytach B, aż do ich końcowego różnicowania [20]. Nie jest do końca jasne w jakim stadium różnicowania są obecne we krwi obwodowej limfocyty B wykazujące niską ekspresję CD21 oraz wysoką ekspresję CD19 ($CD19^{++}/CD21^{low}$). Mogą to być niedojrzałe limfocyty B, które jeszcze nie posiadają ekspresji CD21 [142], lub limfocyty B aktywowane w GC, na których powierzchni wtórnie doszło do obniżenia ekspresji tej czą-

Rysunek 1: Schemat dojrzewania i różnicowania krążących limfocytów B



steczki. Niska ekspresja CD21 na aktywowanych limfocytach B może być efektem złuszczenia tego receptora bądź efektem obniżenia jego ekspresji w wyniku bezpośredniej aktywacji przez C3d [138, 150]. Natomiast wzrost ekspresji CD19 być może jest wtórny do spadku ekspresji CD21 [62, 150]. Jednak pewne dane wskazują, że regulacja ekspresji CD21 na limfocytach B w warunkach fizjologicznych może przebiegać zupełnie inaczej niż w warunkach zaburzonej immunoregulacji [70], stąd wzrost ilości komórek o powyższym immunofenotypie opisywany w pewnych schorzeniach (tj autoimmunizacja, pierwotne i wtórne niedobory odporności) może być spowodowany przez odmienne mechanizmy [8, 97, 98, 150].

1.3.2 Regulacja procesu przełączania izotypu

W trakcie rozwoju osobniczego dojrzałe, spoczynkowe limfocyty B, przed kontaktem z antygenem, produkują i uwalniają przeciwciała klasy IgM i IgD o niskim powinowactwie do antygeny, o identycznej swoistości. Po kontakcie ze swoistym antygenem dochodzi do rearanżacji genów immunoglobulinowych i dojrzewania powinowactwa przeciwciał do antygeny (SHMs), a następnie dochodzi do zmiany klas syntezowanych przeciwciał na IgG, IgA czy IgE (Class-switch recombination – CSR). Klasa przeciwciała determinuje jego funkcję; między innymi inaktywację toksyn, neutralizację wirusów [167] czy aktywację odpowiednich komórek uczestniczących w eliminacji kompleksu antygen-przeciwciało (makrofagów, komórek NK czy mastocytów) [132].

Produkcja przez limfocyt różnych klas i podklas immunoglobulin z zachowaniem tej samej swoistości antygenowej (tych samych części zmiennych immunoglobuliny) jest możliwe dzięki szczególnej strukturze genów immunoglobulinowych. W kierunku 3' od segmentów genów V(D)J, kodujących części zmiennych, położony jest locus regionu stałego immunoglobulin, w którym geny leżą w porządku określającym kolejność ich transkrypcji, a za tym idzie, wytwarzanie przeciwciał odpowiedniej klasy. Kolejność genów dla części stałych łańcuchów ciężkich immunoglobulin jest następująca: $C\mu$, $C\delta$, $C\gamma3$, $C\gamma1$, $\psi\epsilon$, $C\alpha1$, $\psi\gamma$, $C\gamma2$, $C\gamma4$, $C\epsilon$, $C\alpha2$ (geny $\psi\epsilon$ i $\psi\gamma$ są pseudogenami i nie ulegają ekspresji). Kompleks genów V(D)J wyjściowo połączony jest z genem dla łańcucha ciężkiego μ , następnie δ . W trakcie dalszego różnicowania się limfocytu B geny V(D)J przyłączają się kolejno do genów dla łańcuchów ciężkich $C\gamma$, $C\epsilon$ lub $C\alpha$, umożliwiając syntezę immunoglobulin klasy IgG, IgE lub IgA [72, 132]. Do przełączenia tego dochodzi w wyniku rekombinacji wewnątrzchromosomalnej genów kodujących części stałe pomiędzy sekwencjami przełączeniowymi S (switch regions). Sekwencje te znajdują się w intronach, po stronie 5' powyżej każdego z genów dla części stałych łańcuchów ciężkich (za wyjątkiem genu dla łańcucha $C\delta$) [88]. Na regiony S działa enzym AID (activation-induced cytidine deaminase), umożliwiający nacięcie obu nici DNA, wytworzenie pętli i delecję odcinka DNA leżącego między nimi. Dostępność danego regionu S dla enzymu AID jest zależna od

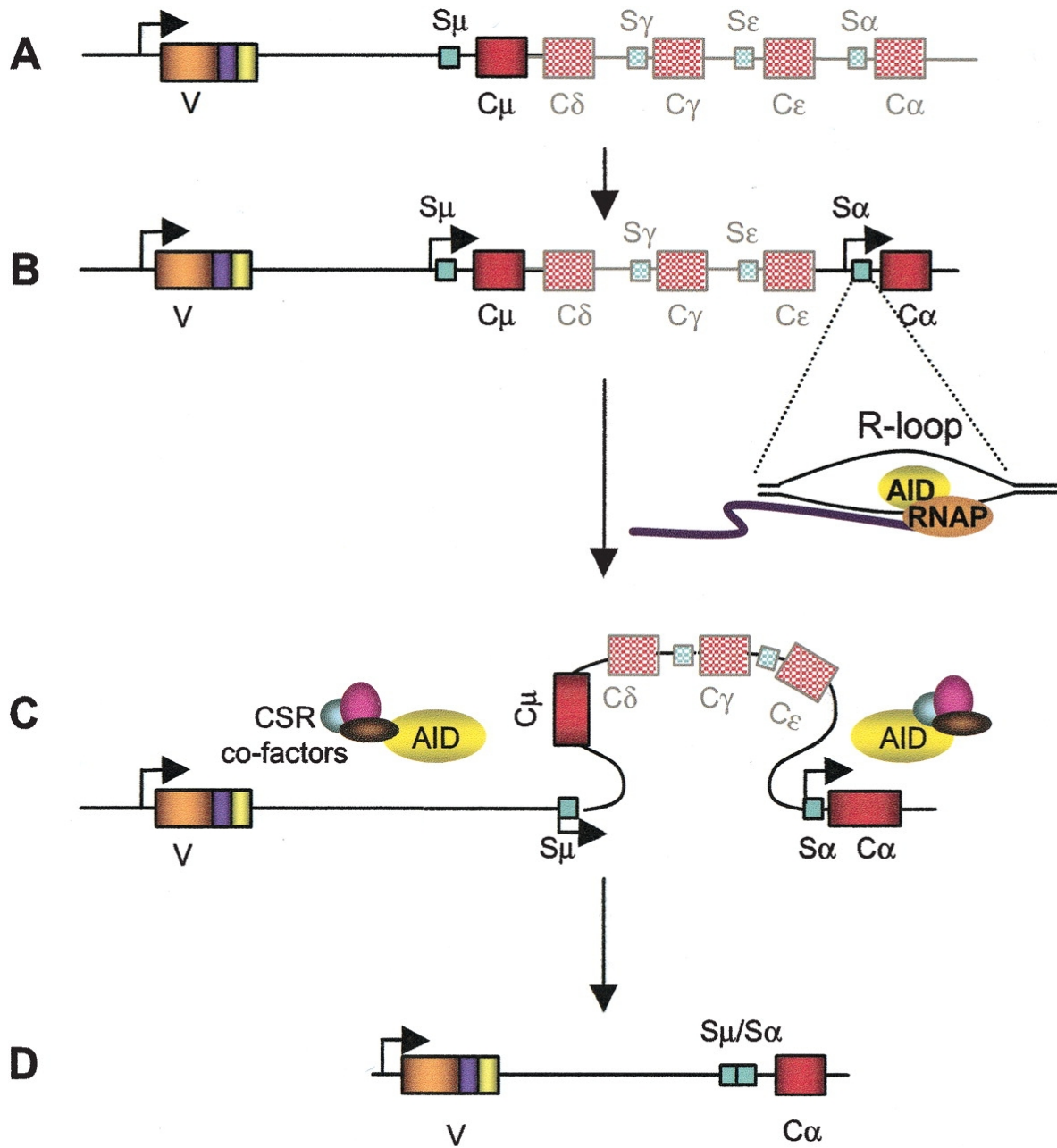
rozplecenia nici DNA w procesie transkrypcji, inicjowanej w promotorach zlokalizowanych w kierunku 5' powyżej każdego regionu S. Powstające w tym procesie mRNA nie koduje białka – powstają tzw “sterylnie” transkrypty (germline transcripts – GT). Indukcja transkrypcji konkretnego GT odbywa się po przyłączeniu do jego promotora czynników transkrypcyjnych indukowanych odpowiednią cytokiną. Zatem zdolność danej cytokiny do selektywnej indukcji transkrypcji danego GT determinuje przełączenie syntezy na wybrany izotyp przeciwciała Fig. 2. IL-4 powoduje przełączenie syntezy do IgE, IgG4 [130, 131], IgG1 lub IgG3 [50], IL-10 do IgG3 i IgG1 [34], IL-13 do IgG4 i IgE [112], natomiast TGF- β do IgG2b lub IgA [43, 49, 133, 143, 165].

Cytokiny produkowane przez limfocyty Th czy komórki dendrytyczne, poza ukierunkowaniem przełączenia izotypu, wzmagają również ekspresję enzymu AID. Jednak do indukcji AID w limfocytach B konieczne są również sygnały od ligandów należących do nadrodziny cząsteczek TNF tj; CD40L lub APRIL i BAFF, przekazywane przez obecne na limfocytach B receptory powierzchniowe, należące do nadrodziny receptorów dla TNF, tj. CD40, TACI i BAFF-R [27, 52, 85]. Interakcje CD40L, cząsteczki ulegającej ekspresji na aktywowanych limfocytach T, z jej receptorem, glikoproteiną CD40 obecną na limfocytach B, zachodzą w największym stopniu w ośrodkach różnicowania grudek limfatycznych, w odpowiedzi na antygeny T-zależne. APRIL i BAFF, produkowane i wydzielane głównie przez komórki dendrytyczne i makrofagi, indukują ekspresję AID (synergistycznie z cytokinami) poprzez interakcje z obecnymi na limfocytach B receptorami TACI i BAFF-R, niezależnie od interakcji z limfocytami T [27]. Przypuszcza się, że CSR (zarówno do IgG jak i IgA) indukowany poprzez APRIL i BAFF, uzależniony jest w największym stopniu od interakcji tych molekuł z TACI [116]. Ponadto, uważa się, że sygnał z receptora TACI jest niezbędny do produkcji immunoglobulin przeciwko antygenom T-niezależnym, a interakcja APRIL-TACI jest kluczowa do syntezy IgA przeciwko antygenom T-niezależnym [27, 128].

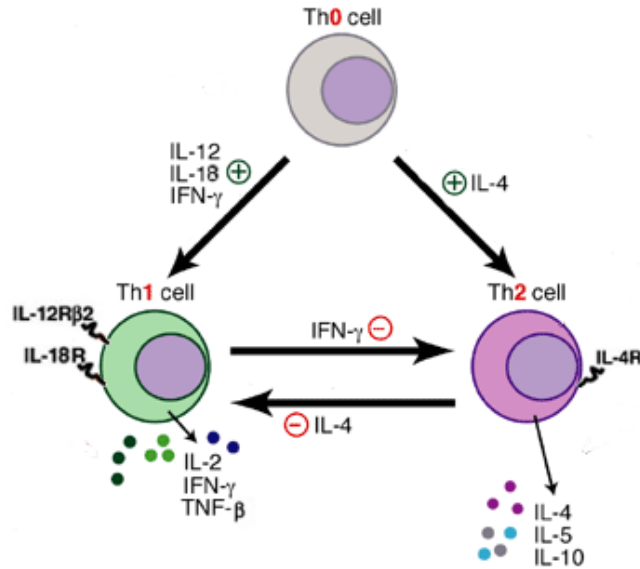
1.3.3 Wpływ Th1/Th2 na produkcję przeciwciał

Jak opisano powyżej, do prawidłowej odpowiedzi typu humoralnego, konieczna jest kooperacja limfocytów B z limfocytami T pomocniczymi, albo przez bezpośredni kontakt bądź też poprzez wydzielane cytokiny. Za wspomaganie odpowiedzi humoralnej odpowiedzialna jest subpopulacja limfocytów pomocniczych Th2. Odpowiedź typu komórkowego wspomagana jest przez różniącą się pod względem funkcjonalnym subpopulację Th1. Th1 wytwarzające m. in. IL-2 czy IFN- γ mają wybitny udział we wspomaganiu odpowiedzi typu komórkowego – ułatwiają aktywację, proliferację i różnicowanie prekursorów limfocytów cytotoksycznych czy pobudzają makrofagi [72]. Th2 wytwarzające m. in. IL-4 i IL-10, cytokiny będące czynnikami wzrostu i różnicowania limfocytów B, wspomagają głównie odpowiedź typu humoralnego.

Rysunek 2: Schemat zmiany izotypu syntezowanych przeciwciał



Rysunek 3: Zjawisko dewiacji immunologicznej



Cytokiny wydzielane przez jedną subpopulację hamują proliferację i funkcje drugiej subpopulacji Fig. 3. Zatem intensywne aktywacja limfocytów Th1 i odpowiedzi komórkowej może interferować z rozwojem odpowiedzi humoralnej, a intensywne aktywacja limfocytów Th2 i odpowiedzi humoralnej, może zmniejszać odpowiedź komórkową. Zjawisko to nazywa się dewiacją immunologiczną.

Wyda się, że w trakcie swego czynnościowego różnicowania dojrzałe limfocyty Th po opuszczeniu grasicy przechodzą etapy rozwoju różniące się rodzajem cytokin wydzielanych w wyniku aktywacji. Początkowo wydzielają głównie IL-2, potem wiele różnych cytokin, a dopiero w wyniku długotrwałej stymulacji antygenem różnicują się do limfocytów Th1 lub Th2. Różnicowanie i aktywacja limfocytów Th1 i Th2 zależy nie tylko od intensywności i rodzaju sygnałów przekazywanych z receptorów TCR w czasie interakcji z różnymi komórkami prezentującymi antygen i ilości dostępnego antygeny, ale również od sygnałów kostymulujących oraz cytokin. Wydzielane przez komórki cytokiny, IL-12 czy IL-18 oraz IFN- γ są kostymulatorami i czynnikami różnicowania limfocytów TH1, natomiast IL-4 jest autokrynowym czynnikiem wzrostu i różnicowania limfocytów Th2. W początkowym okresie swego rozwoju limfocyty Th2, stymulowane przez IL-12, przy braku IL-4, mogą się przekształcać w limfocyty Th1, a limfocyty Th1 mogą pod wpływem IL-4 przejść w limfocyty Th2. Cytokiny mogą wywierać swoje działanie poprzez obecne na komórkach odpowiednie receptory. Receptor dla IL-12, obecny głównie na aktywowanych limfocytach T, zbudowany jest z dwóch podjednostek typu β (IL-12 β 1 oraz IL-12 β 2), które wykazują wysokie powinowactwo do IL-12 jedynie w formie

dimeru, natomiast oddzielnie wykazują niskie powinowactwo do tej cytokiny [36]. Na limfocytach spoczynkowych nie stwierdzono ekspresji IL-12R. Stymulacja antygenowa indukuje ekspresję obu podjednostek IL-12R. Komórki które różnicują się w kierunku Th1 zachowują ekspresję obu podjednostek, natomiast komórki różnicujące się w kierunku Th2 tracą podjednostkę IL-12 β 2, która jest odpowiedzialna za transdukcję sygnału [113]. Zatem ekspresja podjednostki β 2 determinuje rozwój w kierunku Th1, a jej ekspresja jest selektywnie zredukowana na komórkach Th2 [135]. Receptor dla IL-18 jest również zbudowany z dwóch podjednostek. Podjednostka IL-18R α /IL-1Rrp jest odpowiedzialna za wiązanie IL-18, natomiast druga (IL-18R α /AcPL) za transdukcję sygnału [106]. IL-18R występuje na limfocytach Th1, natomiast na limfocytach Th2 nie stwierdzono ekspresji tego receptora [157]. Znaczna ilość IL-18 może wzmacniać ekspresję IL-12R [2]. Równoczesna ekspresja IL-12R oraz IL-18R jest konieczna do maksymalnej aktywacji transkrypcji genu dla IFN- γ . W czasie wiązania się IL-12 i IL-18 do swoich receptorów dochodzi do aktywacji promotora dla IFN- γ . IL-12 bezpośrednio aktywuje czynnik transkrypcyjny STAT4 (Signal Transducers and Activator of Transcription) [100, 113], natomiast IL-18 indukuje NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) oraz AP-1 (activator protein 1) [2, 121]. Kombinacja tych czynników transkrypcyjnych efektywnie aktywuje promotor dla IFN- γ , co jest podstawą synergistycznego działania IL-12 i IL-18 w [99]. Natomiast sygnałowanie z IL-4R oraz odpowiednia stymulacja receptora TCR aktywuje czynnik transkrypcyjny GATA3 (Trans-acting T-cell-specific transcription factor), umożliwiając optymalne różnicowanie w kierunku Th2, a hamujący szlak w stronę Th1 [123].

1.4 DEFEKTY PRODUKCJI PRZECIWCIAŁ W NIEDOBORACH ODPOORNOCI HUMORALNEJ Z KRAŻĄCYMI LIMFOCYTAMI B

Większość prac nad patomechanizmem niedoborów odporności charakteryzujących się zaburzeniami w produkcji przeciwciał pomimo obecności limfocytów B we krwi obwodowej, poświęconych jest CVID, szczególnie u dorosłych. Informacji o CVID u dzieci oraz o SIgAD jest znacznie mniej, natomiast prace dotyczące THI pojawiają się sporadycznie.

1.4.1 Zaburzenia w obrębie subpopulacji krążących limfocytów B

U pacjentów z CVID wykazano zarówno pierwotne defekty funkcji limfocytów B [35, 83, 115] jak i zmiany w zakresie odsetka subpopulacji tych komórek [11, 30, 71]. Opisane nieprawidłowości funkcji oraz odchylenia w zakresie subpopulacji krążących limfocytów B u pacjentów z CVID stały się podstawą klasyfikacji tej heterogennej grupy chorych. Pierwsze próby klasyfikacji oparte były o testy funkcjonalne limfocytów B *in vitro* [12, 115], jednak z powodu trud-

ności w standaryzacji procedur i braku znaczenia klinicznego, testy te nie zostały wdrożone do rutynowych procedur diagnostycznych. Kolejne klasyfikacje, oparte o zmiany odsetkowe w zakresie krążących subpopulacji limfocytów B, które korespondują z objawami klinicznymi, dzielą chorych na bardziej homogenne podgrupy. Do najczęściej stosowanych klasyfikacji należą: klasyfikacja “Freiburg” według Warnatza i wsp. [147], klasyfikacja Paryska, opracowana przez Piqueras i wsp. [108] oraz klasyfikacja EUROclass [151]. Wszystkie te klasyfikacje jako główne kryterium podziału stosują poziom “class-switched” limfocytów B pamięci. Opisano wcześniej, że u większości pacjentów z COVID zaburzone jest końcowe różnicowanie limfocytów B [1] i często stwierdza się obniżony poziom limfocytów B pamięci, a w szczególności znaczne obniżenie poziomu subpopulacji - “class-switched” limfocytów B pamięci, przy prawidłowej liczbie dojrzałych limfocytów B [13]. Istniejące klasyfikacje przedstawiają limfocyty B pamięci oraz ich subpopulacje jako odsetek wszystkich limfocytów krwi obwodowej (peripheral blood lymphocytes – PBL) (Warnatz), bądź jako odsetek frakcji limfocytów B (Piqueras, EUROClass).

Warnatz, w oparciu o poziom poszczególnych subpopulacji limfocytów B wyróżnił grupy pacjentów, u których:

grupa I limfocyty $CD19^+CD27^+IgD^-IgM^-$ stanowią $< 0.4\%$ PBL

Ia poziom $CD21^{low}$ limfocytów B jest $> 20\%$ limfocytów B

Ib poziom $CD21^{low}$ jest prawidłowy lub nieznacznie podwyższony

grupa II poziom “class-switched” limfocytów B jest prawidłowy

W grupie Ia stwierdzono wyższy odsetek pacjentów ze splenomegalią.

Piqueras wyróżnił następujące podgrupy pacjentów z COVID (odsetek subpopulacji limfocytów B w obrębie wszystkich limfocytów B):

grupa MBO – poziom limfocytów B pamięci $CD27^+$ poniżej 11%

grupa MB1 – wybiórcza redukcja “class-switched” limfocytów B pamięci

($>11\%$ limfocytów B pamięci $CD27^+$ B przy jednoczesnym obniżeniu $CD19^+CD27^+IgD^-IgM^-$ poniżej 8% limfocytów B)

grupa MB2 – pacjenci niespełniający powyższych kryteriów

W grupie MBO stwierdzano większy odsetek pacjentów ze splenomegalią.

Klasyfikacja EUROClass jest najbardziej szczegółowym opracowaniem, wskazującym że określony fenotyp krążących subpopulacji limfocytów B odpowiada różnym defektom różnicowania limfocytów B, czy to we wczesnym etapie ich dojrzewania, mającym miejsce czy na etapie limfocytów B strefy brzeżnej, czy też zaburzeń w dojrzewaniu ośrodków różnicowania. Zasadniczym kryterium klasyfikującym jest poziom $CD19^+CD27^+IgD^-IgM^-$ “class-switched” limfocytów B pamięci, natomiast parametrami drugorzędnymi są:

(A) poziom “transitional” limfocytów B pamięci

(B) poziom $CD21^{low}$ limfocytów B

Według EUROClass, cały szereg obserwowanych nieprawidłowości w badanych parametrach koreluje z różnymi objawami klinicznymi. Niski poziom “class-switched” limfocytów B pamięci wskazuje na zaburzenie dojrzewania ośrodków różnicowania grudek, a u pacjentów w tej podgrupie stwierdza się splenomegalię oraz ziarniniaki. Te powikłania występują także u pacjentów z wysokim poziomem limfocytów B $CD21^{low}$. Podwyższona liczba “transitional” limfocytów B związana jest z limfadenopatią. Dodatkowo pacjenci z podwyższoną liczbą “transitional” limfocytów B wykazują obniżony poziom krążących limfocytów strefy brzeżnej, co sugeruje nieprawidłowe dojrzewanie tych ostatnich komórek. Ponadto, w najnowszych badaniach opisano wybiórczy defekt różnicowania się komórek strefy brzeżnej, sklasyfikowany jako odrębne zaburzenie, naśladujące CVID [109].

Wszystkie te klasyfikacje opisują głównie zmiany w CVID u dorosłych [46]. W ostatnim czasie ukazała się jedna praca poświęcona poziomom subpopulacji limfocytów B pamięci u zdrowych dzieci oraz u dzieci z CVID (jednak w pracy tej, w grupie CVID praktycznie wszystkie dzieci były powyżej piątego roku życia) [67]. Ponadto, w innych hipogammaglobulinemiach z krążącymi limfocytami B, tj, SIgAD czy THI zmian w zakresie subpopulacji limfocytów B dotychczas nie opisano.

1.4.2 Defekty genetyczne

U większości pacjentów z CVID defekt genetyczny nie został stwierdzony. U około 15% pacjentów, wcześniej diagnozowanych jako CVID [104], stwierdza się mutacje genów kodujących ICOS, CD19, BAFF-R lub TACI. Mutację ICOS stwierdzono jedynie u kilku spokrewnionych chorych na CVID [56, 119]. ICOS należy do rodziny cząsteczek CD28 i ulega ekspresji jedynie na aktywowanych limfocytach T. W czasie wczesnej aktywacji limfocytów T przez antygeny, ICOS reguluje ich różnicowanie w stronę Th2 [4]. Wysoką ekspresję ICOS stwierdza się w strefie jasnej ośrodków różnicowania grudek, ponieważ ICOS jest niezbędne w czasie

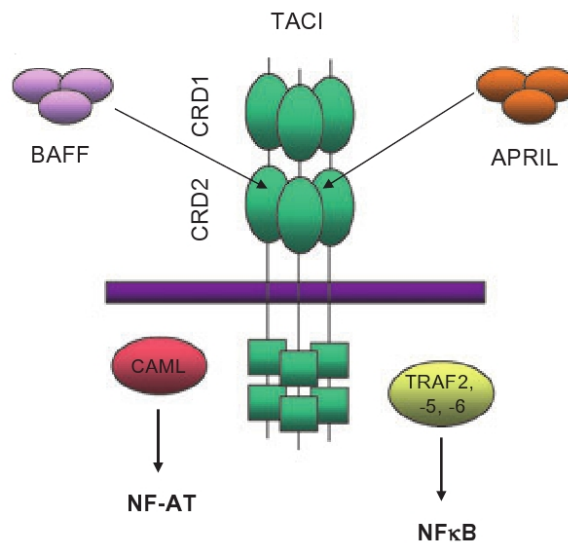
CSR zależnego od limfocytów T (somatyczne hipermutacje, zachodzące w strefie ciemnej, są niezależne od udziału tej molekuly), a zatem jest niezbędne do końcowego różnicowania limfocytów B do komórek pamięci oraz komórek plazmatycznych [7, 68]. Mutację molekuly CD19 jak dotychczas stwierdzono u 4 chorych z CVID [164]. CD19, wraz z innymi molekułami, tworzy ko-receptory obniżające próg czułości receptora BCR na stymulację antygenową [23, 44]. Brak CD19 i sygnałowania od tej molekuly powoduje słabą odpowiedź na stymulację antygenową i uniemożliwia efektywną odpowiedź humoralną [4]. Mutację BAFF-R znaleziono jak dotąd u jednego pacjenta z CVID [148], u którego stwierdzono zatrzymanie różnicowania limfocytów B na etapie “transitional” limfocytów B, co potwierdza rolę BAFF i BAFF-R w przeżyciu limfocytów B na obwodzie. U największej liczby pacjentów z CVID (około 10-15%), stwierdza się mutację w genie kodującym TACI (transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor). Jednak w najnowszej klasyfikacji pierwotnych niedoborów odporności [104] wyłączono z grupy CVID chorych ze zidentyfikowanym defektem genetycznym. U pacjentów z THI nie opisano dotąd żadnej mutacji. U nieznacznej części pacjentów z SIgAD stwierdzono występowanie mutacji genu kodującego receptor TACI [27, 116].

Receptor TACI

Budowa receptora TACI

Receptor ten zbudowany jest z trzech części: zewnątrzkomórkowej, transbłonowej i wewnątrzkomórkowej. Zewnątrzkomórkowa N-końcowa część receptora składa się z dwóch domen bogatych w cysteinę (CRDs – cistein-rich domains). Domeny te zawierają 6 wysoko konserwatywnych cystein, które stabilizują antyrównoległe łańcuchy β białka poprzez 3 mostki dwusiarczkowe [5, 10]. Druga domena CRD-2 jest miejscem wiązania ligandów receptora TACI (cząsteczek APRIL i BAFF), pierwsza domena CRD-1 prawdopodobnie nie jest konieczna do wiązania ligandu. Po związaniu ligandu, wewnątrzkomórkowa domena receptora TACI może wiązać różne cząsteczki TRAFs (TNF-associated factors). TACI może wiązać TRAF-2, -5, i -6, a aktywacja TRAF prowadzi do aktywacji NF- κ B (nuclear factor- κ B) oraz kinaz c-Jun (Jun amino terminal kinase – JNK) [9]. Część wewnątrzkomórkowej domeny TACI wiąże CAML (calcium-modulating cyclophilin ligand), co prowadzi do wzrostu kalcyneuryny, a w rezultacie do defosforylacji i jądrowej translokacji NF-AT (nuclear factor of activated T cells transcription factor) [15]. Do efektywnego przekazania sygnału receptor TACI musi ulec trymeryzacji i przyłączyć trzy cząsteczki ligandu [69]. Brak trymeryzacji receptora na powierzchni limfocytów B prowadzi do niedostatecznego wiązania ligandu, a co za tym idzie, do nieefektywnego przekazywania sygnału do wnętrza komórki.

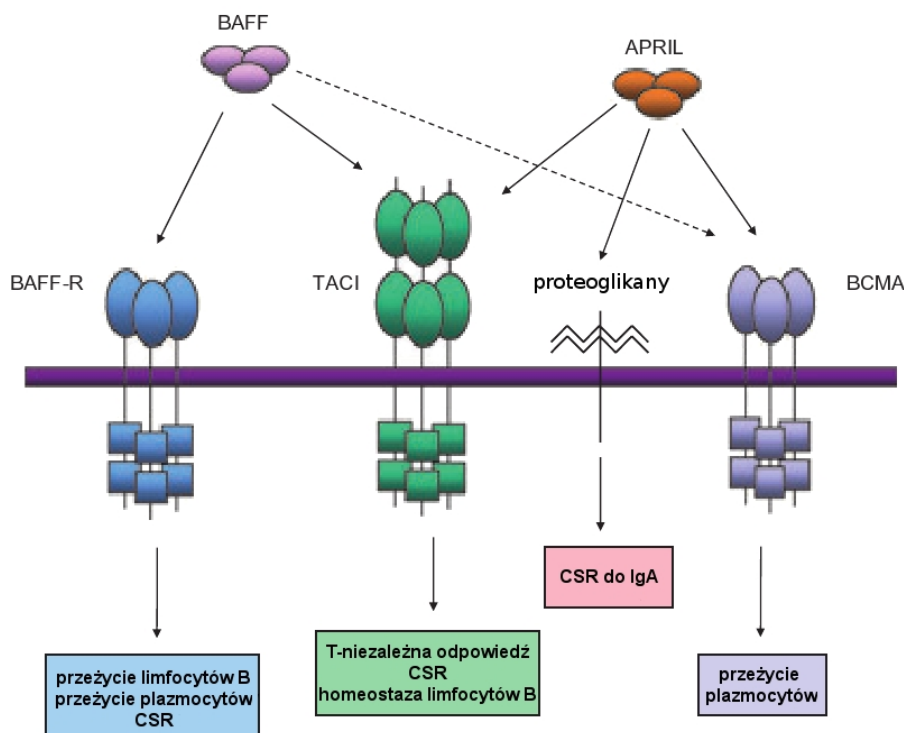
Rysunek 4: Budowa receptora TACI [4]



Funkcja osi BAFF/BAFF-R/TACI/APRIL/BCMA

Receptor TACI należy do nadrodziny receptorów dla TNF – dużej grupy białek przekazujących sygnały regulujące przeżycie jak również apoptozę komórek układu immunologicznego [116]. Oprócz TACI do nadrodziny receptorów dla TNF ulegających ekspresji na limfocytach B (poza opisanym już CD40) należą BAFF-R oraz BCMA (B-cell maturation antigen; TNFRSF17). TACI i BCMA ulegają ekspresji na limfocytach B, a ich ligandami są BAFF i APRIL. BAFF (zwany również BLys, THANK, TALL-1, zTNF4, CD257) wiąże również swój unikalny receptor BAFF-R [86, 124]. APRIL ma dodatkowo powinowactwo do proteoglikanu występującego w dużej ilości na powierzchni plazmocytów [26] Fig. 5. Zarówno APRIL jak i BAFF produkowane są przez komórki dendrytyczne i makrofagi po stymulacji interferonem- α , interferonem- γ lub CD40L [85]. BAFF poprzez interakcje z BAFF-R odgrywa rolę w aktywacji i przeżyciu limfocytów B oraz dostarcza kluczowego sygnału do dojrzewania limfocytów B [26, 118]. Badania nad funkcją APRIL wykazały jego rolę w rekombinacji umożliwiającej syntezę różnych klas przeciwciał (CSR) niezależną od limfocytów T poprzez interakcje z receptorem TACI [27, 85]. Receptor BCMA uczestniczy w prezentacji antygeny [158] i nie wydaje się odgrywać roli w CSR po połączeniu z BAFF czy APRIL [27]. Na rysunku 5 szczegółowo przedstawiono efekty poszczególnych interakcji ligand-receptor osi BAFF/BAFF-R/TACI/APRIL/BCMA.

Rysunek 5: Schemat interakcji APRIL, BAFF z ich receptorami BAFF-R, TACI i BCMA [4]



Badania na modelu mysim potwierdziły rolę receptora TACI w regulacji odpowiedzi humoralnej szczególnie na antygeny T-niezależne. U myszy z defektem TACI i APRIL poza upośledzoną produkcją IgA na antygeny T-niezależne [15, 16, 24], obserwowano choroby limfoproliferacyjne [126] i autoimmunizacyjne (przypominające toczeń układowy u ludzi) [126]. Podobne schorzenia stanowią istotne powikłania u chorych z CVID i SIgAD.

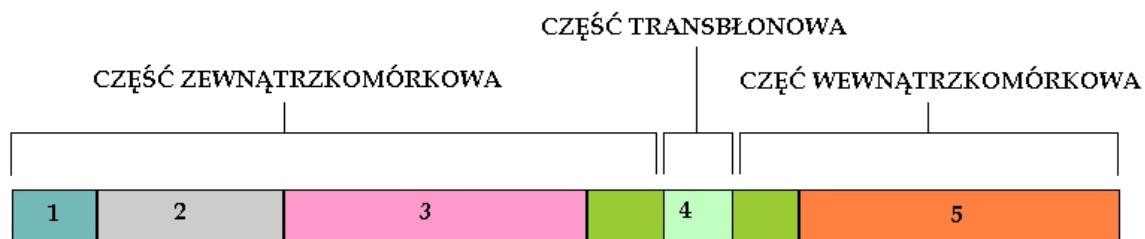
Gen kodujący receptor TACI

Gen dla receptora TACI – *TNFRSF13B* – znajduje się na krótkim ramieniu chromosomu 17 [26] i składa się z pięciu egzonów kodujących trzy części receptora Fig. 6. *TNFRSF13B* jest polimorficznym genem. Najczęściej występujące polimorfizmy to T27T w egzonie 2 i S277S w egzonie 5 [116]. Rzadziej występuje polimorfizm P97P (egzon 3) oraz polimorfizmy powodujące zmianę aminokwasu P251L (egzon 5) i V220A (egzon 4) Tab. 1 [27, 107, 116, 166].

