

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**A WISKOTT-ALDRICH SZINDRÓMA
MOLEKULÁRIS PATOLÓGIÁJA**

Dr. Gulácsy Vera

Témavezető: Lajszné Dr. Tóth Beáta



DEBRECENI EGYETEM

**PETRÁNYI GYULA KLINIKAI
IMMUNOLÓGIAI ÉS ALLERGOLÓGIAI DOKTORI ISKOLA**

Debrecen, 2014

TARTALOMJEGYZÉK

BEVEZETÉS	5
A WAS MOLEKULÁRIS PATOLÓGIÁJA.....	6
A WAS gén.....	6
A WASP szerkezete és funkciója.....	7
KLINIKAI MANIFESZTÁCIÓK ÉS KEZELÉS.....	10
Thrombocytopenia.....	10
Immundefektus/fertőzések.....	11
Ekcéma.....	12
Autoimmunitás.....	12
Tumorok.....	14
Variáns formák.....	14
XLT.....	14
XLN.....	15
Hordozó nők.....	15
WAS score.....	16
Genotípus-fenotípus korreláció.....	17
Szomatikus reverzió.....	18
A WAS terápiája.....	18
Tüneti kezelés.....	18
Őssejt transzplantáció.....	19
Génterápia.....	20
CÉLKITŰZÉSEK	22
BETEGEK ÉS RUTIN LABORATÓRIUMI, HEMATOLÓGIAI, IMMUNOLÓGIAI MÓDSZEREK	23
Vizsgált betegek és hordozók.....	23
DNS amplifikáció és szekvenálás.....	26
DNS izolálás.....	26
Amplifikációs polimeráz láncreakció.....	26
Agaróz gélelektroforézis.....	26
Szekvenálási PCR és célzott génszekvenálás.....	27
Áramlási citometriás mérések.....	27
Western blot.....	28
T sejt proliferációs vizsgálat.....	28

Podoszóma festés	28
EREDMÉNYEK.....	29
Magyarországi WAS betegek	29
A magyar WAS betegek fenotípusos jellemzői.....	30
Esetismertetések.....	35
A WAS gén mutációk típusai.....	47
Új nagy deléciós WASP mutáció	59
Másodlagos mutációk és szomatikus reverzió	64
MEGBESZÉLÉS.....	67
Magyarországi WAS betegek és hordozók.....	67
WAS gén mutációk közép-kelet-európai, orosz, törökországi és azerbajdzsáni betegekben	70
A WAS gén nagy deléciós mutációi.....	72
Másodlagos WAS gén mutációk és szomatikus reverzió	74
ÖSSZEFOGLALÁS	77
SUMMARY	79
IRODALOMJEGYZÉK	80
TÁRGYSZAVAK.....	94
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	95
FÜGGELÉK.....	96

*“A helyes út nem az elvont elmélkedéshez,
hanem mélyen a tapasztalatba vezet.”*

Paracelsus

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ADA	Adenozin-dezamináz
ADCC	Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ellenanyagfüggő cytotoxicitás)
APC	Antigen-presenting cell (antigénprezentáló sejt)
ARP2/3	Actin-related protein 2/3
BCL-2	B-cell leukemia/lymphoma 2
Cdc42	Cell division cycle 42
CGD	Chronic granulomatous disease (krónikus granulomás betegség)
EDTA	Etilén-diamin-tetraacetát
EVH1	Enabled/VASP (vasodilator-stimulated protein) homology
GBD	GTPase-binding domain (GTPáz-kötő domén)
gDNS	Genomiális DNS
GTP	Guanosin-triphosphate (guanozin-trifoszfát)
HLA	Humán leukocita antigén
ITP	Immun thrombocytopenias purpura
IVIG	Intravénás immunglobulin
iXLT	Intermittent X-linked thrombocytopenia (intermittáló X-kromoszómához kötött thrombocytopenia)
LTR	Long terminal repeats
MPV	Átlagos vérlemezke térfogat (Mean platelet volume)
N-WASP	Neural Wiskott–Aldrich syndrome protein
P	Phosphate (foszfát)
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell (Perifériás vér mononucleáris sejt)
PCR	Polimeráz chain reaction (polimeráz láncreakció)
PPP	Prolin rich region (prolingazdag régió)
SIN	Self-inactivating
VCA	Verprolin homology, cofilin homology and acidic domains
WAS	Wiskott–Aldrich syndrome
WASP	Wiskott–Aldrich syndrome protein
WAVE	WASP family verprolin-homology protein
WIP	WAS interacting protein
XLT	X-linked thrombocytopenia (X-kromoszómához kötött thrombocytopenia)
XLN	X-linked neutropenia (X-kromoszómához kötött neutropenia)

BEVEZETÉS

A Wiskott–Aldrich-szindróma (WAS) X-kromoszómához kötött, recesszíven öröklődő, ritka, primer immunhiányos betegség, amelyet microthrombocytopenia, visszatérő fertőzésekhez vezető kombinált immundefektus és ekcéma jellemez. A betegség gyakorisága 1 millió élve születésre 1–10 közé tehető [Puck, 2006; Ochs, 2009; Ochs és Thrasher, 2006].

Alfred Wiskott német gyermekgyógyász 1937-ben elsőként írta le a betegséget három fiútestvér esetében, akikben röviddel a születésüket követően észlelt véres hasmenés hátterében thrombocytopenia igazolódott, majd a későbbiekben ekcémában és visszatérő középfülgyulladásban szenvedtek [Wiskott, 1937]. Mind a három gyermek gasztrointesztinális vérzés és sepsis következtében hunyt el két éves koruk előtt. *Robert Anderson Aldrich* 1954-ben ismerte fel, a betegség X-kromoszómához kötötten öröklődik, mivel egy hat generációt felölelő családban számos fiú halt meg a korábban *Wiskott* által leírt betegséggel megegyező kórkép következtében, a család női tagjait azonban nem érintette a betegség [Aldrich, 1954]. A kórképet mindezek alapján az 1960-as évektől Wiskott–Aldrich-szindróma néven tartják számon a primer immundeficienciák között.

A WAS legjellemzőbb tünete a **thrombocytopeniás vérzékenység** – amelyet a thrombocytopenia mellett a vérlemezkék funkciózavara okoz –, a bakteriális kórokozókkal szembeni fokozott érzékenységből eredő **ismétlődő fertőzések** és az **ekcéma**. A tünetek az esetek többségében az első életév során jelentkeznek. Típusos esetben már újszülött korban pontszerű bevérzések jelennek meg az érintett fiúgyermekek bőrén, amelyeket véres hasmenés, visszatérő orrvérzés követ, a későbbiekben légúti bakteriális fertőzések alakulnak ki, végül általában az ekcéma jelentkezik utoljára. A három klinikai tünet együtt alkotja a klasszikus WAS-t, ami azonban csak az érintett betegek egyharmadában észlelhető [Ariga, 2012]. Későbbi manifesztációk között szerepelnek az autoimmun betegségek és a malignus lymphoreticularis tumorok. A WAS három variánsa, enyhébb formája: az X-kromoszómához kötött thrombocytopenia (XLT) [Villa, 1995], az intermittáló thrombocytopenia [Notarangelo, 2002, 2008] és az X-kromoszómához kötött súlyos neutropenia (XLN). XLT esetében csupán microthrombocytopenia észlelhető, az ekcéma és a fertőzésekre való fokozott hajlam kevésbé jellemző [Alapi, 2005]. Az intermittáló thrombocytopenia a WAS legkevésbé súlyos fenotípusos formája, jellemzője a thrombocytaszám fluktuációja a normális és a kórosan alacsony tartomány között, a csökkent thrombocyta térfogat, valamint a vérzéses és egyéb tünetek hiánya [Notarangelo, 2002]. XLN esetén visszatérő, bakteriális infekciók, súlyos,

veleszületett neutropenia és monocytopenia hívja fel a figyelmet a genetikai betegségre [Ancliff, 2006; Devriend, 2001].

A betegségért felelős génszakaszt 1994-ben írták le az X kromoszóma rövid karján [Derry, 1994]. A gén 12 exonból áll és egy 502 aminosav hosszúságú fehérjét, a Wiskott-Aldrich szindróma proteint (WASP) kódolja. A WASP-ről igazolták, hogy csak a haematopoietikus sejtek és osteoclastok expresszálják, funkciója az aktin polimerizációjától kezdve a jelátviteli folyamatokon keresztül az immunsejtek működésének irányításáig rendkívül szerteágazó [Ariga, 2012]. WAS betegek jelenlegi egyetlen, végleges gyógyulást biztosító kezelése a HLA-identikus, allogén őssejt transzplantáció [Ozsahin, 2008]. A jelenleg is zajló kutatások alapján alternatív kezelésként a jövőben a génterápia is ígéretesnek tűnik [Boztug, 2006, 2010; Galy, 2011; Qasim, 2009] olyan betegek számára, akik nem rendelkeznek megfelelő őssejt donorral [Notarangelo, 2013].

A WAS MOLEKULÁRIS PATOLÓGIÁJA

A WAS gén

A WAS háttérében az 502 aminosav hosszúságú, 66 kDa molekulatömegű fehérje, a Wiskott–Aldrich-szindróma protein (WASP) hiánya, csökkent mennyisége vagy funkcióvesztése áll, amelyet a *WAS* génen bekövetkezett mutáció okoz [Alapi, 2005; Ochs, 1998]. A fehérjét kódoló gént 1994-ben *Derry* pozicionális klónozással azonosították az X-kromoszóma rövid karján [Derry, 1994]. Az Xp.11.22–23 régióra lokalizált gén közel 9 kilobázis hosszú, és 12 exont tartalmaz [Kwan, 1991; Zhu, 1998].

Mutáció a gén bármelyik exonján kialakulhat; eddig több mint 300 különféle mutációt azonosítottak. A leggyakrabban az első négy exon valamelyikét érinti a mutáció, amely általában misszensz pontmutáció [Jin, 2004; Albert, 2010]. A második leggyakoribb mutáció típusok a STOP kodon képződéssel járó nonszensz mutációk és a splice site defektus mutációk, amelyek többnyire a 6-11 exonon illetve az intronikus szakaszokon következnek be. A génhibák kisebb hányadát a 10 nukleotidnál kisebb szakaszok kivágódásával illetve beépülésével járó deléciók és inszerciók képezik, komplex mutációk és nagy deléciók alig fordulnak elő a WAS génen [Ochs, 2009; Albert, 2010].

Az ismert hat mutációs forrópont (hotspot) közül három a WAS gének az exonikus, a másik három pedig az intronikus szakaszát változtatja meg. Az első két forrópont a kettes exonon kialakuló misszensz mutációk következménye: az ATG-triplettől számított 134.

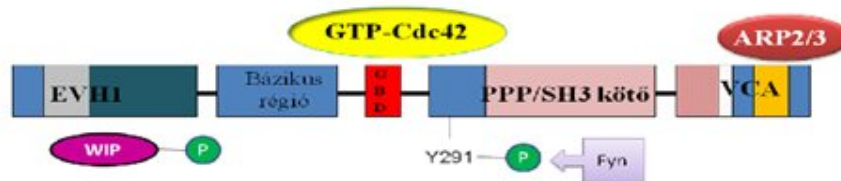
citozin nukleotid timinre cserélődik (c.134C>T) treonin-metionin cserét okozva a 45. aminosav pozíciójában (T45M). Az aminosav sorrendben 86. helyen álló arginin helyett, a kódoló bázis triplet valamelyik tagjának megváltozása miatt, szerin, glicin, cisztein, hisztidin vagy leucin kódolódik (R86S/G/C/H/L). A harmadik exonikus forrópont a hetes exon nonszensz mutációja (c.631C>T): a CGA bázis triplet TGA-ra változik, amely arginin helyett stopkodont eredményez a 211. aminosav pozíciójában. A három leggyakoribb intronikus splice site defektus mutáció a hatos (IVS6+5G>A) és a nyolcas (IVS8+1G>A/C/T; IVS8+1-6delGTGA) intron megváltoztatásával a WASP funkcióvesztését vagy csökkent mennyiségét eredményezi [Jin, 2004; Notarangelo, 2008; Burns, 2004]. Az XLT-ben szenvedő betegek 76%-ában misszensz mutáció áll a háttérben, míg klasszikus WAS esetében a mutáció spektruma széles. Enyhébb WAS-formában általában van kimutatható WASP, míg súlyos WAS esetében a fehérje többnyire teljesen hiányzik. A WASP hiánya vagy jelenléte és a klinikai tünetek súlyossága között szoros összefüggés van, és a reziduális fehérje mennyisége a prognózist is befolyásolja [Imai, 2004]. WASP-pozitív betegek esetében a 10 és a 20 éves túlélés közel 93%, a WASP-negatív betegek várható 10 éves túlélése azonban csupán 76%, a második évtizedet pedig a fehérjét nem termelő betegek kevesebb, mint 1%-a éri meg [Ochs, 2002]. A WAS leggyakoribb, általában halálos szövődménye az intracranialis vérzés, amely a WASP-negatív betegekben rendszerint 30 éves koruk előtt bekövetkezik, de a WASP pozitív betegekben is gyakori, csupán egyharmaduk kerül el az agyvérzést a 30. életév betöltése előtt [Ochs, 2002].

A WASP szerkezete és funkciója

A WASP egy citoszkeletonregulátor proteincsalád tagja, amelyhez a neuronális WASP (N-WASP) és a WASP család verprolinhomológ proteinjei (WAVE 1, 2, 3) is tartoznak. E fehérjék közös jellemzője a C-terminálisan elhelyezkedő VCA domén, amellyel az actin-related protein2/3 (ARP^{2/3}) komplexet képesek aktiválni, és ezáltal új aktinfilamentumok képződését indítják el [Kim, 2000; Burns, 2004, Rotty, 2013]. A WASP számos más eltérő funkciójú doménnel is rendelkezik (1. ábra).

Az EVH1- (Ena/Vasp: enabled/vasodilatatorstimulált foszfoproteinhomológ-1) régió a WASP-interacting proteinnel (WIP) kapcsolódik. A WIP részt vesz az aktinpolimerizáció szabályozásában, stabilizálja az aktinfilamentumokat, valamint SH3-kötő régióival jelátviteli folyamatokban is közreműködik [Burns, 2004]. A WIP továbbá alapvető szerepet tölt be az inaktív WASP stabilizálásában, illetve megelőzi a fehérje degradálódását [Lanzi, 2012]. WIP

hiányában, amely a 2. kromoszómán található WIP gén autoszóm recesszív öröklésmentet mutató mutációja kapcsán is kialakulhat, a WASP szint nagymértékben csökken és ez az eltérés klinikailag WAS fenotípushoz vezet [Lanzi, 2012].



1. ábra. Az aktív Wiskott–Aldrich-szindróma protein (WASP). Az ábrán a fehérje legfontosabb doménjei és ligandjai láthatók. WASP aktivációja során a WIP foszforilálódik, a Fyn kináz foszforilálja a 291 pozícióban lévő tirozint, a nyugvó állapotban zárt hajtú alakú (2. ábra) WASP linearizálódik (megváltozik a harmadlagos szerkezete), a GBD kötőhely megköti a GTP-vel kapcsolt Cdc42-t, valamint a VCA domén az Arp2/3 komplexszel kapcsolódik [Kim, (2000); Burns, (2004), Rotty, (2013) alapján].

A WASP-WIP interakció gátolja a WASP effektor funkcióját. A WASP csak a WIP foszforilálódása után szabadul fel a gátlás alól, amely például lymphocytákban Tsejt-receptor-mediált aktiváció után következik be [Wada, 2003]. A GTP-áz-kötő domén (GBD) a GTP-kötött Cdc42-t képes felismerni és megkötni. A Cdc42 olyan Rho-szerű GTPáz, amely központi szerepet tölt be az aktin-citoskeleton összerendezésében [Wada, 2003]. Inaktív formában a WASP GBD doménje a C-terminális VCA-csoporttal kapcsolódik egy hajtúformát képezve, ezáltal a fehérje autoinhibícióját valósítva meg [Kim, 2000] (2. ábra).

A GBD domént kódoló génszakaszon bekövetkező típusos mutációk a WASP α 1-helix szerkezetének destabilizálódásához vezetnek, a fehérje állandó aktivált formát vesz fel, amely eltérés klinikailag az XLN-t okozza [Devriend, 2001; Ancliff, 2006]. A prolinban gazdag régió számos SH3 doménnel rendelkező jelátviteli molekulával lép interakcióba. A WASP a CD34+ haematopoeticus őssejtekben, valamint a vér összes noneritroid alakos elemében a citoplazmán belül helyezkedik el [Boztug, 2006; Calle, 2004]. Újabban osteoclastokban is azonosították [Ochs, 2005].



2. ábra. Az inaktív Wiskott–Aldrich-szindróma protein (WASP). Nyugvó állapotában a WASP N-terminális VCA doménje a GBD csoporttal kapcsolódik. A két funkcióscsoport így saját ligandjai (Cdc42, ARP2/3) számára nem hozzáférhető, a fehérje ebben a formában inaktív. Kim (2000) alapján.

A WASP alapvető szerepet játszik az aktin-citoszkeleton fenntartásában és minden olyan sejt folyamatban, amely a citoszkeleton átrendeződését igényli. A nyugvó állapotban levő WASP például T-lymphocytákban T-sejt-receptor-mediált aktivációt követően, thrombocytákban kollagén hatására, hízósejtekben pedig IgE-stimulációra, tirozinfoszforiláció eredményeképpen aktiválódik [Burns, 2004]. Az aktivált WASP az Arp2/3 komplexszel kapcsolódva új aktinfilamentumok képzésében vesz részt [Rotty, 2013]. A monocyták és makrofágok IgG mediált fagocitózisa is a WASP jelenlétét igényli, hiányában a fagocitotikus sapka nem alakul ki [Wada, 2003]. A WASP nélkülözhetetlen a makrofágok, dendritikus sejtek és az osteoclastok podoszómaképzéséhez és vándorlásához [Lacout, 2003]. WASP hiányában a makrofágok kórosan megnyúlnak, és csökkent mértékű kemotaxist mutatnak [Lacout, 2003]. WASP-null osteoclastok csontreszorptív képessége is kóros [Ochs, 2005]. A WASP az NK-sejtek funkciójához nagymértékben hozzájárul, mivel a CD16 iniciálta WASP-foszforiláció az NK-sejtek aktiválásában alapvető szerepet játszik [Lacout, 2003], újabb tanulmányok a WAS protein fontosságát az NK sejtek mozgékonyágában és migrációs képességüknek szabályozásában is igazolták [Serrano-Pertierra, 2012]. A WASP az immunológiai szinapszisban halmozódik fel, az immunsejtek, például T-lymphocyták és az antigénprezentáló sejtek (APC) közti kommunikációhoz szükséges citoszkeletonváltozásokat segíti [Burns, 2004]. Az immunológiai szinapszis a T-sejtek és az APC között kialakuló szoros kontaktus, amelyben a jelátadó molekulák tér- és időbeli szerveződése nagymértékben hozzájárul az antigén-felismerés által kiváltott jelhez [Erdei, 2012]. A WASP apoptózisban betöltött funkciója még nem tisztázott, ugyanakkor megfigyelték, hogy WAS-betegek lymphocytáiban csökkent a Bcl-2-expresszió, míg a sejthalált indukáló kaszpáz-3 és CD95 vagy Fas expressziója emelkedett [Wada, 2003]. A WASP-nak fontos szerepe lehet a haematopoeticus progenitor sejtek magzati májból csontvelőbe történő migrációjában is [Burns, 2004, Westerberg, 2005]. Mivel a WASP számos szignálmolekulával képes kapcsolódni, funkciója jelátviteli folyamatokban is jelentős.

KLINIKAI MANIFESZTÁCIÓK ÉS KEZELÉS

Thrombocytopenia

A thrombocytaszám WAS-betegekben nagy egyéni változatosságot mutat, de rendszerint 70 G/l alatti (Referencia tartomány: 150-400 G/L) [Alapi, 2005; Wada, 2003]. A megakariocyták száma és morfológiája többnyire normális, a thrombocyták azonban több szempontból is kórosak [Albert, 2010]. WAS betegekben sokszor tévesen ITP diagnózist állítanak fel a thrombocytopenia miatt, azonban az elkülönítést nagyban segíti a thrombocyta térfogat meghatározása, amely WAS esetében tipikusan 7 fl-nél kisebb (Referencia tartomány: 7.2-11.1 fl) [Alapi, 2005; Wada, 2003], míg ITP-ben normál vagy nagyméretű thrombocytákat detektálunk [Ariga, 2012]. A WAS-beteg thrombocytái egyéb funkcionális és morfológiai eltéréseket is mutatnak: α -granulum-hiány, a citoplazmatikus szervecskék száma csökkent, az aggregációjuk kóros adrenalin, adenzinnal vagy kollagénnel való stimulációra [Wada, 2003]. A thrombocyta-defektusok miatt már korán manifesztálódnak az olyan tünetek, mint a pontszerű bőrvérzés, purpura, vérhányás, véres hasmenés, orrvérzés, ínyvérzés [Zhu, 1997]. Életet veszélyeztető szövődményként súlyos emésztőrendszeri, illetve koponyán belüli vérzés is felléphet, amely a súlyos, refrakter thrombocytopenia mellett észlelhető legnagyobb arányban [Wada, 2003; Mahlaoui, 2013]. Az átlagos thrombocytaszám és a súlyos vérzéses szövődmény valószínűsége között azonban restropektív tanulmányok nem tudtak szignifikáns összefüggést kimutatni, infekciók alatt viszont fokozódik a vérzésveszély [Albert, 2010]. A vérlemezkék feltehetően a lépben vonódnak ki a keringésből, mivel a splenectomia a thrombocytaszám korrekciójához vezet WAS betegekben [Burns, 2004]. A lépeltávolítás azonban nem javasolt azokban a WAS betegekben, akik őssejtátültetésre várnak, mivel súlyos bakteriális fertőzések kockázatát hordozhatja [Ariga, 2012]. A funkcionális defektusok, a hypersplenia mellett autoimmun háttere is lehet a thrombocytopeniának, mivel intravénás immunglobulin adása mellett mérsékelt sejtszám emelkedés tapasztalható [Albert, 2010].

Differenciál diagnosztikai problémaként a thrombocytopenia hátterében legtöbbször ITP, allogén thrombocytopenia, intrauterin vagy perinatalis fertőzések, Fanconi-anaemia, histiocytosis vetődik fel, illetve sokszor a gyermeket ennek megfelelően kezelik. Amennyiben a thrombocytaszám az alkalmazott IVIG, steroid illetve antibiotikum kezelésre sem reagál, a

kromoszóma vizsgálat fokozott törekenységre nem utal, a szövettan a histiocytosis ellen szól, fiúgyermek esetében a WAS lehetőségére mindenképpen gondolnunk kell.

Immundefektus/fertőzések

WAS-ban a humorális és a sejtes immunitás is zavart szenved, mivel a WASP a legtöbb immunsejt vonalban expresszálódik, ezért a T sejt, B sejt, monocyta/makrofág/dendritikus sejt, granulocyta vonalak is érintettek lesznek [Ariga, 2012]. Az életkor előre haladtával a lymphocyták száma mérhetően csökken, a T-lymphocyták specifikus antigének és anti-CD3-ra mutatott proliferációs válasza *in vitro* vizsgálatok során alacsonynak bizonyult [Ochs, 2009; Albert, 2010].

A betegek szérum-IgG-koncentrációja általában a normáltartományban mérhető, az IgM-szint többnyire csökkent, míg az IgA és az IgE szintje emelkedett [Ochs, 2009]. A B-nyiroksejtek mozgékonyasága, vándorlása és kitapadása is kóros [Gismondi, 2004].

A sejtek csökkent válaszkészséget mutatnak a T-sejtfüggő és a T-sejt független antigénnel szemben [Gismondi, 2004], kiemelendő a poliszacharidtokkal bíró baktériumok elleni érzéketlenség. WAS-betegek lépében az egészségesekéhez képest kisebbek a B-sejt zónák, ami a lymphocyták zavart „hazatalálásának” (homing) tulajdonítható [Gismondi, 2004]. Megfigyelték, hogy a B-sejtek sejten belüli kalciummobilizációja is kóros, rövidek a mikrovillusaik, nem válaszolnak megfelelően IL-4- és anti-CD40-stimulációra, alig fejeznek ki CD21/CD35 receptorokat, és más komplementreceptoraik is hiányozhatnak [Boztug, 2006].