Defekty genu kodującego receptor TACI u pacjentów z CVID i SIgAD

Dwie niezależne grupy naukowców Salzer i wsp. [116] Castigli i wsp. [27] zidentyfikowały

Rysunek 6: Schemat pięciu egzonów genu *TNFRSF13B* oraz kodowane przez nie części receptora TACI (na podstawie [27])



Tablica 1: Polimorfizmy w genie *TNFRSF13B*. *badania przeprowadzone przez grupę Salzer i wsp. 2007.

Wariant	T27T	P97P	V220A	P251L	S277S
Egzon	2	3	4	5	5
Pozycja w genie	81G→A	291T→G	659T→C	752C→T	831T→C
Zmiana aminokwasu (kodonu)	Treonina ACG ↓ Treonina ACA	Prolina CCU ↓ Prolina CCG	Walina GUG ↓ Alanina GCG	Prolina CCC ↓ Leucyna CUC	Seryna AUG ↓ Seryna ACG
Częstość występowania w grupie kontrolnej*	40,3%	1,6%	0,8%	10,4%	25,8%

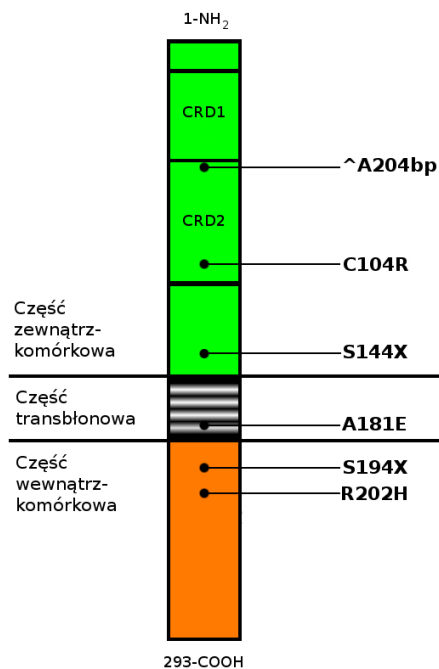
Tablica 2: Mutacje w genie *TNFRSF13B* wykryte u pacjentów z CVID i SIgAD [27, 26, 116, 117].

Wariant	204insA	C104R	S144X	A181E	S194X	R202H
Egzon	3	3	3	4	4	4
Pozycja w genie	204-205	310T→C	431C→A	542C→A	581C→A	605G→A
Zmiana aminokwasu	-	Cytozyna ↓ Arginina	Seryna ↓ stop kodon	Alanina ↓ Glutaminian	Seryna ↓ stop kodon	Arginina ↓ Histydyna

mutacje w genie *TNFRSF13B* w CVID i SIgAD zarówno w przypadkach występujących sporadycznie jak i rodzinie. Opisanie do tej pory mutacje przedstawiono w tabeli 2. Ostatnio stwierdzono, że pewne mutacje występują u zdrowych osób, jednak niezwykle rzadko i jedynie w formie heterozygotycznej [4].

Mutacje wykryte w TACI występują we wszystkich trzech domenach receptora: trzy w domenie zewnątrzkomórkowej, jedna w części transmembranalnej i dwie w domenie wewnątrzkomórkowej (rysunek 7) [26, 117].

Rysunek 7: Mutacje w domenach receptora TACI (na podstawie [26])



Opisane mutacje skutkują dysfunkcją receptora na różnych poziomach jego działania tj. wiązania ligandu, trimeryzacji oraz wiązania wewnątrzkomórkowych przekaźników. Mutacje C104R, A181E i R202H to mutacje zmiany sensu [26]. Mutacje S144X i S194X to mutacje nonsensowne, zamieniające trójkę nukleotydów kodujących aminokwas na “stop kodon” [26]. Insercja adeniny pomiędzy nukleotydami 204 i 205 powoduje zmianę ramki odczytu [27].

U pacjentów, u których wykryto insercję adeniny (204insA), nie stwierdza się obecności receptora TACI na powierzchni limfocytów B. Defekt ten przypuszczalnie powoduje powstanie bądź skróconego nieprawidłowego mRNA, bądź nieprawidłowego białka ulegającego degradacji [117].

Zmiana cytozyny na argininę w miejscu 104 (C104R) w zewnątrzkomórkowej domenie CRD2 wiążącej ligandy BAFF i APRIL [158], powoduje brak połączenia między receptorem a ligandem [27, 116]. U większości pacjentów mutacja ta występuje w postaci heterozygoty, a więc tylko jeden allel jest nieprawidłowy. Opisuje się, że heterozygotyczny defekt C104R, mimo obecności jednego prawidłowego allelu, może skutkować defektem funkcji receptora [26]. Może być to spowodowane tym, że na powierzchni komórki zmutowany receptor wpływa negatywnie na funkcję prawidłowych cząstek receptora, co uniemożliwia efektywną trymerzycję, wiązanie trzech cząstek ligandu, a w konsekwencji wpływa na sygnałowanie zależne od ligandu [26, 51]. Ostatnio opisano u nieznaczącej liczby zdrowych osób występowanie C104R, ale jedynie w postaci heterozygotycznej [4].

Mutacja S144X jest mutacją nonsensowną, prowadzącą do przedwczesnego zakończenia syntezy białka [26]. Pacjenci, u których opisano tę mutację byli homozygotami i nie stwierdzono u nich obecności ani białka, ani mRNA TACI - produkty wadliwego genu prawdopodobnie ulegają degradacji [26]. U pacjentów z mutacją A181E, występującą w części kodującej transbłonową domenę receptora TACI, receptor jest obecny na powierzchni komórek i prawidłowo wiąże BAFF i APRIL [27]. Jednak zamiana neutralnego aminokwasu (adeniny) na aminokwas o odczynie kwaśnym (kwas glutaminowy), prawdopodobnie zaburza trymerzycję receptora lub zmienia konformację dalszej części łańcucha, uniemożliwiając przekazywanie sygnału do wnętrza komórki [26].

Mutacja R202H powoduje zamianę aminokwasu w regionie wiążącym CAML [27]. U pacjentów z tym defektem, receptor TACI nie wiąże wewnątrzkomórkowego przekaźnika CAML, a w związku z tym nie dochodzi do aktywacji czynnika jądrowego NF-AT [116].

Mutacja S194X występuje w części kodującej wewnątrzkomórkową domenę receptora wiążącą przekaźniki TRAFs [27]. Receptor nie posiada fragmentów wiążących cząsteczki TRAF (mutacja prowadzi do przedwczesnego zakończenia syntezy łańcucha białkowego). Nie dochodzi w związku z tym do aktywacji czynników jądrowych biorących udział w zmianie klasy syntezowanych przeciwciał oraz różnicowaniu limfocytów B w kierunku komórek plazmatycznych [26].

Ostatnie badania przeprowadzone na dużej populacji pacjentów oraz zdrowych dawców wykazały, że ze wszystkich wcześniej opisywanych defektów genetycznych receptora TACI (204insA, C104R, S144X, A181E, S194X, R202H), statystycznie istotny związek z CVID mają trzy typy mutacji: C104R, A181E oraz insercja adeniny w pozycji 204 [25, 107, 110]. Opisane mutacje w genie *TNFRSF13B* formie homo- bądź heterozygoty [118] występowały sporadycznie, lub częściej, w rodzinnych przypadkach występowania CVID i/lub SIgAD [27, 116]. U osób spokrewnionych z tą samą mutacją obserwowano różny obraz kliniczny i przebieg choroby [116]. W jednej rodzinie ta sama mutacja może być przyczyną izolowanego niedoboru

IgA jak i CVID [4, 25, 116]. Mutacje receptora TACI mogą mieć różną penetrację zależną od dodatkowych czynników genetycznych i środowiskowych np. dziedziczenia genów MHC korelujących z SIgAD i CVID [26]. Do precyzyjnego określenia korelacji genotypowo/fenotypowych konieczną są jeszcze dalsze analizy, na większej ilości chorych [4].

Jak dotąd nie przeprowadzono podobnych badań w większej grupie dzieci z CVID, jak również u dzieci z THI i SIgAD. W populacji polskiej brak ponadto danych o częstości występowania mutacji w genie TACI u dorosłych pacjentów z CVID.

1.4.3 Zaburzenia równowagi Th1/Th2

W wielu pracach opisano zachwianą równowagę TH1/Th2 prowadzącej do hiperreaktywności Th1 u pacjentów z CVID. Opisano między innymi wzrost produkcji IL-12 *in vitro* przez monocyty [17], wzrost stężenia IL-12 i IFN- γ w surowicy pacjentów [93] czy wzrost produkcji IL-12 i IFN- γ przez komórki blaszki właściwej ścian jelit [90]. Opisano również znaczny wzrost produkcji IL-18 *in vitro* przez komórki dendrytyczne zdrowego dawcy inkubowane z dodatkiem surowicy pacjentów z CVID, co sugeruje obecność w surowicy pacjentów rozpuszczalnych czynników indukujących produkcję IL-18 [105]. Ponadto, opisano wzrost ekspresji receptorów dla IL-12 i IL-18 na poszczególnych subpopulacjach krążących limfocytów T, głównie na subpopulacjach limfocytów T dziewiczych, co jest dalszym dowodem na polaryzację odpowiedzi w stronę Th1 u pacjentów z CVID. Wzrost ekspresji tych receptorów korelował z tworzeniem ziarniników w węzłach chłonnych i śledzionie, prawdopodobnie z powodu wyższej produkcji IFN- γ i aktywacji makrofagów [95]. Większość tych doniesień opisuje zmiany u dorosłych pacjentów z CVID. Prace opisujące zaburzenia równowagi Th1/Th2 u dzieci z THI i SIgAD, sugerujące również polaryzację odpowiedzi immunologicznej w stronę Th1. U dzieci z THI opisano podwyższoną liczbę monocytów wykazujących cytoplazmatyczną ekspresję IL-12 oraz zwiększoną produkcję IL-12 i IL-18 przez komórki jednojądrzaste krwi obwodowej (peripheral blood mononuclear cells – PBMCs). U dzieci z SIgAD obserwowano wzrost produkcji IL-12 a także nieznaczny wzrost IL-18 [80].

W badaniach nad produkcją cytokin przez PBMCs u dzieci z THI i SIgAD stwierdzono zmiany dotyczące głównie TNF [80]. W THI wzrost dotyczył zarówno TNF α jak i TNF, podczas gdy w SIgAD jedynie TNF α [78]. Stwierdzono, że wzrostowi poziomu IgG w surowicy dzieci z THI towarzyszy spadek produkcji TNF. Wyniki te sugerują, że podwyższona produkcja TNF α może odgrywać rolę w patomechanizmie THI i SIgAD, za czym przemawia również hamujący wpływ egzogenego TNF α i TNF na syntezę IgG i IgA *in vitro* [78]. W THI stwierdzono zwiększoną liczbę komórek CD3⁺/CD4⁺ wykazujących cytoplazmatyczną ekspresję TNF α bądź TNF. W SIgAD natomiast, stwierdzono podwyższony odsetek limfocytów CD3⁺/CD4⁺ z cytoplazmatyczną ekspresją TNF α i IFN γ , czyli cytokin charakterystycz-

nych dla limfocytów TH1 [77]. Stwierdzono także znamienne podwyższoną produkcję IL-12, cytokiny istotnej do indukcji limfocytów Th1, przez PBMC u dzieci z THI i z SIgAD [77]. Wyniki te sugerują, że THI i SIgAD można zaliczyć do grupy chorób w patogenezie których rolę może odgrywać nadreaktywność limfocytów Th1.

2 CELE I ZAŁOŻENIA PRACY

2.1 CELE OGÓLNE

Celem niniejszej pracy było ustalenie znaczenia diagnostycznego i prognostycznego wybranych parametrów immunologicznych u dzieci z CVID, SIgAD oraz THI. Spośród najczęściej opisywanych u dorosłych pacjentów z CVID defektów immunologicznych, do badań wybrano te parametry, które mogą mieć znaczenie kliniczne, a metody ich pomiaru pozwalają na ewentualne ich wdrożenie do rutynowych procedur diagnostycznych.

2.2 CELE SZCZEGÓŁOWE

1. Ocena wybranych parametrów immunologicznych u dzieci z THI, SIgAD i CVID takich jak:
 - Subpopulacje limfocytów B, ze szczególnym uwzględnieniem komórek B pamięci ($CD19^+/CD27^+$), w tym tzw. “switched” komórek B pamięci ($CD19^+/CD27^+/IgD^-/IgM^-$)
 - Subpopulacje limfocytów T $CD4^+$ i $CD8^+$ dziewiczych ($CD3^+/CD45RA^+$) i pamięci ($CD3^+/CD45RO^+$) z ekspresją błonowych receptorów dla interleukin IL-12 i IL-18
 - Badanie struktury genu kodującego receptor TACI
2. Podział badanych pacjentów z hipogammaglobulinemią na grupy różniące się w zakresie badanych parametrów i próba korelacji z obrazem klinicznym
3. Ocena znaczenia badanych parametrów immunologicznych w diagnostyce różnicowej THI i CVID u małych dzieci.
4. Ocena znaczenia predykcyjnego badanych parametrów, umożliwiającego ewentualne wyłonienie spośród dzieci z SIgAD pacjentów, u których ryzyko przejścia SIgAD w CVID jest większe.
5. Porównanie wyników otrzymanych u dzieci z CVID z wynikami opisywanymi w CVID u dorosłych i ustalenie podobieństw i/lub różnic pomiędzy formą CVID rozpoczynającą się we wczesnym dzieciństwie lub dopiero w wieku dojrzałym.

3 MATERIAŁY I METODY

3.1 PACJENCI I GRUPA KONTROLNA

Badania objęły grupę dzieci z zaburzoną syntezą immunoglobulin pomimo obecności krążących limfocytów B. Pacjentów wybrano spośród około 600 dzieci w wieku powyżej 6-mcy, pozostających pod opieką Oddziału i Poradni Immunologicznej Uniwersyteckiego Szpitala Dziecięcego w Krakowie, cierpiących z powodu przewlekłych infekcji dróg oddechowych, u których stwierdzono hipogammaglobulinemię. Grupy pacjentów wyłoniono retrospektywnie, po długotrwałym okresie obserwacji poziomu immunoglobulin w surowicy. Pacjenci, u których utrzymywała się hipogammaglobulinemia, zostali zdiagnozowani jako CVID, natomiast pacjenci, u których poziom immunoglobulin w trakcie trwania projektu znormalizował się, zostali sklasyfikowani jako THI. U pacjentów zdiagnozowanych jako SIgAD, poziom IgA pozostawał obniżony poniżej 0.05g/L w czasie okresu obserwacji powyżej trzech lat. Grupę kontrolną, powstającą równocześnie, stanowiły dzieci, u których badania diagnostyczne wykluczyły zaburzenie odporności.

Badania objęły również grupę dorosłych pacjentów z CVID oraz grupę zdrowych dorosłych.

Do badań włączono jedynie te dzieci, których Rodzice (Opiekunowie) wyrazili w formie pisemnej zgodę na udział dziecka w projekcie, po udzieleniu informacji o celu i rodzaju przeprowadzanych badań. Badania prowadzone były równolegle ze standardowymi badaniami diagnostycznymi oceniającymi odporność lub w trakcie planowych badań monitorujących przebieg choroby u dzieci ze stwierdzonym wcześniej niedoborem odporności humoralnej. Komisja Bioetyczna Uniwersytetu Jagiellońskiego wyraziła zgodę na przeprowadzanie powyższych badań. Zgoda na badania immunofenotypowe komórek krwi: KBET/163/B/2001, zgoda na badania genetyczne: KBET/21/B2007.

3.2 OCENA STANU ODPORNOŚCI PACJENTÓW I GRUPY KONTROLNEJ

Podstawowe badania diagnostyczne obejmowały:

- Pomiar poziomu immunoglobulin (IgG, IgA, IgM) w surowicy krwi – wykonany metodą nefelometrii używając nefelometru Dade Behring BN II Nephelometer
- Ocenę subpopulacji limfocytów krwi obwodowej (limfocytów T i ich subpopulacji, limfocytów B oraz komórek NK) oraz ocenę markerów aktywacji (ekspresja HLA-DR na limfocytach T) – wykonaną z użyciem diagnostycznych zestawów odpowiednich przeciwciał monoklonalnych (monoclonal antibodies - mAbs) firmy Becton Dickinson. Analizę

subpopulacji limfocytów prowadzono na cytometrze przepływowym FACSCalibur (Becton Dickinson).

- Ocenę funkcji limfocytów *in vitro* w teście proliferacji limfocytów po stymulacji fitohe-maglutyniną (PHA) i przeciwciałami indukującymi anty-CD3. Stopień proliferacji lim-focytów oceniano z użyciem inkorporowanej ^3H tymidyny do proliferujących komórek. Radioaktywność próbek mierzono w liczniku scyntylicyjnym firmy Beckman (model Beckman LS 3801).

Wszystkie badania diagnostyczne wykonano w Zakładzie Immunologii Klinicznej Uniwersy-teckiego Szpitala Dziecięcego w Krakowie.

3.3 IZOLACJA KOMÓREK JEDNOJĄDRZASTYCH

Komórki jednojądrzaste krwi obwodowej (Peripheral blood mononuclear cells – PBMCs) izo-lowano z pełnej krwi pacjentów pobranej na antykoagulant EDTA. Krew rozcieńczono roztwo-rem soli fizjologicznej, nawarstwiono na medium rozdzielające Isopaque/Ficoll (Pharmacia, Uppsala, Szwecja) i wirowano z prędkością 400g przez 30 min w temperaturze pokojowej. Po wirowaniu zbierano warstwę komórek jednojądrzastych, płukano buforem fosforanowym (Phosphate-buffered saline – PBS) i liczono komórki w komorze Bürkera. Następnie komórki zawieszano w stężeniu $1 \times 10^6/\text{ml}$ w podłożu hodowlanym RPMI-1640 (Biochrom, Berlin, Niemcy) zawierającym antybiotyki (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycyny, 100U/ml penicyliny, 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ gentamycyny), glutaminę (2mM) (Gibco, Paisley, Wielka Brytania) i 10% dodatkiem płodo-wej surowicy cielęcej (FCS, Biochrom) i używane do dalszych eksperymentów.

3.4 OCENA IMMUNOFENOTYPU SUBPOPULACJI LIMFOCYTÓW

Do badań immunofenotypowych użyto komercyjnie dostępnych przeciwciał monoklonalnych (BD Biosciences Pharmingen, BD Biosciences, R&D i Beckman Coulter) sprzężone z izo-tiocyanianem fluoresceiny (FITC), fikoerytryną (PE), alloflokocyjaniną (APC) lub z tande-mem barwników fikoerytryna/barwnik cyjaninowy (PE-Cy5). Analizę odpowiednio przygo-towanych próbek przeprowadzono przy użyciu cytometru przepływowego FACSCanto (BD Biosciences Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA) wyposażonego w dwa lasery (niebieski laser: Coherent Sapphire – 488nm, 20mW oraz czerwony laser: JDS Uniphase He-lium/Neon – 633nm, 20mW) z zastosowaniem oprogramowania FACSDiva v.5.01 (Becton Dickinson, CA, USA). Analiza obejmowała minimum 10000 komórek.

3.4.1 Ocena subpopulacji limfocytów B

W celu oceny subpopulacji limfocytów B we krwi obwodowej badanych osób stosowano metodę trój- i czterokolorowej cytometrii przepływowej. Izolowane z krwi komórki jednojądrzaste (PBMCs) inkubowano z odpowiednimi kombinacjami mAbs, użytymi w stężeniu zalecanym przez producenta. Komórki były inkubowane z przeciwciałami przez 30 minut w temperaturze 4°C, dwukrotnie odplukiwane i zawieszane w 250µl PBS. Wykazano, że odsetki poszczególnych subpopulacji limfocytów B u pacjentów oraz zdrowych dawców uzyskane metodą barwienia PBMCs, nie są znacząco różne od wyników uzyskiwanych z zastosowania barwienia pełnej krwi (odplukanej od osocza) [46]. Z uwagi na wcześniejsze prace [147], w chwili rozpoczęcia projektu stosowano metodę barwienia PBMCs, zatem, w celu kontynuacji metodyki badawczej wszystkie późniejsze oznaczenia również wykonywano z zastosowaniem tej metody.

Niedojrzałe limfocyty B (CD19⁺/CD21^{low}) były identyfikowane przy pomocy przeciwciał anty-CD19 sprzężonych z APC i anty-CD21 sprzężonych z PE oraz anty-IgM sprzężonych z FITC. Limfocyty B naiwne (CD19⁺/CD27⁻/IgD⁺/IgM⁺) oraz limfocyty B pamięci (CD19⁺/CD27⁺) i ich subpopulacje “marginal zone” limfocyty B (CD19⁺/CD27⁺/IgM⁺/IgD⁺) oraz “class-switched” (CD19⁺/CD27⁺/IgM⁻/IgD⁻) komórki B pamięci były identyfikowane przy pomocy przeciwciał anty-CD19 sprzężonych z APC, anty-CD27 sprzężonych z PE-Cy5, anty-IgD sprzężonych z PE oraz anty-IgM sprzężonych z FITC. Odpowiednie zestawy kontroli izotypowych były stosowane równolegle.

Limfocyty były identyfikowane na podstawie parametrów morfologicznych wielkości i ziarnistości (FSC/SSC). Analiza cytofluometryczna obejmowała określenie odsetka poszczególnych subpopulacji limfocytów B w obrębie populacji limfocytów B. Ten sposób analizy (analiza odsetka poszczególnych komórek w obrębie populacji limfocytów B zamiast w obrębie populacji wszystkich limfocytów) wybrano za względu na wytyczne literaturowe [108, 151].

3.4.2 Ocena ekspresji receptorów dla IL-12 i IL-18 na poszczególnych subpopulacjach limfocytów T

W celu oceny ekspresji determinant na powierzchni poszczególnych subpopulacji limfocytów T we krwi obwodowej pacjentów zastosowano czterokolorową metodę cytofluometryczną przepływową. 100µl krwi inkubowano z odpowiednimi kombinacjami mAbs, użytymi w stężeniu zalecanym przez producenta. Komórki krwi inkubowano z przeciwciałami przez 30 minut w temperaturze 4°C, hemolizowano buforem hemolitycznym firmy Becton Dickinson, dwukrotnie odplukiwano i zawieszane w 250µl PBS.

Identyfikację limfocytów T przeprowadzano z użyciem przeciwciał monoklonalnych anty-CD3 sprzężonych z APC, subpopulacji limfocytów T pomocniczych i cytotoksycznych z za-

stosowaniem mAbs anti-CD4 lub anti-CD8 sprzężonych z tandemem barwników PE-Cy5. Limfocyty T pamięci i dziewicze były oceniane przy pomocy przeciwciał monoklonalnych anti-CD45RA i anti-CD45RO sprzężonych z FITC. W celu oceny stopnia ekspresji receptorów cytokinowych dla IL-12 i IL-18 na powierzchni subpopulacji limfocytów T CD4 i CD8 dziewiczych oraz pamięci, stosowano odpowiednie kombinacje przeciwciał w celu identyfikacji poszczególnych subpopulacji limfocytów T oraz przeciwciała anti-IL-12R (PE) i anti-IL-18R (PE). Jako kontroli izotypowych użyto oczyszczonych mysich immunoglobulin IgG1 PE (Becton Dickinson). Powyższe mAbs użyto w następujących kombinacjach:

- CD3/CD4/CD45RA/IgG1
- CD3/CD4/CD45RA/IL-12R
- CD3/CD4/CD45RA/IL-18R
- CD3/CD8/CD45RA/IgG1
- CD3/CD8/CD45RA/IL-12R
- CD3/CD8/CD45RA/IL-18R
- CD3/CD4/CD45RO/IgG1
- CD3/CD4/CD45RO/IL-12R
- CD3/CD4/CD45RO/IL-18R
- CD3/CD8/CD45RO/IgG1
- CD3/CD8/CD45RO/IL-12R
- CD3/CD8/CD45RO/IL-18R

Limfocyty były identyfikowane cytometrycznie na podstawie parametrów morfologicznych: wielkości i ziarnistości (FSC/SSC). Analiza cytofluorymetryczna obejmowała określenie odsetka komórek wykazujących ekspresję receptorów cytokinowych, oraz stopnia ekspresji receptorów cytokinowych na powierzchni poszczególnych subpopulacji limfocytów T. Stopień ekspresji wyrażano jako średnią intensywność fluorescencji (Mean fluorescence intensity – MFI).

3.5 IDENTYFIKACJA MUTACJI W GENIE KODUJĄCYM TACI (*TNFRSF13B*, LOCUS 17P11.2)

Procedura wykrywania zmian w sekwencji genu *TNFRSF13B* obejmowała etap badań przesiewowych (analiza heterodupleksów – HET) w badanych grupach, a następnie, u pacjentów, u których metodą przesiewową wykryto zmianę nukleotydową, metodą sekwencjonowania badano dokładną sekwencję nukleotydów egzonów 1-5 genu *TNFRSF13B*.

Procedura obejmowała następujące etapy:

1. Izolację DNA z krwi za pomocą zestawu firmy Qiagen.
2. Metodę przesiewową wykrywania mutacji (heterodupleksy) obejmującą:
 - reakcję PCR ze starterami firmy Tib BiolMol znakowanymi FAM dla każdego z pięciu egzonów z zastosowaniem DNA pacjenta lub DNA kontrolnego
 - sprawdzenie na żelu agarozowym obecności produktu PCR.
 - reakcję tworzenia heterodupleksów z produktów PCR pacjenta i kontroli
 - rozdział produktów reakcji PCR z użyciem sekwenatora kapilarnego ABI Prism 310.
3. Sekwencjonowanie egzonów 1-5 genu *TNFRSF13B* u pacjentów, u których metodą przesiewową wykryto zmianę nukleotydową. Metoda ta obejmowała:
 - amplifikację każdego z pięciu egzonów z użyciem odpowiednich starterów firmy Tib BiolMol.
 - sprawdzenie na żelu agarozowym obecności produktu PCR.
 - oczyszczanie DNA po reakcji PCR
 - użycie oczyszczonego produktu PCR do sekwencyjnego PCR
 - precypitację produktu reakcji sekwencyjnego PCR
 - rozdział produktów PCR sekwencyjnego w aparacie ABI PRISM 310

3.5.1 Izolacja DNA

W celu zbadania obecności mutacji w genie *TNFRSF13B* w pierwszym etapie izolowano DNA z 200 μ l pełnej krwi lub PBMCs. Izolację DNA przeprowadzono z zastosowaniem zestawu do izolacji DNA firmy Qiagen, zgodnie z procedurą podaną przez producenta. W pierwszym etapie próbki odbiałczano za pomocą proteinazy K, hemolizowano buforem a następnie inkubowano w 56°C przez 10 min. Po dodaniu etanolu próbki przenoszono na kolumnę, na której adsorbowane było DNA. DNA związane na kolumnie przepłukiwano buforami myjącymi, a następnie czyste DNA wmywano z kolumny za pomocą buforu eluującego. Tak wyizolowane DNA, wolne od białek, nukleaz oraz innych zanieczyszczeń, było stosowane do dalszych analiz. Stężenie uzyskanego DNA określano poprzez spektrofotometryczny pomiar absorbancji przy długości fali 260nm (DU 640B, Beckman Coulter, CA). Czystość izolowanego DNA określano na podstawie ilorazu absorbancji w zakresie 260nm i w 280nm.

Tablica 3: Startery stosowane do reakcji PCR w metodzie HET.

Startery	Sekwencja
Egzon 1	
-sensowny	5'-gCC Cgg CAg gCC TTC CAC T-3'
-antysensowny	5'-FAM-gCA AgC CCC ACA TCC CAg Agg-3'
Egzon 2	
-sensowny	5'-gCC CCA ggC CCC TAg CAA gTg-3'
-antysensowny	5'-FAM-TCT CCT CCT gCC ACC CTT TCC TCA-3'
Egzon 3	
-sensowny	5'-ggC TTA CTC Tgg AAT TgC CTT CTg-3'
-antysensowny	5'-FAM-CTT CTg gCC ATT TgC TTg gAC T-3'
Egzon 4	
-sensowny	5'-CCA gCC TCT CCA ggA gCC AgA C-3'
-antysensowny	5'-FAM-CCg ggT gCC ACT CTC CCA gTT A-3'
Egzon 5	
-sensowny	5'-ACC TgT CTg ggg gCg TTC TAC g-3'
-antysensowny	5'-FAM-TgC CCC gAC CTC CTg CTC TAT C-3'

3.5.2 Testy przesiewowe wykrywające mutację w genie *TNFRSF13B*

Do wstępnego wykrywania mutacji została zastosowana analiza heterodupleksów (HET).

Reakcja Łańcuchowa Polimerazy (PCR) egzonów genu *TNFRSF13B*

Wyizolowane DNA kontrolne pochodzące od zdrowego dawcy oraz DNA pacjentów poddawano amplifikacji metodą PCR. W reakcji tej stosowano termostabilną polimerazę AmpliTaq Gold, dNTP oraz specyficzne pary starterów firmy Biomers.net GmbH (Tab. 3). W metodzie HET w każdej parze starterów starter antysensowny był znakowany fluorescencyjnie barwnikiem FAM. Skład mieszaniny reakcyjnej podano w tabeli 4. Jako kontrolę pozytywną użyto 2ng AmpFlSTR Control DNA 007 (PE Applied Biosystems, Warrington, Wielka Brytania). Proces amplifikacji przeprowadzono w termocyklerze MJ Research PT200 w odpowiednio dobranych warunkach cieplnych przedstawionych na rysunku 8

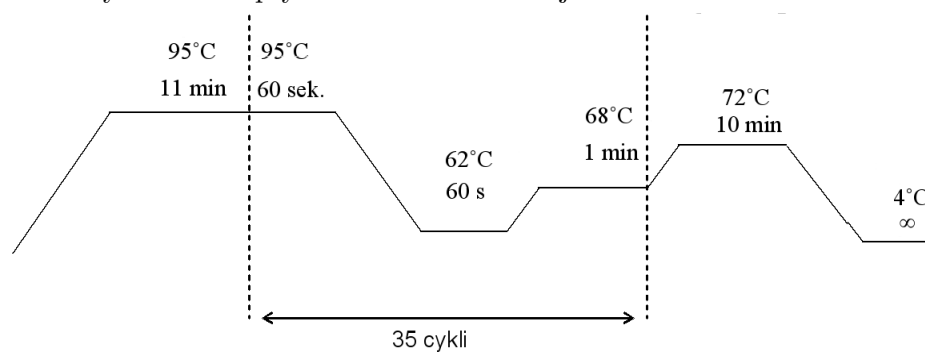
Tworzenie heterodupleksów

Tworzenie heterodupleksów przeprowadzono w termocyklerze PTC200 DNA Engine jako osobny etap, w odpowiednio dobranych warunkach cieplnych przedstawionych w tabeli 5. Jeśli przeprowadzenie kolejnych etapów procedury było możliwe dopiero po dłuższym okresie

Tablica 4: Skład mieszaniny reakcyjnej PCR.

Składnik	Stężenie wyjściowe	Stężenie końcowe	Objętość dla próbki
DNA	1-2.5 ng DNA	0.1 ng/ μ l	3 μ l
Startery:			
-sensowny	10 μ M	0,5 μ M	1 μ l
-antysensowny	10 μ M	0,5 μ M	1 μ l
Nukleotydy:			
-dATP	10 mM	0,5 mM	0,1 μ l
-dTTP	10 mM	0,5 mM	0,1 μ l
-dCTP	10 mM	0,5 mM	0,1 μ l
-dGTP	10 mM	0,5 mM	0,1 μ l
Bufor dla polimerazy AmpliTaq Gold	10x	1x	2 μ l
MgCl ₂	-	-	1,2 μ l
Polimeraza AmpliTaq Gold	2 U/ μ l	0,15 U/ μ l	0,15 μ l
H ₂ O	-	-	10,8 μ l

Rysunek 8: Optymalne warunki reakcji PCR w metodzie HET.



Tablica 5: Warunki tworzenia heterodupleksów (na podstawie [101]).

Etap	°C	Czas	Cykl
Denaturacja	96	10 min	
Formacja heterodupleksów	96	20 sec	x72 cykle, spadek temperatury o 0.5°C w kolejnych cyklach
Koniec	60	30 min	

czasu, uzyskane produkty reakcji tworzenia heterodupleksów przechowywano w temperaturze -20°C .