Kóros T-lymphocyta funkcióra utal, hogy anti-CD3-ellenanyaggal való aktivációra kevésbé bocsátanak ki IL-2-t a betegek T-nyiroksejtjei, mint az egészséges T-sejtek, és a sejtek felszínéről hiányoznak a mikrobolyhok [Wada, 2003]. A T- és B-sejtek kóros interakcióját jelzi a csökkent memóriasejt-képződés és az izotípusváltás zavara [Zhu, 1997]. A felgyorsult lymphocytaapoptózis következtében a CD4+ és CD8+ nyiroksejtszám 6–8 éves korra erősen csökken [Zhu, 1997]. A kóros T-sejt funkciót jelzi az ismert tény, hogy WAS betegek körében nagyobb arányban fordul elő *Pneumocystis jiroveci* pneumonia is.

WAS-betegek NK-sejtjei is kóros működést mutatnak: a természetes és az ellenanyagfüggő sejtölésben is csökkent a funkciójuk. Ez az eltérés azonban IL-2-szubstitúcióval korrigálható [De Noronha, 2005]. Bár a monocyták és neutrofil fehérvérsejtek száma megfelelő, kemotaxisuk és az Fc- γ -receptor-függő fagocitózis sok esetben zavart szenved [Zhu, 1997]. Az invariáns NKT sejtek, amelyek nevüket arról kapták,

hogy a sejtfelszínükön hordozott T-sejt receptor láncok csekély változatosságot („invariáns”) mutatnak és egészségesekben az autoimmun és tumoros folyamatok hatékony őrei, teljes mértékben hiányoznak WAS betegekből és csökkent számuk mutatható ki XLT esetében is, ami az autoimmun és onkológiai betegségekre való fokozott hajlamra is magyarázatot ad [Albert, 2010].

A dendritikus sejtek működése szintén kóros a podoszómaképzés és a nyirokcsomókba jutás szempontjából [De Noronha, 2005].

A bakteriális fertőzések általában a betegek 6 hónapos kora körül, az anyai IgG-szint csökkenésével párhuzamosan jelentkeznek először. A leggyakoribb fertőzéseket WAS-ban *S. pneumoniae*, b típusú *H. influenzae* és *S. aureus* okozza. Az infekciós kórképek közül kiemelendő a középfülgyulladás, az orrmelléküreg-gyulladás, az alsó légúti fertőzések, súlyos esetben az agyhártyagyulladás és a szepszis. Visszatérő vírusinfekciót számos esetben a *H. simplex* okoz. A gombás megbetegedések fő kórokozói a Candida-törzsek közül kerülnek ki. WAS-betegek tüdőgyulladásának hátterében gyakran *Pneumocystis jiroveci* azonosítható.

Ekcéma

A WAS betegek 80%-ban alakul ki az ekcéma, amely főleg a könyök, a csukló, a mellkas, a térdhajlat, illetve a hát területére lokalizálódik [Imai, 2004]. A száraz, hámló, viszkető, kiemelkedő foltokat a gyermek gyakran elvakarja, ami vérzéshez, illetve fertőzéshez vezethet. Az ekcéma súlyossága nagy variabilitást mutat a betegek között, sok esetben terápia rezisztens formák is előfordulnak. Egyéb allergiás manifesztációként a különböző ételallergiák, szénanátha és asztma fordulhat elő. Az emelkedett szérum össz IgE szint és a Th2 túlsúlyú citokin produkció az atópiás dermatitishez hasonlóan WAS-ban is megfigyelhető, ennek ellenére az ekcéma pontos pathomechanizmusa WAS-ban továbbra is feltáratlan [Trifari, 2006].

Autoimmunitás

Az autoimmun kórképek általában a WAS késői manifesztációi közé tartoznak, ugyanakkor két éves kor előtt is jelentkezhetnek, tanulmányok alapján a betegek 40-70%-ban alakulnak ki és a WAS valamint XLT betegeket is egyaránt érintik [Ariga, 2012; Bosticardo, 2009]. Az autoimmunitás hátterében a WAS betegekből kimutatható károsodott regulatórikus T-sejt funkció és a perifériás tolerancia zavarára állhat [Maillard, 2007]. A regulatórikus T

sejtek, amelyek általában gátló hatású, szabályozó lymphocyták, CD25 expresszióját alacsonynak találták és *in vitro* aktivációt követően ezek a sejtek képtelenek voltak IFN- γ termelésére és az effektor T-sejtek proliferációjának megállítására, valamint *in vivo* a regulatórikus T sejt gyulladt szövetekbe történő migrációja is zavart [Albert, 2010]. A defektív Fas ligand expresszió pedig csökkent Fas-mediált apoptózishoz vezet WAS betegekben [Albert, 2010]. Az emelkedett szérum IgM koncentráció figyelmeztethet autoimmun komplikációkra, de önmagában nem elég specifikus az autoimmun betegségekre [Ochs, 2009].

Az autoimmun kórképek széles skáláját leírták már WAS-betegek esetében. A leggyakrabban autoimmun haemolyticus anaemia (AIHA), bőrre lokalizált illetve viszcerális (agy, bél, tüdő) vasculitis, arthritis, neutropenia, gyulladással járó bélbetegség, IgA-nephropathia, glomerulonephritis, myositis, uveitis, autoimmun thrombocytopenia és autoimmun hepatitis fordul elő [Imai, 2004; Ochs, 2009; Ariga, 2012; Mahlaoui, 2013].

Az autoimmun kórképek közül az AIHA az egyik leggyakoribb és egyéb cytopeniak is társulhatnak mellé. A relapsus hajlam magas és ezek a betegek elhúzódó immunszuppresszív kezelést igényelnek [Mahlaoui, 2013].

Súlyos, konzervatív terápia (transzfúziók) mellett időszakosan sem javuló thrombocytopenia esetében autoimmun etiológiára is gondolnunk kell. Ebben az esetben életveszélyes koponyaűri vagy intesztinális vérzés bármikor bekövetkezhet, az egyedüli hatékony kezelés az őssejt átültetés. Az ITP kezelésében használt új készítmények, mint a romiplostim és az eltrombopag a donor keresés időszakában megelőzhetik a súlyos vérzéses komplikációkat [Mahlaoui, 2013].

Glomerulonephritis az esetek körülbelül 3.5-19%-ban jelentkezik, krónikus veseelégtelenséghez és vese transzplantáció szükségességéhez vezethet [Liu, 2012]. A veseérintettség leggyakoribb formája WAS/XLT betegekben az IgA nephropathia [Liu 2012; Matsukura, 2004]. Ezen betegek szérumában magasabb glikozilálatlan IgA szint és emelkedett IgG-IgA keringő immunkomplex érték figyelhető meg, amely patológiás laboratóriumi paraméterek hiányoznak az autoimmun betegségben nem szenvedő WAS/XLT betegek esetében [Shimizu, 2013]. Az IgA tartalmú immundepozitumok a vese mesangiumában és a glomerulusokban rakódnak le, azok károsodását okozva. Őssejt átültetést követően az immundepozitumok száma jelentősen csökken a vesében, ami az immunrendszerrel korrekciójára utal [Shimizu, 2013].

Az autoimmun komplikációk kezelésében az immunszuppresszív terápia (steroid, IVIG, azathioprin, cyclophosphamid) hozhat átmeneti javulást [Dupois-Girod, 2003]. A végleges

gyógyulást az őssejt transzplantációval érhetjük el, azonban a kimenetelt befolyásolhatja, hogy a kevert kimériszmus miatt az átültetést követően is visszatérhet az autoimmun betegség [Moratto, 2011; Ozsahin, 2008].

Tumorok

Malignus tumorok kialakulásának valószínűsége 10-20% gyakorisággal, fiatal felnőtt, illetve felnőttkorú WAS-betegben a legnagyobb [Imai, 2004; Ochs, 2009]. Leukemia, lymphoma – főleg Epstein–Barr vírus pozitív B-sejtes lymphoma –, myelodysplasia egyaránt előfordul [Wada, 2003]. XLT betegek esetében alacsony a tumorok előfordulási valószínűsége. Néhány mutáció (+5 g>a, 6 intron) az enyhe WAS fenotípus mellett a megfigyelések szerint malignus betegségekre hajlamosít [Shcherbina, 2003]. WAS-ban a malignus betegségekre való fokozott hajlam háttere egyelőre tisztázatlan, azonban annyi bizonyosnak látszik, hogy a cytotoxikus T lymphocyták és NK sejtek csökkent funkciója összefüggésbe hozható a jelenséggel [Ariga, 2012].

Variáns formák

XLT

A WAS gén első 1-4 exonján bekövetkező misszensz vagy splice site defektus típusú mutációk gyakran a WASP csökkenését okozzák, azonban a kevés maradék fehérje miatt a klinikai tünetek általában enyhék [Ariga, 2012]. Ebben a formában a legtöbbször csak a microthrombocytopenia a prezentációs tünete a génhibának. A betegség legenyhébb változatában még a thrombocytopenia sem észlelhető állandóan, ezt a kórformát intermittáló XLT-nek nevezzük [Notarangelo, 2002].

XLT betegek életkilátásai jók, annak ellenére, hogy autoimmun és malignus betegségekre nézve, a klasszikus WAS formában szenvedő betegekhez hasonlóan, magasabb kockázattal bírnak, bár megbízható biomarkerrel nem rendelkezünk ezen események előrejelzésére [Albert, 2010]. Egy tanulmány szerint a leggyakoribb autoimmun manifesztáció az autoimmun nephritis és a hemolitikus anaemia ebben a betegcsoportban, a tumorok közül pedig a lymphoid eredetűek a listavezetők [Albert, 2010]. A tanulmány azt is igazolta, hogy az XLT betegek esetében a fatális vérzéses szövődmény kialakulására életük első 30 évében van a legnagyobb esély. A prognózist meglepő módon nem befolyásolta a WAS gén mutációjának típusa, a WASP protein expresszió hiánya és a profilaktikus

antibiotikum illetve IVIG kezelés sem a vizsgált XLT beteg csoportban. Ugyanakkor a közlemény rávilágított arra a tényre, hogy a splenektómia nem feltétlenül oldotta meg a betegek thrombocytopeniáját viszont egyértelműen emelte a súlyos fertőzések kialakulásának a rizikóját [Albert, 2010].

XLN

A WAS gén három misszensz mutációja (L270P, S272P, I294T) okozza ezt a ritka variáns formát [Devriendt, 2001; Ancliff, 2006]. Mind a három mutáció funkciónyerő, ugyanis a mutációk következtében a WASP autoinhibitorikus szerkezete felbomlik és a fehérje karboxiterminális VCA szegmense folyamatosan szabaddá válik az aktin polimerizáció számára.

Az L270P mutáció következtében kialakuló fenotípusra jellemző, hogy az érintett fiúkban súlyos veleszületett neutropenia és monocytopenia figyelhető meg visszatérő bakteriális fertőzésekkel, az aktivált CD8⁺ T-sejt arány emelkedett, a csontvelői kenetben pedig a promyelocyta/myelocyta stádiumban érési blokk igazolható [Devriendt, 2001; Notarangelo, 2008]. Mindemellett a thrombocyták száma és mérete, valamint a T lymphocyták funkciója többnyire normális [Notarangelo, 2008], azonban néhány esetben a klasszikus WAS-ra jellemző lymphopeniát és proliferációs zavart is kimutatták [Albert, 2010].

Ancliff és munkatársai által leírt két további mutáció kapcsán súlyosabb immunsejt diszfunkció volt kimutatható. Ezek a betegek a normálisnál kevesebb NK sejttel rendelkeztek, a T-sejtek proliferációs válasza csökkent volt, valamint a neutrofil sejtek fagocitózisa és aktivációs képessége is károsodott. További vizsgálatokkal igazolták, hogy a mutáció következtében a sejtek cytokinesise és mitozisa is sérül [Moulding, 2007]. Ezáltal bizonyíthatóvá vált a WASP sejtosztódásban és a genetikai instabilitás kontrollálásában betöltött szerepe [Notarangelo, 2008].

Hordozó nők

A WAS öröklődésmenete szerint a betegség csak fiúkban manifesztálódik, a mutációt szintén genetikai állományukban hordozó nők az esetek nagy többségében klinikailag tünetmentesek. Az irodalomban azonban számos közleményt találhatunk nőnemű WAS és XLT betegekről is [Parolini, 1998; Lutskiy, 2002; Andreu, 2003; Daza-Cajigal, 2013]. Ezekben az esetismertetésekben a nőbetegek a klasszikus WAS fenotípusát mutatják illetve,

az XLT-re jellemzően, thrombocytopeniában szenvednek. Az esetek többségében a betegek családjában másokat is érint a mutáció, de olyan közleményt is olvashatunk, amelyben a bemutatott 8 éves leánygyermekben az egészséges apától származó X-kromoszómán található WAS génen alakult ki spontán sporadikus mutáció és ennek következtében a gyermekben a WAS-ra jellemző klinikai kép [Parolini, 1998].

Normál esetben az anyai és apai eredetű X-kromoszómák random módon inaktiválódnak a nőnemű magzat sejtjeiben, ezáltal a nőkre egyfajta mozaicizmus jellemző [Parolini, 1998]. A szervezet védekező mechanizmusa révén, a mutációt hordozó X-kromoszóma többnyire inaktív formában van jelen a sejtekben, ezekben az esetekben tehát az inaktiváció nem véletlenszerű. A hordozó nők tünetmentességéért a mutáns X-kromoszóma lyonizációja felelős, vagyis a nők két X-kromoszómája közül csak az egyik aktív, a másik kromoszómáról nem történik génátíródás. WAS tünetegyüttesét mutató, hordozó nők esetében azonban sokszor a mutáns X-kromoszóma marad aktív a hematopoetikus sejtek egy részében, míg más sejtekben az ép X-kromoszóma működik, tehát a random inaktiváció révén a mutáns X-kromoszóma is kifejeződhet. Mivel azonban a kifejeződés nem 100%-os, az érintett nőkben a klinikai tünetek általában enyhébb formában manifesztálódnak [Parolini, 1998].

WAS score

A WAS-ban jelentkező klinikai tünetek megléte illetve a tünetek súlyossága alapján pontrendszert állítottak fel, amely 1–5-ig értékeli a betegséget. Intermittáló thrombocytopenia a legenyhébb manifesztációnak tekinthető, amely esetében a pontszám nem éri el az 1-t. XLT-ben a fő prezentációs tünet a mikrothrombocytopenia (1), amennyiben ehhez enyhe fertőzések és ekcéma is társul, a pontszám 2. Klasszikus WAS-ban a három típusos tünet különböző súlyossággal jelenik meg a score táblázatban (1. táblázat). A thrombocytopenia mellett észlelhető perzisztáló, de jó terápiás válaszkészségű ekcéma vagy fertőzések esetén 3 pontszám adható. A súlyosabb 4 pont az ekcéma vagy a fertőzések súlyosabb, terápia rezisztens formáját jelöli. Amennyiben bármilyen autoimmun (A) vagy malignus (M) kórkép jelentkezik a betegben, a WAS score érték a legmagasabb, 5 kategóriának feleltethető meg. A beteg score értéke nem állandó az élete során, bármely életkorban megváltozhat, például autoimmun betegség társulása esetén a korábbi enyhébb 3 érték ebben az esetben 5 pontszámmal súlyozandó [Albert, 2010]. A score érték csupán a felállítás pillanatában észlelhető tünetekre utal, a genotípusra, a WAS protein expresszió mértékére nem

következtethetünk általa és a betegség prognózisának megjósolására sem alkalmas [Albert, 2010].

1. táblázat. A WAS score felállításához szükséges kritérium rendszer

Klinikai score	iXLT	XLT		WAS		
	<1	1	2	3	4	5 (A/M)
Thrombocytopenia	-/+	+	+	+	+	+
Ekcéma	-	-	(+)	+	++	(+)/+/+++
Fertőzések	-	-	(+)	+	+/+++	(+)/+/+++
Autoimmunitás	-	-	-	-	-	+
Malignitás	-	-	-	-	-	+

iXLT, intermittáló X-kromoszómához kötött thrombocytopenia; XLT, X-kromoszómához kötött thrombocytopenia; A, autoimmunitás; M, malignitás; -, hiányzik; (+) enyhe; +, mérsékelten súlyos; ++, súlyos. Zhu, (1997) valamint Ochs és Thrasher, (2006); Ochs, (2009) alapján.

Genotípus-fenotípus korreláció

A genetikai háttér klinikai tünetek formájában való kifejeződése WAS esetében a WASP jelenlététől illetve hiányától nagy arányban függ [Notarangelo, 2008]. Azokban a betegekben, ahol a WAS gén mutációja következtében az expresszálandó fehérje szerkezete nem sérült, csak a mennyisége csökkent, a betegség enyhe formában manifesztálódik, ezen betegek közül kerül ki a legtöbb XLT beteg. A betegek mutációs típusa jellemzően misszensz és többnyire a WAS gén első 1-2 exonján található. A klasszikus WAS fenotípusú betegek többségében a WASP nem kimutatható vagy struktúrájában károsodott fehérje termelődik, amely funkcióját nem képes maradéktalanul ellátni [Notarangelo, 2008]. Ezekre a betegekre többnyire nonszensz és deléciós mutációk jellemzőek.

Autoimmun és malignus kórképek egyaránt kifejlődhetnek mind a WASP pozitív és a WASP negatív csoportban is, de a fehérjét nem expresszáló betegek esetében gyakrabban fordulnak elő [Notarangelo, 2008]. A genetikai mutáció ismeretében és a beteg által

expresszált fehérje mennyisége és minősége alapján következtethetünk a klinikai tünetek súlyosságára [Moratto, 2007] [Lutskiy, 2005].

Szomatikus reverzió

Primer immunhiányos betegségek közül több esetben is (ADA, X-SCID) leírták a reverzió jelenségét, amely során, többnyire egy második mutáció következtében, a betegséget okozó génhiba eltűnik és visszaáll a vad típusra jellemző nukleotid sorrend a hematopoetikus sejtekben, és ezáltal szomatikus mozaicizmust hoz létre [Notarangelo, 2008; Ariga, 2012]. A jelenség WAS esetében is ismert. A reverzió során a beteg prekursor immunsejtjeiben, elsősorban a T, B és NK-sejtek esetében igazolták, kijavítódik a genetikai hiba és a sejtek WASP expressziója is helyreáll. A megfelelően funkcionáló WASP-t expresszáló sejtek előnyhöz jutnak a mutáns őssejtekhez képest és utódaik rövid időn belül túlnövik a kóros sejteket [Notarangelo, 2008; Stewart, 2006]. Ezáltal az immunológiai diszfunkció rendeződik és a betegség klinikai tünetei is javulnak.

A WAS terápia

Tüneti kezelés

A WAS betegek esetében szükséges thrombocytopótlás indikációi nem különböznek a más etiológiájú thrombocytopeniák esetében érvényes kritériumoktól. A transzfúziót megelőzően érdemes megfontolni a jövőbeli őssejtátültetés lehetőségét és a fölösleges immunizáció elkerülése érdekében érdemes választott, szűrt, irradiált thrombocytakészítményt választani.

A splenectomia hatása ellentmondásos a WAS betegek esetében, ugyanis bár a beavatkozás után a thrombocytaszám emelkedése várható, viszont szepszis kialakulásának veszélyét is fokozza a lépeltávolítás. Ezért a műtét ellenjavallt minden olyan beteg esetében, akiben őssejtátültetést terveznek [Ariga, 2012]. Azokat a betegeket, akik mégis splenectomián esnek át, antibiotikum-profilaxisban kell részesíteni, valamint a poliszacharidokkal rendelkező baktériumokkal (*S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *N. meningitidis*) szemben védőoltással kell ellátni. Aszpirin adása WAS-betegek esetében kontraindikált, hiszen gátolja a thrombocyták aggregációját [Cines, 2004].

Enyhe ekcéma kezelésére a hidratálókrémek alkalmasak. Súlyosabb esetben szteroid tartalmú kenőcsök, esetleg belsőleg szteroid alkalmazandó. A szisztémás kezelés időtartamát azonban a szteroid-mellékhatások erősen behatárolják. A kifejezetten súlyos ekcéma kezelésében hatékonynak találták a tacrolimus tartalmú lokális készítményeket [Bienemann, 2007]. WAS-betegek ekcémájának terápiájában hatásos szer lehet az FK506-tartalmú krém is [Ochs, 2002].

Az infekciók megelőzésében alapvető szerepet tölt be az intravénás immunglobulin-szubsztitúció, súlyos herpes vírus fertőzés megelőzésére az acyclovir, *Pneumocystis jiroveci* profilaxisra pedig trimethoprim-sulfamethoxazol alkalmazható. Infekciós szövődmények kezelésében törekedjünk a minél korábban megkezdett, lehetőleg célzott antibiotikum, antifungális és ahol lehetséges, antivirális terápiára. Az élő vírust vagy baktériumot tartalmazó védőoltások WAS-betegek számára kontraindikáltak.

Össejt transzplantáció

Végleges terápiás megoldás lehet a HLA-identikus donortól származó csontvelő-transzplantáció. A korán, lehetőleg az első életév előtt elvégzett össejt átültetés biztosítja a legjobb eredményeket, még a WASP negatív, súlyos manifesztációkkal terhelt betegek esetében is [Notarangelo, 2013]. Akkor a legnagyobb az esély a gyógyulásra, ha a beteg az egészséges testvérétől kapja a HLA-kompatibilitás szempontjából megfelelő csontvelőt. A HLA-identikus rokon donorral végzett beavatkozás 73-100% túlélési aránnyal végezhető [Moratto, 2011; Catucci, 2012]. A rokon, nem megfelelően egyező donorral végzett transzplantáció kimenetele azonban sokkal rosszabb, mindössze 29-52% [Ozsahin, 2008; Catucci, 2012]. Ha nincs testvér, vagy nagyfokú a különbség a testvérek között, a beteg 5 éves koráig meg lehet próbálni idegen donorcsontvelő transzplantációját, amely az esetek 71-81%-ban hozhat sikert [Kobayashi, 2006]. Ez a módszer azonban kevésbé hatékony idősebb gyermekek esetében [Longhurst, 2002]. A csontvelő-eredetű össejtek helyett kiváló eredménnyel alkalmaznak köldökzsinórvérből vett össejteket is fiatal, lehetőleg 25 kg alatti betegek esetében [Wada, 2003]. Az össejtátültetést követően a kimérizmus mértékét feltétlenül követni kell, mert az alacsony donor kimérizmus a beavatkozás sikerét veszélyeztetheti illetve autoimmun komplikációk rizikójával és perzisztáló thrombocytopeniával is járhat [Albert, 2010; Ariga, 2012]. A kevert kimérizmus megelőzhető a transzplantáció előtt alkalmazott myeloablatív kondicionáló kezeléssel. Össejt-transzplantációt követő autoimmun betegségek a kimérizmuson kívül szoros összefüggést

mutatnak a donor típusával is, idegen illetve mismatched donor esetében magasabb a kockázatuk [Ochs, 2009]. XLT betegek transzplantációja kérdéses, bár az alapbetegség autoimmun és malignus szövődményei miatt, a beavatkozást érdemes megfontolni, amennyiben a betegnek van elérhető HLA identikus testvérdonora [Albert, 2010; Ariga, 2012].

Az őssejt transzplantáció, megfelelő körülmények között elvégezve, végleges gyógyulást hozhat a WAS betegeknek. Nem szabad elfelejtenünk azonban, hogy a beavatkozásnak számos szövődménye ismert kezdve az életveszélyes EBV mediált lymphoproliferatív szindrómától, a súlyos fertőzéseken, autoimmunitáson át a graft versus host betegségig. Továbbá a beavatkozásra szoruló betegeknek csupán 1/3-a rendelkezik HLA-identikus donorral, a mismatched donorral végzett transzplantáció során a sikeres engraftment 60% körüli, amely tovább növeli a beavatkozás morbiditását és mortalitását [Kildebeck, 2012]. Éppen ezért a kutatások középpontjában jelenleg a beteg számára kevésbé kockázatos és megterhelő, de ugyancsak kuratív kezelési stratégia, a génterápia áll.