Rozdział heterodupleksów za pomocą elektroforezy kapilarnej

Uzyskane heterodupleksy rozdzielano względem różnic w ich ruchliwości zależnej od przestrzennej konformacji w warunkach niedenaturujących przy użyciu sekwenatora kapilarnego ABI PRISM 310 Genetic Analyzer. Każdą z próbek rozcieńczano 50 razy dejonizowaną wodą. Do próbek do sekwencjonowania dodawano $1\mu\text{l}$ rozcieńczonej próbki DNA, $1\mu\text{l}$ 40x rozcieńczonego standardu (ROX-1000, Applied Biosystems, Warrington, Wielka Brytania) oraz $10\mu\text{l}$ dejonizowanej wody. Równocześnie przygotowywano aparaturę sekwencyjną (ABI Prism 310 PE Applied Biosystems, USA) poprzez założenie kwarcowej kapilary o długości 47cm i średnicy $50\mu\text{m}$ (PE Applied Biosystems, Rotkreuz, Szwajcaria) wypełnionej odpowiednio przygotowanym polimerem (skład poniżej, Tab.6) oraz kalibrację automatycznego podajnika próbek. Rozdział każdej z próbek przeprowadzono w warunkach niedenaturujących w temperaturze 30°C przy napięciu 13kV. Bufor do elektroforezy stanowił 1xTBE (0.890 mM Tris, 0.890 mM Boric Acid, 0.220mM EDTA, pH= 8,3) z 10% glicerolem Tab.7. Fluorescencja emitowana przez barwniki fluorescencyjne (6-FAM – sprzężony z heterodupleksami i ROX – standard wielkości), była rejestrowana przez odpowiednie detektory z zastosowaniem wirtualnego filtra D. Uzyskane wyniki analizowano za pomocą oprogramowania 310 GeneScan3.1.2 (Applied Biosystems) i przedstawiono w postaci chromatogramu ze szczytami fluorescencji odpowiadającymi poszczególnym fragmentom standardu wielkości i uzyskanym heterodupleksom.

3.5.3 Sekwencjonowanie genu *TNFRSF13B*

Jeśli metoda przesiewowa wykazała obecność mutacji w genie *TNFRSF13B*, wtedy w celu identyfikacji mutacji stosowano bezpośrednie sekwencjonowanie DNA. Do określenia sekwencji nukleotydów w analizowanym genie użyto zautomatyzowanej metody terminacji łańcucha (metoda „dideoksy” Sangera). Sekwencjonowanie składało się z następujących etapów: reak-

Tablica 6: Schemat przygotowania 5 ml 5% polimeru z 10% glicerolem (na podstawie [3]).

Składnik	ilość
7% GeneScan Polymer	3,57 ml
10% glicerol	0,5 ml
10xTBE	0,5 ml
H ₂ O	0,43 ml

Tablica 7: Schemat przygotowania 25 ml buforu do elektroforezy kapilarnej – 1xTBE z 10% glicerolem (na podstawie [3]).

Składnik	ilość
10xTBE	2,5 ml
10% glicerol	2,5 ml
H ₂ O	20 ml

cji PCR i elektroforezy produktów reakcji PCR w żelu agarozowym, oczyszczeniu produktów reakcji PCR, PCR sekwencyjnego, precypitacji produktów reakcji PCR sekwencyjnego i ich rozdzieleniu w sekwenatorze.

Reakcja PCR

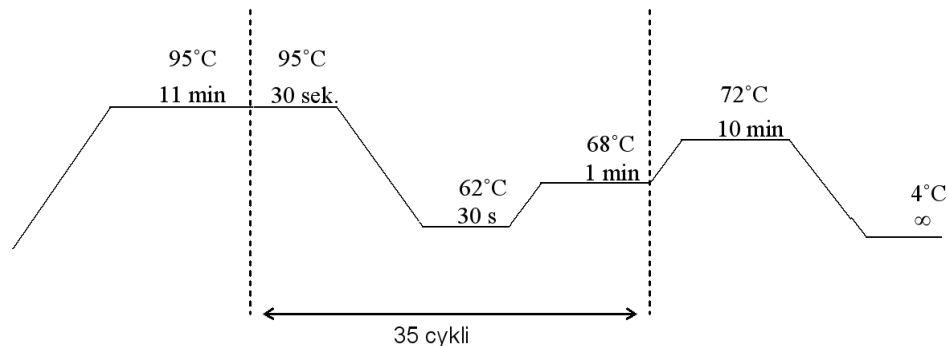
Reakcję PCR przeprowadzono w celu amplifikacji wszystkich pięciu egzonów genu *TNFRSF13B* kodującego receptor TACI. Matrycą w reakcji PCR było DNA uprzednio wyizolowane z krwi obwodowej pacjentów i kontroli. Reakcja przebiegała z zastosowaniem pięciu par specyficznych starterów (TIB MOLBIOL)(sekwencja starterów jak w reakcji PCR heterodupleksów – tabela 3). Mieszaninę do reakcji PCR, o końcowej objętości 20 μ l, przygotowano w probówkach typu Eppendorf, osobno dla każdego z pięciu egzonów. Skład mieszaniny reakcyjnej przygotowano według przepisu przedstawionego w tabeli 4, stosując nieznakowane startery. Reakcje prowadzono w termocyklerze MJ Research PT200 w warunkach cieplnych przedstawionych na rys. 9.

Elektroforeza produktu reakcji PCR

Przygotowanie 1.5% żelu agarozowego:

Mieszaninę agarozy (Sigma) i buforu 1xTAE (Tris, kwas borny, EDTA, pH 8,5) gotowano do całkowitego rozpuszczenia agarozy a następnie dodawano roztworu bromku etydyiny (EtBr, 1mg/ml) (Sigma, St. Louis, MO). Lekko schłodzony roztwór agarozy wylewano do formy z grzebieniami. Po zastygnięciu grzebień wyjmowano, a żel wkładano do aparatu do elektroforezy (Biotec-Fischer) i zalewano buforem 1xTAE.

Rysunek 9: Cykl cieplny zastosowany do reakcji PCR dla genu *TNFRSF13B*.



Przygotowanie próbek do elektroforezy:

Do 3 μ l produktu reakcji PCR dodawano 2 μ l buforu obciążającego (Sigma) i uzupełniano wodą do 15 μ l. Do sporządzenia próbki z markerem wielkości używano 1 μ l markera masowego (Gen Ladder 100, Inno-train Diagnostik GmBH). Przygotowane próbki w całości nakładano do kieszonek w żelu.

Elektroforeza przeprowadzana była przy napięciu 80V przez około 30 minut. Po zakończeniu rozdziału, żel umieszczano w transiluminatorze (Vilber Lourmat, Transilluminator – UV White Light) w celu uwidocznienia w postaci prążków DNA związanego z bromkiem etydyny.

Oczyszczenie produktu reakcji PCR

Kolejny etap procedury sekwencjonowania DNA wymagał użycia oczyszczonego produktu PCR i usunięcia składników mieszaniny pozostałych po reakcji PCR (jonów, wolnych nukleotydów, polimerazy).

Produkty uzyskane w reakcji PCR oczyszczano za pomocą zestawu QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen), według procedury podanej przez producenta. Oczyszczanie produktu PCR z użyciem zestawu polegało na związaniu DNA na kolumnie z filtrem z silikonową membraną w obecności dużych stężeń soli chaotropowych i w odpowiednim pH. Następnie przechodzące przez kolumnę zanieczyszczenia usuwano, a zaadsorbowane DNA wymywano w ostatnim etapie buforem Tris o odpowiednim pH.

Sekwencyjny PCR

Matrycą dla sekwencyjnego PCR były uprzednio zamplifikowane i oczyszczone egzony 1-5 genu *TNFRSF13B*. W reakcji PCR zastosowano jeden ze specyficznych starterów oraz dideoksynukleotydy (ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP) pozbawione grupy 3'-OH, sprzężone z czterema różnymi barwnikami fluorescencyjnymi. Startery (sensowny bądź antysensowny)

Tablica 8: Startery stosowane do PCR sekwencyjnego.

Startery	Sekwencja
Egzon 1 -antysensowny	5'-gCA AgC CCC ACA TCC CAg Agg-3'
Egzon 2 -sensowny	5'-gCC CCA ggC CCC TAg CAA gTg-3'
Egzon 3 -antysensowny	5'-CTT CTg gCC ATT TgC TTg gAC T-3'
Egzon 4 -antysensowny	5'-CCg ggT gCC ACT CTC CCA gTT A-3'
Egzon 5 -sensowny	5'-ACC TgT CTg ggg gCg TTC TAC g-3'

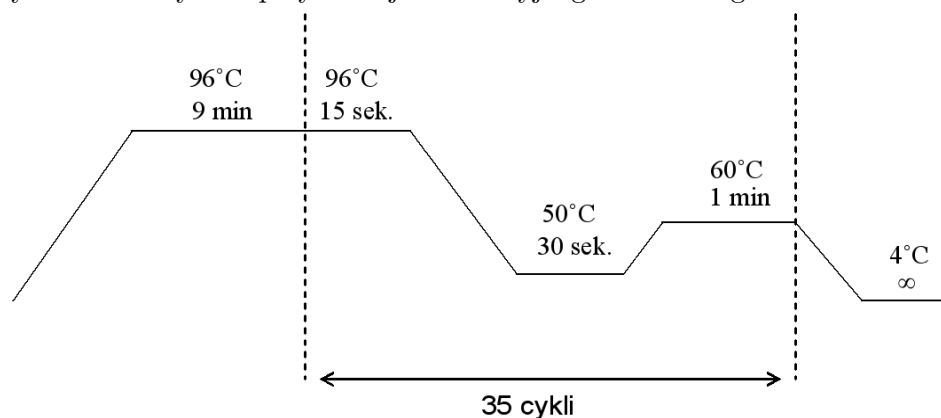
Tablica 9: Skład mieszaniny do reakcji PCR.

Składnik	Stężenie wyjściowe	Stężenie końcowe	Objętość dla próbki
DNA	-	-	10 μ l
Starter	1 μ M	3,2 μ M	3,2 μ l
Ready Reaction Premix	2,5x	0,625x	4 μ l
BigDye Sequencing Buffer	5x	0,5x	2 μ l
H ₂ O	-	-	0,8 μ l

wybrano doświadczalnie na podstawie analizy wyników reakcji sekwencyjnego PCR prowadzonego kolejno ze starterem sensownym lub antysensownym (tab.8). Skład mieszaniny reakcyjnej podano w tabeli 9.

Mieszaniny przygotowywano w objętości 20 μ l w probówkach typu Eppendorf, a reakcje sekwencyjnego PCR przeprowadzono w termocyklerze GenAmp PCR System 9700 według programu cieplnego BigDye® ustalonego przez producenta (warunki przedstawiono na rysunku 10).

Rysunek 10: Cykl cieplny reakcji sekwencyjnego PCR dla genu *TNFRSF13B*.



Precypitacja DNA z użyciem EDTA i etanolu

Precypitację produktów sekwencyjnego PCR przeprowadzono w celu oddzielenia powstałych fragmentów jednoniciowego DNA, od pozostałych składników mieszaniny. W tym celu do mieszaniny poreakcyjnej dodawano 5 μ l roztworu 125mM EDTA oraz 60 μ l 100% etanolu. Następnie inkubowano w temperaturze pokojowej bez dostępu światła przez 15 min. W kolejnym etapie próbki wirowano w temperaturze 4°C przez 30 min przy 3000 g. Usuwano nadsącz i po dodaniu 60 μ l 70% etanolu wirowano w temperaturze 4°C przez 15 min przy 1650g. Po dokładnym usunięciu supernatantu, peletkę rozpuszczano w 25 μ l formamidu, przenoszono do probówki do sekwencjonowania. W celu zdenaturowania DNA próbki inkubowano przez 3 min w 95°C, a następnie przenoszono na lód na ok. 10 min. Tak przygotowane próbki umieszczano w sekwenatorze ABI PISM 310 Genetic Analyzer.

Rozdział elektroforetyczny produktów sekwencyjnego PCR

Rozdział elektroforetyczny produktów sekwencyjnego PCR prowadzono na sekwenatorze kapilarnym ABI PRISM 310 Genetic Analyzer z zastosowaniem polimeru POP-6 i kapilary o długości 47cm, średnica 50 μ m (PE Applied Biosystems, Rotkreuz, Szwajcaria). W aparacie umieszczano kapilarę, strzykawkę (Kloehn) napelnioną polimerem oraz pojemnik z buforem z EDTA. Odpowiednia ilość polimeru była dozowana ze strzykawki do kapilary automatycznie. Rozdział każdej z próbek przeprowadzono w temperaturze 60°C przez 24 minuty. Fragmenty DNA zakończone znakowanymi dideoksyrobnukleotydami rozdzielane były względem długości. Barwniki fluorescencyjne sprzężone z ddNTP wzbudzone światłem lasera emitowały fluorescencję rejestrowaną przez odpowiednie detektory. Analizę uzyskanego wyniku sekwencjonowania przeprowadzono za pomocą programu Ridom TraceEdit 1.1.0 firmy Ridom GmbH.

Porównywano uliniowaną sekwencję badanego egzonu z sekwencją zamieszczoną w bazie danych GenBank.

3.6 ANALIZA STATYSTYCZNA WYNIKÓW

Wyniki analizowano stosując oprogramowanie PRISM GraphPad 4 statistical package (GraphPad Prism, USA). Cechy ilościowe charakteryzowano przez podanie wartości średniej, mediany, minimalnej, maksymalnej i odchyłeń standardowych. Jeśli nie potwierdzono zgodności z rozkładem normalnym, stosowano testy nieparametryczne. Do porównania rozkładu pomiędzy dwoma grupami stosowano test Manna-Whitney'a. W przypadkach porównania większej ilości grup używano test Kruskala-Wallisa z testem wielokrotnych porównań Dunna. Zależności między dwoma cechami ilościowymi oceniano przy zastosowaniu współczynnika korelacji rang Spearmana oraz stosowano regresję liniową. Zależności między cechami jakościowymi weryfikowano dokładnym testem Fishera. Stwierdzone różnice lub współzależności uznano za istotne statystycznie, gdy ich poziom istotności był równy lub mniejszy od 0,05.

4 WYNIKI

4.1 SUBPOPULACJE LIMFOCYTÓW B KRWI OBWODOWEJ

Immunofenotyp subpopulacji limfocytów B oceniano we frakcji PBMCs izolowanych z krwi obwodowej dzieci z CVID, SIgAD, THI oraz w grupie dorosłych z CVID i odpowiednio dobranych wiekowo grupach kontrolnych. Do analizy zastosowano metodę cytometrii przepływowej.

4.1.1 Limfocyty B naiwne $CD19^+/CD27^-/IgM^+/IgD^+$

Poziom limfocytów B naiwnych przedstawiano jako odsetek limfocytów B. W pracy tej nie wykazano różnic w poziomie tych komórek pomiędzy grupą kontrolną a żadną z badanych grup pacjentów.

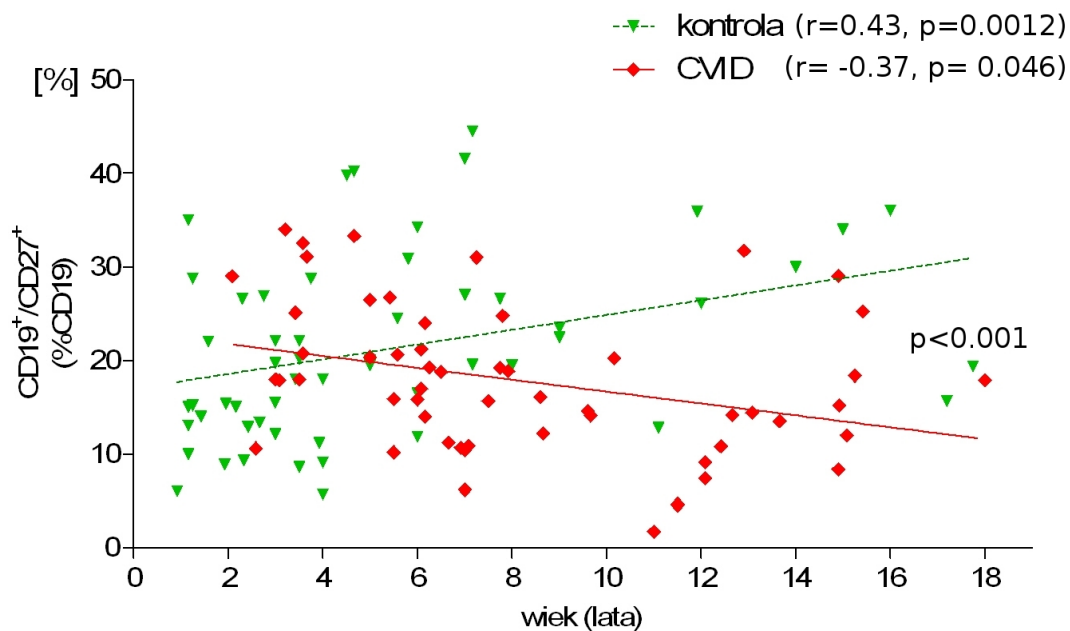
4.1.2 Limfocyty B pamięci $CD19^+/CD27^+$ i ich subpopulacje

Limfocyty B pamięci ($CD19^+/CD27^+$)

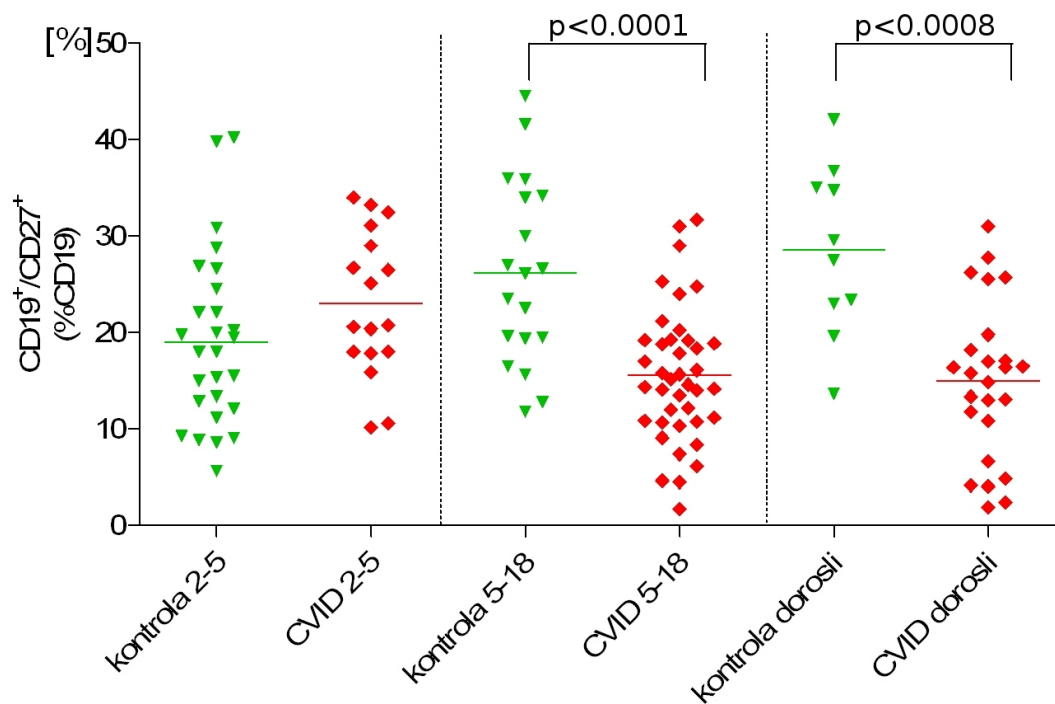
Z względu na ograniczone dane w literaturze na temat norm subpopulacji limfocytów B u dzieci (dostępne w literaturze normy obejmują głównie dorosłych) w pracy tej w pierwszym etapie ustalono poziomy tych komórek dla poszczególnych grup wiekowych u zdrowych dzieci. W grupie kontrolnej zaobserwowano dodatnią korelację pomiędzy wiekiem a poziomem limfocytów B pamięci we krwi obwodowej (współczynnik korelacji Spearmana $r = 0,43$ przy $p = 0,0012$, Fig.11). Natomiast w grupie dzieci z CVID poziom limfocytów B pamięci nie wzrastał z wiekiem (współczynnik korelacji Spearmana $r = -0,37$ przy $p = 0,0046$, Fig.11). Ponadto, w analizie regresji linowej wykazano statystycznie znamienne różnice pomiędzy nachyleniem linii regresji dla grupy kontrolnej, a linią dla grupy CVID ($p < 0,001$, Fig.12). Różnice te były bardziej wyraźne w grupie chłopców niż dziewczynek. Poziom komórek B pamięci u dzieci z CVID poniżej 4-5 roku życia był porównywalny do wiekowo dobranej grupy kontrolnej, jednak, w przeciwieństwie do grupy kontrolnej, u dzieci z CVID poziom tych komórek nie wzrastał z wiekiem, i u starszych dzieci (5-18 lat) obserwowano obniżony, w porównaniu do grupy kontrolnej, poziom limfocytów B pamięci ($p < 0,0001$ Fig.11). Zmiany w poziomie limfocytów B pamięci u starszych dzieci z CVID były zbliżone do tych obserwowanych u dorosłych pacjentów z CVID (dorośli – $p = 0,0008$ Fig.12). Wielokrotne badania poziomu komórek B pamięci u poszczególnych dzieci z CVID wykazały, że u niektórych dzieci, u których początkowo stwierdzano prawidłowy odsetek komórek B pamięci, nie tylko nie obserwowano wzrostu ale spadek odsetka tych komórek w kolejnych badaniach (Fig.13).

W grupach dzieci z SIgAD oraz THI, poziom limfocytów B pamięci oraz wiek były dodatnio skorelowane (Fig.14 – Spearman $r = 0,37$ przy $p = 0,02$, Fig.15 – Spearman $r = 0,35$

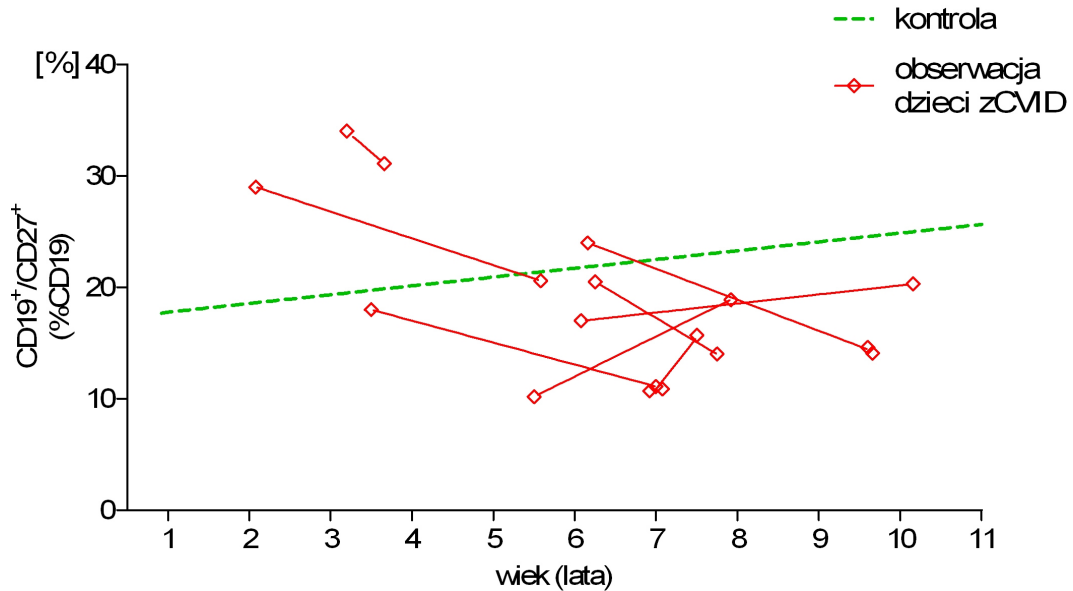
Rysunek 11: Limfocyty B pamięci (CD19⁺/CD27⁺) u dzieci z CVID.



Rysunek 12: Porównanie limfocytów B pamięci (CD19⁺/CD27⁺) w różnych grupach wiekowych dzieci z CVID i u dorosłych pacjentów z CVID.



Rysunek 13: Obserwacja poziomu limfocytów B pamięci ($CD19^+/CD27^+$) w kolejnych badaniach u wybranych dzieci z CVID.

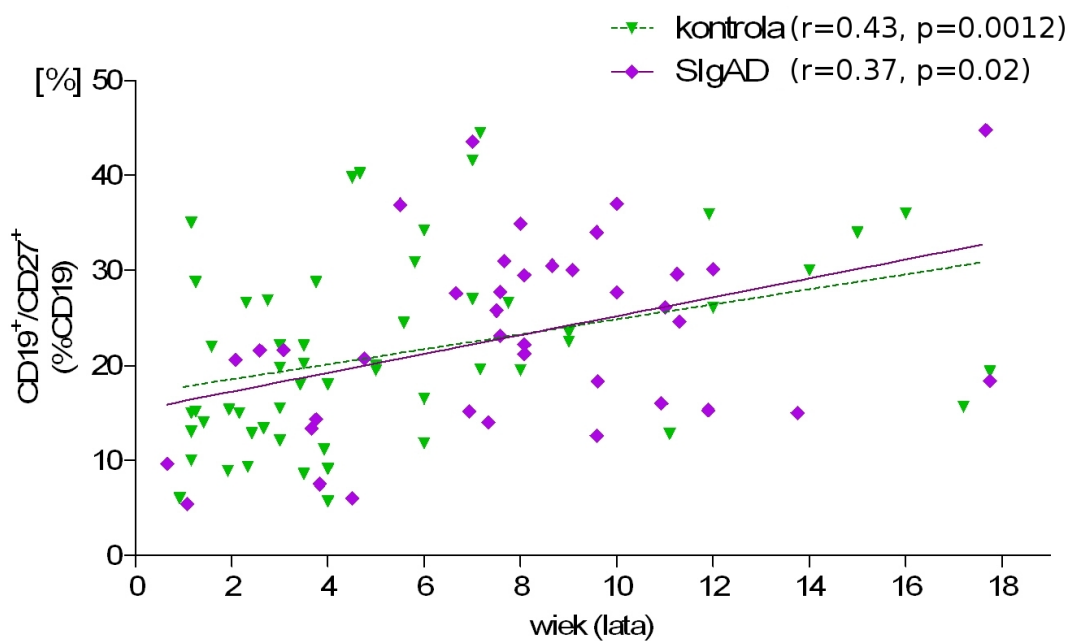


przy $p = 0,03$, odpowiednio), podobnie jak w grupie kontrolnej. Analiza regresji liniowej nie wykazała statystycznie znamiennych różnic pomiędzy nachyleniem lub przesunięciem linii regresji uzyskanych dla grup pacjentów i dla grupy kontrolnej (Fig.14, 15). W grupie dzieci z SIGAD i THI, w czasie całego okresu obserwacji, poziom limfocytów B pamięci był porównywalny do grupy kontrolnej. Porównanie poziomu limfocytów B pamięci w grupie dzieci z THI z podgrupą wiekową dzieci z CVID pomiędzy 2 a 7 rokiem życia wykazało statystycznie znamienne różnice pomiędzy nachyleniem linii regresji liniowej dla CVID a THI ($p < 0,0001$) (Fig.16).

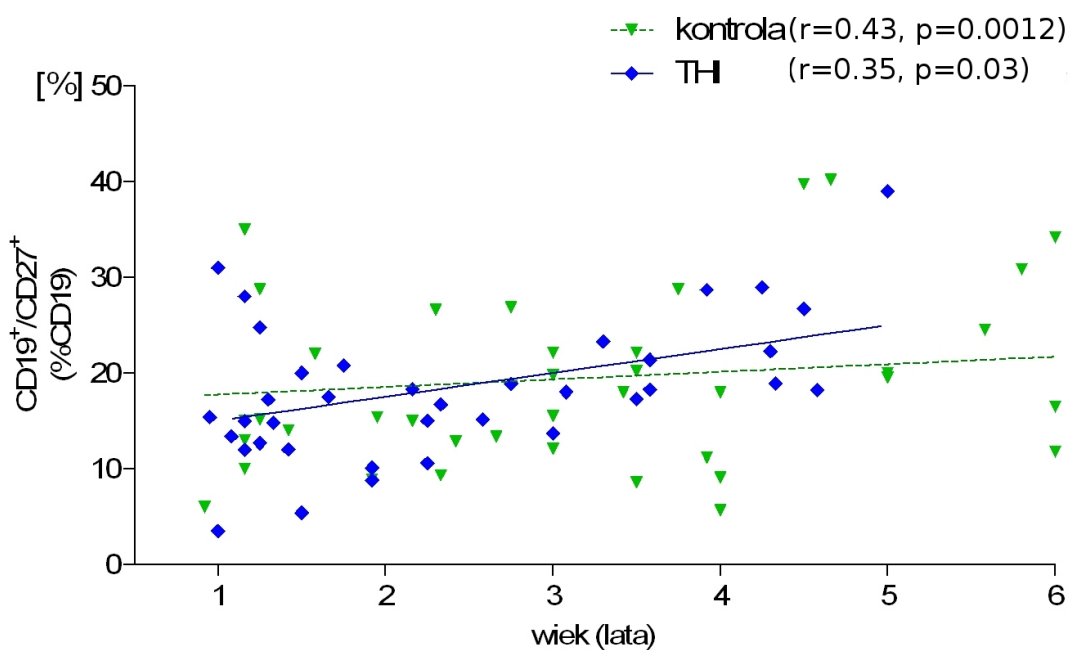
Limfocyty B pamięci po przełączeniu klas $CD19^+/CD27^+/IgM^-/IgD^-$ (Class-switched memory B cells)

Poziom limfocytów B pamięci po przełączeniu klas przedstawiono jako odsetek wszystkich limfocytów B (Fig.17, 21, 23) bądź jako odsetek limfocytów B pamięci (Fig.18, 22, 24). W grupie kontrolnej, niezależnie od sposobu analizy, poziom limfocytów B pamięci po przełączeniu klas wzrastał z wiekiem (Spearman $r = 0,57$ przy $p < 0,0001$ Fig.17, Spearman $r = 0,54$ przy $p < 0,0001$ Fig.18, odpowiednio). Jednak u dzieci z CVID odsetek tych komórek nie podnosił się z wiekiem (Fig.17 oraz Fig.18 korelacja nieznamienna statystycznie). Różnice pomiędzy nachyleniem linii regresji liniowej dla CVID i grupy kontrolnej były statystycznie znamienne ($p = 0,0001$ dla danych przedstawionych jako odsetek limfocytów B – Fig.17, $p = 0,01$ dla danych przedstawionych jako odsetek limfocytów B pamięci – Fig.18). Różnice

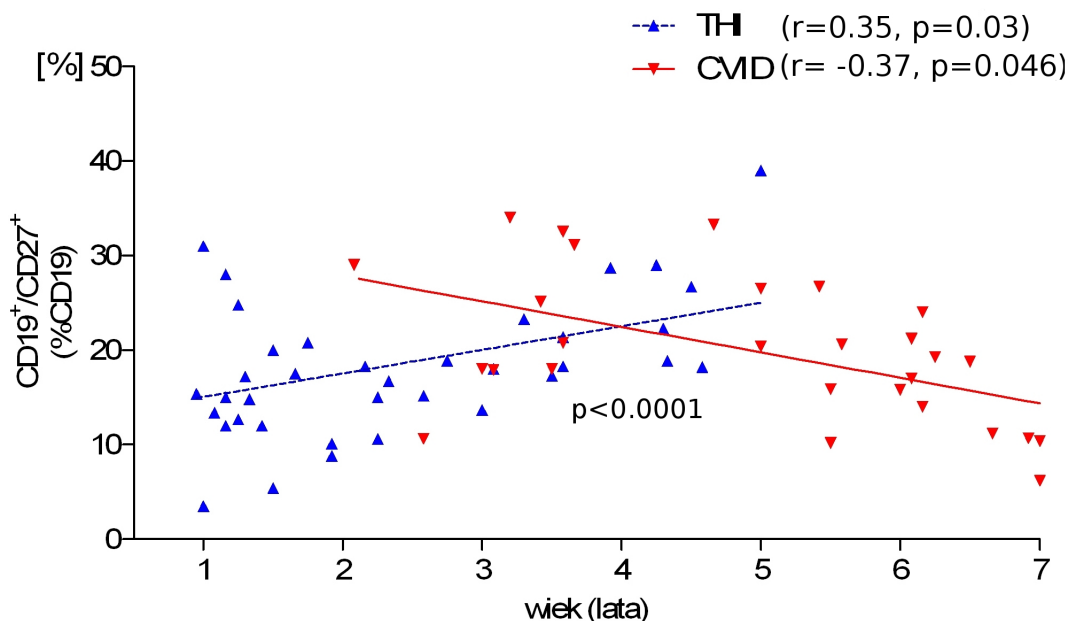
Rysunek 14: Limfocyty B pamięci ($CD19^+/CD27^+$) u dzieci z SIgAD.



Rysunek 15: Limfocyty B pamięci ($CD19^+/CD27^+$) u dzieci z THI.



Rysunek 16: Porównanie limfocytów B pamięci ($CD19^+/CD27^+$) u dzieci z CVID i THI.