Génterápia

Az elmúlt két évtizedben több primer immunhiány-betegségben alkalmaztak génmódosított őssejt terápiát, amellyel már sikeresen gyógyítottak például közös γ -lánc-defektusban, ADA-deficientiában vagy CGD-ben szenvedő betegeket. Napjainkban WAS betegek számára is megnyílt az út a génterápia irányában. A kezelés lényege, hogy a betegtől izolált CD34 + őssejtekbe vírusvektor segítségével bejuttatják a normális génszekvenciát, és az ily módon transzdukált őssejteket ezt követően autológ transzplantáció során visszajuttatják a beteg szervezetébe [Kildebeck, 2012]. Néhány esetben az effektor vagy regulatorikus T-sejtek bejuttatása is elégséges lehet a megfelelő terápiás hatás kiváltásához [Aiuti, 2012]. Az eddigi megfigyelések arra utalnak, hogy a génterápiában részesült betegekben a WASP-expresszió jól mérhetően megjelenik, a thrombocytaszám emelkedik, az ekcéma és más betegségi tünetek jelentősen javulnak. A génterápia azokban az esetekben jön szóba, amikor sem rokon, sem idegen donor nem áll rendelkezésre transzplantáció céljára [Notarangelo, 2008; Kildebeck, 2012].

A beavatkozás előtt kondicionáló myeloablatív kemoterápia szükséges, amely a módosított őssejtek hosszútávú engraftmentjét segíti [Aiuti, 2012; Fischer, 2013]. Autoimmun komplikációk esetén az autoreaktív lymphocyták eltávolítása is létfontosságú [Aiuti, 2012].

A vírus vektor megválasztása is létfontosságú a lehetséges szövődmények szempontjából. Az első klinikai génterápiás tanulmány során Busulfán kondicionálást követően LTR-vezérelt gammaretrovírus vektort használtak az egészséges génszakasz bejuttatására [Boztug, 2010]. A gammaretrovírus vektorral együtt bevitt erős vírus enhancer azonban olyan, a vektor genotoxicitásáért és haematológiai komplikációk kiváltásáért felelős protoonkogéneket aktivált, mint az LMO2, MDS/Evi1, PRDM16 és a CCND2 [Aiuti, 2012; Zhang, 2013]. A kezelt betegek nagy százalékánál alakult ki a beavatkozást követően néhány éven belül malignus transzformáció, leggyakrabban leukémia és myelodysplasiás szindróma [Aiuti, 2012].

Jelenleg humán promóterek kontrollált lentivírus vektorral zajlik kutatás, amelyet a retrovírusoknál kevésbé genotoxikusnak és így biztonságosabbnak találtak [Notarangelo, 2008; Aiuti, 2012; Fischer, 2013]. A lentivírussal végzett *in vitro* kísérletek során sikeresen tudták visszaállítani a WAS protein expressziót a WAS betegektől származó CD34+ őssejtekben, T-, B-lymphocytákban és dendritikus sejtekben, valamint a TCR-függő aktiváció is megfelelőnek bizonyult [Aiuti, 2012]. Egérmodellek hosszútávú követése során oncogenezisre utaló eltérést eddig nem fedeztek fel. A kutatások rávilágítottak arra, hogy a biztonságos génterápiához néhány szabályt be kell tartanunk, például olyan vírusvektort használjunk, amely nem integrálódik promóterek közelébe, és nem okoz transzgén expressziót; öninaktiváló (SIN) LTR és szigetelő elemek valamint belső humán promóter alkalmazása [Kildebeck, 2012; Zhang, 2013]. A génterápiába fontosságát jelzi, hogy számos más PID (FOXP3 deficiencia, SAP deficiencia, perforin defektus és XLA) esetében is már preklinikai fázisnál tartanak a génterápiás kísérletek [Aiuti, 2012].

CÉLKITŰZÉSEK

1. Magyarországi Wiskott-Aldrich szindrómás betegek diagnosztizálása immunológiai, hematológiai és génvizsgálatok alapján. Genotípusos és fenotípus jellegzetességek elemzése génszekvencia variánsok és klinikai fenotípus jelek közötti összefüggések tanulmányozása.
2. Családvizsgálatok során potenciális hordozók felkutatása és diagnosztizálása. Prenatalis genetikai vizsgálat WAS hordozó nőkben a 10-12. terhességi héten korionboholy mintákból izolált DNS szekvencia analízissel.
3. Közép- és kelet-európai országokból, Oroszországból, Törökországból és Azerbajdzsánból származó WAS betegek mutációinak vizsgálata, a térségre jellemző mutációs spektrum felmérése és összehasonlítása az irodalmi adatokkal.
4. WAS deléciós mutációk molekuláris genetikai elemzése saját eredmények és irodalmi adatok alapján.

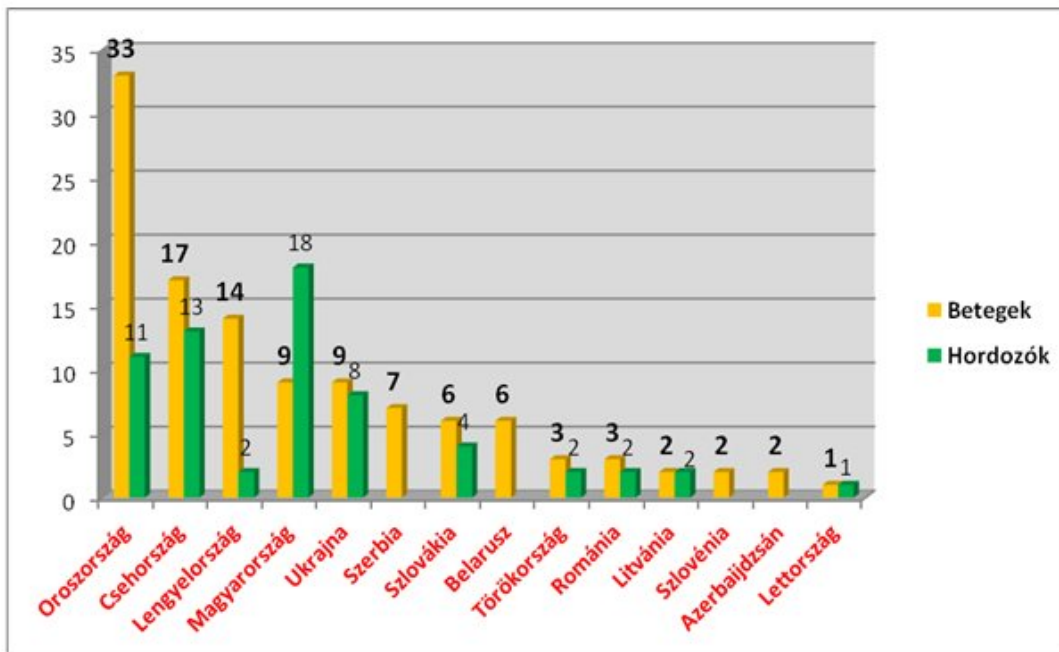
BETEGEK ÉS RUTIN LABORATÓRIUMI, HEMATOLÓGIAI, IMMUNOLÓGIAI MÓDSZEREK

A vizsgálatokat minden esetben megelőzte a vizsgálandó személyek vagy törvényes képviselőjük tájékoztatása és a beleegyező nyilatkozat aláírása a Debreceni Egyetem Orvos és Egészségtudományi Centrum Etikai Bizottsága által meghatározott követelményeknek megfelelően. A genetikai és klinikai kutatáshoz engedélyt adtak a vizsgált országok illetékes hatóságai.

Vizsgált betegek és hordozók

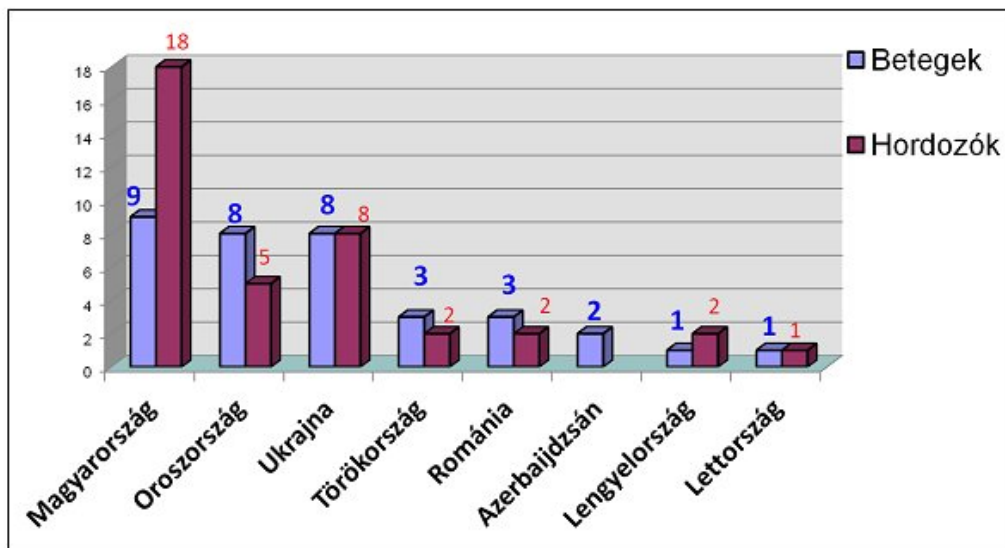
Tizenkettő közép-kelet-európai országból, Törökországból és Azerbajdzsánból származó, 100 egymással nem rokon családból, összesen 177 WAS mutációt hordozó személy (114 hemizigóta fiú és 63 hordozó nő) került be a vizsgálatunkba (3. táblázat). A WAS diagnózisát a típusos klinikai tünetek, mint a mikrothrombocytopenia, ekcéma és visszatérő fertőzések megléte, valamint a laboratóriumi eredmények alapján állítottuk fel. A betegek életkora a diagnózis felállításakor 2 hónap és 23 év közötti volt, átlagosan 3.5 év. A betegek többsége életben volt az adatok gyűjtésekor, azonban a 114 betegből 25 (21.9%) sajnos a betegség szövődésében illetve a kezelés során vesztették idejekorán életüket. Ezek a betegek átlagosan 3.9 évet éltek meg. Az elhunyt betegek általában a WASP fehérje hiányával és következésképpen súlyosabb fenotípussal járó deléció (32%) vagy nonszensz (28%) mutációkkal rendelkeztek, kisebb arányban splice site defektus és misszensz (16%-16%) valamint inszerció (8%) mutáció állt a betegségük hátterében.

Az alábbiakban a résztvevő betegek és a hordozó nők számát ismertetjük nemzetiségük alapján (betegek száma + hordozók száma): orosz (33+11), cseh (17+13), lengyel (14+2), magyar (9+18), ukrán (9+8), szerb (7), szlovák (6+4), török (3+2), román (3+2), litván (2+2), szlovén (2), azerbajdzsáni (2), lett (1+1) (3. ábra).



3. ábra. A vizsgálatban szereplő WAS betegek és hordozó nők száma országok szerint. Összesen 14 ország WAS-ban szenvedő betegek és a tünetmentes hordozó nők adatit rendszereztük. A legtöbb beteg Oroszországból származott, a legtöbb hordozó nőt Magyarországról sikerült összegyűjteni.

Harmincöt fiú és 38 nő (27 magyar, 16 ukrán, 13 orosz, 5 török, 5 román, 3 lengyel, 2 azerbajdzsán és 2 lett) genetikai vizsgálatát az Infektológiai és Gyermekimmunológiai Tanszék molekuláris genetikai laboratóriumában végeztük el (4. ábra), a többi beteg (beteg azonosító szám, 3. táblázat) mutáció analízise az alábbi kutatók nevéhez fűződik: Prof. Shcherbina (No. 12, 22, 27, 28, 33, 56, 61, 69, 79, 91, 92, 93, 97, 100, 109 és 112), Prof. Ochs (pat. 34 és 52), Prof. Klein (No. 24). A cseh és szlovák betegek genetikai vizsgálatára a Masaryk University Primer Immundeficiencia Centrumában, Brnoban került sor négy beteg kivételével (No. 40, 80 és 83 vizsgálatát a Università di Brescia, Clinica Pediatrica, No. 114 vizsgálatát pedig Londonban az Institute of Child Health-ben végezték el).



4. ábra. Debrecenben diagnosztizált WAS betegek és hordozók száma országok szerint. A Tanszékünkön diagnosztizált betegek közül a legtöbben magyar, orosz és ukrán nemzetiségűek. A legtöbb hordozó nő a magyar csoportban azonosítottunk.

A vizsgált személyektől származó vérminták feldolgozása a vérvétel napján megtörtént, vagy a vizsgálat helyére szobahőmérsékleten tárolva juttaták el. Összesen 87 beteg szerepel korábbi közleményekben [Jin, 2004; Boztug, 2006; Boztug, 2008; Gulácsy, 2011]. Prenatalis diagnosztikai vizsgálatot öt magyar és egy orosz beteg (No. 11, 23, 35, 39, 53 és 107) hozzátartozóinál végeztünk. Ezekben az esetekben a genetikai vizsgálatot a terhesség 12. hetében, amniocentesis során nyert korionboholy sejtekből izolált DNS mintán végeztük el [Alapi, 2005].

DNS amplifikáció és szekvenálás

DNS izolálás

Genomiális DNS-t (gDNS) izoláltunk etilén-diamin-tetraacetáttal (EDTA) alvadásgátolt perifériás vérből a Gen ELUTE Blood Genomic DNA mini kit (Sigma-Aldrich Ltd., Germany) használatával standard módszer szerint. A kivont gDNS tisztaságának és koncentrációjának meghatározásához spektrofotométert alkalmaztunk. A DNS koncentrációt a 260 nm-en meghatározott abszorbancia átlagból kalkuláltuk, a tisztaságot a 260, illetve 280 nm-en mért abszorbancia átlagok hányadosa alapján számoltuk ki (normál értéke: 1,7-1,9).

Amplifikációs polimeráz láncreakció

A WAS gén mind a 12 exonját polimeráz láncreakcióval (PCR) felszaporítottuk specifikus intronikus oligonukleotid primer párok használatával. Minden egyes reakcióelegy tartalmazott 12,5 µl JumpStart RedTaq Ready Mixet (Sigma Aldrich, St. Louis, MO), 0,5 µl forward és 0,5 µl reverse primert (10 pmol/ ml koncentráció), 100 ng minta DNS-t (a kivont DNS koncentrációjától függően), desztillált vízzel 25 µl-re kiegészítve. A PCR-hoz a GeneAmp®PCR System 2700 készülékét (Applied Biosystems, Foster City, CA) alkalmaztuk.

Agaróz gélelektroforézis

A PCR eredményességét és a felszaporított DNS fragmentumok méretét agaróz-gélelektroforézissel ellenőriztük az EasyLadder I (100 bp-2000 bp) segítségével (Bioline, London, UK), 2%-os agarózgélt alkalmazva. A DNS-fragmentumok gélben történő detektálására a GelRed (Biotium, Hayward, CA) fluoreszcens jelzést használtunk, amely a DNS-molekulához kapcsolódik és UV fényben piros színben fluoreszkál.

Szekvenálási PCR és célzott génszekvenálás

A Microcon 100 vagy Amicon Ultra 100K (Millipore, Carrigtwohill, Ireland) oszlop használatával bekoncentráljuk, sóalanítjuk és a primerektől megtisztítottuk a PCR terméket. A szekvenálási PCR során a felsokszorozott kétszálú DNS szakaszhoz csak a primer pár egyik tagját adtuk hozzá, így a reakció során egyszálú DNS szakaszt kaptunk felsokszorozott formában. A reakcióhoz normál dNTP-eket és fluoreszcens festékkel jelölt ddNTP-eket használtunk, amelyek, az új szálba véletlenszerűen beépülve, leállították a reakciót. A polimerizáció során eltérő hosszúságú kópiák keletkeztek, amelyek 3'-végen jelölődtek. A reakciót szintén GeneAmp®PCR System 2700 készüléken (Applied Biosystems) végeztük el. A reakció után az elegyet Spin Post-Reaction Purification Columns zselés tisztító oszlopok (Sigma) segítségével megtisztítottuk a gyártó által javasolt protokolnak megfelelően, majd előkészítettük (bepárlás, felvétel formamidba, denaturálás) a mintát a szekvenálásra. A szekvenáláshoz ABI 3130 DNA automata szekvenálót (Applied Biosystems) használtunk.

A szekvenálás során kapott elektroferogrammmok értékeléséhez a GenBank adatbázisát használtuk (WAS gDNS referenciaszáma: Ensembl - NG_007877.1 cDNS referenciaszáma: Ensembl - ENST00000376701) (www.ensembl.org). A nukleotid sorrend számozásakor a cDNS iniciációs kódjának (ATG) az adeninje felelt meg az első pozíciónak. A mutációk nomenklaturájakor a den Dunnen and Antonarakis (2003) ajánlásait követtük (den Dunnen és Antonarakis, 2003). A WAS gén mutációit az ESID által létrehozott Human Gene Mutation Database-ben (HGMD) (<http://www.hgmd.cf.ac.uk>) szereplő mutációkkal vetettük össze.

Áramlási citometriás mérések

A vizsgálathoz EDTA-val alvadásgátolt vért használtunk. Intracellulárisan jelenlévő WAS protein jelöléséhez anti-human-WASP nyúl monoklonális antitestet (Abcam, London, UK) és Alexa Fluor 488 (Cell Signaling, Eugene, OR, USA) másodlagos antitestet alkalmaztunk, IgG2a isotípus kontroll (Sigma-Aldrich) mellett. A mérések a DEOEC III. Belgyógyászat Immunológiai Laboratóriumával kollaborációban történtek.

Western blot

Heparinnal alvadásgátolt vérmintából mononukleáris sejteket (PBMC) izoláltunk Ficol grádiens centrifugálással. A mononukleáris sejtekből total proteint izoláltunk szulfhidril-védő reagens és proteáz inhibitorok jelenléte mellett. Denaturáló poliakrilamid gélelektroforézissel (SDS-PAGE) a fehérjéket méret szerint elválasztottuk, majd polivinildifluorid (PVDF) membránra (Millipore Corp, Billerica, MA) blottoltuk. A membrán szabad felületét 5%-os tejoldattal blokkoltuk. A WAS protein kimutatásához indirekt jelölést használtunk. Az elsődleges antitesttel, anti-humán-WASP nyúl monoklonális antitesttel (Abcam, London, UK) inkubáltuk a membránt, majd mosást követően a másodlagos antitesttel, a torma peroxidáz konjugált kecske anti-nyúl IgG-vel (Sigma-Aldrich) jelöltük. Detektáláshoz kemilumineszcenciás (Thermo Science, Rockford, IL) módszert alkalmaztunk. A kísérletet aktin kontroll mellett végeztük, melyhez elsődleges antitestnek anti-aktin nyúl monoklonális antitestet (Sigma-Aldrich), másodlagos antitestnek torma peroxidáz konjugált kecske anti-nyúl IgG (Sigma-Aldrich) használtunk.

T sejt proliferációs vizsgálat

A vizsgálat a korábbiakban leírtaknak megfelelően történt [Klein, 2003] az alábbi módosításokkal. T sejteket anti-CD3-mal fedett, 96 lyukú tálcára vittük fel humán interleukin-2 (IL-2) hozzáadásával vagy anélkül, a végkoncentráció 10 IU/ml volt. A sejteket 48 órán keresztül stimuláltuk, majd a thymidine felvétel ismételt ellenőrzése mellett, 24 órán keresztül ³H-thymidine-ből (Perkin Elmer, Jügesheim, Németország) 1 uCi (0.037 MBq) mennyiségek kerültek hozzáadásra. A vizsgálat Prof. Dr. Klein laboratóriumában, kollaborációs vizsgálat keretében történt.

Podoszóma festés

CD14+ sejteket jelöltünk anti-CD14 mágneses gyöngyökkel (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Németország) és ezeket a sejteket AutoMACS készülékkel izoláltuk (Miltenyi Biotech). Podosoma vizsgálatot a korábban leírtaknak megfelelően végeztük [Dewey, 2006] Prof. Dr. Klein laboratóriumában, kollaborációs vizsgálat keretében.

Molekuláris analízis

No. 5 és 6 betegektől származó CD3+ lymphocytákat WASP-pozitív illetve WASP-negatív frakciókra választottuk szét. Mindkét frakcióból kivontuk a genomikus DNS-t, amelyet a teljes WAS gén felamplifikálása követett PCR-ral. Az 1-11 exonok esetében az amplifikáció során alkalmazott aniling hőfok 60 C° fok volt, egyedi primer párokat alkalmaztunk [Boztug, 2008]. A 12. exon PCR kondíciók a korábban leírtaknak megfelelőek voltak [Jones, 2002]. A DNS szekvenciát ABI Prism 3130 DNA automata szekvenáló és 3.4 verziójú DNA Sequencing Analysis software (Applied Biosystems) valamint 3.4.1 verziójú Sequencer (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI) segítségével határoztuk meg.

A WASP-pozitív és WASP-negatív sejtekben a WAS gén egyes exonján található számos független, másodlagos helyen létrejött mutáció kimutatására a WASP-pozitív frakcióból származó CD3-CD56+ NK sejtek és a B sejtek (CD3-CD56-CD19+CD20+) amplifikációjával, a fentieknek megfelelően végeztük el. A terméket gélen elválasztottuk és a PCR-Script cloning vectorral (Stratagene, Amsterdam, Hollandia) klónoztuk. A klónok szekvenálását M13 univerzális primerekkel végeztük. A fenti genetikai vizsgálatok Prof. Dr. Klein laboratóriumában kollaborációval történtek.

EREDMÉNYEK

Magyarországi WAS betegek

A vizsgálatunk célja elsősorban a magyarországi WAS családok felkutatása és diagnosztizálása volt. 2004 óta, amióta Magyarországon egyedülálló módon, a Tanszékünkön lehetőség van a WAS gén szekvenálására, összesen 9 családot sikerült azonosítanunk, 9 beteg fiúval és 18 hordozó nővel. A genetikai vizsgálat révén a családtervezést is elősegítettük ezekben a családokban, több prenatalis vizsgálat elvégzésével. Az alábbiakban a magyar WAS betegek részletes adatait ismertetjük, azonosításukra a 3. táblázatban használt beteg számokat alkalmaztuk.

A magyar WAS betegek fenotípusos jellemzői

Thrombocytopenia

Mind a kilenc magyar beteg első prezentációs tünete a különböző súlyosságú thrombocytopenia volt. Az eltérés véres hasmenés és apró bőrvérzések klinikai tüneteivel manifesztálódott a betegekben. Az összes beteg esetében a vérlemezkeszám csökkenését már röviddel a születést követően felfedezték, kivételt képez a 81. beteg, akiben a thrombocytopenia egészen 2 éves koráig, a vérzéses szövődménnyel zajló varicelláig, észrevétlen maradt, valamint a 113. beteg, akiben az első vérképvizsgálatra csak 4.5 hónapos korában került sor. A betegek átlagban legalacsonyabb thrombocytaszáma 20 G/L (Referencia tartomány: 150-400 G/L) körüli illetve az alatti volt. A thrombocyták átlagos térfogata a 7 fl-t (Referencia tartomány: 7.2-11.1 fl) nem érte el illetve csak kevéssel haladta meg a legtöbb beteg esetében a rendelkezésünkre álló adatok alapján. A thrombocytopenia hátterében, szinte az összes betegben, ITP-t illetve perinatalis infekciót gyanítottak és ennek megfelelő kezelést alkalmaztak. Thrombocyta transzfúziót minden beteg kapott, de a vérlemezkeszám emelkedés elmaradt, illetve csak átmeneti volt. A 35. számú beteg thrombocytopeniájának hosszadalmas kivizsgálása a definitív diagnózis felállítását évekkel hosszabbította meg. A kilenc beteg közül az első, 11. számú beteg esetében a thrombocytopenia volt a WAS egyedüli manifesztációja.