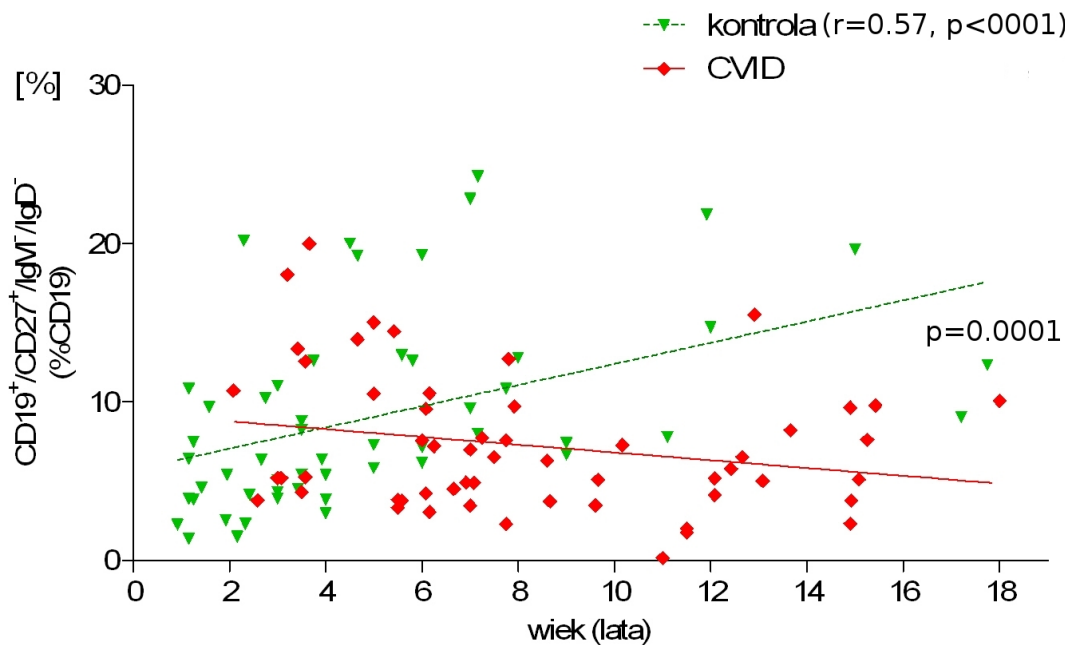


te były bardziej zaznaczone w grupie chłopców niż grupie dziewcząt. W podgrupie wiekowej dzieci z CVID pomiędzy 2 a 5 rokiem życia poziom limfocytów B $CD19^+/CD27^+/IgM^-/IgD^-$ był porównywalny z grupą kontrolną, natomiast u starszych dzieci z CVID (powyżej 5 roku życia) poziom tych komórek był statystycznie znamienne niższy niż w dobranej wiekowo grupie kontrolnej (Fig.19 dane przedstawione jako odsetek limfocytów B – $p < 0,0001$, Fig.20 dane przedstawione jako odsetek limfocytów B pamięci – $p = 0,01$). Monitorowanie poziomu subpopulacji limfocytów B wykazało, że u części dzieci z CVID, pomimo początkowo prawidłowych poziomów limfocytów B $CD19^+/CD27^+/IgM^-/IgD^-$ u niektórych dzieci, w kolejnych badaniach obserwowano spadek odsetka tych komórek. Zmiany w poziomie limfocytów B pamięci po przełączeniu klas u starszych dzieci z CVID były zbliżone do tych obserwowanych u dorosłych pacjentów z CVID (Fig.19 $p = 0,0007$, Fig.20 $p = 0,004$).

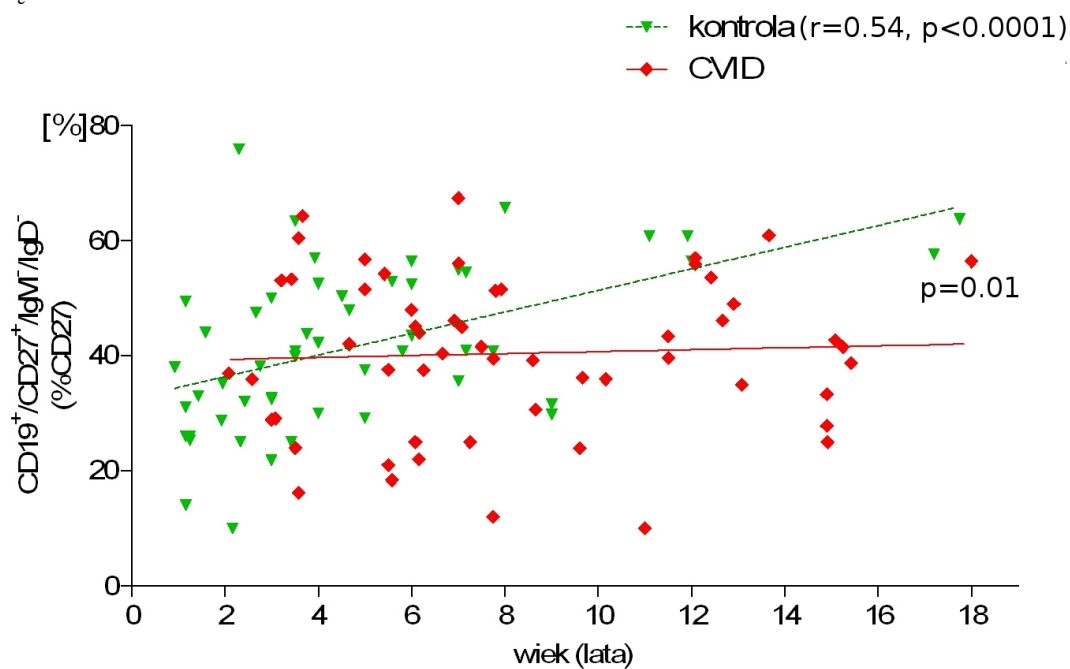
U dzieci z SIgAD poziom limfocytów B pamięci po przełączeniu klas wzrastał z wiekiem, gdy poziom tych komórek przedstawiono jako odsetek limfocytów B (Spearman $r = 0,36$ przy $p = 0,03$), i różnica pomiędzy nachyleniem czy przesunięciem linii regresji dla SIgAD, a linii dla grupy kontrolnej nie była statystycznie znamienna (Fig.21). Jednak gdy poziom tych komórek wyrażono jako odsetek limfocytów B pamięci (Fig.22) analiza wykazała podobne odchylenia jak u dzieci z CVID: odsetek tych komórek nie wzrastał z wiekiem, a różnica nachylenia linii regresji dla SIgAD i kontroli była statystycznie znamienna ($p = 0,02$, Fig.22).

U dzieci z THI poziom limfocytów B pamięci po przełączeniu klas wzrastał z wiekiem ($CD19^+/CD27^+/IgM^-/IgD^-$ wśród limfocytów B – Spearman $r = 0,43$ przy $p = 0,006$ –

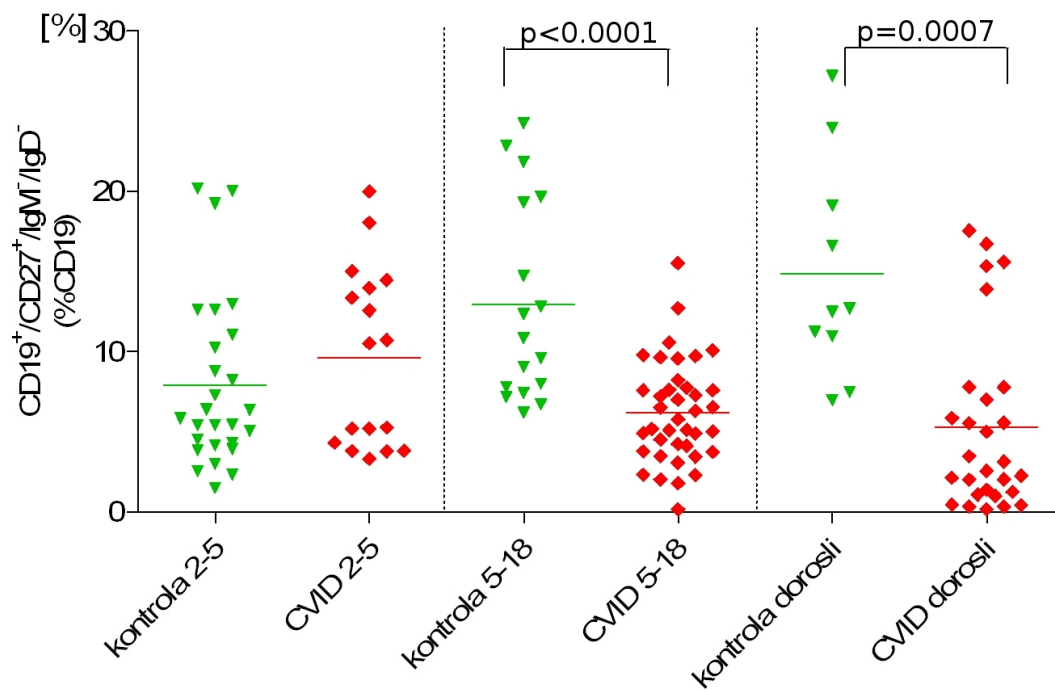
Rysunek 17: “Class-switched” limfocyty B pamięci przedstawiane jako odsetek limfocytów B u dzieci z CVID.



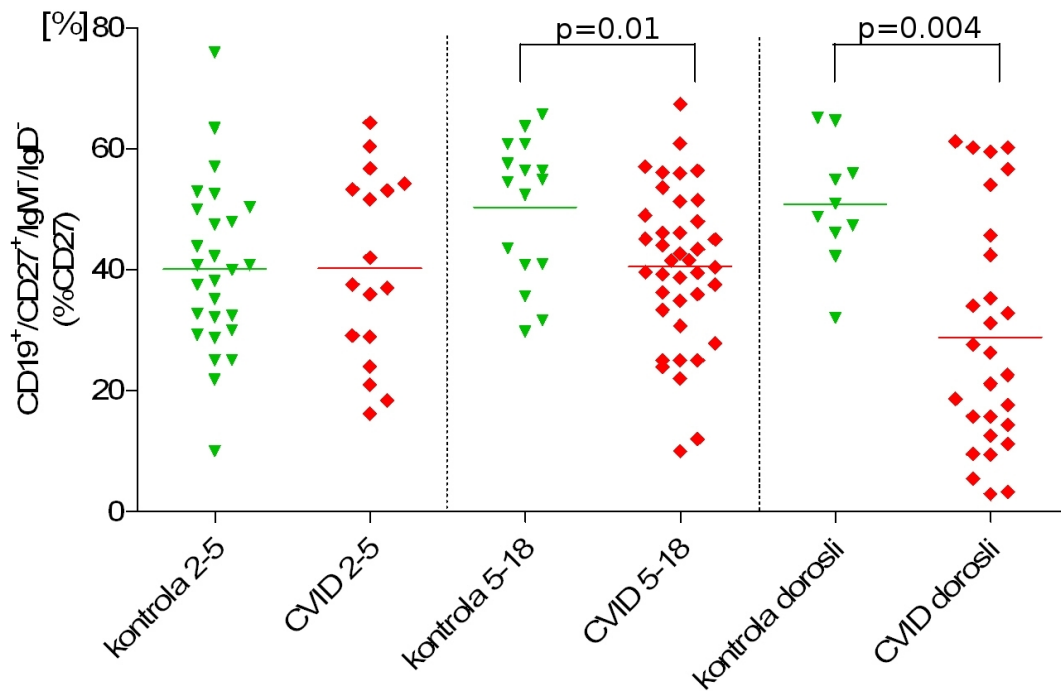
Rysunek 18: “Class-switched” limfocyty B pamięci przedstawiane jako odsetek limfocytów B pamięci u dzieci z CVID.



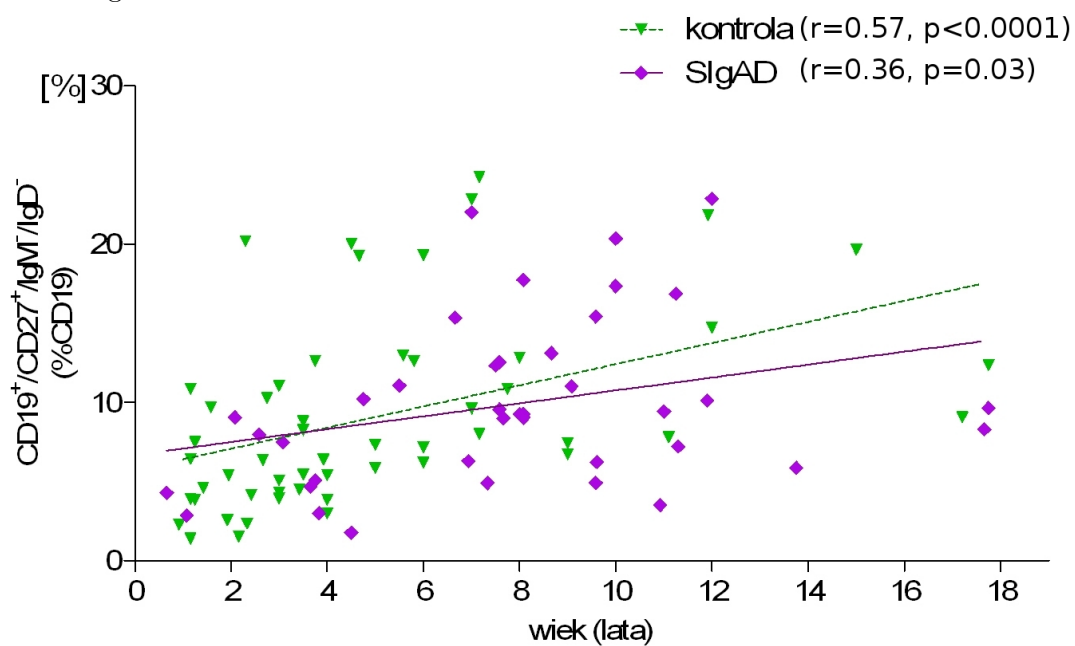
Rysunek 19: Porównanie limfocytów B pamięci “Class-switched” przedstawiane jako odsetek limfocytów B w różnych podgrupach wiekowych dzieci z CVID i u dorosłych pacjentów z CVID.



Rysunek 20: Porównanie limfocytów B pamięci “Class-switched” przedstawiane jako odsetek limfocytów B pamięci w różnych podgrupach wiekowych dzieci z CVID i u dorosłych pacjentów z CVID.



Rysunek 21: “Class-switched” limfocyty B pamięci przedstawiane jako odsetek limfocytów B u dzieci z SIgAD.



Rysunek 22: “Class-switched” limfocyty B pamięci przedstawiane jako odsetek limfocytów B pamięci u dzieci z SIgAD.

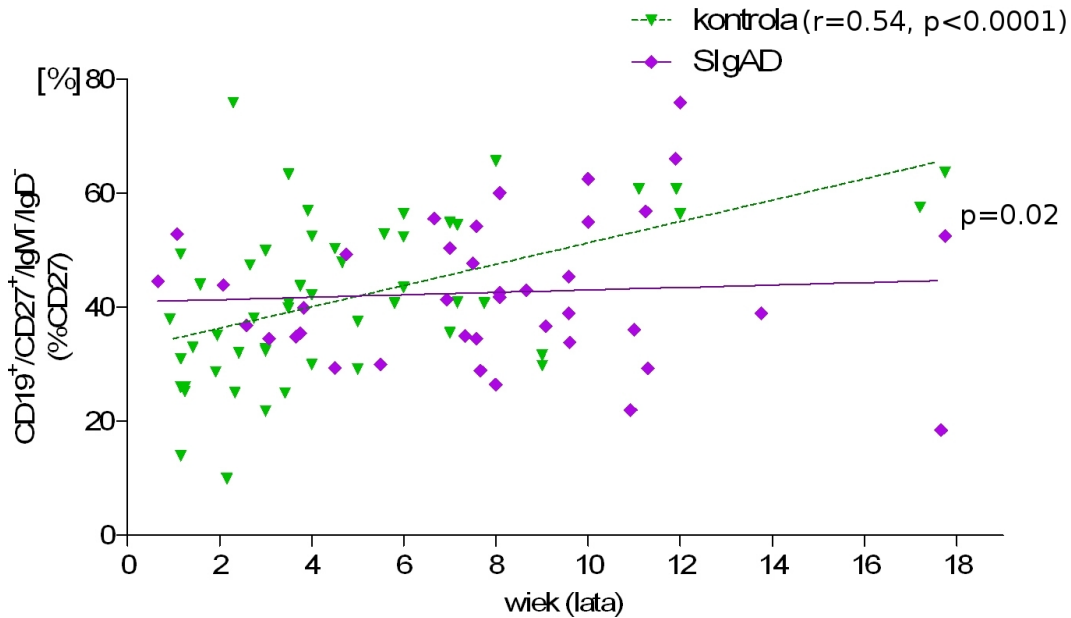
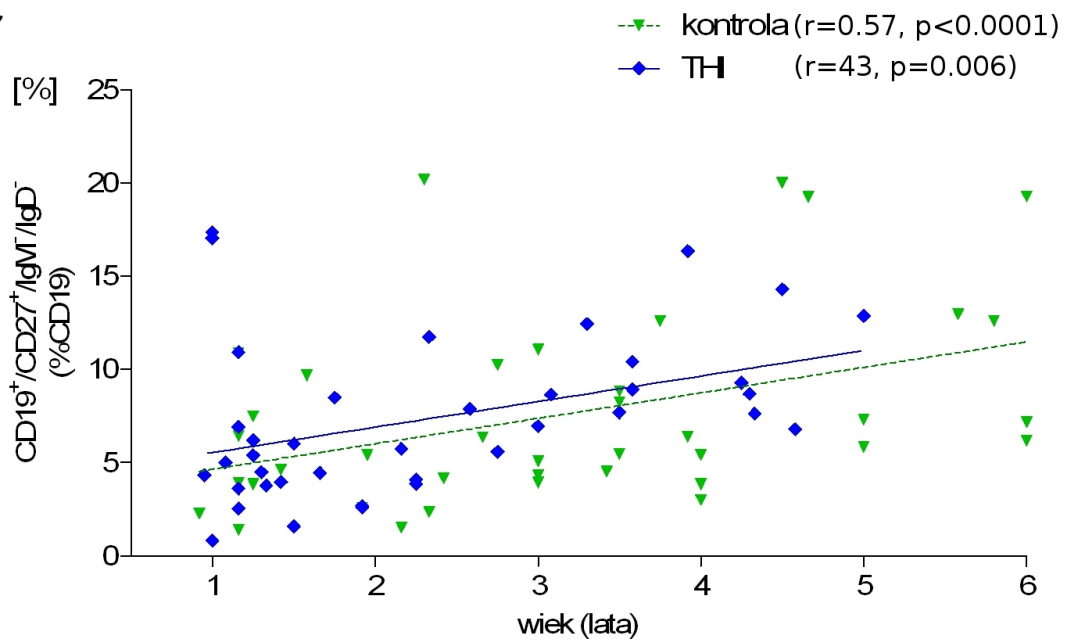


Fig.23; CD19⁺/CD27⁺/IgM⁻/IgD⁻ pośród komórek B pamięci – Spearman $r = 0,37$ przy $p = 0,02$ - Fig.24), a różnica w nachyleniu czy przesunięciu linii regresji dla THI względem kontroli nie była statystycznie znamienne. W grupie dzieci z THI, w czasie całego okresu trwania hipogammaglobulinemii, poziom limfocytów B pamięci po przełączeniu klas był porównywalny do grupy kontrolnej, niezależnie od sposobu przedstawiania danych (Fig.23 oraz Fig.24). Natomiast porównanie poziomu limfocytów CD19⁺/CD27⁺/IgM⁻/IgD⁻ między grupą dzieci z THI a podobną wiekowo podgrupą dzieci z CVID wykazało statystycznie znamienne różnice pomiędzy nachyleniem linii regresji liniowej dla CVID a THI, co pozwala na stwierdzenie, że poziom tej subpopulacji limfocytów B zachowuje się inaczej u dzieci z THI niż z CVID, co może mieć niezwykle istotne znaczenie kliniczne.

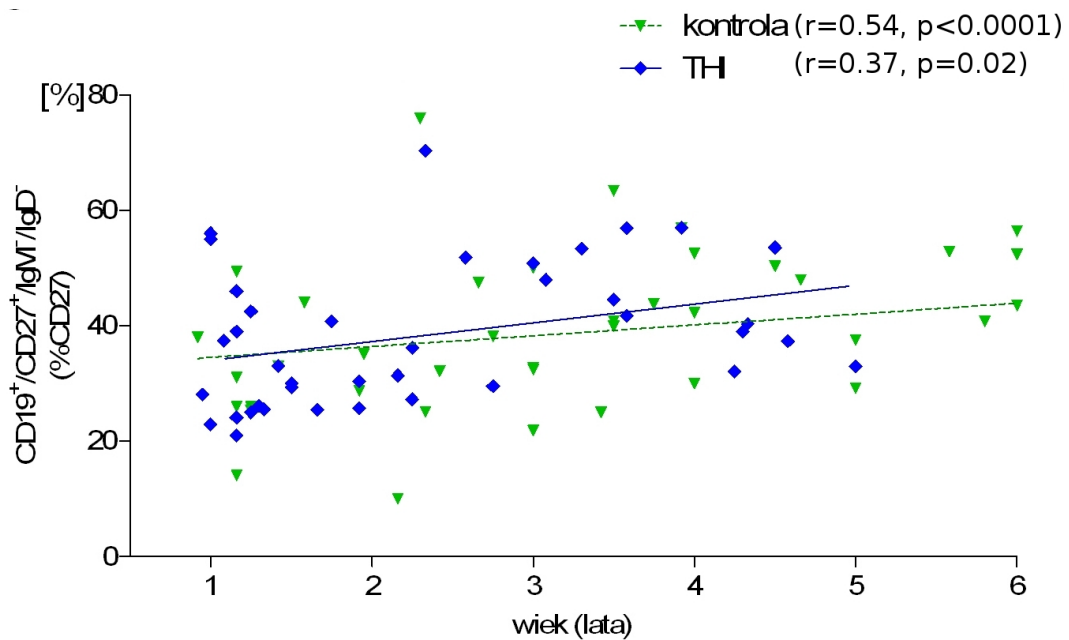
Limfocyty B strefy brzeżnej (CD19⁺/CD27⁺/IgM⁺/IgD⁺ - Marginal zone B cells)

W grupie dzieci bez niedoboru odporności stwierdzono dodatnią korelację między poziomem limfocytów B strefy brzeżnej (CD19⁺/CD27⁺/IgM⁺/IgD⁺) a wiekiem. W grupie dzieci z CVID obniżony poziom tych komórek był obserwowany u tych pacjentów, u których stwierdzano równocześnie niski odsetek limfocytów B pamięci. U dzieci z SIgAD oraz THI nie stwierdzono różnic w poziomie tych komórek względem grupy kontrolnej.

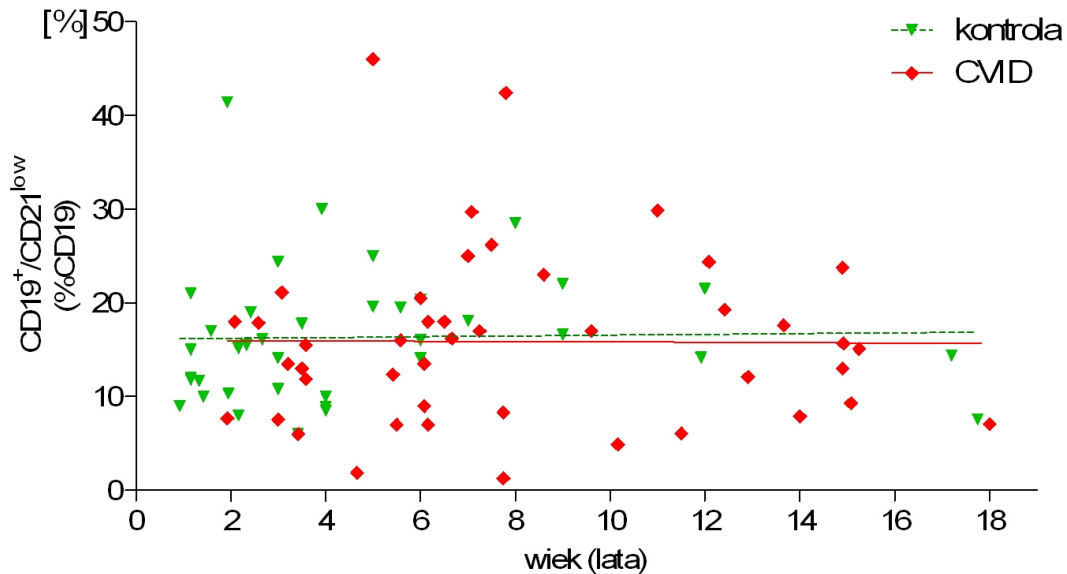
Rysunek 23: “Class-switched” limfocyty B pamięci przedstawiane jako odsetek limfocytów B u dzieci z THI.



Rysunek 24: ‘Class-switched’ limfocyty B pamięci przeliczone jako odsetek limfocytów B pamięci u dzieci z THI.



Rysunek 25: Limfocyty B CD19⁺/CD21^{low} u dzieci z CVID



4.1.3 Limfocyty B niedojrzałe CD19⁺/CD21^{low}

We wszystkich grupach pacjentów oraz w kontroli korelacja pomiędzy poziomem limfocytów B CD21^{low} a wiekiem nie była statystycznie znamienna. Również różnice pomiędzy nachyleniem czy przesunięciem linii regresji pacjentów i kontroli nie były statystycznie istotne (Fig.25, 26, 27). U dzieci z CVID nie stwierdzono odchyżeń w poziomie limfocytów B CD21^{low} podobnych jak opisywane u dorosłych pacjentów z CVID (Fig.28). Nie wykazano bowiem podwyższonego poziomu tych komórek u dzieci z CVID w porównaniu z odpowiednią grupą kontrolną, natomiast różnica pomiędzy dorosłymi pacjentami z CVID a kontrolą była statystycznie znamienna, $p = 0,004$ – Fig.28.

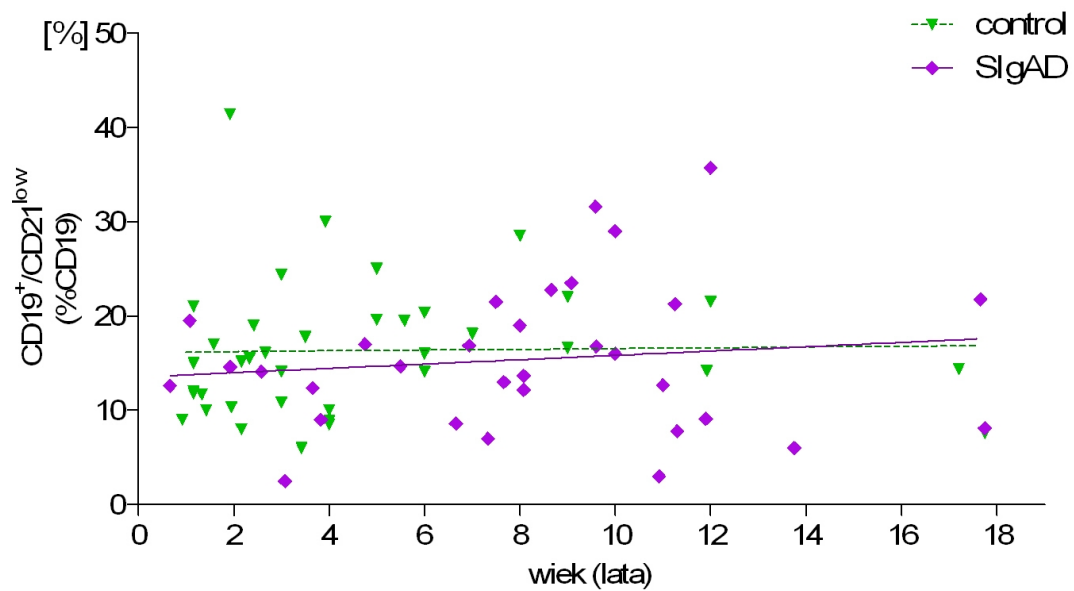
4.2 EKSPRESJA RECEPTORÓW DLA IL-12 I IL-18 NA SUBPOPULACJACH LIMFOCYTÓW T

Immunofenotyp subpopulacji limfocytów T oceniano we krwi obwodowej dzieci z CVID, SI-gAD, THI oraz w grupie dorosłych z CVID i odpowiednio dobranych wiekowo grupach kontrolnych. Do analizy zastosowano metodę cytometrii przepływowej.

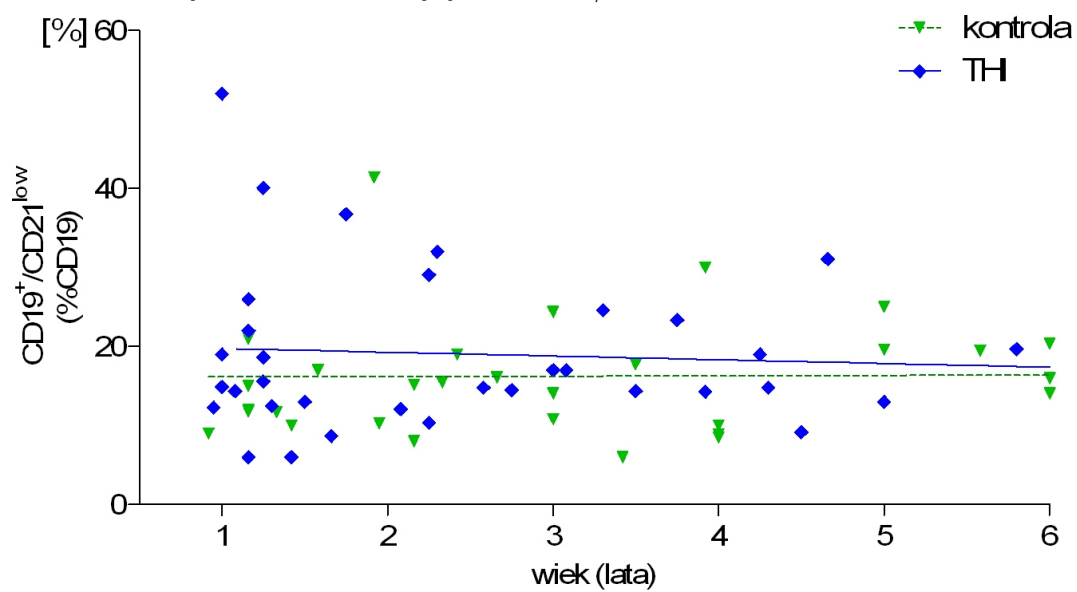
4.2.1 Ekspresja receptorów dla IL-12 na subpopulacjach limfocytów T CD4⁺ i CD8⁺ dziewiczych i pamięci

Immunofenotyp subpopulacji limfocytów T CD4⁺ i CD8⁺ dziewiczych oraz pamięci, odsetek komórek wykazujących ekspresję receptorów dla IL-12 i IL-18, oraz stopień ekspresji tych

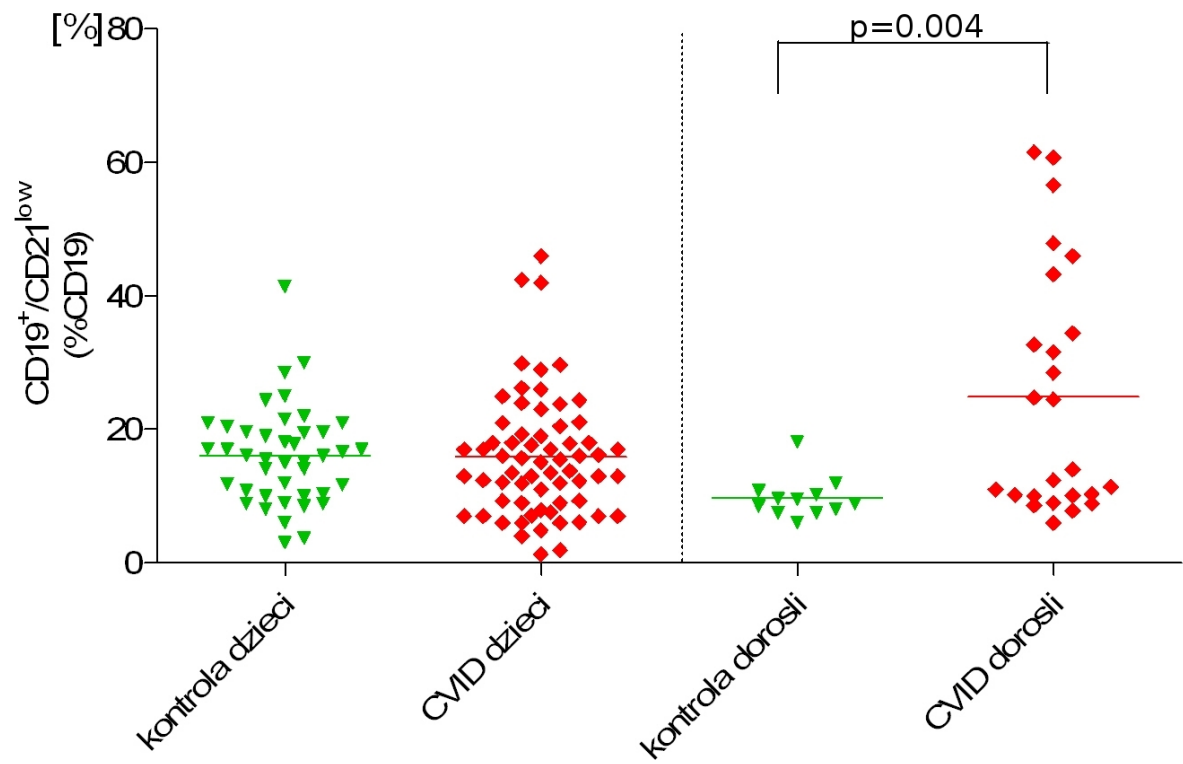
Rysunek 26: Limfocyty B CD19⁺/CD21^{low} u dzieci z SIgAD.



Rysunek 27: Limfocyty B CD19⁺/CD21^{low} u dzieci z THI.