Infekciók

Különböző súlyosságú fertőzések, a 11 és 113. számú betegek kivételével, az összes fiút érintették, a legsúlyosabb formában a 35. számú betegben alakultak ki infekciók (pneumonia, Salmonella sepsis). BCG oltást követő, lokális gennyes folyamat 2 beteg (No. 13, 23) esetében alakult ki. A betegek jellemző fertőzései a légutakat érintették, pneumonia több betegben diagnosztizálásra került, egy betegben (No. 13) recidív perianális tályog hívta fel a figyelmet az immunhiányra. Fatális infekció a 39. számú betegben következett be, még mielőtt a beteg kuratív terápiát kaphatott volna. A 19 és 53. számú betegek az összejt transzplantációt követő súlyos fertőzések kapcsán exitáltak.

Ekcéma

Ekcéma a 11. számú beteg kivételével, minden magyar kisfiúnál kialakult, a bőrtünetek eltérő életkorban jelentkeztek, de többnyire már az első életévben leírásra kerültek. Az ekcémás bőrtünetek az alkalmazott hagyományos kezelésekre nem jól reagáltak, a legmakacsabb ekcéma a 35. és 81. számú betegeket érintette.

Autoimmunitás/malignitás

Autoimmun valamint tumoros szövődmények a megfigyelési időszakban a kilencből mindösszesen egy betegben manifesztálódtak. Egyedül a 35. számú betegben észleltünk, feltehetőleg a tartós penicillin profilaxis mellett jelentkező ITP-t, amely IVIG kezelés hatására gyorsan regrediált. Ugyanebben a betegben a rendszeres csontvelő vizsgálat során, a génterápiát követő 7. évben, myelodysplasia jelei mutatkoztak. Egyelőre a beteg szoros obszerváció alatt áll, a későbbiekben köldökzsínórvérrel történő transzplantációját tervezik.

WAS score

A klinikai tünetek megléte alapján felállított WAS score rendszerbe minden beteg beilleszthető, a legkisebb pontszámot a 11. számú beteg kapta, akiben a WAS variáns XLT diagnózisa állítható fel. Természetesen, mivel a gyermek korán részesült kuratív kezelésben, az új tünetek későbbi társulását és ezáltal a pontszám növekedését valamint a klasszikus WAS kritériumainak teljesülését a terápia befolyásolta. A 113. számú beteg score értéke 3, bár a diagnózis felállítását megelőzőleg infekciója még nem zajlott, azonban a klinikai kép, a korán manifesztálódó ekcémával és a kifejezetten súlyos thrombocytopeniával, a klasszikus WAS kritériumait teljesíti. A további hét beteg is a klasszikus WAS-ra jellemző fenotípust mutatta, közülük 3-3 beteg kapott, a tünetek súlyossága alapján 3 illetve 4 pontot. A legsúlyosabb fenotípussal a 35. számú beteg rendelkezik, az ő pontszáma 5.

Laboratóriumi jellemzők

A laboratóriumi eltérések közül jelentős lymphopeniát egyik vizsgált betegben sem észleltünk, de kezelés nélkül az életkor előrehaladtával a lymphocyták depléciója

előrejelezhető. A szérum immunglobulin izotípusok (IgG, IgA, IgM, IgE) általában a korspecifikus normál tartományban voltak mérhetőek, egy-egy betegben a WAS-ra jellemző IgA, IgE emelkedés, 3 betegben IgM csökkenés volt megfigyelhető, a 113. számú beteg emelkedett immunglobulin értékei a megelőző IVIG szubsztitúciót tükrözik. Tartós IVIG kezelést indikáló hypogammaglobulinaemia egyik betegben sem alakult ki.

Terápia

A kilenc magyar beteg közül egy beteg még a kuratív kezelés előtt elhunyt, a többi nyolc beteg közül hét kisfiú részesült őssejtátültetésben, egy beteg pedig génterápiában. A hét transzplantált beteg közül öt beteg gyógyult, jelenleg is egészséges, 2 beteg sajnos exitált. A génterápiában részesült beteg hét évvel a beavatkozást követően egyelőre tünetmentes, de a csontvelő hematológiai paraméterei myelodysplasia jeleit mutatták, emiatt a gyermeket szorosán követjük.

Családi anamnézis

A családi anamnézis csupán 2 beteg esetében volt WAS-ra nézve pozitív, a 11. és 23. számú betegek családjában egy-egy fiú gyermekben WAS állt a korán bekövetkezett haláluk hátterében. A probandok genetikai vizsgálatát követő családszűrés során ezen elhunyt gyermekek édesanyjai az adott családra jellemző mutációk tekintetében hordozónak bizonyultak. A többi beteg esetében vagy nem volt lehetőség a családszűrésre (No. 13, 113), illetve spontán, de novo mutáció okozott betegséget a probandban/máterben (No. 19, 39, 53, 81), valamint a több generációra visszavezethető mutáció a hordozó nőknél lappangott (No. 35).

2. táblázat. Magyar WAS betegek fenotípusos jellemzői[#]

Beteg No.	Klinikai tünetek			WAS score	Thrombocyta paraméterek ¹		Lymph. Szám ¹	Immunglobulin				Kezdeti diagnózis (kezelés)	Kuratív terápia (életkor)	Családi anamnézis
	Thrombocytopenia	Fertőzések	Ekcéma		Szám (G/l)	MPV (fl)		%/G/L	IgG	IgA	IgM			
11.	+	-	-	2	24	7.1	29/2.3	N	N	N	↓	Perinatalis fertőzés (ab) ITP (IVIG)	Össejt átültetés (8 hó)	pozitív
13.	+	+	+	3	9	6.9	28/3.09	N	↑	N	↑	Perinatalis fertőzés (ab)	Össejt átültetés (10 hó)	NA
19.	+	++	+	4	15	NA	20/1.02	N	N	↓	N	NA	Össejt átültetés (4.5 év) †	negatív
23.	+	(+)	+	3	16	7.2	56/2.99	N	N	N	N	Perinatalis fertőzés (ab) ITP (IVIG, steroid)	Össejt átültetés (9 hó)	pozitív

Beteg No.	Klinikai tünetek			WAS score	Thrombocytopenia paraméterek ¹		Lymph. Szám ¹	Immunglobulin				Kezdeti diagnózis (kezelés)	Kuratív terápia (életkor)	Családi anamnézis
	Thrombocytopenia	Fertőzések	Ekcéma		Szám (G/l)	MPV (fl)		%/G/L	IgG	IgA	IgM			
35.	+	++	++	5 (A,M)	<5	6.2	29/2.9	N	N	↓/N	N	Perinatalis fertőzés (ab) ITP (IVIG) Histiocytosis Fanconi anaemia	Génterápia (3.5 év)	negatív
39.	+	++	+	4	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	- †	negatív
53.	+	+	+	3	7	6.3	45.4/1.88	↑	N	↑	N	Perinatalis fertőzés (ab)	Ossejt átültetés (7 hó) †	negatív
81.	+	+	++	4	18	6.1	28.1/2.14	N	N	↓	NA	ITP (IVIG)	Ossejt átültetés (3 év)	negatív
113.	+	-	+	3	5	NA	34.7/2.83	↑	↑	↑	NA	ITP (IVIG)	Ossejt átültetés (6 hó)	negatív

#A táblázatban a 9 magyar beteg fiú WAS-ra jellemző klinikai tüneteit, laboratóriumi paramétereit és kezelését foglaltuk össze.

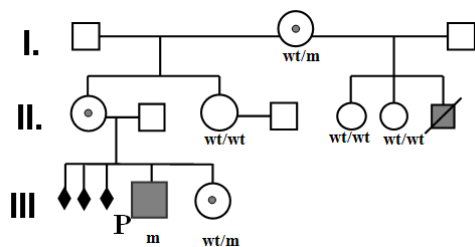
Beteg No., beteg azonosítószám; ¹legalacsonyabb thrombocytopenia-, lymphocytaszám; Lymph, lymphocyták; G/l, giga/liter; MPV, thrombocyták átlagos térfogata; fl, femtoliter; IgG, immunglobulin G izotípus; IgA, immunglobulin A izotípus; IgM, immunglobulin M izotípus; IgE, immunglobulin E izotípus; +, jelen levő tünet; - hiányzó tünet; N, normál; ↓, csökkent; ab, antibiotikum; ITP, immun thrombocytopenias purpura; IVIG; intravénás immunglobulin; ↑, emelkedett; NA, hiányzó adat; †, elhunyt; (+), enyhe tünetek; A,M, autoimmunitás, malignitás.

Referencia tartományok: Thrombocytaszám: 150-400 G/l; MPV: 7.2-11.1 fl; Lymphocyták: 19-41 %; Lymphocyták abszolút szám: 0.9-4.44 G/l;

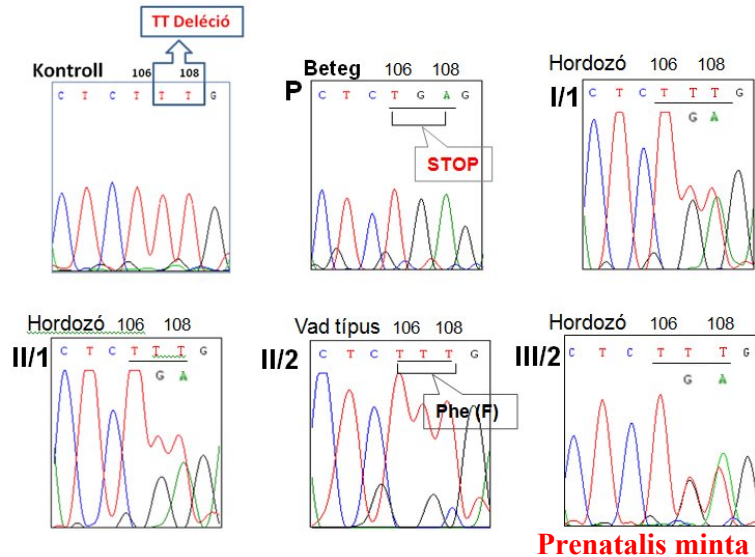
Tíz éves beteg (2-3. táblázat No. 11)

A kisfiú édesanyja negyedik (1 spontán, 2 művi abortusz), zavartalan terhességéből, első élő gyermekként született normál időre és 3150 grammal per vias naturales. A gyermek első életórájában testszerte petechiák jelentkeztek, amely háttérben thrombocytopenia igazolódott. Perinatalis infekció gyanúja miatt 8 napig antibiotikus kezelésben részesült, de a vérlemezke szám nem emelkedett. Egy hónapos korában véresnyákos székletürítés kapcsán kialakult anaemia és perzisztáló thrombocytopeniája miatt transzfúziót igényelt. A családi anamnézis WAS irányában pozitív, mivel a gyermek anyai nagybátyja hasonló tünetektől szenvedett és 8 hónapos korában elhunyt. A gyermek családfáját az 5. ábra szemlélteti.

A kisfiú genetikai vizsgálatával a *WAS* gén első exonján két timin deléciójával járó mutációt igazoltunk (6. ábra), amely eredményeként a 36. aminosav pozícióban a WASP fehérjeszintézise leáll. A mutáció az irodalomban korábban leírt génhiba [Jin, 2004]. A gyermek 8 hónapos korban sikeres allogén őssejtátültetsét hajtottak végre, amely eredményeképpen a thrombocytopeniája megszűnt és a jelenleg 9 éves kisfiú azóta is panaszmentes. A családvizsgálat során lehetőségünk nyílt a gyermek édesanyján kívül több női rokon vizsgálatára is. A gyermek édesanyja és anyai nagymamája hordozza a betegséget okozó mutációt. Három anyai nagynéni vad típusnak bizonyult. Az időközben megfogant testvérben prenatalis vizsgálatot végeztünk a terhesség 12. hetében és a korionboholyból izolált DNS minta szekvenálása során hordozó leánygyermeket azonosítottunk, aki azóta megszületett és egészséges (5. ábra).



5. ábra. A beteg (P) családfája. wt/m, hordozó; wt/wt, vad típus; P, proband; m, mutáció.

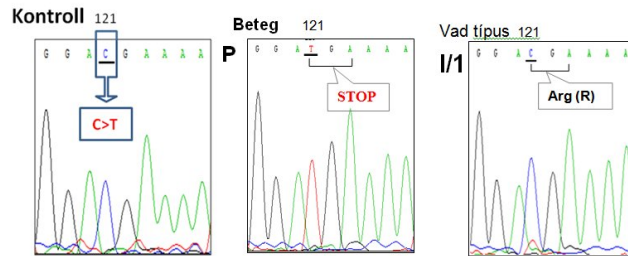
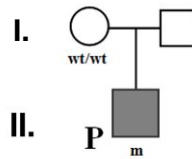


6. ábra. A beteg (P) és családtagjainál végzett mutáció analízis eredményei a WAS génen. A WAS gén 1 exonján két timin deléciójával járó mutációt igazoltunk a 106-108 nukleotid pozícióban, amely eredményeként a 36. aminosavat (Phe, fenilalanin) kódoló triplet stop kodonra cserélődött.