Rysunek 28: Porównanie limfocytów B CD19⁺/CD21^{low} w CVID u dzieci i u dorosłych pacjentów z CVID



receptorów na poszczególnych subpopulacjach limfocytów T (wyrażony jako średnia intensywność fluorescencji (Mean fluorescence intensity – MFI)) oceniano w pełnej krwi dzieci z CVID, SIgAD, THI, dzieci z grupy kontrolnej oraz w grupie dorosłych z CVID i zdrowych dawców metodą cytometrii przepływowej.

Badania immunofenotypowe limfocytów T wykazały, że ekspresja receptorów dla IL-12 na limfocytach T nie jest zależny od wieku.

Ekspresja IL-12R na limfocytach CD4⁺ dziewiczych

W grupie dzieci z CVID, w stosunku do kontroli, wykazano znaczący wzrost odsetka limfocytów CD4⁺ dziewiczych wykazujących ekspresję receptora dla IL-12 ($p = 0,048$) (Fig.29a), natomiast stopień ekspresji tego receptora był porównywalny do grupy kontrolnej (Fig.30a). U dorosłych pacjentów z CVID wykazano podobne zmiany, jednak statystycznie nieznamienne.

W grupie dzieci z SIgAD wykazano najwyższy wzrost odsetka limfocytów CD4⁺ dziewiczych wykazujących ekspresję receptora dla IL-12 (Fig.29a), oraz najwyższy poziom ekspresji IL-12R na tej subpopulacji komórek (Fig.30a). W porównaniu z kontrolą, zarówno wzrost odsetka limfocytów CD4⁺ dziewiczych wykazujących ekspresję IL-12R był statystycznie znamienne ($p = 0,0003$), jak i stopień ekspresji IL-12R ($p = 0,011$). W porównaniu z grupą CVID różnica w odsetku komórek IL-12R⁺ również była statystycznie znamienna (przy $p = 0,0006$), jak i różnica w poziomie ekspresji IL-12R ($p = 0,0358$). Największe różnice stwierdzono w odsetku komórek IL-12R⁺ pomiędzy grupą SIgAD a THI ($p = 0,0002$). Znamienna była również różnica w poziomie ekspresji IL-12R pomiędzy SIgAD a THI ($p = 0,031$).

W grupie dzieci z THI odsetek limfocytów CD4⁺ dziewiczych wykazujących ekspresję receptora dla IL-12 był zbliżony do kontroli (Fig.29a). Stopień ekspresji tego receptora był również porównywalny do grupy kontrolnej (Fig.30a).

Ekspresja IL-12R na limfocytach CD8⁺ dziewiczych

W grupie dzieci z CVID odsetek limfocytów CD8⁺ dziewiczych wykazujących ekspresję receptora dla IL-12 był wyższy w porównaniu do kontroli, jednak $p > 0,05$ (Fig.29b), Stopień ekspresji tego receptora był porównywalny do grupy kontrolnej (Fig.30b). Natomiast wzrost odsetka tej subpopulacji w CVID był statystycznie znamienne w porównaniu z grupą THI ($p = 0,0207$); poziom ekspresji IL-12R był tylko nieznacznie wyższy w CVID w stosunku do THI. U dorosłych pacjentów z CVID nie wykazano ani wzrostu odsetka komórek IL-12R⁺, ani wzrostu w poziomie ekspresji tego receptora.

W grupie dzieci z SIgAD wykazano najwyższy wzrost odsetka limfocytów CD8⁺ dziewiczych wykazujących ekspresję receptora dla IL-12 (Fig.29b), oraz najwyższy poziom ekspresji

IL-12R na tej subpopulacji komórek (Fig.30b). W porównaniu z kontrolą zarówno wzrost odsetka limfocytów CD8⁺ dziewiczych wykazujących ekspresję IL-12R był statystycznie znamienne ($p = 0,0041$), jak i stopień ekspresji IL-12R ($p = 0,0002$). W porównaniu z grupą CVID, różnica w odsetku komórek IL-12R dodatnich w SIgAD nie była statystycznie znamienna, jednak różnica w poziomie ekspresji IL-12R była znamienna ($p = 0,0079$). Największe różnice w odsetku komórek IL-12R⁺ ($p = 0,0007$) oraz w poziomie ekspresji IL-12R ($p < 0,0001$) stwierdzono pomiędzy grupą SIgAD a THI (Fig.30b).

W grupie dzieci z THI odsetek limfocytów CD8⁺ dziewiczych wykazujących ekspresję receptora dla IL-12 był zbliżony do kontroli (Fig.29b). Stopień ekspresji tego receptora był również porównywalny do grupy kontrolnej (Fig.30b).

Ekspresja IL-12R na limfocytach CD4⁺ pamięci

W grupie dzieci z CVID zarówno odsetek limfocytów CD4⁺ pamięci wykazujących ekspresję receptora dla IL-12 (Fig.29c), jak i poziom ekspresji tego receptora był porównywalny do kontroli (Fig.30c). U dorosłych pacjentów z CVID wykazano nieznaczny wzrost odsetka komórek IL-12R⁺, natomiast poziom ekspresji tego receptora był zbliżony do grupy kontrolnej.

W grupie dzieci z SIgAD, w porównaniu z kontrolą, nie wykazano wzrostu odsetka limfocytów CD4⁺ pamięci wykazujących ekspresję receptora dla IL-12 (Fig.29c), a poziom ekspresji IL-12R na tej subpopulacji komórek był tylko nieznacznie wyższy w stosunku do kontroli ($p = 0,0733$) (Fig.30c). Jednak w porównaniu do grupy z CVID zarówno wzrost odsetka limfocytów CD4⁺ pamięci wykazujących ekspresję IL-12R, jak i wzrost poziomu ekspresji IL-12R w grupie z SIgAD był statystycznie znamienne ($p = 0,0178$ i $p = 0,0066$, odpowiednio). W porównaniu z grupą THI zarówno różnica w odsetku komórek IL-12R dodatnich była statystycznie znamienna ($p = 0,0349$), jak i różnica w poziomie ekspresji IL-12R ($p = 0,0159$) (Fig.29c, 30c).

W grupie dzieci z THI odsetek limfocytów CD4⁺ pamięci wykazujących ekspresję receptora dla IL-12 był zbliżony do kontroli (Fig.29c). Stopień ekspresji tego receptora był również porównywalny do grupy kontrolnej (Fig.30c).

Ekspresja IL-12R na limfocytach CD8⁺ pamięci

W grupie dzieci z CVID zarówno odsetek limfocytów CD8⁺ pamięci wykazujących ekspresję receptora dla IL-12 (Fig.29d), jak i poziom ekspresji tego receptora był tylko nieznacznie wyższy w porównaniu do kontroli (Fig.30d). U dorosłych pacjentów z CVID odsetek komórek IL-12R⁺ był nieznacznie wyższy niż w kontroli, jednak poziom ekspresji tego receptora był zbliżony do grupy kontrolnej.

W grupie dzieci z SIgAD, w porównaniu z kontrolą, wykazano jedynie nieznaczny wzrost zarówno odsetka limfocytów CD8⁺ pamięci wykazujących ekspresję receptora dla IL-12 (przy $p > 0,05$) (Fig.30d), jaki i poziomu ekspresji IL-12R na tej subpopulacji komórek ($p = 0,0532$) (Fig.29d). W porównaniu do grupy z CVID zarówno wzrost w SIgAD odsetka limfocytów CD8 pamięci wykazujących ekspresję IL-12R, jak i wzrost poziomu ekspresji IL-12R był statystycznie nieznamienne. W porównaniu z grupą THI wzrost w odsetku komórek IL-12R dodatnich nie był statystycznie znamienne, jednak różnica w poziomie ekspresji IL-12R była znamienne ($p = 0,0102$) (Fig.30d).

W grupie dzieci z THI odsetek limfocytów CD8⁺ pamięci wykazujących ekspresję receptora dla IL-12 był zbliżony do kontroli (Fig.29d). Stopień ekspresji tego receptora był również porównywalny do grupy kontrolnej (Fig.30d).

4.2.2 Ekspresja receptorów dla IL-18 na subpopulacjach limfocytów T CD4⁺ i CD8⁺ dziewiczych i pamięci

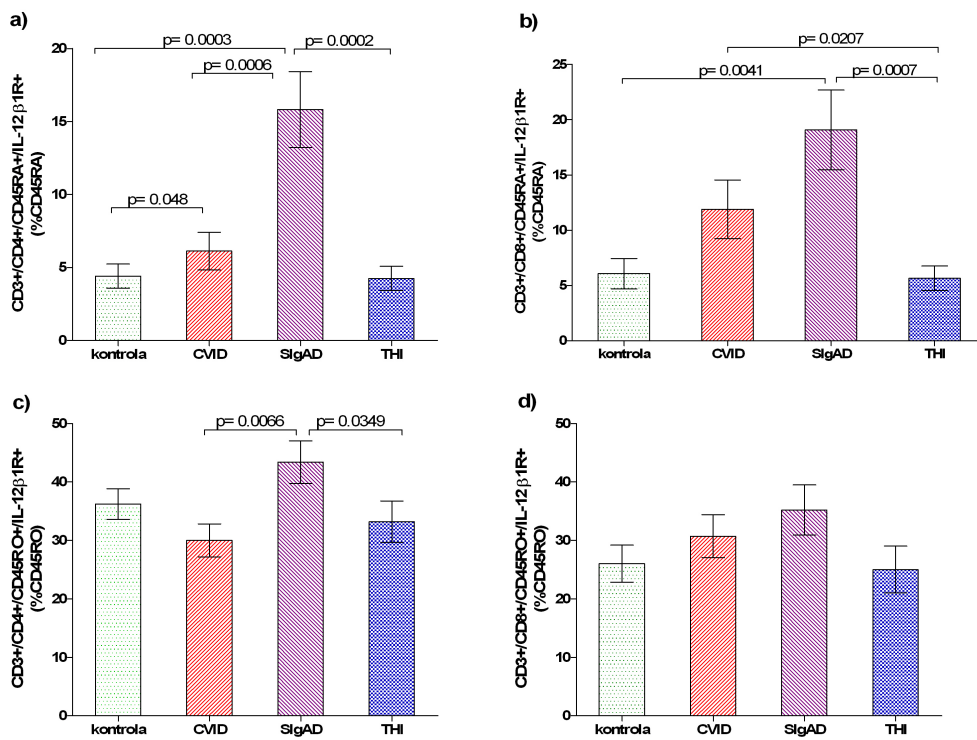
Badania immunofenotypowe limfocytów T wykazały, że ekspresja receptorów dla IL-18 na limfocytach T nie jest zależny od wieku.

Ekspresja IL-18R na limfocytach CD4⁺ dziewiczych

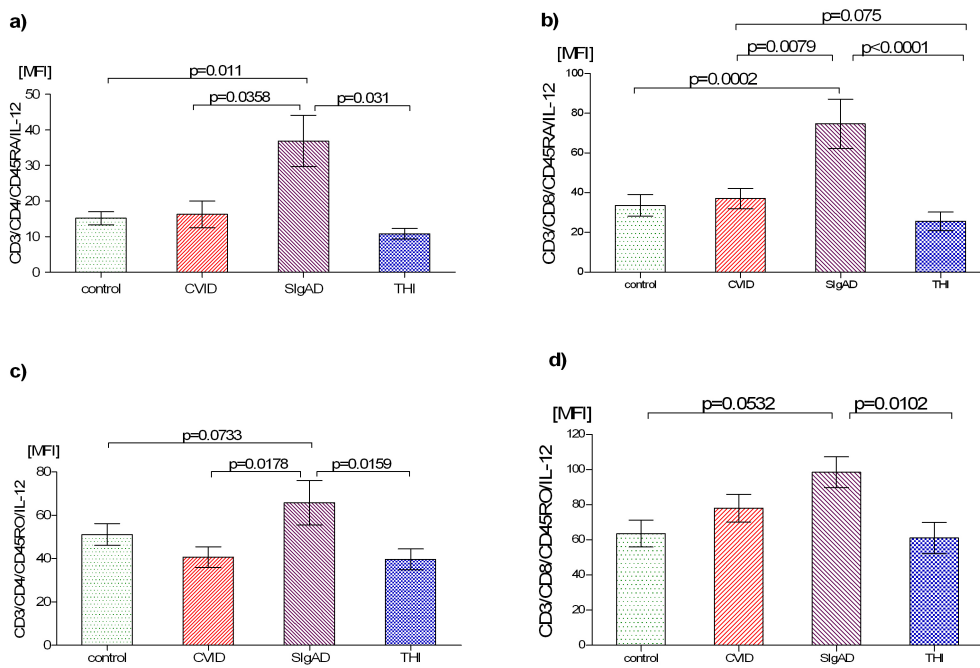
W grupie dzieci z CVID, w stosunku do kontroli, nie wykazano różnicy w odsetku limfocytów CD4⁺ dziewiczych wykazujących ekspresję receptora dla IL-18 (Fig.31a), ani w stopieniu ekspresji tego receptora (Fig.32a). Jednak u dorosłych pacjentów z CVID wykazano statystycznie znamienne wzrost odsetka komórek IL-18R⁺ ($p = 0,0291$), a poziom ekspresji tego receptora był tylko nieznacznie wyższy niż w kontroli.

W grupie dzieci z SIgAD, w porównaniu z grupą kontrolną, wykazano nieznacznie wyższy odsetek limfocytów CD4⁺ dziewiczych wykazujących ekspresję receptora dla IL-18 (Fig.31a), jednak poziom ekspresji IL-18R na tej subpopulacji komórek był porównywalny z kontrolą (Fig.32a). W porównaniu z grupą CVID i THI odsetek komórek IL-18R dodatnich był jedynie nieznacznie wyższy w SIgAD, a poziom ekspresji IL-18R był porównywalny we wszystkich grupach.

Rysunek 29: Odsetek poszczególnych subpopulacji limfocytów T wykazujących ekspresję receptorów dla IL-12 u dzieci z CVID, SigAD oraz THI



Rysunek 30: Poziom ekspresji IL-12 na poszczególnych subpopulacjach limfocytów T u dzieci z CVID, SIgAD oraz THI



W grupie dzieci z THI odsetek limfocytów CD4⁺ dziewiczych wykazujących ekspresję receptora dla IL-18 był zbliżony do kontroli (Fig.31a). Stopień ekspresji tego receptora był również porównywalny do grupy kontrolnej (Fig.32a).

Ekspresja IL-18R na limfocytach CD8⁺ dziewiczych

W grupie dzieci z CVID, w stosunku do kontroli, nie wykazano różnicy w odsetku limfocytów CD8⁺ dziewiczych wykazujących ekspresję receptora dla IL-18 (Fig.31b), ani w stopniu ekspresji tego receptora (Fig.32b). Zbliżone wyniki uzyskano u dorosłych pacjentów z CVID.

W grupie dzieci z SIgAD, w porównaniu z grupą kontrolną, wykazano nieznacznie wyższy odsetek limfocytów CD8⁺ dziewiczych wykazujących ekspresję receptora dla IL-18 (Fig.31b), jednak poziom ekspresji IL-18R na tej subpopulacji komórek był porównywalny w kontrolą (Fig.32b). W porównaniu z grupą CVID i THI odsetek komórek IL-18R dodatnich był jedynie nieznacznie wyższy w grupie z SIgAD, a poziom ekspresji IL-18R był porównywalny we wszystkich grupach.

W grupie dzieci z THI odsetek limfocytów CD8⁺ dziewiczych wykazujących ekspresję receptora dla IL-18 był zbliżony do kontroli (Fig.31b). Stopień ekspresji tego receptora był również porównywalny do grupy kontrolnej (Fig.32b).

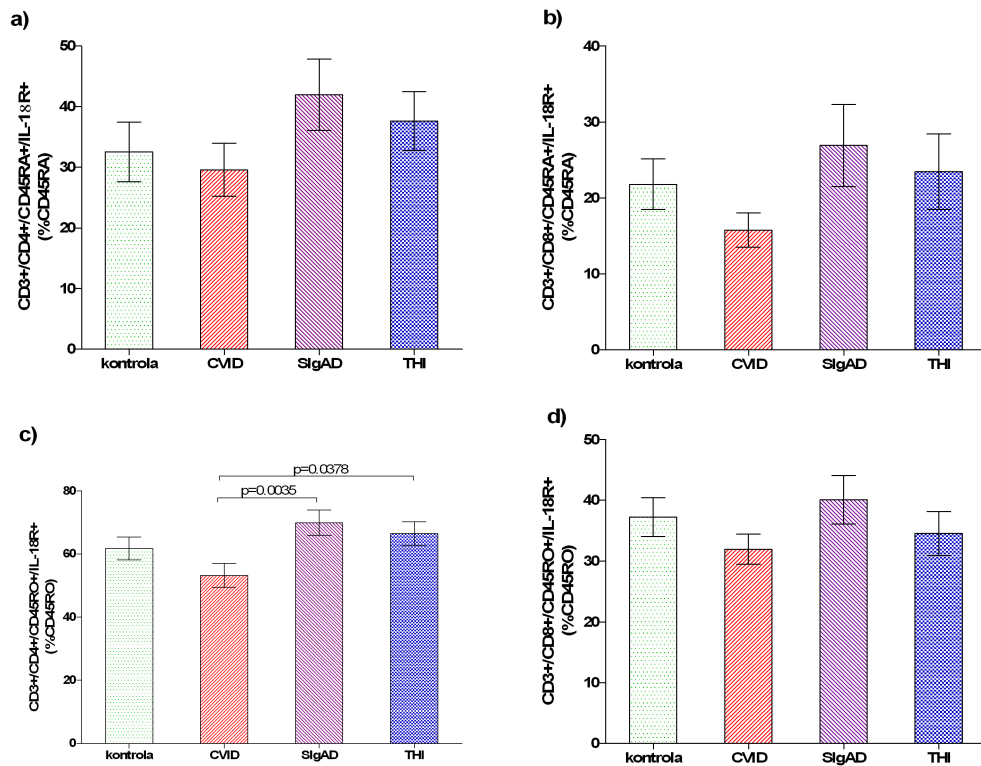
Ekspresja IL-18R na limfocytach CD4⁺ pamięci

W grupie dzieci z CVID, w stosunku do kontroli, nie wykazano różnicy w odsetku limfocytów CD4⁺ pamięci wykazujących ekspresję receptora dla IL-18 (Fig.31c), ani w stopniu ekspresji tego receptora (Fig.32c). U dorosłych pacjentów z CVID wykazano nieznaczny wzrost odsetka komórek IL-18R⁺ ($p > 0,05$), a poziom ekspresji tego receptora był porównywalny z kontrolą

W grupie dzieci z SIgAD, w porównaniu z grupą kontrolną, wykazano nieznacznie wyższy odsetek limfocytów CD4⁺ dziewiczych wykazujących ekspresję receptora dla IL-18 (Fig.31c), jednak poziom ekspresji IL-18R na tej subpopulacji komórek był porównywalny z kontrolą (Fig.32c). W SIgAD, porównaniu z grupą CVID, zarówno odsetek komórek IL-18R dodatnich był statystycznie znamienne wyższy ($p = 0,0035$), jak i poziom ekspresji IL-18R ($p = 0,0357$). W porównaniu z THI, w SIgAD odsetek komórek IL-18R⁺ nie był wyższy, jednak poziom ekspresji tego receptora w SIgAD był statystycznie znamienne wyższy ($p = 0,0221$).

W grupie dzieci z THI odsetek limfocytów CD4⁺ pamięci wykazujących ekspresję receptora dla IL-18 był zbliżony do kontroli (Fig.31c). Stopień ekspresji tego receptora był również porównywalny do grupy kontrolnej (Fig.32c).

Rysunek 31: Odsetek poszczególnych subpopulacji limfocytów T wykazujących ekspresję receptorów dla IL-18 u dzieci z CVID, SIgAD oraz THI



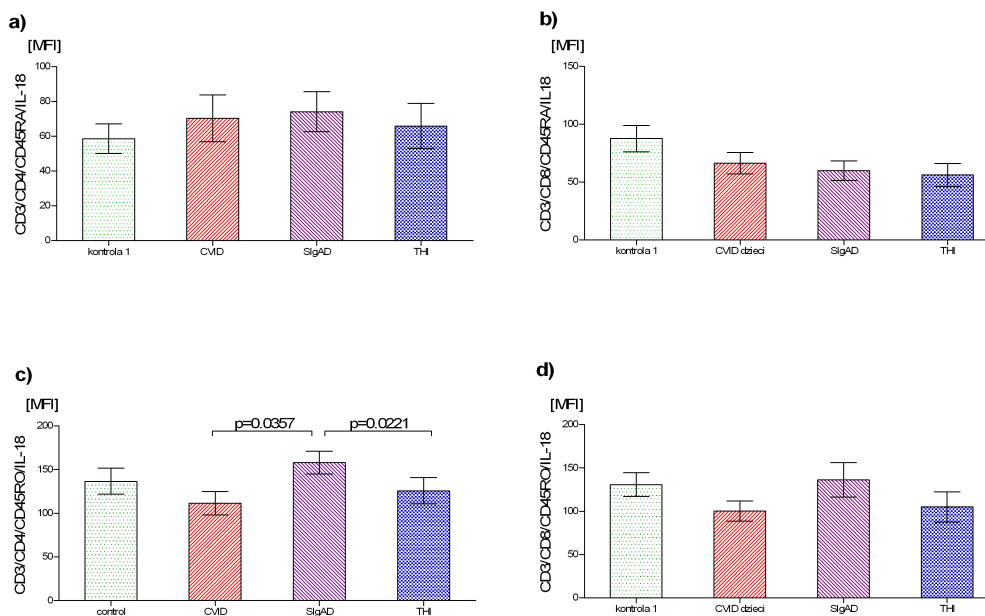
Ekspresja IL-18R na limfocytach CD8⁺ pamięci

Zarówno odsetek limfocytów CD8⁺ pamięci wykazujących ekspresję receptora dla IL-18 (Fig.31d), jak i stopień ekspresji tego receptora był porównywalny pomiędzy wszystkimi badanymi grupami dzieci (Fig.32d), jak również pomiędzy grupami dorosłych.

4.3 ANALIZA SEKWENCJI GENU *TNFRSF13B*

Badanie sekwencji części kodujących genu *TNFRSF13B* przeprowadzono u 21 dzieci z CVID, 20 dzieci z SIgAD, 15 dzieci z THI oraz u 10 dorosłych pacjentów z CVID i u 15 osób z grupy kontrolnej. W celu zbadania sekwencji genu kodującego receptor TACI w pierwszym etapie przeprowadzono amplifikację wszystkich pięciu egzonów genu *TNFRSF13B* za pomocą reakcji PCR. Wielkość produktów reakcji PCR oceniano wykonując elektroforezę w żelu agarozowym w obecności bromku etydyny (BrEt). Obecność prążka w odpowiednim miejscu w żelu świadczyła o uzyskaniu prawidłowego produktu reakcji (Fig.33). Natomiast wyniki elek-

Rysunek 32: Poziom ekspresji IL-18 na poszczególnych subpopulacjach limfocytów T u dzieci z CVID, SigAD oraz TH1



troforezy kapilarnej produktów sekwencyjnego PCR przedstawiano w postaci chromatogramu, z którego odczytywano sekwencję analizowanego fragmentu DNA (Fig.34).

4.3.1 Polimorfizmy genu *TNFRSF13B*

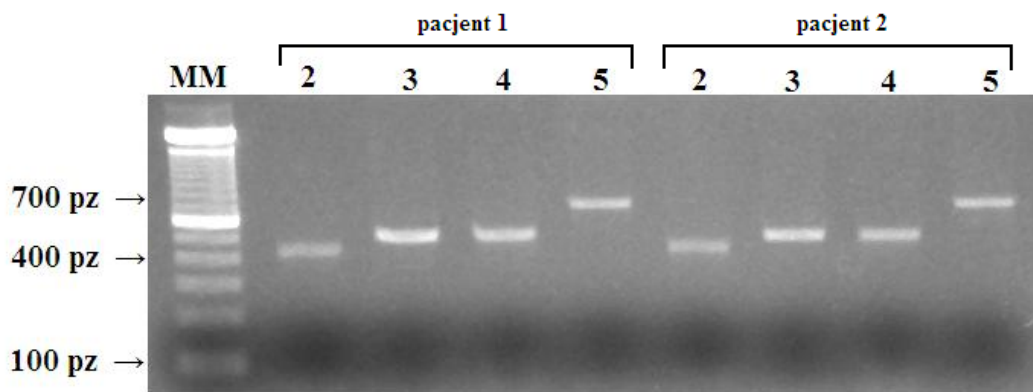
Badania przeprowadzone w obrębie genu *TNFRSF13B* wykazały obecność wszystkich opisanych polimorfizmów: T27T, P97P, V220A, P251L oraz S277S. Obecność tych polimorfizmów wykazano zarówno w grupach badanych jak i w grupie kontrolnej.

Polimorfizm T27T (81 G → A)

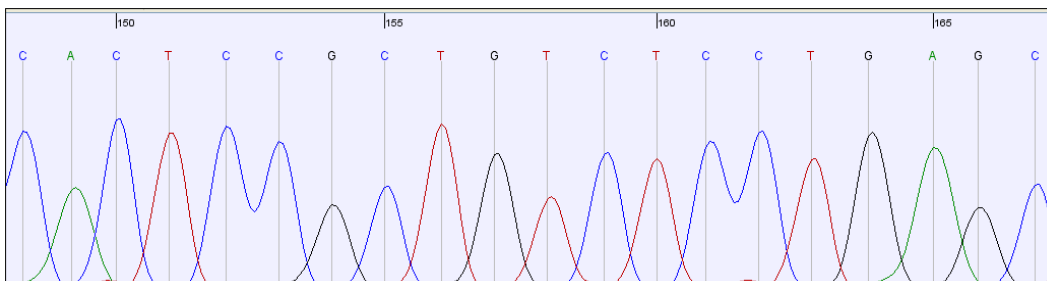
Zamiana guaniny (G) na adeninę (A) w miejscu 81 w egzonie 2 genu *TNFRSF13B* była najczęściej występującym polimorfizmem. Obecność polimorfizmu T27T w miejscu 81 stwierdzono w formie homo- bądź heterozygoty u ponad 90% pacjentów oraz u osób z grupy kontrolnej. Zamiana nukleotydu G na A w miejscu 81 sekwencji nukleotydowej nie powoduje zamiany aminokwasu w łańcuchu aminokwasowym, ponieważ kodon zawierający guaninę (ACG) jak i polimorficzny kodon zawierający adeninę (ACA) kodują treoninę.

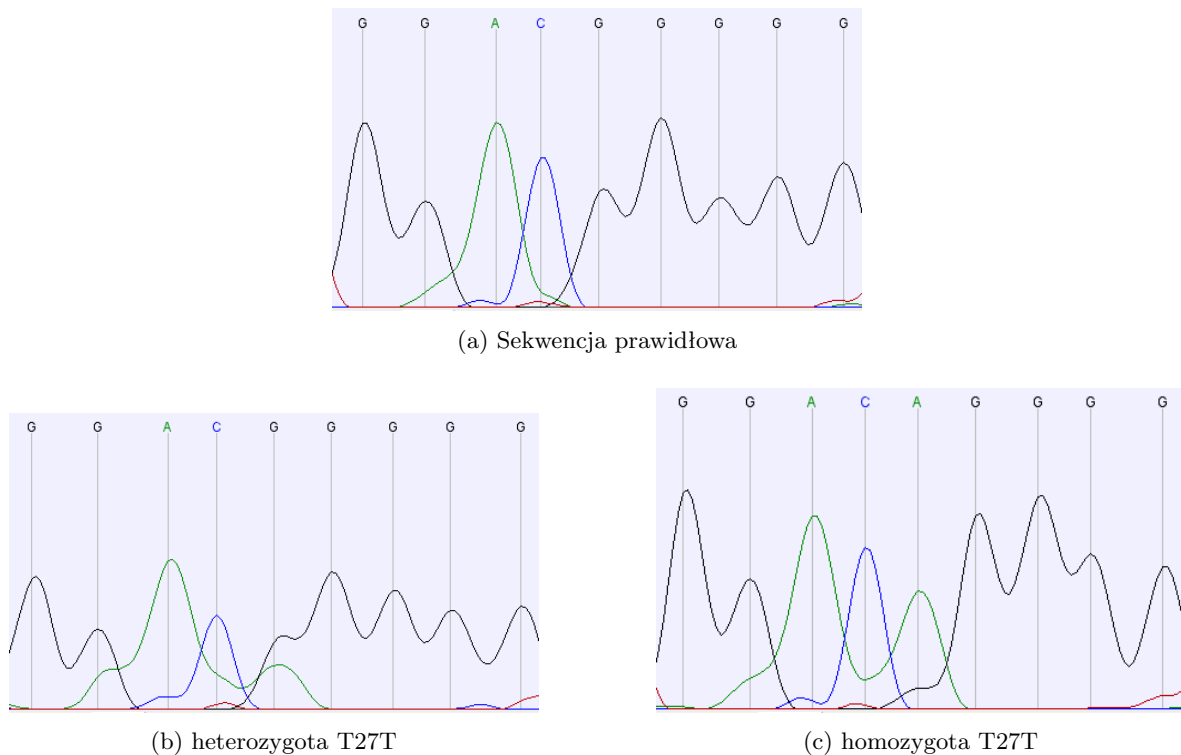
W grupie dzieci z CVID polimorfizm T27T w formie homozygoty stwierdzono u 16 dzieci, a w formie heterozygoty u 4 dzieci (jedno dziecko nie miało polimorfizmu T27T). W grupie

Rysunek 33: Elektroforeza produktów reakcji PCR pięciu egzonów genu *TNFRSF13B* jednego z pacjentów. MM – marker masowy, 1-5 – numery kolejnych egzonów.



Rysunek 34: Fragment chromatogramu 3 egzonu jednego z pacjentów.

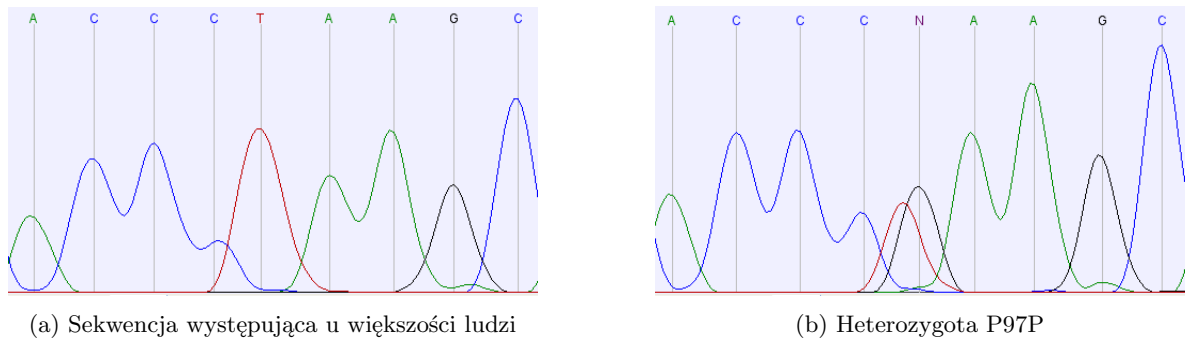




Rysunek 35: Polimorfizm T27T.

dzieci z izolowanym niedoborem IgA 11 pacjentów było homozygotami pod względem tego polimorfizmu, natomiast 9 dzieci było heterozygotami. W grupie dzieci z THI polimorfizm T27T w postaci homozygoty stwierdzano u 9 dzieci, natomiast w postaci heterozygoty u 5 dzieci (jedno dziecko nie miało polimorfizmu T27T). W grupie dorosłych z CVID polimorfizm T27T występował w formie homozygotycznej u 8 pacjentów, natomiast w postaci heterozygoty u 2 osób. W grupie kontrolnej 9 osób było homozygotami pod względem tego polimorfizmu, 4 osoby było heterozygotami, natomiast jedna nie posiadała tego polimorfizmu.

Analiza wyników u spokrewnionych chorych w grupie dzieci z CVID wykazała, że u rodzeństwa jeden z braci był homozygotą a drugi heterozygotą pod względem polimorfizmu T27T (Fig.35). W grupie z SIgAD analiza polimorfizmu T27T u spokrewnionych chorych wykazała, że w przypadku dwóch siostr polimorfizm występował w postaci heterozygoty, natomiast u obu braci z SIgAD w postaci homozygoty. Analiza polimorfizmu T27T w przypadkach rodzinnego występowania SIgAD i CVID wykazała, że córka z SIgAD oraz matka z CVID są homozygotami pod względem polimorfizmu.



Rysunek 36: Polimorfizm P97P.

Polimorfizm P97P (291 T → G)

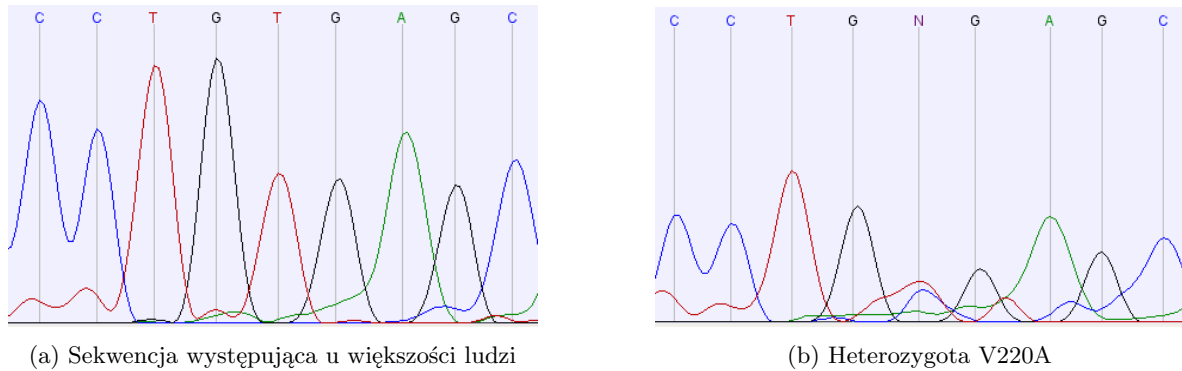
Zamiana tyminy (T) na guaninę (G) w miejscu 291 w egzonie 3 genu *TNFRSF13B* (polimorfizm P97P) nie powoduje zamiany aminokwasu w łańcuchu aminokwasowym, ponieważ zarówno kodon zawierający tyminę (CCT) jak i polimorficzny kodon zawierający guaninę (CCG) kodują prolinę. Obecność polimorfizmu P97P (formie homo- bądź heterozygoty) stwierdzano stosunkowo rzadko (około 5% dzieci z CVID oraz 7% dzieci z THI). Polimorfizm P97P został znaleziony u jednego dziecka z CVID oraz jednego dziecka z THI. Na rysunku 36 przedstawiono sekwencję bez polimorfizmu oraz sekwencję z polimorfizmem P97P u pacjenta z THI. żadne z dzieci z SIgAD oraz THI, ani w grupie kontrolnej nie posiadały tego polimorfizmu.

Polimorfizm V220A (659 T → C)

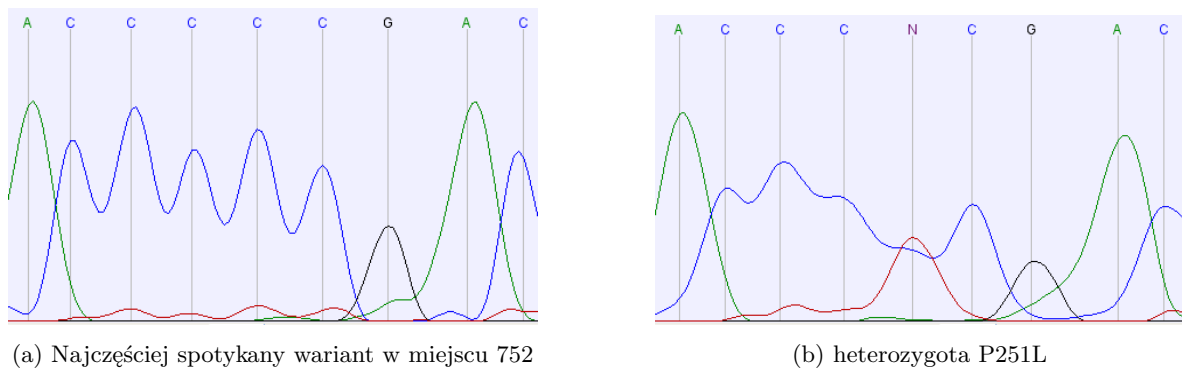
Zamiana tyminy (T) na cytozynę (C) w miejscu 659 w egzonie 4 genu *TNFRSF13B* (polimorfizm V220A) powoduje zamianę aminokwasu w łańcuchu aminokwasowym; kodon zawierający uracyl (GUG) koduje walinę, a polimorficzny kodon zawierający cytozynę (GCG) kodują alaninę. Obecność polimorfizmu V220A (formie homo- bądź heterozygoty) stwierdzano stosunkowo rzadko (5% dzieci z SIgAD, 7% dzieci z THI, 7% osób z grupy kontrolnej). Polimorfizm V220A został znaleziony u jednego dziecka z SIgAD, jednego z THI i jednej osoby z grupy kontrolnej. Na rysunku 37 przedstawiono sekwencję DNA genomowego bez polimorfizmu oraz sekwencję z polimorfizmem V220A u pacjenta z THI.

Polimorfizm P251L (752 C → T)

Zamiana cytozyny (C) na tyminę (T) w miejscu 752 w egzonie 5 genu *TNFRSF13B* (polimorfizm P251L)) powoduje zamianę aminokwasu w łańcuchu aminokwasowym, ponieważ kodon zawierający cytozynę (CCC) koduje prolinę, a polimorficzny kodon zawierający uracyl (CUC) kodują leucynę. Obecność polimorfizmu P251L (formie homo- bądź heterozygoty)



Rysunek 37: Polimorfizm V220A.



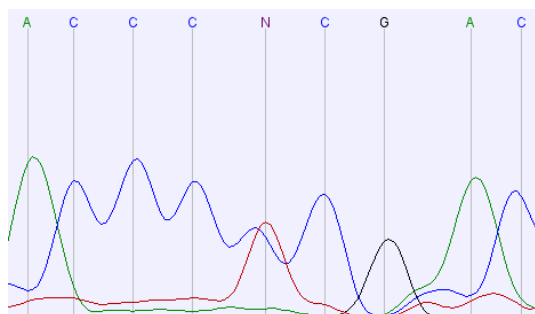
Rysunek 38: Polimorfizm P251L.

stwierdzono u 9% dzieci z CVID, 5% dzieci z SIgAD, 13% dzieci z THI, 20% dorosłych z CVID natomiast u żadnej osoby z grupy kontrolnej. W grupie dzieci z CVID polimorfizm P251L w formie homozygoty stwierdzono u 1 dziecka, a w formie heterozygoty również u 1 dziecka. W grupie dzieci z izolowanym niedoborem IgA jeden pacjent był heterozygotą pod względem tego polimorfizmu. W grupie dzieci z THI polimorfizm P251L w postaci homozygoty stwierdzano u jednego dziecka, natomiast w postaci heterozygoty również u jednego dziecka. W grupie dorosłych z CVID polimorfizm P251L występował w formie heterozygoty u 2 osób. W grupie kontrolnej żadna z osób nie miała tego polimorfizmu (Fig. 38).

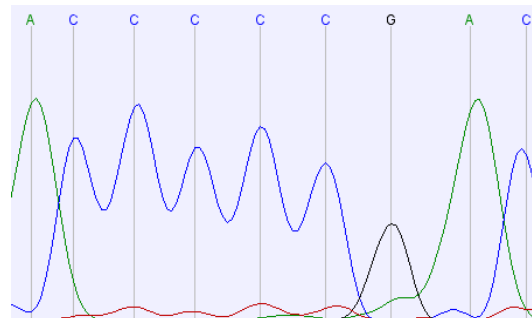
Polimorfizm występował u jednego dziecka z CVID, którego siostra nie posiadała tego polimorfizmu (rys. 39). Wszystkie przypadki polimorfizmu P251L to heterozygoty.

Polimorfizm S277S (831 T → C)

Zamiana tyminy (T) na cytozynę (C) w miejscu 831 w egzonie 5 genu *TNFRSF13B* była drugim, co do częstości polimorfizm wykrywany w badanych grupach. Zamiana nukleotydu T

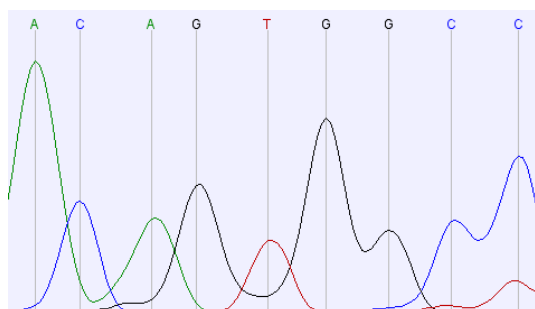


(a) Pacjentka z CVID – heterozygota P251L

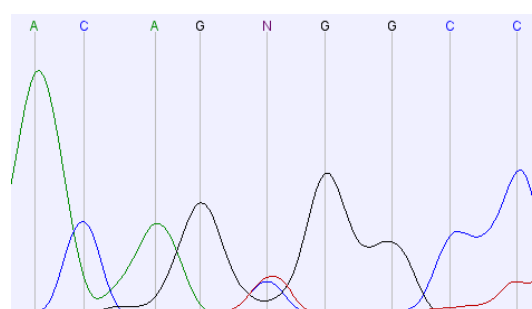


(b) Pacjentka z CVID – brak polimorfizmu

Rysunek 39: Polimorfizm P251L u rodzeństwa z CVID.



(a) Najczęściej spotykany wariant w miejscu 831

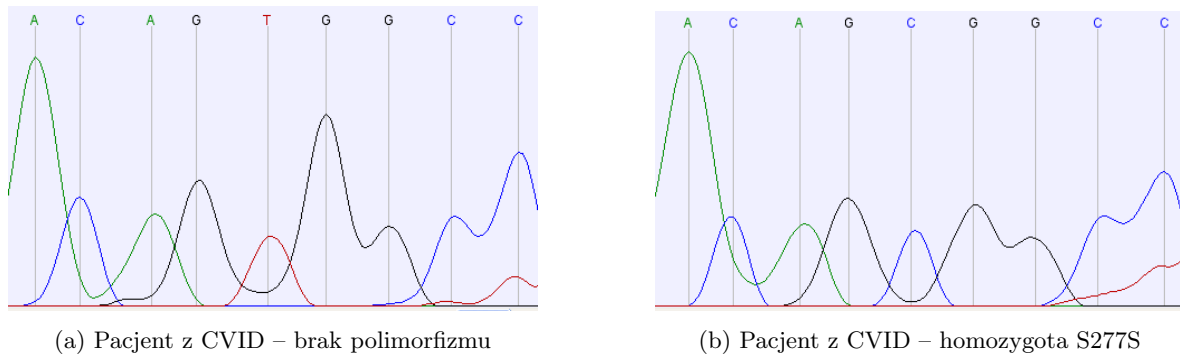


(b) Heterozygota S277S

Rysunek 40: Polimorfizm S277S

na C w miejscu 831 sekwencji nukleotydowej nie powoduje zamiany aminokwasu w łańcuchu aminokwasowym, ponieważ zarówno kodon zawierający uracyl (AUG) jak i polimorficzny kodon zawierający cytozynę (ACG) kodują serynę. Obecność polimorfizmu S277S w miejscu 81 stwierdzono w formie homo- bądź heterozygoty u 15% dzieci z CVID, 35% dzieci z SIgAD, 20% dzieci z THI, 30% dorosłych z CVID oraz 20% osób z grupy kontrolnej. Większość osób, u których wykryto polimorfizm S277S były heterozygotami.

U 18 dzieci z CVID wykazano najczęściej spotykany opisywany wariant (tymina w miejscu 831), natomiast polimorfizm S277S zaobserwowano u 3 dzieci z CVID. W grupie dzieci z SIgAD polimorfizm S277S był obecny u 7 dzieci. W grupie dzieci z THI polimorfizm S277S występował u 3% dzieci. W grupie kontrolnej u 3 osób stwierdzano polimorfizm S277S (Fig.40). W grupie dorosłych pacjentów z CVID, u 3 pacjentów występowała guanina w miejscu 831, natomiast u 7 dorosłych z CVID wykazano polimorfizm S277S. Polimorfizmu S277S występował u jednego z braci chorych na CVID, natomiast drugi brat nie posiadał tego polimorfizmu (Fig.41).



Rysunek 41: Polimorfizm S277S u braci z CVID.

4.3.2 Mutacje w genie *TNFRSF13B*

Przeprowadzone badania w obrębie genu *TNFRSF13B* wykazały obecność następujące mutacji: C104R oraz A181E. Obecność tych mutacji stwierdzono jedynie u trójki pacjentów (z SIgAD, z THI oraz z niejasną formą hipogammaglobulinemii), natomiast u żadnej z osób z grupy kontrolnej ich nie wykryto.

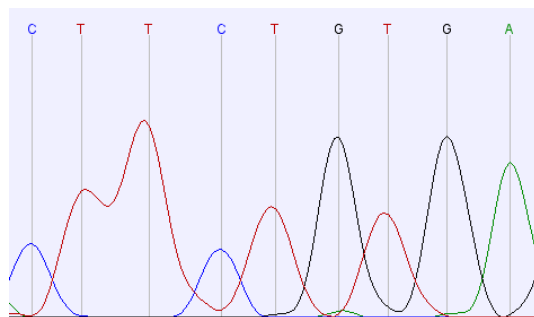
Mutacja C104R (310 T → C)

Zamiana tyminy (T) na cytozynę (C) w miejscu 310 w egzonie 3 genu *TNFRSF13B* powoduje zmianę aminokwasu w łańcuchu aminokwasowym z cysteina na arginę. Obecność mutacji C104R stwierdzono w formie heterozygoty u dwójki pacjentów (Fig.42). Jeden z pacjentów, 15 letni chłopiec, miał niedobór SIgAD, natomiast druga pacjentka, 4 letnia dziewczynka, została zakwalifikowana do grupy THI. Przed zakończeniem badań poziomy immunoglobulin w surowicy tej pacjentki znormalizowały się.

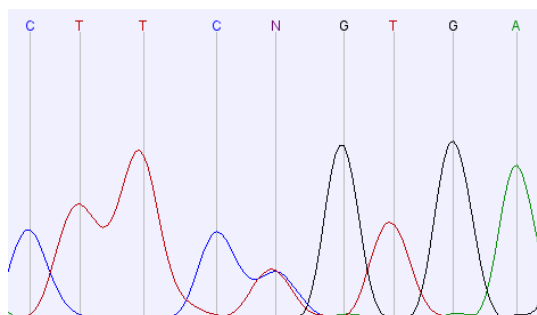
Mutacja A181E (542 C → A)

Zamiana cytozyny (C) na adenozyne (A) w miejscu 542 w egzonie 4 genu *TNFRSF13B* powoduje zmianę aminokwasu w łańcuchu aminokwasowym z alaniny na glutaminę. Obecność mutacji A181E stwierdzono w formie heterozygoty u jednego pacjenta – dwu letniego chłopca (Fig.43). U tego pacjenta w wyjściowych badaniach stwierdzono niskie poziomy zarówno IgG jak i IgA, w kolejnych badaniach kontrolnych poziom IgG znormalizował się, natomiast poziom IgA pozostaje nadal niski.

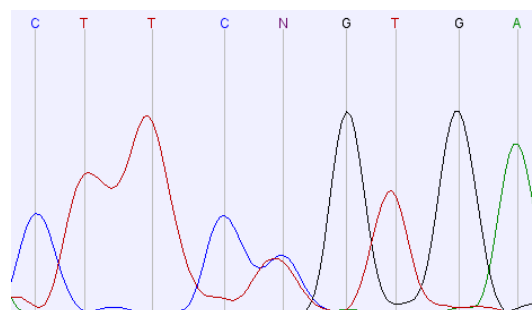
Reasumując, w badanych grupach pacjentów jak i grupie kontrolnej stwierdzono występowanie wszystkich z pięciu polimorficznych wariantów genu kodującego receptor TAC1 (T27T, P97P, P251L, V220A oraz S277S). Polimorfizmy P97P, P251L, V220A oraz S277S występowały u pacjentów i w kontroli z częstością porównywalną, do opisywanej w literaturze.



(a) Sekwencja prawidłowa

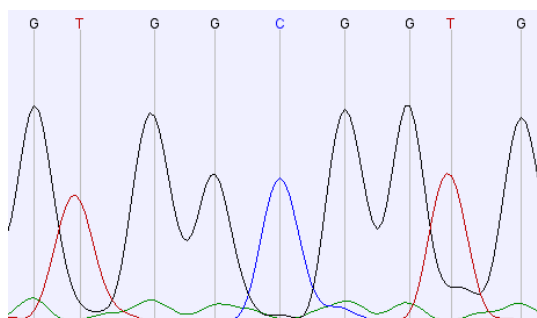


(b) Mutacja C104R u chłopca z SIgAD

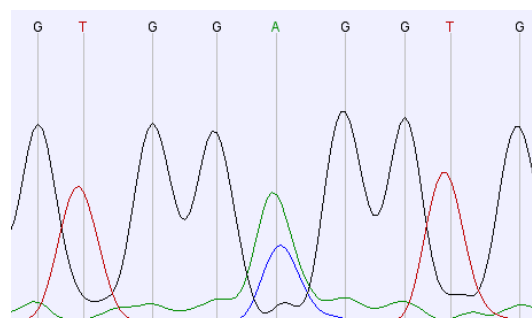


(c) Mutacja C104R u chłopca z THI

Rysunek 42: Mutacja C104R u dziecka z SIgAD oraz z THI



(a) Sekwencja prawidłowa



(b) Mutacja A181A

Rysunek 43: Mutacja A181E u pacjenta z wciąż niejasną formą hipogammaglobulinemii

Natomiast polimorfizm T27T w postaci homo- bądź heterozygotycznej stwierdzono w ponad **90%** badanych przypadków z jednakową częstością w grupach pacjentów jak i w grupie kontrolnej. Wyniki zasadniczo odbiegają od danych w literaturze, które podają częstość tego polimorfizmu na poziomie około **40%**. Znaczenie wykrytych mutacji u dzieci z SIgAD i THI wymaga dalszych obserwacji celem stwierdzenia czy obecność mutacji u tych pacjentów może predysponować do rozwinięcia CVID w późniejszym wieku.

5 OMÓWIENIE WYNIKÓW I DyskusJA

Badane zespoły niedoborów odporności

Niektóre formy hipogammaglobulinemii u dzieci takie jak: pospolity zmienny niedobór odporności (CVID), selektywny niedobór IgA (SIgAD), czy przejściowa hipogammaglobulinemia wieku dziecięcego (THI), charakteryzują się obecnością limfocytów B we krwi obwodowej, a ich patomechanizm nie został do końca poznany.

CVID jest stosunkowo częstym, niezwykle heterogennym zespołem niedoboru odporności humoralnej, którego patomechanizm pozostaje niejasny. U około 10-20% przypadków, sklasyfikowanych wcześniej jako CVID, zidentyfikowano defekty genetyczne w obrębie TACI, CD19, BAFF-R lub ICOS i według najnowszej klasyfikacji zostały one wyłączone z grupy CVID [104], a pozostały w niej jedynie przypadki hipogammaglobulinemii o wciąż nieustalonej etiologii. Niedobór ten najczęściej ujawnia się w trzeciej dekadzie życia, ale pierwszy szczyt zachorowań obserwuje się między 5 a 10 rokiem życia. Częstość zachorowań między 1 a 5 rokiem życia jest przedmiotem wielu kontrowersji (niektórzy właśnie ten przedział wiekowy podają za pierwszy szczyt częstości zachorowań) z uwagi na trudności diagnostyczne w różnicowaniu z innymi formami hipogammaglobulinemii występującymi w tym wieku.

Selektywny niedobór IgA (SIgAD) jest najczęstszym niedoborem odporności humoralnej. Patomechanizm upośledzonej produkcji IgA pozostaje wciąż niejasny. W 20-25% stwierdza się rodzinne występowanie CVID i selektywnego niedoboru IgA [61, 84, 144] oraz przypadki rozwoju CVID z niedoboru IgA [41, 61]. Nie ma jak dotąd kryteriów diagnostycznych, umożliwiających wskazanie pacjentów z SIgAD, u których ryzyko przejścia tego niedoboru w postać CVID jest zwiększone.

Kolejnym niedoborem odporności wieku wczesnodziecięcego jest przejściowa hipogammaglobulinemia wieku dziecięcego (THI). Częstość występowania THI ciągle pozostaje przedmiotem kontrowersji, a różne ośrodki podają różne dane [39, 59, 63, 140, 146]. THI charakteryzuje się opóźnieniem w rozpoczęciu syntezy immunoglobulin poza okres fizjologicznej hipogammaglobulinemii [94], a następnie normalizacją ich poziomu między drugim a piątym rokiem życia [18]. Przyczyny opóźnionej syntezy immunoglobulin w THI oraz mechanizm samoistnej normalizacji ich poziomu pozostają nieznane. Do chwili obecnej u pacjentów z THI nie zostały opisane żadne defekty genetyczne.

U dzieci z hipogammaglobulinemią pomiędzy 1 a 5 rokiem życia największe problemy sprawia diagnostyka różnicowa CVID z THI. Pełnoobjawowa forma THI może cechować się podobnym obrazem klinicznym oraz podobnym typem zmian parametrów immunologicznych jak CVID. Kryteria diagnostyczne tych zespołów chorobowych są niejednoznaczne. Kryterium

diagnostyczne CVID, za jakie uważano upośledzoną produkcję specyficznych przeciwciał po szczepieniach, jest ostatnio kwestionowane bowiem u części pacjentów z CVID stwierdzono prawidłową reakcję na szczepienia – zatem prawidłowa synteza swoistych przeciwciał nie wyklucza rozpoznania CVID [54, 120]. Z drugiej strony, upośledzona produkcja specyficznych przeciwciał nie wyklucza rozpoznania przejściowej hipogammaglobulinemii, ponieważ u części dzieci z THI synteza swoistych przeciwciał po szczepieniach jest upośledzona [38, 155]. W praktyce, w wielu przypadkach prawidłowa diagnoza możliwa jest dopiero retrospektywnie po długotrwałej obserwacji i wielokrotnych badaniach immunologicznych. THI jest rozpoznawane po stwierdzeniu normalizacji poziomu immunoglobulin, natomiast utrzymywanie się niskich poziomów immunoglobulin powyżej 4-5 roku życia przemawia za rozpoznaniem CVID. U dzieci z THI poziom IgG zwykle normalizuje się wcześniej niż IgA, i u części dzieci z THI można obserwować długo utrzymujące się niskie poziomy IgA przy prawidłowych poziomach pozostałych typów immunoglobulin [94], co może sprawiać kolejne problemy w różnicowaniu tego niedoboru z zespołem obniżonego poziomu IgA.

Opisane powyżej trudności w diagnostyce różnicowej omawianych form hipogammaglobulinemii są jedną z wielu przyczyn opóźnień w postawieniu właściwego rozpoznania i wdrożenia odpowiedniego leczenia. Według danych z Wielkiej Brytanii opóźnienie w rozpoznaniu CVID wynosi u dzieci około 3 lat [53], u dorosłych około 6 lat, a według innych danych nawet 10 lat. Brak właściwego rozpoznania i w konsekwencji niepodjęcie odpowiedniego leczenia może prowadzić do ciężkich, zagrażających życiu zakażeń, nieodwracalnych zmian narządowych a nawet inwalidztwa. Wczesne rozpoznanie i wdrożenie odpowiedniego leczenia pozwala natomiast zapobiec wielu powikłaniom.

Patogenezie CVID poświęcono wiele badań, jednak znakomita większość dotyczy osób dorosłych. Do najczęściej opisywanych zmian u dorosłych pacjentów z CVID należą zaburzenia funkcjonalne lub/i ilościowe w obrębie subpopulacji krążących limfocytów B [11, 30, 35, 71, 83, 115] oraz nieprawidłowa polaryzacja równowagi Th1/Th2 w kierunku Th1 [17, 80, 90, 93, 95, 105]. Z defektów genetycznych najczęściej opisywano mutację w genie kodującym receptor TACI [27, 116], jednak ostatnio pacjentów z tym defektem wyłączono z grupy CVID [104]. Ilość doniesień opisujących zmiany w zakresie powyższych parametrów w niedoborach odporności humoralnej u dzieci jest znacznie ograniczona, a w szczególności dotyczy to THI.

Przedmiotem niniejszej pracy było zbadanie oraz ustalenie znaczenia diagnostycznego i prognostycznego wybranych parametrów immunologicznych u dzieci z CVID, SIgAD oraz THI, które mogłyby pomóc w różnicowaniu i rokowaniu różnych form hipogammaglobulinemii przebiegających z obecnością limfocytów B we krwi obwodowej.

Subpopulacje limfocytów B

Z defektów w obrębie krążących subpopulacji limfocytów B (zaburzeń funkcjonalnych lub/i ilościowych), opisywanych u dorosłych pacjentów z COVID [11, 30, 35, 71, 83, 115], w pracy tej wybrano oznaczanie poziomu poszczególnych subpopulacji obwodowych limfocytów B, ponieważ testy *in vitro*, wskazujące na defekty funkcjonalne limfocytów B, związane są z trudnościami w standaryzacji procedur oraz brakiem znaczenia klinicznego [12, 115]. Analizie poddano następujące subpopulacje limfocytów B: dojrzałe, dziewicze limfocyty B ($CD19^+/CD27^-/IgD^+/IgM^+$); limfocyty B pamięci ($CD19^+/CD27^+$) oraz ich subpopulacje – “class-switched” limfocyty B pamięci ($CD19^+/CD27^+/IgD^-/IgM^-$) i krążące limfocyty B strefy brzeżnej ($CD19^+/CD27^+/IgD^+/IgM^+$); oraz limfocyty B $CD19^+/CD21^{low}$. W momencie rozpoczęcia niniejszych badań brak było danych na temat znaczenia klinicznego poziomu pozostałych dwóch subpopulacji krążących limfocytów B (przejściowych limfocytów B oraz tzw. “class-switched plasmablasts”) [108, 147], stąd, w pracy tej, nie poddano analizie tych dwóch subpopulacji.

Poziomy subpopulacji krążących limfocytów B są podstawą najczęściej stosowanych klasyfikacji COVID u dorosłych pacjentów: klasyfikacji “Freiburg” według Warnatza i wsp. [147], klasyfikacji Paryskiej, opracowanej przez Piqueras i wsp. [108] oraz klasyfikacji EUROclass [151]. Wszystkie te klasyfikacje jako główne kryterium podziału zastosowały poziom “class-switched” limfocytów B pamięci, ponieważ opisano, że u większości pacjentów z COVID zaburzone jest końcowe różnicowanie limfocytów B [1]. Powyższe klasyfikacje opierają się o wartości uzyskiwane u osób dorosłych. Należy jednak podkreślić, iż poziom krążących subpopulacji limfocytów B jest parametrem zależnym od wieku. We krwi pępowinowej nie ma komórek B pamięci, około pierwszego roku życia ich poziom powoli się podnosi i około drugiego roku życia osiąga 10-20% limfocytów B. U dorosłych komórki te stanowią około 30-60% wszystkich limfocytów B, z czego połowę stanowią “class-switched” limfocyty B pamięci [82]. Zatem, z powodu zależności poziomu poszczególnych subpopulacji limfocytów B od wieku, powyższe klasyfikacje mają ograniczone zastosowanie u dzieci. Dotychczas ukazała się tylko jedna praca (w roku 2009) [67] poświęcona poziomom subpopulacji limfocytów B pamięci u zdrowych dzieci [67]. Zarówno w cytowanej pracy [67] jak i w niniejszym opracowaniu, wykazano znaczne różnice w poziomie subpopulacji limfocytów B u zdrowych dzieci w porównaniu do norm opracowanych dla zdrowych dorosłych. W niniejszej pracy wykazano bowiem, że poziom “class-switched” limfocytów B pamięci u niektórych zdrowych dzieci poniżej 10-tego roku życia jest niższy od wartości prawidłowych ustalonych dla zdrowych dorosłych i wynosi poniżej 6.5% limfocytów B (dolna granica normy według klasyfikacji EUROClass), czy poniżej 0.4% wszystkich limfocytów (dolna granica normy według klasyfikacji “Freiburg”) (podobne

wyniki uzyskał również Huck i wsp. [67]). Natomiast poziom limfocytów B CD21^{low} u zdrowych dzieci jest znacznie wyższy niż u zdrowych dorosłych. Potwierdza to sugestię, że wyniki uzyskiwane u dzieci z hipogammaglobulinemią muszą być porównywane z odpowiednio dobraną wiekowo grupą kontrolną, a jak dotąd ukazała się tylko jedna praca, opublikowana w roku 2009 (czyli po zakończeniu badań dotyczących powyższej pracy), dotycząca zakresów wartości referencyjnych dla krążących subpopulacji limfocytów B z uwzględnieniem grup wiekowych [67]. W literaturze niewiele jest również informacji na temat krążących subpopulacji limfocytów B u dzieci z CVID (w pracy Huck i wsp w grupie dzieci z CVID jedynie jeden pacjent był poniżej piątego roku życia) i praktycznie dotąd nie ma badań obejmujących to zagadnienie w SIgAD czy THI.

Limfocyty B pamięci oraz “class-switched” limfocyty B pamięci

U około 80% dorosłych pacjentów z CVID stwierdza się obniżony poziom “class-switched” limfocytów B pamięci (CD19⁺/CD27⁺/IgD⁻/IgM⁻), co wskazuje na zaburzoną funkcję ośrodków różnicowania grudek chłonnych [151]. Huck i wsp. wykazali, że również u dzieci z CVID można obserwować obniżony poziom limfocytów B pamięci, jednak w ich opracowaniu w grupie pacjentów z CVID tylko jeden pacjent miał mniej niż pięć lat, a żaden z pacjentów nie miał wykonanych ponownych badań kontrolnych [67]. W naszych badaniach u dzieci z CVID młodszych niż 4-5 lat wyniki badań subpopulacji limfocytów B były zbliżone do danych uzyskanych w wiekowo dobranej kontroli. Jednak, w przeciwieństwie do podobnej wiekowo kontroli, u dzieci z CVID poziom limfocytów B pamięci nie wzrastał z wiekiem, i u dzieci starszych niż 5 lat stwierdzano zmiany podobne jak u dorosłych pacjentów z CVID czyli obniżony poziom limfocytów B pamięci oraz ich subpopulacji “class-switched” limfocytów B pamięci w porównaniu do kontroli. Sugeruje to zatem, że dzieci z CVID rozwijają odchylenia w zakresie subpopulacji krążących limfocytów B pamięci, zbliżone do odchylenia opisywanych u dorosłych z CVID, dopiero z wiekiem. U części młodszych dzieci z CVID, u których wyjściowo stwierdzano prawidłowy poziom subpopulacji limfocytów B pamięci, w kolejnych badaniach nie tylko nie wykazano wzrostu (co jest fizjologiczne), a wręcz spadki odsetka tych komórek. Zmiany te były prawdopodobnie związane ze wzrostem całkowitej ilości limfocytów B CD19⁺, bez jednoczesnego wzrostu subpopulacji komórek B pamięci, niż z obniżaniem się liczby bezwzględnej samych limfocytów B pamięci u tych dzieci. Nasze dane uzyskane w grupie dzieci z CVID odbiegają zatem od danych uzyskiwanych u dorosłych pacjentów z CVID. Natomiast dostępne dane literaturowe na temat dzieci z CVID [67] w pewnym stopniu zbliżone są do danych uzyskanych w niniejszej pracy, jednak nasze badania jako jedyne obejmują dzieci młodsze niż 5 lat i opisują zmiany w czasie w kolejnych badaniach w obrębie limfocytów B pamięci u danego dziecka.

W grupie pacjentów z SIgAD poziom limfocytów B pamięci był zbliżony do dobranej wiekowo grupy kontrolnej, jak również odsetek “class-switched” limfocytów B pamięci w obrębie wszystkich limfocytów B. Jednak gdy subpopulację ‘class-switched” limfocytów B przedstawiono jako odsetek jedynie limfocytów B pamięci, stwierdzono odchylenia zbliżone do tych, obserwowanych u dzieci z CVID (odsetek “class-switched” komórek B pamięci nie podnosił się z wiekiem). U dzieci z SIgAD wykazano zatem pewne odchylenia w zakresie subpopulacji limfocytów B pamięci, częściowo zbliżone do tych, obserwowanych u dzieci z CVID. Podobieństwo w zakresie tego parametru pomiędzy CVID a SIgAD stanowi kolejny dowód łączący te dwie jednostki chorobowe [60, 74, 145]. Pacjenci z SIgAD, u których stwierdzono znacznie obniżony odsetek “class-switched” limfocytów B pamięci wymagają zatem dalszych obserwacji, umożliwiających wykazanie czy defekt ten nie predysponuje do przejścia selektywnego niedoboru IgA w uogólnioną formę CVID. Jak dotąd w literaturze nie ma danych wskazujących na związek pomiędzy obniżonym odsetkiem tych komórek a zwiększonym ryzykiem rozwinięcia CVID.

U dzieci THI, w porównaniu do wiekowo dobranej grupy kontrolnej, nie wykazano żadnych odchyżeń w zakresie limfocytów B pamięci oraz ich subpopulacji “class-switched” limfocytów B w całym okresie trwania hipogammaglobulinemii. Dane te potwierdzają hipotezę, że THI jest raczej związane z nieprawidłową immunoregulacją niż z zaburzeniami w różnicowaniu poszczególnych subpopulacji limfocytów B.

Przedstawione badania i ich wyniki sugerują, że w grupie dzieci z CVID, w przeciwieństwie do THI, różnicowanie komórek B pamięci oraz ich subpopulacji “class-switched” limfocytów B jest nieprawidłowe, ponieważ u dzieci z CVID młodszych niż 5 lat poziomy tych komórek zbliżone są do poziomów obserwowanych w grupie kontrolnej, natomiast u dzieci starszych niż pięć lat obserwowano obniżenie poziomu tych komórek względem grupy kontrolnej. Huck i wsp. badał dzieci starsze niż 5 lat i wykazał jedynie, że w grupie dzieci z CVID stwierdza się obniżone poziomy subpopulacji limfocytów B pamięci [67], natomiast nie wykazał on dynamiki zmian w poziomie tych komórek w tej grupie pacjentów. Huck sugerował, że obniżony poziom limfocytów B pamięci może być pomocny w diagnozie CVID u dzieci, jednak w badanej przez niego grupie wiekowej już utrzymujące się niskie poziomy immunoglobulin potwierdzają diagnozę CVID, bez konieczności wykonania badań immunofenotypowych subpopulacji limfocytów B pamięci. Natomiast problemy diagnostyczne i terapeutyczne dotyczą dzieci młodszych niż 5 lat, u których niskie poziomy immunoglobulin stwierdza się zarówno u dzieci z CVID jak i z THI. Powyższe badania są jak dotychczas jedynym opracowaniem uwzględniającym retrospektywne analizy wyników uzyskanych u pacjentów poniżej 5 roku życia z niejasną formą hipogammaglobulinemii. Uzyskane wyniki sugerują że, utrzymywanie się w kolejnych badaniach u dzieci z hipogammaglobulinemią oraz obecnymi krążącymi lim-

focytami B, niskich poziomów limfocytów B pamięci i ich subpopulacji wskazuje raczej na CVID niż THI, co może być pomocne nie tylko w diagnostyce różnicowej, ale przede wszystkim w terapii – w podjęciu lub nie decyzji o substytucji preparatami immunoglobulinowymi.

CD21^{low} limfocyt B

W klasyfikacji “Freiburg” według Warnatza z roku 2002, pierwszej klasyfikacji uwzględniająca poziom limfocytów B CD19⁺/CD21^{low}, opisywano komórki o tym immunofenotypie jako komórki niedojrzałe. W klasyfikacji EUROClass z 2008 roku, w celu lepszego scharakteryzowania komórek wykazujących niską ekspresję antygenu CD21, uwzględniono dodatkowo ekspresję antygenu CD38, i komórki o immunofenotypie CD19⁺/CD21^{low}CD38^{low} opisano jako komórki aktywowane. Nie jest jednak do końca jasne na jakim stadium różnicowania są obecne we krwi obwodowej limfocyty B wykazujące niską ekspresję CD21. Mogą to być niedojrzałe limfocyty B, które jeszcze nie posiadają ekspresji CD21 [142], lub limfocyty B aktywowane w ośrodkach różnicowania, na których powierzchni wtórnie doszło do obniżenia ekspresji tej cząsteczki. Dodatkowo, pewne dane wskazują, że regulacja ekspresji CD21 na limfocytach B w warunkach fizjologicznych może przebiegać zupełnie inaczej niż w warunkach zaburzonej immunoregulacji [70], stąd wzrost ilości limfocytów B o niskiej ekspresji CD21 opisywany w pewnych schorzeniach (tj autoimmunizacja, pierwotne i wtórne niedobory odporności) może być wynikiem odmiennych mechanizmów [8, 97, 98, 150]. Być może obserwowany przyrost komórek CD21^{low} w zależności od stanu klinicznego pacjenta, odpowiada innej funkcji układu immunologicznego i w istocie mogą to być komórki bądź niedojrzałe u jednego pacjenta, bądź aktywowane u innego, w innym stanie klinicznym. Ponadto, w innych pracach pokazano, że molekuła CD21 może ulegać słabej ekspresji na różnych subpopulacjach limfocytów B, zarówno na komórkach naiwnych jak i pamięci, a komórki CD21^{low} nie stanowią odrębnej funkcjonalnie subpopulacji [70, 73].

Wyniki naszych badań wykazały, że u zdrowych dzieci poziom komórek CD19⁺/CD21^{low} jest znacznie wyższy niż u zdrowych dorosłych, co może sugerować, że komórki o niskiej ekspresji CD21 są jednak komórkami o charakterze niedojrzałym. Dodatkowo, obserwacja ta wskazuje na znacznie ograniczone zastosowanie w grupie pediatrycznej klasyfikacji opracowanych dla dorosłych pacjentów.

U części dorosłych pacjentów z CVID, niezależnie od typu klasyfikacji, wykazano wzrost limfocytów B o niskiej ekspresji CD21 [147, 151]. Nasze badania wykazały, że w grupie dzieci z CVID, nie ma żadnych różnic w odsetku tych komórek w porównaniu do zdrowych dzieci. U dzieci z CVID, nie wykazano zatem odchyleń takich jak te, opisywane u osób dorosłych z CVID. Ta obserwacja jest zgodna z faktem, że u dorosłych pacjentów z CVID, u których obserwowano podwyższony poziom CD21^{low} limfocytów B, choroba ujawniała się statystycz-

nie znamienne częściej w drugiej-trzeciej dekadzie życia, w stosunku do pacjentów, u których poziom tych komórek był prawidłowy [151].

Zarówno w grupie dzieci z SIgAD jak i w THI nie obserwowano żadnych różnic w zakresie limfocytów B wykazujących niską ekspresję molekuly CD21. Sugeruje to ograniczoną przydatność oznaczania tego parametru w celach diagnostycznych.

Ekspresja receptorów dla IL-12 i IL-18 na subpopulacjach limfocytów T

Procedury pomiarowe większości parametrów stosowanych u dorosłych pacjentów z CVID w celu wykazania polaryzacji równowagi Th1/Th2 w stronę Th1 [17, 80, 90, 93, 95, 105], są obarczone licznymi trudnościami w standaryzacji, a dodatkowo, w większości nie mają udokumentowanego znaczenia klinicznego. Jedynie wzrost ekspresji receptorów dla IL-12 i IL-18 na poszczególnych subpopulacjach krążących limfocytów T (głównie na subpopulacjach limfocytów T dziewiczych) ma udokumentowane znaczenie kliniczne – koreluje z tworzeniem ziarniniaków w węzłach chłonnych i śledzionie [95]. Rozważano, czy na obserwowany wzrost ekspresji tych receptorów cytokinowych u pacjentów z CVID nie jest wtórny do infekcji lub terapii IVIG. Jednak, u pacjentów z agammaglobulinemią Brutona, cierpiących na podobne typy infekcji i otrzymujących taką samą terapię jak pacjenci z CVID, ekspresja receptorów dla IL-12 i IL-18 nie jest podwyższona [95]. Zatem mało prawdopodobne jest, by obserwowana u pacjentów z CVID dysregulacja ekspresji tych receptorów była wtórna do infekcji lub regularnych wlewów immunoglobulinowych. Ponadto, mało prawdopodobne jest by wtórny wzrost ekspresji tych receptorów miał ujawniać się wybiórczo na populacji dziewiczych limfocytów T. Wydaje się zatem, że odchylenia w zakresie receptorów cytokinowych u pacjentów z CVID są raczej wynikiem zaburzonej immunoregulacji, niż następstwem prawidłowej odpowiedzi immunologicznej na toczące się w organizmie procesy zapalne czy też substytucję immunoglobulinową.

Ze względu na udokumentowane znaczenie kliniczne badania ekspresji receptorów cytokinowych [95] oraz możliwość uzyskania wyników o wysokiej powtarzalności, w niniejszych badaniach wybrano właśnie oznaczanie receptorów dla IL-12 i IL-18 na subpopulacjach limfocytów T CD4⁺ oraz CD8⁺ dziewiczych i pamięci, oraz oznaczanie odsetka poszczególnych subpopulacji limfocytów T wykazujących ekspresję tych receptorów cytokinowych. Dotychczas nie zbadano zachowania się receptorów cytokinowych na subpopulacjach limfocytów T u dzieci z CVID, jak również u dzieci z SIgAD ani THI.

W niniejszej pracy wykazano, że poziom ekspresji receptorów dla IL-12 oraz IL-18 w obrębie poszczególnych subpopulacji limfocytów T, nie jest parametrem zależnym od wieku, zatem dalszych analiz dokonywano bez uwzględnienia podgrup wiekowych badanych dzieci.

Wykazano, że u dzieci z CVID odsetek limfocytów CD4⁺ dziewiczych wykazujących ekspresję receptorów dla IL-12, podobnie jak u dorosłych pacjentów z CVID, był wyższy niż w kontroli. Różnice pomiędzy dziećmi z CVID a kontrolą w poziomie pozostałych limfocytów T z ekspresją receptorów dla IL-12R i IL-18R nie były statystycznie istotne. Wyższy odsetek limfocytów T CD4⁺ dziewiczych wykazujących ekspresję IL-12R obserwowany u dzieci z CVID wskazuje na przesunięcie równowagi Th1/Th2 w kierunku Th1 u tych pacjentów.

U dzieci z SIgAD stwierdzono, że odsetek limfocytów dziewiczych CD4⁺ i CD8⁺ z ekspresją receptorów dla IL-12 był wyższy zarówno w porównaniu do kontroli jak i do pozostałych badanych grup pacjentów. Również stopień ekspresji tych receptorów na powyższych subpopulacjach komórkowych, był najwyższy spośród wszystkich badanych grup pacjentów. Wysoki odsetek oraz stopień ekspresji IL-12R na limfocytach T obserwowany w SIgAD, wykazuje na największe spośród badanych grup pacjentów zaburzenia w immunoregulacji w kierunku Th1.

W grupie pacjentów z potwierdzoną przejściową hipogammaglobulinemią, analiza ekspresji receptorów dla IL-12 i IL-18 na subpopulacjach limfocytów T wykazała, że zarówno odsetek limfocytów T dziewiczych oraz pamięci CD4⁺ i CD8⁺ wykazujących ekspresję receptorów dla IL-12 i IL-18, jak i poziom ekspresji tych receptorów u większości dzieci były zbliżone do grupy kontrolnej, co może się okazać pomocne w różnicowaniu THI i CVID.

Wydaje się zatem, że obserwacja poziomu subpopulacji limfocytów T (głównie populacji komórek CD4⁺ dziewiczych), dodatnich pod względem ekspresji receptorów cytokinowych, może być pomocna we wskazaniu spośród małych dzieci z niejasną postacią hipogammaglobulinemii, tych pacjentów, u których ryzyko rozwinięcia utrwalonej formy hipogammaglobulinemii CVID jest wyższe.

Ponadto, u dzieci z THI poziom IgG zwykle normalizuje się szybciej niż IgA, dlatego u części dzieci z THI można obserwować utrzymujące się niskie poziomy IgA przy prawidłowych poziomach pozostałych typów immunoglobulin [94] – oznaczanie ekspresji receptorów cytokinowych na subpopulacjach limfocytów T, może pomóc we wskazaniu w grupie dzieci z niskim poziomem IgA oraz prawidłowymi poziomami pozostałych klas przeciwciał w surowicy, tych dzieci, u których prawdopodobieństwo, że niski poziom IgA nie wyrówna się, a wręcz przeciwnie – może przejść w postać SIgAD, jest wyższe. Niski poziom ekspresji receptorów cytokinowych u dzieci, u których utrzymują się niskie poziomy IgA przy prawidłowych poziomach pozostałych typów immunoglobulin, może sugerować THI, natomiast wysoki poziom ekspresji tych receptorów, przemawiać może raczej za SIgAD.

Polimorfizmy oraz mutacje w genie kodującym receptor TACI

Spośród defektów molekularnych opisywanych wcześniej u dorosłych pacjentów z CVID (TACI, CD19, BAFF-R czy ICOS), w pracy tej wybrano ocenę mutacje genu kodującego receptor TACI. Defekt ten wybrano ze względu na jego stosunkowo częste występowanie w grupie CVID oraz stwierdzanie tego defektu u części pacjentów SIgAD [56, 119].

U około 10-15% pacjentów z CVID oraz u nieznacznej liczby pacjentów z SIgAD, stwierdzono mutację w genie kodującym receptor TACI (transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand (CAML) interactor) [56, 119]. Jednak większość danych dotyczy dorosłych pacjentów. Jak dotąd nie przeprowadzono podobnych badań w większej grupie dzieci z CVID, jak również dzieci z SIgAD ani THI. W populacji polskiej brak jest jakichkolwiek danych o częstości występowania mutacji w genie TACI u pacjentów z CVID czy SIgAD.

Ostatnie badania przeprowadzone na dużej populacji pacjentów oraz zdrowych dawców wykazały, że ze wszystkich wcześniej opisywanych defektów genetycznych receptora TACI (204insA, C104R, S144X, A181E, S194X, R202H), statystycznie istotny związek z CVID mają jedynie trzy typy mutacji: C104R, A181E oraz insercja adeniny w pozycji 204 [25, 107, 110]. U osób z tym samym typem mutacji obserwuje się różnorodny obraz kliniczny i przebieg choroby [107]. Różnice dotyczą także poziomu immunoglobulin IgA i IgG w surowicy. Mutacje genu kodującego receptor TACI, mogą objawiać się w różnej formie – w jednej rodzinie ta sama mutacja może być przyczyną izolowanego niedoboru IgA jak i CVID, a także może występować u zdrowych członków rodziny [116]. W badaniu jednej z rodzin obciążonej defektem genu kodującego receptor TACI stwierdzono, że u członka rodziny z mutacją C104R początkowo zakwalifikowanego do grupy SIgAD, w czasie trwania badań poziom IgG oraz IgA obniżył się, stan kliniczny uległ znacznemu pogorszeniu, w efekcie czego konieczna była substytucja immunoglobulinowa. Osoba ta została ostatecznie zakwalifikowana jako CVID [26]. Sugeruje się także, że forma SIgAD, która nie jest związana z mutacjami w genie TACI, może nie być obciążona ryzykiem przejścia w CVID [26]. Wydaje się zatem, że sam defekt receptora TACI, bez wystąpienia/współistnienia dodatkowych czynników środowiskowych i/lub genetycznych, nie jest wystarczający do ujawnienia pełnego obrazu klinicznego, obserwowanego u pacjentów z CVID. Jednak do precyzyjnego określenia korelacji genotypowo/fenotypowych konieczne są jeszcze dalsze analizy, na większej ilości chorych [4]. Tę hipotezę w pewnym stopniu potwierdzać mogą wyniki uzyskane w powyższej pracy. U żadnego z przebadanych dzieci z CVID nie stwierdzono bowiem mutacji w genie kodującym receptor TACI. Być może jest to wynikiem tego, że w dziecięcej grupie z CVID występuje inny niż opisywany u dorosłych pacjentów z CVID defekt, który powoduje wystąpienie objawów klinicznych już w okresie niemowlęctwa

lub wczesnego dzieciństwa, bez konieczności wystąpienia/oddziaływania dodatkowych czynników środowiskowych, tak jak się to opisuje u dorosłych pacjentów z defektem TACI. Jednak z powodu zbyt małej liczebności grupy nie można wyciągnąć definitywnych wniosków.

Pośród dzieci z selektywnym niedoborem IgA mutację w genie kodującym receptor TACI stwierdzono u jednego dziecka. Diagnozę SIgAD u tego pacjenta postawiono w wieku 9 lat, po historii nawracających infekcji. U dziecka tego wykryto heterozygotyczną postać mutacji C104R. Dziecko to należy obserwować pod kątem przejścia selektywnego niedoboru IgA w uogólnioną formę CVID, ponieważ, jak opisano powyżej, wydaje się, że defekt ten może predysponować do rozwinięcia w późniejszym wieku CVID.

W grupie dzieci z potwierdzoną przejściową hipogammaglobulinemią, u jednego dziecka stwierdzono obecność heterozygotycznej mutacji C104R w genie kodującym receptor TACI. W trakcie trwania projektu, u dziecka tego poziom immunoglobulin wyrównał się w wieku 4 lat. Możliwe jest, że u tego dziecka, dysfunkcja receptora TACI, ujawniająca się u tego pacjenta w początkowym okresie umiarkowaną hipogammaglobulinemią, została z czasem wyrównana przez inne mechanizmy regulujące proces produkcji immunoglobulin czy proces przełączania izotypu syntezowanych przeciwciał. Jednak nie wykluczone, że pacjent ten w późniejszym wieku, pod wpływem dodatkowych czynników środowiskowych i/lub genetycznych, z powodu defektu receptora TACI, może rozwinąć zespół CVID.

U innego, dwuletniego chłopca, z wciąż niejasną formą hipogammaglobulinemii wykryto heterozygotyczną postać mutacji A181E. U pacjenta tego w początkowych badaniach (około pierwszego roku życia) stwierdzano niskie poziomy zarówno IgG jak i IgA, w kolejnych badaniach kontrolnych poziom IgG znormalizował się, jednak poziom IgA pozostaje wciąż obniżony. Pacjenta tego należy obserwować pod kątem rozwinięcia częściowego niedoboru IgA, lub jak powyżej, pod kątem rozwinięcia w późniejszym wieku uogólnionej postaci hipogammaglobulinemii – CVID.

U żadnego pacjenta, u którego wykryto mutacje w genie kodującym receptor TACI nie stwierdzono odchyień w zakresie krążących subpopulacji limfocytów B, co jest zgodne z faktem, że receptor ten uczestniczy jedynie w końcowym różnicowaniu limfocytów B (na etapie komórek plazmatycznych) i nie wiąże się z konkretnym typem odchyień w zakresie krążących subpopulacji limfocytów B [151]. Potwierdza to dodatkowo fakt, że u większości dzieci z CVID, u których obserwowano niskie poziomy limfocytów B pamięci i ich subpopulacji “class-switched”, wykluczono defekt receptora TACI.

Z powyższych obserwacji wynika, że ocena mutacji w genie kodującym receptor TACI ma ograniczone znaczenie kliniczne w doraźnej diagnostyce dzieci z hipogammaglobulinemią o niejasnej etiologii i stratyfikacji tych pacjentów do grup podwyższonego ryzyka rozwinięcia utrwalonej formy niedoboru CVID lub SIgAD. Jednak nie jest wykluczone, że obecność mu-

tacji u danego pacjenta może predysponować do wystąpienia choroby w późniejszym wieku, zatem pacjent taki wymaga systematycznych badań kontrolnych. Niniejsze badania mogą sugerować ponadto, że opisywane w literaturze występowanie mutacji w genie kodującym receptor TACI u zdrowych osób, nie cierpiących obecnie z powodu zaburzeń odporności humoralnej, mogło się wiązać z umiarkowaną hipogammaglobulinemią u tych osób w dzieciństwie, jednak z powodu braku jednoznacznych objawów klinicznych lub problemów diagnostycznych nie rozpoznano u tych osób niedoboru odporności. Nie jest również wykluczone, że osoby te, w późniejszym wieku mogą rozwinąć CVID, jako że, przedział wiekowy, w którym choroba może się ujawnić, jest bardzo szeroki (pierwsze objawy mogą wystąpić nawet około 70-80-go roku życia).

Ponadto, w niniejszej pracy stwierdzono występowanie wszystkich pięciu polimorficznych wariantów genu kodującego receptor TACI (T27T, P97P, P251L, V220A oraz S277S), zarówno w grupach pacjentów jak i grupie kontrolnej. Jednak dystrybucja pewnych polimorfizmów w populacji polskiej jest inna, niż opisywano to do tej pory w literaturze. Największe różnice dotyczyły występowania polimorfizmu T27T. Według danych literaturowych polimorfizm ten występuje u 72% pacjentów z CVID i u 40% osób w grupie kontrolnej [116]. Wyniki uzyskane w niniejszej pracy zasadniczo różnią się od danych opisywanych w literaturze, ponieważ stwierdzono, że polimorfizm T27T występował w postaci homo- bądź heterozygotycznej u ponad 90% przebadanych osób, zarówno w grupach pacjentów jak i w grupie kontrolnej. Może to sugerować pewną odmienność populacji polskiej.

Powyższe badania mają implikacje zarówno diagnostyczne, terapeutyczne, jak i poznawcze, bowiem rzucają nowe światło na patomechanizm dziecięcych form hipogammaglobulinemii oraz na odmienny patomechanizm dziecięcej i dorosłej postaci CVID.

6 WNIOSKI

6.1 Wnioski wynikające z badań subpopulacji krążących limfocytów B

1. Zakresy wartości referencyjnych dla poszczególnych subpopulacji limfocytów B opracowane dla zdrowych dorosłych nie mogą być stosowane u dzieci. Poziom limfocytów B pamięci oraz ich subpopulacji “class-switched” u zdrowych dzieci jest niższy od poziomu ustalonego jako prawidłowy dla zdrowych dorosłych, natomiast poziom limfocytów B CD21^{low} jest wyższy niż u zdrowych dorosłych.
2. W grupie badanych dzieci z pospolitym zmiennym niedoborem odporności (CVID) analiza subpopulacji limfocytów B pozwalała wyłonić dwie podgrupy. U młodszych dzieci z CVID, stwierdzono, że w odróżnieniu od dorosłych z CVID, poziomy limfocytów B pamięci oraz ich subpopulacji “class-switched”, są porównywalne do wartości w odpowiednio dobranej pod względem wieku grupie kontrolnej. W miarę dorastania, poziom tych komórek w kontroli wzrasta, natomiast u dzieci z CVID nie tylko nie wzrasta, ale u części dzieci nawet się obniża. U dzieci starszych z CVID obserwuje się zatem (podobnie jak u dorosłych z CVID), obniżony poziom limfocytów B pamięci oraz ich subpopulacji “class-switched” w porównaniu do odpowiedniej kontroli. Poziom limfocytów B CD21^{low} był porównywalny do odpowiednich wiekowo kontroli zarówno w grupie młodszych jak i starszych dzieci z CVID. Nie stwierdzono opisywanego u osób dorosłych z CVID podwyższonego poziomu tych komórek.
3. U dzieci z selektywnym niedoborem IgA (SIgAD) poziom limfocytów B pamięci był porównywalny do kontroli, natomiast odsetek limfocytów “class-switched” w obrębie populacji limfocytów B pamięci był obniżony (podobnie jak u starszych dzieci z CVID). Nie obserwowano natomiast różnic w poziomie limfocytów B z niską ekspresją molekuly CD21 między dziećmi z SIgAD a grupą kontrolną.
4. U dzieci z przejściową hipogammaglobulinemią (THI), poziom limfocytów B pamięci oraz ich subpopulacji “class-switched” był porównywalny do wiekowo dobranej grupy kontrolnej, zarówno w czasie trwania hipogammaglobulinemii, jak i po normalizacji poziomów immunoglobulin. Poziom tych komórek u dzieci z THI wzrastał z wiekiem tak jak w grupie kontrolnej. Nie obserwowano również żadnych różnic w zakresie limfocytów B wykazujących niską ekspresję molekuly CD21.
5. Obserwacje prospektywne i wielokrotne badania poziomów limfocytów B pamięci oraz “class-switched” limfocytów B pamięci u dzieci hipogammaglobulinemią o niejasnej etiologii pozwoliły na obserwację zmian czasowych w zachowaniu się tych parametrów.

Stwierdzono, że utrzymujący się w kolejnych badaniach niski poziom tych komórek przemawia za CVID, a nie THI, co sugeruje przydatność tych badań w różnicowaniu THI i CVID u dzieci poniżej 5 roku życia, co jak dotąd jest niezwykle trudne.

6. Brak różnic w poziomie limfocytów B CD21^{low} pomiędzy dziećmi ze wszystkich badanych grup oraz grupą kontrolną pozwala na stwierdzenie o ograniczonej przydatności oznaczania tego parametru w celach diagnostycznych u dzieci z hipogammaglobulinemią.

6.2 Wnioski wynikające z badań nad ekspresją receptorów cytokinowych dla IL-12 i IL-18 na limfocytów T CD4⁺ i CD8⁺ dziewiczych i pamięci

1. U dzieci z CVID jedynie odsetek limfocytów CD4⁺ dziewiczych wykazujących ekspresję receptorów dla IL-12 był wyższy niż w kontroli. Różnice pomiędzy dziećmi z CVID a kontrolą w poziomie pozostałych limfocytów T z ekspresją receptorów dla IL-12R i IL-18R nie były statystycznie istotne.
2. U dzieci z SIgAD odsetek dziewiczych limfocytów CD4⁺ i CD8⁺ z ekspresją receptorów dla IL-12 był wyższy zarówno w porównaniu do kontroli jak i do pozostałych badanych grup pacjentów. Również stopień ekspresji tych receptorów na powyższych subpopulacjach komórkowych, był najwyższy spośród wszystkich badanych grup pacjentów.
3. U dzieci z THI, odsetek limfocytów T zarówno dziewiczych jak i pamięci CD4⁺ i CD8⁺ wykazujących ekspresję receptorów dla IL-12 i IL-18, jak i poziom ekspresji tych receptorów były zbliżone do kontroli.
4. Wyższy odsetek i stopień ekspresji IL-12R na limfocytach T obserwowany w CVID i SIgAD wykazują na przesunięcie w tych schorzeniach równowagi Th1/Th2 w kierunku Th1.
5. Uzyskane wyniki i istotne różnice w ekspresji IL-12R pomiędzy pacjentami z CVID a grupą z THI i grupą kontrolną (w CVID wyższa ekspresja il-12R niż w THI oraz kontroli) sugerują przydatność kliniczną tych badań w różnicowaniu THI i CVID u dzieci poniżej 5 roku życia.

6.3 Wnioski wynikające z badań genetycznych struktury genu kodującego receptor TACI

1. W grupie dzieci z CVID u żadnego z badanych pacjentów nie stwierdzono defektu TACI opisywanego u dorosłych z CVID.

2. W grupie dzieci z SIgAD, u jednego pacjenta wykryto heterozygotyczną postać mutacji C104R w genie kodującym receptor TACI. U dziecka tego nie stwierdzono odchyień w zakresie krążących subpopulacji limfocytów B.
3. W grupie pacjentów z THI u jednego dziecka stwierdzono obecność heterozygotycznej mutacji C104R w genie kodującym receptor TACI.
4. W grupie dzieci z wciąż niejasną formą hipogammaglobulinemii (zbyt krótki okres obserwacji) w jednym przypadku wykryto heterozygotyczną postać mutacji A181E. U tego pacjenta w wyjściowych badaniach stwierdzono niskie poziomy zarówno IgG jak i IgA, w kolejnych badaniach kontrolnych poziom IgG znormalizował się, natomiast poziom IgA pozostaje nadal niski.
5. W badanych grupach pacjentów jak i grupie kontrolnej stwierdzono występowanie wszystkich z pięciu polimorficznych wariantów genu kodującego receptor TACI (T27T, P97P, P251L, V220A oraz S277S). Polimorfizmy P97P, P251L, V220A oraz S277S występowały u pacjentów i w kontroli z częstością porównywalną, do opisywanej w literaturze. Natomiast polimorfizm T27T w postaci homo- bądź heterozygotycznej stwierdzono w ponad **90%** badanych przypadków z jednakową częstością w grupach pacjentów jak i w grupie kontrolnej. Wyniki zasadniczo odbiegają od danych w literaturze, które podają częstość tego polimorfizmu około **40%**.
6. Uzyskane wyniki sugerują, że badania mutacji w genie kodującym receptor TACI u dzieci z hipogammaglobulinemią o niejasnej etiologii mają ograniczone znaczenie kliniczne w diagnostyce i różnicowaniu różnych form hipogammaglobulinemii u dzieci. Znaczenie wykrytych mutacji u dzieci z SIgAD i THI wymaga dalszych obserwacji celem stwierdzenia, czy obecność mutacji u tych pacjentów może predysponować do rozwinięcia CVID w późniejszym wieku.
7. U pacjentów, u których wykryto mutacje w genie kodującym receptor TACI nie stwierdzono zmian w obrębie krążących subpopulacji limfocytów B.

Przedstawione wyniki badań wydają się być istotne klinicznie, bowiem część z nich może mieć znaczenie zarówno diagnostyczne jak i prognostyczne u dzieci z różnymi formami zaburzeń odporności humoralnej.

Literatura

- [1] Agematsu K, Futatani T, Hokibara S, Kobayashi N, Takamoto M, Tsukada S, Suzuki H, Koyasu S, Miyawaki T, Sugane K, Komiyama A, Ochs HD. Absence of memory B cells in patients with common variable immunodeficiency. *Clin Immunol.* 2002;103(1):34–42.
- [2] Aita T, Yamamura M, Kawashima M, Okamoto A, Iwahashi M, Yamana J, Makino H. Expression of interleukin 12 receptor (IL-12R) and IL-18R on CD4+ T cells from patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* 2004;31(3):448–56.
- [3] Applied Biosystem GeneScan References Guide: Chemistry References for the ABI PRISM 310 Genetic Analyser Applied Biosystem.
- [4] Bacchelli C, Buckridge S, Thrasher AJ, Gaspar HB. Translational mini-review series on immunodeficiency: molecular defects in common variable immunodeficiency. *Clin Exp Immunol.* 2007;149(3):401–9.
- [5] Banner DW, D’Arcy A, Janes W, Gentz R, Schoenfeld HJ, Broger C, Loetscher H, Lesslauer W. Crystal structure of the soluble human 55 kd TNF receptor-human TNF beta complex: implications for TNF receptor activation. *Cell.* 1993;73(3):431–45.
- [6] Bayry J, Lacroix-Desmazes S, Kazatchkine MD, Galicier L, Lepelletier Y, Webster D, Levy Y, Eibl MM, Oksenhendler E, Hermine O, Kaveri SV. Common variable immunodeficiency is associated with defective functions of dendritic cells. *Blood.* 2004;104(8):2441–3.
- [7] Beier KC, Hutloff A, Dittrich AM, Heuck C, Rauch A, Bechner K, Ludewig B, Ochs HD, Mages HW, Kroczeck RA. Induction, binding specificity and function of human ICOS. *Eur J Immunol.* 2000;30(12):3707–17.
- [8] Benedetto A, Di Caro A, Camporiondo MP, Gallone D, Zaniratti S, Tozzi V, Elia G. Identification of a CD21 receptor-deficient, non-Ig-secreting peripheral B lymphocyte subset in HIV-seropositive drug abusers. *Clin Immunol Immunopathol.* 1992;62(2):139–47.
- [9] Bishop GA. The multifaceted roles of TRAFs in the regulation of B-cell function. *Nat Rev Immunol.* 2004;4(10):775–86.
- [10] Bodmer J, Schneider P, Tschopp J. The molecular architecture of the TNF superfamily. *Trends Biochem Sci.* 2002;27(1):19–26.

- [11] Brouet JC, Chedeville A, Fermanand JP, Royer B. Study of the B cell memory compartment in common variable immunodeficiency. *Eur J Immunol.* 2000;30(9):2516–20.
- [12] Bryant A, Calver NC, Toubi E, Webster AD, Farrant J. Classification of patients with common variable immunodeficiency by B cell secretion of IgM and IgG in response to anti-IgM and interleukin-2. *Clin Immunol Immunopathol.* 1990;56(2):239–48.
- [13] Buckley RH. Pulmonary complications of primary immunodeficiencies. *Paediatr Respir Rev.* 2004;5 Suppl A:S225-33.
- [14] Budd RC, Fortner KA. T lymphocytes. In: *Kelley's Textbook of Rheumatology.* Harris ED Jr, Budd RC, Firestein GS, et al. (eds). Elsevier Saunders, Philadelphia 2005. p. 133–54.
- [15] von Bulow GU, Bram RJ. NF-AT activation induced by a CAML-interacting member of the tumor necrosis factor receptor superfamily. *Science.* 1997;278(5335):138–41.
- [16] von Bulow GU, van Deursen JM, Bram RJ. Regulation of the T-independent humoral response by TACI. *Immunity.* 2001;14(5):573–82.
- [17] Cambronero R, Sewell WA, North ME, Webster AD, Farrant J. Up-regulation of IL-12 in monocytes: a fundamental defect in common variable immunodeficiency. *J Immunol.* 2000;164(1):488–94.
- [18] Cano F, Mayo DR, Ballow M Absent specific viral antibodies in patients with transient hypogammaglobulinemia of infancy. *J Allergy Clin Immunol.* 1990;85(2):510–3.
- [19] Capolunghi F, Cascioli S, Giorda E, Rosado MM, Plebani A, Auriti C, Seganti G, Zuntini R, Ferrari S, Cagliuso M, Quinti I, Carsetti R CpG drives human transitional B cells to terminal differentiation and production of natural antibodies. *J Immunol.* 2008;180(2):800–8.
- [20] Carroll MC. The role of complement and complement receptors in induction and regulation of immunity. *Annu Rev Immunol.* 1998;16:545–68.
- [21] Carroll MC. The role of complement in B cell activation and tolerance. *Adv Immunol.* 2000;74:61–88.
- [22] Carsetti R, Rosado MM, Donnanno S, Guazzi V, Soresina A, Meini A, Plebani A, Aiuti F, Quinti I. The loss of IgM memory B cells correlates with clinical disease in common variable immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol.* 2005;115(2):412-7.

- [23] Carter RH, Fearon DT. CD19: lowering the threshold for antigen receptor stimulation of B lymphocytes. *Science* 1992; 256:105–7.
- [24] Castigli E, Scott S, Dedeoglu F, Bryce P, Jabara H, Bhan AK, Mizoguchi E, Geha RS. Impaired IgA switching in APRIL-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(11):3903–8.
- [25] Castigli E., et al. Reexamining the role of TACI coding variants in common variable immunodeficiency and selective IgA deficiency. *Nat Genet*. 2007;39, 430–431.
- [26] Castigli E, Geha RS. Molecular basis of common variable immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;117(4):740–6.
- [27] Castigli E, Wilson S, Garibyan L, Rachid R, Bonilla F, Schneider L, et al. TACI is mutant in common variable immunodeficiency and IgA deficiency. *Nat Genet*. 2005;37(8):829–34.
- [28] Coggeshall KM. Positive and negative signaling in B lymphocytes. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2000;245(1):213–60.
- [29] Conley ME, Notarangelo LD, Etzioni A, Diagnostic criteria for primary immunodeficiencies. Representing PAGID (Pan-American Group for Immunodeficiency) and ESID (European Society for Immunodeficiencies). *Clin Immunol*. 1999;93(3):190–7.
- [30] Cooper MD, Lawton AR. Circulating B-cells in patients with immunodeficiency. *Am J Pathol*. 1972;69(3):513–28.
- [31] Cunningham-Rundles C. Clinical and immunologic analyses of 103 patients with common variable immunodeficiency. *J Clin Immunol*. 1989;9(1):22–33.
- [32] Cunningham-Rundles C, Bodian C. Common variable immunodeficiency: clinical and immunological features of 248 patients. *Clin Immunol*. 1999;92(1):34–48.
- [33] Cunningham-Rundles C, Radigan L. Deficient IL-12 and dendritic cell function in common variable immune deficiency. *Clin Immunol*. 2005;115(2):147–53.
- [34] Defrance T, Vanbervliet B, Briere F, Durand I, Rousset F, Banchereau J. Interleukin 10 and transforming growth factor beta cooperate to induce anti-CD40-activated naive human B cells to secrete immunoglobulin A. *J Exp Med*. 1992;175(3):671–82.
- [35] Denz A, Eibel H, Illge H, Kienzle G, Schleiser M, Peter HH. Impaired up-regulation of CD86 B cells of type A common variable immunodeficiency. *Eur J Immunol*. 2000;30(4):1069–77.

- [36] Desai BB, Quinn PM, Wolitzky AG, Mongini PK, Chizzonite R, Gately MK. IL-12 receptor. II. Distribution and regulation of receptor expression. *J Immunol.* 1992;148(10):3125-32.
- [37] Diamond B, Grimaldi C. B cells. In: Kelley's Textbook of Rheumatology. Harris ED Jr, Budd RC, Firestein GS, et al. (eds). Elsevier Saunders, Philadelphia 2005; 153-73.
- [38] Dorsey MJ, Orange JS. Impaired specific antibody response and increased B-cell population in transient hypogammaglobulinemia of infancy. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2006;97(5):590-5.
- [39] Dressler F, Peter HH, Muller W, Rieger CH. Transient hypogammaglobulinemia of infancy: Five new cases, review of the literature and redefinition. *Acta Paediatrica Scandinavica.* 1989;78(5):767-74.
- [40] Dunn-Walters DK, Isaacson PG, Spencer J. Analysis of mutations in immunoglobulin heavy chain variable region genes of microdissected marginal zone (MGZ) B cells suggests that the MGZ of human spleen is a reservoir of memory B cells. *J Exp Med.* 1995;182(2):559-66.
- [41] Espanol T, Catala M, Hernandez M, Caragol I, Bertran JM Development of a common variable immunodeficiency in IgA deficient patients. *Clin Immunol Immunopathol.* 1996;80(3 Pt 1):333-5.
- [42] Farrington M, Grosmaire LS, Nonoyama S, Fischer SH, Hollenbaugh D, Ledbetter JA, Noelle RJ, Aruffo A, Ochs HD. CD40 ligand expression is defective in a subset of patients with common variable immunodeficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(3):1099-103.
- [43] Fayette J, Dubois B, Vandenabeele S, Bridon JM, Vanbervliet B, Durand I, Banchereau J, Caux C, Briere F. Human dendritic cells skew isotype switching of CD40-activated naive B cells towards IgA1 and IgA2. *J Exp Med.* 1997;185(11):1909-18.
- [44] Fearon DT, Carroll MC. Regulation of B lymphocyte responses to foreign and self-antigens by the CD19/CD21 complex. *Annu Rev Immunol.* 2000;18:393-422.
- [45] Ferrer JM, Iglesias J, Hernandez M, Matamoros N. Alterations in interleukin secretion (IL-2 and IL-4) by CD4 and CD4 CD45RO cells from common variable immunodeficiency (CVI) patients. *Clin Exp Immunol.* 1995;102(2):286-9.
- [46] Ferry BL, Jones J, Bateman EA, Woodham N, Warnatz K, Schlesier M, Misbah SA, Peter HH, Chapel HM. Measurement of peripheral B cell subpopulations in common

- variable immunodeficiency (CVID) using a whole blood method. *Clin Exp Immunol.* 2005;140(3):532–9.
- [47] Fischer MB, Goerg S, Shen L, Prodeus AP, Goodnow CC, Kelsoe G, Carroll MC Dependence of germinal center B cells on expression of CD21/CD35 for survival. *Science.* 1998;280(5363):582–5.
- [48] Fischer MB, Hauber I, Vogel E, Wolf HM, Mannhalter JW, Eibl MM. Defective interleukin-2 and interferon-gamma gene expression in response to antigen in a subgroup of patients with common variable immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol.* 1993;92(2):340–52.
- [49] Fujieda S, Waschek JA, Zhang K, Saxon A. Vasoactive intestinal peptide induces S /S switch circular DNA in human B cells. *J Clin Invest.* 1996;98(7):1527–32.
- [50] Fujieda S, Zhang K, Saxon A. IL-4 plus CD40 monoclonal antibody induces human B cells subclass-specific isotype switch: switching to 1, 3 and 4, but not 2. *J Immunol.* 1995;155(5):2318–28.
- [51] Garibyan L, Lobito AA , Siegel RM, Call ME, Wucherpfennig KW, Geha RS. Dominant-negative effect of the heterozygous C104R TACI mutation in common variable immunodeficiency (CVID). *J Clin Invest.* 2007;117(6):1550–7.
- [52] Geha RS., Jabara HH, Brodeur SR. The regulation of immunoglobulin E class-switch recombination. *Nat Rev Immunol.* 2003;3(9):721–32.
- [53] 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; International Union of Immunological Societies Primary Immunodeficiency Diseases Classification Committee. Primary immunodeficiency diseases: an update from the International Union of Immunological Societies Primary Immunodeficiency Diseases Classification Committee. *J Allergy Clin Immunol.* 2007;120(4):776–94.
- [54] Goldacker S, Draeger R, Warnatz K, Huzly D, Salzer U, Thiel J, Eibel H, Schlesier M, Peter HH. Active vaccination in patients with common variable immunodeficiency (CVID). *Clin Immunol.* 2007;124(3):294–303.
- [55] Grimaldi CM, Hicks R, Diamond B. B cell selection and susceptibility to autoimmunity. *J Immunol.* 2005;174(4):1775–81.

- [56] Grimbacher B, Hutloff A, Schlesier M, Glocker E, Warnatz K, Droger R, Eibel H, Fischer B, Schoffer AA, Mages HW, Kroczeck RA, Peter HH. Homozygous loss of ICOS is associated with adult-onset common variable immunodeficiency. *Nat Immunol.* 2003;4(3):261–8.
- [57] Groth C, Drager R, Warnatz K, Wolff-Vorbeck G, Schmidt S, Eibel H, Schlesier M, Peter HH. Impaired up-regulation of CD70 and CD86 in naive (CD27-) B cells from patients with common variable immunodeficiency (CVID). *Clin Exp Immunol.* 2002;129(1):133–9.
- [58] Guinamard R, Okigaki M, Schlessinger J, Ravetch JV. Absence of marginal zone B cells in Pyk-2-deficient mice defines their role in the humoral response. *Nat Immunol.* 2000;1(1):31–6.
- [59] Grumach AS, Duarte AJ, Bellinati-Pires R, Pastorino AC, Jacob CM, Diogo CL, Condino-Neto A, Kirschfink M, Carneiro-Sampaio MM. Brazilian report on primary immunodeficiencies in children: 166 cases studied over a follow-up time of 15 years. *J Clin Immunol.* 1997;17(4):340–5.
- [60] Gutierrez MG, Kirkpatrick CH. Progressive immunodeficiency in a patient with IgA deficiency. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 1997;79(4):297–301.
- [61] Hammarstrom L, Vorechovsky I, Webster D. Selective IgA deficiency (SIgAD) and common variable immunodeficiency (CVID). *Clin Exp Immunol.* 2000;120(2):225–31.
- [62] Hasegawa M, Fujimoto M, Poe JC, Steeber DA, Tedder TF. CD19 can regulate B lymphocyte signal transduction independent of complement activation, *J Immunol.* 2001;167(6):3190–200.
- [63] Hayakawa H, Iwata T, Yata J, Kobayashi N. Primary immunodeficiency syndrome in Japan. I. Overview of a nationwide survey on primary immunodeficiency syndrome. *Journal of Clinical Immunology.* 1981;1(1):31–9.
- [64] Holm AM, Aukrust P, Aandahl EM, Muller F, Tasken K, Froland SS. Impaired secretion of IL-10 by T cells from patients with common variable immunodeficiency— involvement of protein kinase A type I. *J Immunol.* 2003;170(11):5772–7.
- [65] Holm AM, Aukrust P, Damas JK, Muller F, Halvorsen B, Froland SS. Abnormal interleukin-7 function in common variable immunodeficiency. *Blood.* 2005;105(7):2887–90.
- [66] Howard LM, Miller SD. Immunotherapy targeting the CD40/CD154 costimulatory pathway for treatment of autoimmune disease. *Autoimmunity.* 2004;37(5):411–8.

- [67] Huck K, Feyen O, Ghosh S, Beltz K, Bellert S, Niehues T. Memory B-cells in healthy and antibody-deficient children. *Clin Immunol.* 2009;131(1):50–9.
- [68] Hutloff A, Dittrich AM, Beier KC, Eljaschewitsch B, Kraft R, Anagnostopoulos I, Kroczek RA. ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature.* 1999;397(6716):263–6.
- [69] Hymowitz S, Patel D, Wallweber H, Runyon S, Yan M, Yin J. Structures of APRIL-receptor complexes: like BCMA, TACI employs only a single cysteine-rich domain for high affinity ligand binding. *J Biol Chem.* 2005;280(8):7218–27.
- [70] Isaak A, Gergely P Jr, Szekeres Z, Prechl J, Poor G, Erdei A, Gergely J. Physiological up-regulation of inhibitory receptors Fc gamma RII and CR1 on memory B cells is lacking in SLE patients. *Int Immunol.* 2008;20(2):185–92.
- [71] Jacquot S, Macon-Lemaitre L, Paris E, Kobata T, Tanaka Y, Morimoto C, Schlossman SF, Tron F. B cell co-receptors regulating T cell-dependent antibody production in common variable immunodeficiency: CD27 pathway defects identify subsets of severely immuno-compromised patients. *Int Immunol.* 2001;13(7):871–6.
- [72] Jakobisiak M.: Powstawanie przeciwciał [w:] Golab J., Jakobisiak M., Lasek W. *Immunologia*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2002.
- [73] Jiang W, Lederman MM, Mohner RJ, Rodriguez B, Nedrich TM, Harding CV, Sieg SF. Impaired Naive and Memory B-Cell Responsiveness to TLR9 Stimulation in Human Immunodeficiency Virus Infection, *J Virol.* 2008;82(16):7837–45.
- [74] 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):477–83.
- [75] Kinlen LJ, Webster AD, Bird AG, Haile R, Peto J, Soothill JF, Thompson RA. Prospective study of cancer in patients with hypogammaglobulinemia. *Lancet.* 1985;1(8423):263–6.
- [76] Klein U, Rajewsky K, Kuppers R. Human immunoglobulin (Ig)M⁺IgD⁺ peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) B cells. *J Exp Med.* 1998;188(9):1679–89.
- [77] Kowalczyk D, Pietrzyk JJ, Zembala M. TNF production in children with humoral immunodeficiency. *Acta Paediatr.* 1994;83(12):1310–1.

- [78] Kowalczyk D, Mytar B, Zembala M. Cytokine production in transient hypogammaglobulinemia and isolated IgA deficiency. *J Allergy Clin Immunol.* 1997;100(4):556–62.
- [79] Kowalczyk D. Cytokiny w niedoborach odporności u dzieci, [w:] *Folia Medica Cracoviensia*, Vol. XL, 1–2, 1999.
- [80] Kowalczyk D, Baran J, Webster AD, Zembala M. Intracellular cytokine production by Th1/Th2 lymphocytes and monocytes of children with symptomatic transient hypogammaglobulinaemia of infancy (THI) and selective IgA deficiency (SIgAD). *Clin Exp Immunol.* 2002;127(3):507–12.
- [81] Kowalczyk D, Macura-Biegun A, Zembala M. The expression of CD40 on monocytes of children with primary humoral immunodeficiencies. *Pediatr Res.* 2006;59(6):816–9.
- [82] Kruetzmann S, Rosado MM, Weber H, Germing U, Tournilhac O, Peter HH, Berner R, Peters A, Boehm T, Plebani A, Quinti I, Carsetti R. Human immunoglobulin M memory B cells controlling *Streptococcus pneumoniae* infections are generated in the spleen. *J Exp Med.* 2003;197(7):939–45.
- [83] Levy Y, Gupta N, LeDeist F, Garcia C, Fischer A, Weill JC, Reynaud CA. Defect in IgV gene somatic hypermutation in common variable immunodeficiency syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(22):13135–40.
- [84] Lilic D, Sewell WA. IgA deficiency: what we should-or should not-be doing. *J Clin Pathol.* 2001;54(5):337–8.
- [85] Litinskiy MB, Nardelli B, Hilbert DM, He B, Schaffer A, Casali P, Cerutti A. DCs induce CD40-independent Immunoglobulin class switching through BLYS and APRIL. *Nat Immunol.* 2002;3(9):822–9.
- [86] Mackay F, Schneider P, Rennert P, Browning J. BAFF and APRIL: a tutorial on B cell survival. *Annu Rev Immunol.* 2003;21:231–64.
- [87] Marconi M, Plebani A, Avanzini MA, Maccario R, Pistorio A, Duse M, Stringa M, Monafo V. IL-10 and IL-4 co-operate to normalize in vitro IgA production in IgA-deficient patients. *Clin Exp Immunol.* 1998;112(3):528–32.
- [88] Maizels N. Immunoglobulin class switch recombination: will genetics provide new clues to mechanism? *Am J Hum Genet.* 1999;64(5):1270–5.
- [89] Makar KW, Ulgiati D, Hagman J, Holers VM. A site in the complement receptor 2 (CR2/CD21) silencer is necessary for lineage specific transcriptional regulation. *Int Immunol.* 2001;13(5):657–64.

- [90] Mannon PJ, Fuss IJ, Dill S, Friend J, Groden C, Hornung R, Yang Z, Yi C, Quezado M, Brown M, Strober W. Excess IL-12 but not IL-23 accompanies the inflammatory bowel disease associated with common variable immunodeficiency. *Gastroenterology*. 2006;131(3):748–56.
- [91] Marchbank KJ, Watson CC, Ritsema DF, Holers VM. Expression of human complement receptor 2 (CR2,CD21) in Cr2^{-/-} mice restores humoral immune function. *J Immunol*. 2000;165(5):2354-61.
- [92] Martin F, Oliver AM, Kearney JF. Marginal zone and B1 B cells unite in the early response against T-independent blood-borne particulate antigens. *Immunity*. 2001;14(5):617-29.
- [93] Martinez-Pomar N, Raga S, Ferrer J, Pons J, Munoz-Saa I, Julia MR, de Gracia J, Matamoros N. Elevated serum interleukin (IL)-12p40 levels in common variable immunodeficiency disease and decreased peripheral blood dendritic cells: analysis of IL-12p40 and interferon-gamma gene. *Clin Exp Immunol*. 2006;144(2):233–8.
- [94] McGeady SJ. Transient hypogammaglobulinemia of Infancy: need to reconsider name and definition. *J Pediatr*. 1987;110(1):47-50.
- [95] McQuaid A, Tormey VJ, Trafford B, Webster AD, Bofill M. Evidence for increased expression of regulatory cytokine receptors interleukin-12R and interleukin-18R in common variable immunodeficiency. *Clin Exp Immunol*. 2003;134(2):321–7.
- [96] Milner EC, Anolik J, Cappione A, Sanz I. Human innate B cells: a link between host defense and autoimmunity? *Springer Semin Immunopathol*. 2005;26(4):433-52.
- [97] Moir S, Malaspina A, Ogwaro KM, Donoghue ET, Hallahan CW, Ehler LA, Liu S, Adelsberger J, Lapointe R, Hwu P, Baseler M, Orenstein JM, Chun TW, Mican JA, Fauci AS. HIV-1 induces phenotypic and functional perturbations of B cells in chronically infected individuals. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(18):10362-7.
- [98] Moir S, Ho J, Malaspina A, Wang W, DiPoto AC, O’Shea MA, Roby G, Kottlil S, Arthos J, Proschan MA, Chun TW, Fauci AS. Evidence for HIV-associated B cell exhaustion in a dysfunctional memory B cell compartment in HIV-infected viremic individuals. *J Exp Med*. 2008;205(8):1797–805.
- [99] Murphy KM, Ouyang W, Farrar JD, Yang J, Ranganath S, Asnagli H, Afkarian M, Murphy TL. Signaling and transcription in T helper development. *Annu Rev Immunol*. 2000;18:451–94.

- [100] Nakahira M, Tomura M, Iwasaki M, Ahn HJ, Bian Y, Hamaoka T, Ohta T, Kurimoto M, Fujiwara H. An absolute requirement for STAT4 and a role for IFN-gamma as an amplifying factor in IL-12 induction of the functional IL-18 receptor complex. *J Immunol.* 2001;167(3):1306–12.
- [101] National Genetics reference Laboratory(Wessex) Conformation sensitive capillary electrophoresis (CSCE). 2007.
- [102] Nordoy I, Muller F, Aukrust P, Froland SS. Adhesion molecules in common variable immunodeficiency (CVID) – a decrease in l-selectinpositive T lymphocytes. *Clin Exp Immunol.* 1998;114(2):258-63.
- [103] North ME, Webster AD, Farrant J. Role of interleukin-2 and interleukin-6 in the mitogen responsiveness of T cells from patients with “commonvariable” hypogammaglobulinaemia. *Clin Exp Immunol.* 1990;81(3):412-6.
- [104] Notarangelo LD, Fischer A, Geha RS, Casanova JL, Chapel H, Conley ME, Cunningham-Rundles C, Etzioni A, Hammarström L, Nonoyama S, Ochs HD, Puck J, Roifman C, Seger R, Wedgwood J. Primary immunodeficiencies: 2009 update. *J Allergy Clin Immunol.* 2009 Dec;124(6):1161-78. Erratum in: *J Allergy Clin Immunol.* 2010;125(3):771-3.
- [105] Nourizadeh M, Aghamohammadi A, Moazzeni SM, Mahdavi M, Rezaei N, Hadjati J. High production of IL-18 by dendritic cells induced by sera from patients with primary antibody deficiency. *Iran J Allergy Asthma Immunol.* 2007;6(2):59–65.
- [106] Okamura H, Tsutsui H, Kashiwamura S. et al. In: *Cytokine Reference.* Oppenheim J.J, Feldmann M. (eds), Academic Press, 2001,1605–1609.
- [107] Pan-Hammarström Q, Salzer U, Du L, Björkander J, Cunningham-Rundles C, Nelson DL, Bacchelli C, Gaspar HB, Offer S, Behrens TW, Grimbacher B, Hammarström L. Reexamining the role of TACI coding variants in common variable immunodeficiency and selective IgA deficiency. *Nat Genet.* 2007;39(4):429–30.
- [108] Piqueras B, Lavenu-Bombled C, Galicier L, Bergeron-van der Cruyssen F, Mouthon L, Chevret S, Debré P, Schmitt C, Oksenhendler E. Common variable immunodeficiency patient classification based on impaired B cell memory differentiation correlates with clinical aspects. *J Clin Immunol.* 2003;23(5):385–400.
- [109] Plebani A, Lougaris V, Soresina A, Meini A, Zunino F, Losi CG, Gatta R, Cattaneo G, Nespoli L, Marinoni M, Capolunghi F, Vivarelli M, Quinti I, Carsetti R. A novel immu-

- nodeficiency characterized by the exclusive presence of transitional B cells unresponsive to CpG. *Immunology*. 2007;121(2):183–8.
- [110] Poodt AEJ, Driessen GJA, de Clein A, van Donge JJJM, van der Burg M, de Vries E. TACI mutations and disease susceptibility in patients with Common Variable Immunodeficiency. *Clin Exp Immunol* 2009;156(1):35-39.
- [111] Pozzi N, Gaetaniello L, Martire B, De Mattia D, Balestrieri B, Cosentini E, Schlossman SF, Duke-Cohan JS, Pignata C. Defective surface expression of attractin on T cells in patients with common variable immunodeficiency (CVID). *Clin Exp Immunol*. 2001;123(1):99-104.
- [112] Punnonen J, Aversa G, Cocks BG, McKenzie AN, Menon S, Zurawski G, de Waal Malefyt R, de Vries JE. Interleukin 13 induces interleukin 4-independent IgG4 and IgE synthesis and CD23 expression by human B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(8):3730-4.
- [113] Rogge L, Barberis-Maino L, Biffi M, Passini N, Presky DH, Gubler U, Sinigaglia F. Selective expression of an interleukin-12 receptor component by human T helper 1 cells. *J Exp Med*. 1997;185(5):825-31.
- [114] Roozendaal R, Carroll MC. Complement receptors CD21 and CD35 in humoral immunity. *Immunol Rev*. 2007;219:157–66.
- [115] Saiki O, Ralph P, Cunningham-Rundles C, Good RA. Three distinct stages of B cell defect in common variable immunodeficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1982;79(19):6008–12.
- [116] Salzer U, Chapel HM, Webster AD, Pan-Hammarstrom Q, Schmitt-Graeff A, Schlesier M, Peter HH, Rockstroh JK, Schneider P, Schiffer AA, Hammarstrom L, Grimbacher B. Mutations in TNFRSF13B encoding TACI are associated with common variable immunodeficiency in humans. *Nat Genet*. 2005;37(8):820–8.
- [117] Salzer U, Grimbacher B. Common variable immunodeficiency: The power of co-stimulation. *Semin Immunol*. 2006;18(6):337–46.
- [118] Salzer U., Grimbacher B. TACItly changing tunes: farewell to a yin and yang of BAF-Receptor and TACI in humoral immunity? New genetic defects in common variable immunodeficiency. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2005;5(6):496–503.
- [119] Salzer U, Maul-Pavicic A, Cunningham-Rundles C, Urschel S, Belohradsky BH, Litzman J, Holm A, Franco JL, Plebani A, Hammarstrom L, Skrabl A, Schwinger W, Grimbacher

- B. ICOS deficiency in patients with common variable immunodeficiency. *Clin Immunol.* 2004;113(3):234–40.
- [120] Sanchez-Ramon S, Radigan L, Yu JE, Bard S, Cunningham-Rundles C. Memory B cells in common variable immunodeficiency: clinical associations and sex differences. *Clin Immunol.* 2008;128(3):314–21.
- [121] Sareneva T, Julkunen I, Matikainen S. IFN- α and IL-12 induce IL-18 receptor gene expression in human NK and T cells. *J Immunol.* 2000;165(4):1933–8.
- [122] Scheeren FA, Nagasawa M, Weijer K, Cupedo T, Kirberg J, Legrand N, Spits H. T cell-independent development and induction of somatic hypermutation in human IgM⁺ IgD⁺ CD27⁺ B cells., *J Exp Med.* 2008;205(9):2033–42.
- [123] Scheinman EJ, Avni O. Transcriptional regulation of GATA3 in T helper cells by the integrated activities of transcription factors downstream of the interleukin-4 receptor and T cell receptor. *J Biol Chem.* 2009;284(5):3037–48.
- [124] Schneider P. The role of APRIL and BAFF in lymphocyte activation. *Curr Opin Immunol.* 2005;17(3):282–9.
- [125] Scott-Taylor TH, Green MR, Eren E, Webster AD. Monocyte derived dendritic cell responses in common variable immunodeficiency. *Clin Exp Immunol.* 2004;138(3):484–90.
- [126] Seshasayee D, Valdez P, Yan M, Dixit VM, Tumas D, Grewal IS. Loss of TACI causes fatal lymphoproliferation and autoimmunity, establishing TACI as an inhibitory B_LY_S receptor. *Immunity.* 2003;18(2):279–88.
- [127] Shi Y, Agematsu K, Ochs HD, Sugane K. Functional analysis of human memory B-cell subpopulations: IgD⁺ CD27⁺ B cells are crucial in secondary immune response by producing high affinity IgM. *Clin Immunol.* 2003;108(2):128–37.
- [128] Shulga-Morskaya S, Dobles M, Walsh ME, Ng LG, MacKay F, Rao SP, Kalled SL, Scott ML. B-cell activating factor belonging to the TNF family acts through separate receptors to support B cell survival and T cell-independent antibody formation. *J Immunol.* 2004;173(4):2331–41.
- [129] Siegel RL. Clinical disorders associated with T cell subset abnormalities. *Adv Pediatr.* 1984;31:447–80.

- [130] Snapper CF, Marcu KB, Zelazowski P. The immunoglobulin class switch: beyond 'accessibility'. *Immunity*. 1997;6(3):217–23.
- [131] Stavnezer J. Molecular processes that regulate class switching. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2000;245(2):127–68.
- [132] Stavnezer J, Guikema JE, Schrader CE. Mechanism and regulation of class switch recombination. *Annu Rev Immunol*. 2008;26:261–92.
- [133] Stavnezer J, Kang J. The Surprising Discovery That TGF beta Specifically Induces the IgA Class Switch. *J Immunol*. 2009;182(1):5–7.
- [134] Stray-Pedersen A, Abrahamsen TG, Froland SS. Primary immunodeficiency diseases in Norway. *J Clin Immunol*. 2000;20(6):477–85.
- [135] Szabo SJ, Dighe AS, Gubler U, Murphy KM. Regulation of the interleukin (IL)-12R beta 2 subunit expression in developing T helper 1 (Th1) and Th2 cells. *J Exp Med*. 1997;185(5):817–24.
- [136] Tangye SG, Good KL. Human IgM⁺CD27⁺ B cells: memory B cells or “memory” B cells? *J Immunol*. 2007;179(1):13–9.
- [137] Taubenheim N, von Hornung M, Durandy A, Warnatz K, Corcoran L, Peter HH, Eibel H. Defined blocks in terminal plasma cell differentiation of common variable immunodeficiency patients. *J Immunol*. 2005;175(8):5498–503.
- [138] Tedder TF, Inaoki M, Sato S. The CD19-CD21 complex regulates signal transduction thresholds governing humoral immunity and autoimmunity, *Immunity*. 1997;6(2):107–18.
- [139] Tierens A, Delabie J, Michiels L, Vandenberghe P, De Wolf-Peeters C. Marginal-zone B cells in the human lymph node and spleen show somatic hypermutations and display clonal expansion. *Blood*. 1999;93(1):226–34.
- [140] Tiller TL Jr, Buckley RH. Transient hypogammaglobulinemia of infancy: review of the literature, clinical and immunologic features of 11 new cases, and long-term follow-up. *Journal of Pediatrics*. 1978;92(3):347–53.
- [141] Tsuiji M, Yurasov S, Velinzon K, Thomas S, Nussenzweig MC, Wardemann H. A checkpoint for autoreactivity in human IgM⁺ memory B cell development. *J Exp Med*. 2006;203(2):393–400.
- [142] Ulgiati D, Holers VM. CR2/CD21 proximal promoter activity is critically dependent on a cell type-specific repressor. *J Immunol*. 2001;167(12):6912–9.

- [143] van Vlasselaer P, Punnonen J, de Vries JE. Transforming growth factor-beta directs IgA switching in human B cells. *J Immunol.* 1992;148(7):2062–7.
- [144] 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):4408–16.
- [145] Vorechovsky I, Zetterquist H, Paganelli R, Koskinen S, Webster AD, Bjorkander J, Smith CI, Hammarstrom L. Family and linkage study of selective IgA deficiency and common variable immunodeficiency. *Clin Immunol Immunopathol.* 1995;77(2):185–92.
- [146] Walker AM, Kemp AS, Hill DJ, Shelton MJ. Features of transient hypogammaglobulinaemia in infants screened for immunological abnormalities. *Archives of Disease in Childhood.* 1994;70(3):183–6.
- [147] Warnatz K, Denz A, Dräger R, Braun M, Groth C, Wolff-Vorbeck G, Eibel H, Schlesier M, Peter HH. Severe deficiency of switched memory B cells (CD27(+)IgM(-)IgD(-)) in subgroups of patients with common variable immunodeficiency: a new approach to classify a heterogeneous disease. *Blood.* 2002;99(5):1544–51.
- [148] Warnatz K, Salzer U, Gutenburger S et al. Finally found: human BAFF-R deficiency causes CVID. XIth Meeting of the European Society for Immunodeficiencies, 2004.
- [149] Webster AD, Kenwright S, Ballard J, Shiner M, Slavin G, Levi AJ, Loewi G, Asherson GL. Nodular lymphoid hyperplasia of the bowel in primary hypogammaglobulinemia study of in-vivo and in-vitro lymphocyte function. *Gut.* 1977;18(5):364–72.
- [150] Wehr C, Eibel H, Masilamani M, Illges H, Schlesier M, Peter HH, Warnatz K. A new CD21low B cell population in the peripheral blood of patients with SLE. *Clin Immunol.* 2004;113(2):161–71.
- [151] Wehr C, Kivioja T, Schmitt C, Ferry B, Witte T, Eren E, Vlkova M, Hernandez M, Detkova D, Bos PR, Poerksen G, von Bernuth H, Baumann U, Goldacker S, Gutenberger S, Schlesier M, Bergeron-van der Cruyssen F, Le Garff M, Debré P, Jacobs R, Jones J, Bateman E, Litzman J, van Hagen PM, Plebani A, Schmidt RE, Thon V, Quinti I, Espanol T, Webster AD, Chapel H, Vihinen M, Oksenhendler E, Peter HH, Warnatz K. The EUROclass trial: defining subgroups in common variable immunodeficiency. *Blood.* 2008;111(1):77–85.

- [152] Weller S, Braun MC, Tan BK, Rosenwald A, Cordier C, Conley ME, Plebani A, Kumararatne DS, Bonnet D, Tournilhac O, Tchernia G, Steiniger B, Staudt LM, Casanova JL, Reynaud CA, Weill JC. Human blood IgM "memory" B cells are circulating splenic marginal zone B cells harboring a prediversified immunoglobulin repertoire. *Blood*. 2004;104(12):3647–54.
- [153] Weller S, Faili A, Aoufouchi S, Gueranger Q, Braun M, Reynaud CA, Weill JC. Hypermutation in human B cells in vivo and in vitro. *Ann N Y Acad Sci*. 2003;987:158-65.
- [154] Weller S, Faili A, Garcia C, Braun MC, Le Deist F F, de Saint Basile G G, Hermine O, Fischer A, Reynaud CA, Weill JC. CD40-CD40L independent Ig gene hypermutation suggests a second B cell diversification pathway in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(3):1166-70.
- [155] Wolpert J, Knutsen AP. Natural history of selective antibody deficiency to bacterial polysaccharide antigens in children. *Pediatr Asthma, Allergy, Immunol*. 1998;12:183–191.
- [156] Xia XZ, Treanor J, Senaldi G, Khare SD, Boone T, Kelley M, Theill LE, Colombero A, Solovyev I, Lee F, McCabe S, Elliott R, Miner K, Hawkins N, Guo J, Stolina M, Yu G, Wang J, Delaney J, Meng SY, Boyle WJ, Hsu H. TACI is a TRAF-interacting receptor for TALL-1, a tumor necrosis factor family member involved in B cell regulation. *J Exp Med*. 2000;192(1):137–43.
- [157] Xu D, Chan WL, Leung BP, Hunter D, Schulz K, Carter RW, McInnes IB, Robinson JH, Liew FY. Selective expression and functions of interleukin 18 receptor on T helper (Th) type 1 but not Th2 cells. *J Exp Med*. 1998;188(8):1485–92.
- [158] Yang M, Hase H, Legarda-Addison D, Varughese L, Seed B, Ting AT. B cell maturation antigen, the receptor for a proliferation-inducing ligand and B cell-activating factor of the TNF family, induces antigen presentation in B cells. *J Immunol*. 2005;175(5):2814–24.
- [159] Yates AB, Shaw SG, Moffitt JE. Spontaneous resolution of profound hypogammaglobulinemia. *Southern Medical Journal*. 2001;94(12):1215–6.
- [160] Youinou P, Jamin C, Pers JO, Berthou C, Saraux A, Renaudineau Y. B lymphocytes are required for development and treatment of autoimmune diseases. *Ann N Y Acad Sci*. 2005;1050:19–33.
- [161] Zandvoort A, Lodewijk ME, de Boer NK, Dammers PM, Kroese FG, Timens W. CD27 expression in the human splenic marginal zone: the infant marginal zone is populated by naive B cells. *Tissue Antigens*. 2001;58(4):234–42.

- [162] Zandvoort A, Timens W. The dual function of the splenic marginal zone: essential for initiation of anti-TI-2 responses but also vital in the general first-line defense against blood-borne antigens. *Clin Exp Immunol.* 2002;130(1):4–11.
- [163] Zelazko M, Carneiro-Sampaio M, Cornejo de Luigi M, Garcia de Olarte D, Porras Madrigal O, Berren Perez R, Cabello A, Rostan MV, Sorensen RU. Primary immunodeficiency diseases in Latin America: first report from eight countries participating in the LAGID (Latin American Group for Primary Immunodeficiency Diseases). *J Clin Immunol.* 1998;18(2):161–6.
- [164] van Zelm MC, Reisli I, van der Burg M, Castaño D, van Noesel CJ, van Tol MJ, Woellner C, Grimbacher B, Patiño PJ, van Dongen JJ, Franco JL. An antibody-deficiency syndrome due to mutations in the CD19 gene. *N Engl J Med.* 2006;354(18):1901–12.
- [165] Zhang K, Accessibility control and machinery of immunoglobulin class switch recombination. *J Leukoc Biol.* 2003;73(3):323-32.
- [166] Zhang L, Radigan L, Salzer U, Behrens TW, Grimbacher B, Diaz G, Bussel J, Cunningham-Rundles C. Transmembrane activator and calcium-modulating cyclophilin ligand interactor mutations in common variable immunodeficiency: Clinical and immunologic outcomes in heterozygotes. *J Allergy Clin Immunol.* 2007;120(5):1178-85.
- [167] Li Z, Woo CJ, Iglesias-Ussel MD, Ronai D, Scharff MD. The generation of antibody diversity through somatic hypermutation and class switch recombination, *Genes Dev.* 2004;18(1):1-11.