Hét éves gyermek (2-3. táblázat No. 13.)

A következő gyermek első, panaszmentes terhességből 38. hétre született 3250 grammal, per vias naturales. A kisfiú prezentációs tünetei közül a korán manifesztálódó thrombocytopenia, BCG oltást követő suppuráló nyirokcsomó gyulladás, recidív perianális tályog és kezdődő ekcémás bőrtünetek emelhetőek ki. Gravis thrombocytopeniája miatt transfúziót is igényelt. A betegséget okozó mutációt a WAS gén első exonján citozin/timin cserével járó nonszensz mutációként azonosítottuk. A gyermek édesanyja a mutációra nézve vad típusnak bizonyult, tehát a gyermekben a mutáció spontán kialakult de novo mutáció, az irodalomban ez a mutáció korábban leírásra került [Jin, 2004]. A beteg családfáját és a génvizsgálat eredményét a 7. ábra mutatja. A kisfiú édesanyja államilag gondozott gyermek volt, az ő családjáról érdemi információt nem sikerült gyűjtenünk.

A gyermek 10 hónapos korában sikeres allogén őssejtátültetésen ment keresztül, WAS-ra jellemző klinikai tünetei azóta maradéktalanul regrediáltak.

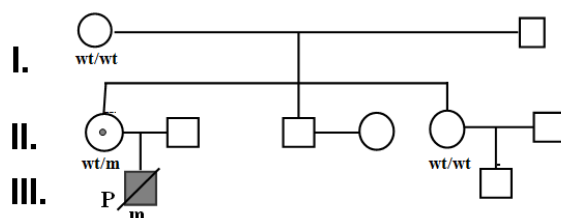


7. ábra. A beteg (P) családfája és mutáció analízis eredményei. wt/wt, vad típus; P, proband; m, mutáció. Genetikai vizsgálat során a WAS gén első exonján citozin/timin cserével járó nonszensz mutációt azonosítottuk a betegben, az édesanyja vad típusnak bizonyult.

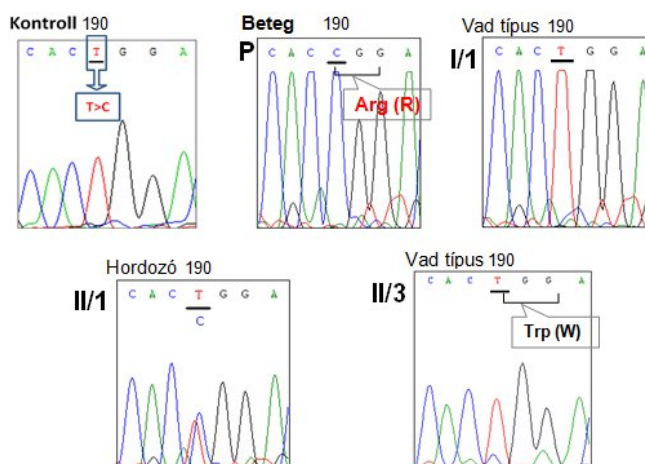
Az öt és fél éves korában exitált gyermek (2-3. táblázat No. 19.)

Első, panaszmentes terhességből született császármetszéssel 3170 grammal. Három napon belül véres bukás, néhány hetesen véres székletürítés, bőrvérzésre utaló tünetek hívták fel a figyelmet a transzfúziót is igénylő thrombocytopeniájára. Több alkalommal zajlott pneumonia, impetigo, csecsemőkorától ekcémás volt. Genetikai vizsgálatra viszonylag későn, négy éves kora után került sor, amely során a WAS gén kettős exonján timin/citozin cserével járó, ismert misszensz mutációt találtunk, a génhiba triptofán/arginin cserét okozott [Jin, 2004]. A gyermek 4.5 éves korában allogén őssejtátültetést kapott, azonban infekciós szövődésben 5.5 éves korában elhunyt. A gyermek családjában egyedül az édesanyjánál sikerült ugyanazt a mutációt megtalálni heterozigóta formában (8. ábra A,B).

A)



B)

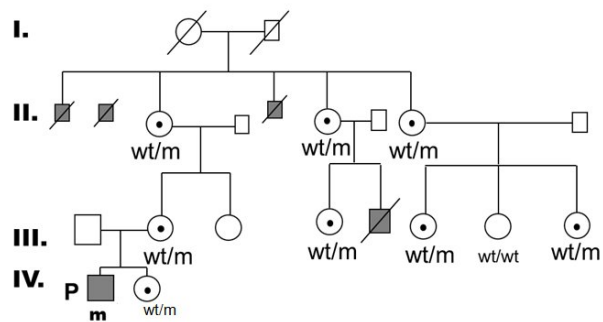


8. ábra. A beteg (P) családfája (A) és az elvégzett genetikai vizsgálat eredményei (B).

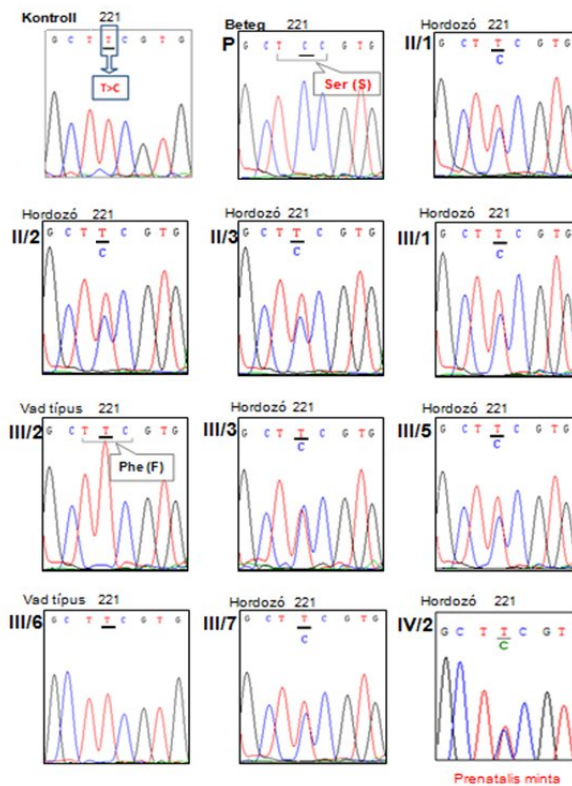
wt/wt, vad típus; wt/m, hordozó; P, proband; m, mutáció. A WAS gén kettes exonján timin/citozin cserével járó misszensz mutációt találtunk, a génhiba a 86. triptofán (Trp) argininre (Arg) cserélődését okozta.

A hat és fél éves kisfiú (2-3. táblázat No. 23.)

A gyermek első, panaszmentes terhességből született természetes úton 3450 grammal. Születést követően észlelték thrombocytopeniáját, amely miatt antibiotikumot és IVIG-et a későbbiekben steroidot is kapott eredménytelenül. Négy hónapos korától ekcémás bőrtünetek jelentkeztek, elgennyedt BCG hegen kívül jelentős infekció nem zajlott. A genetikai vizsgálat a WAS gén kettes exonján ismert fenilalanin/szerin cserével járó misszensz mutációt igazolt [Andreu, 2007]. A gyermek sikeres allogén őssejt transzplantációban részesült 9 hónapos korában. A beteg családjában több fiú mutatott hasonló klinikai tüneteket és ezen betegek korai haláláról számoltak be a szülők. A családszűrés (9. ábra) során számos hordozó nőt tudtunk azonosítani, valamint a későbbiekben a proband leendő testvérében prenatalis vizsgálat elvégzésére is sor került, az eredmény hordozó kislányt igazolt (10. ábra).



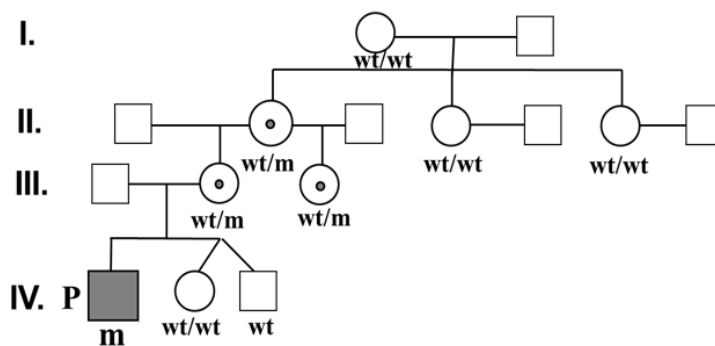
9. ábra. A beteg (P) családfája. wt/m, hordozó; wt/wt, vad típus; P, proband; m, mutáció.



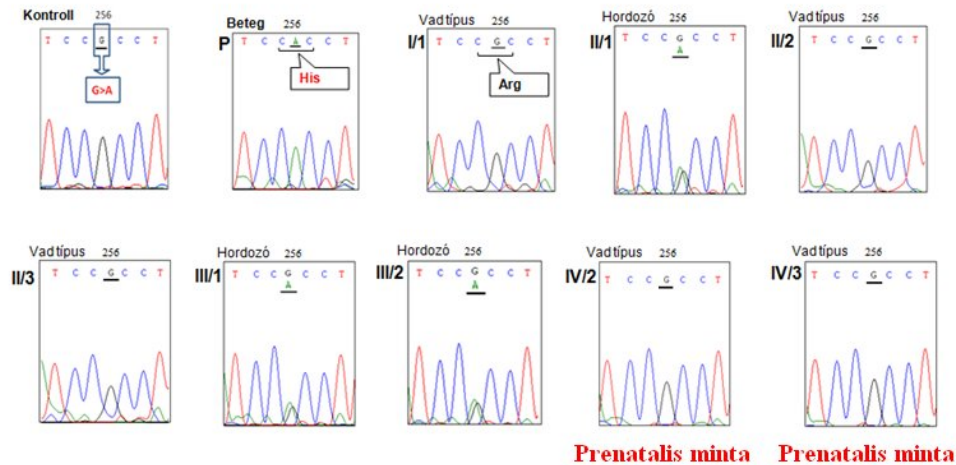
10. ábra. A beteg (P) és családtagjainak mutáció analízis eredményei. Az igazolt génhiba a WAS gén kettes exonján fenilalanin/szerin (Phe/Ser) cserével járt.

A tizenegy éves gyermek (2-3. táblázat No 35.)

Az első, komplikációktól mentes terhességből, 3970 grammal per vias naturales született kisfiúnál néhány órában thrombocytopenia igazolódott. Intrauterin fertőzés gyanúja miatt antibiotikum kezelést és IVIG-et is kapott, de a vérlemezke szám nem emelkedett. Egy éves kora előtt három alkalommal zajlott penumonia. Huszonhat hónapos korában Salmonella sepsis miatt hospitalizálták. Ekcémás bőrtünetei egy éves kora előtt indultak. Súlyos thrombocytopenia és anaemia miatt számos alkalommal kapott transzfúziót. A megfelelő diagnózis felállítása több évet késett, a gyermek esetében Fanconi anaemia és Histiocytosis X is felmerült. A végleges diagnózishoz a genetikai vizsgálat segített hozzá, amely a WAS gén kettős exonján ismert, hotspot mutációt (R86H) mutatott ki [Jin, 2004]. A beteg családjában több hordozó nőt azonosítottunk (11. ábra), valamint prenatalis vizsgálatra is sor került a proband édesanyjának kétpetéjű ikerterhessége során (12. ábra). A gyermek transzplantációját megghiúsította a donorhiány, időközben született kétpetéjű iker testvérei sem voltak HLA identikusak. A beteg egyedüli esélye a túlélésre a kísérleti, retrovírus alapú génterápia volt, amelyet 2006-ban végeztek el Hannóverben. A beavatkozást követő 7 évben a gyermek lényegében tünetmentessé vált, a laboratóriumi paraméterek is alátámasztották a klinikai javulást. A beavatkozást követő hetedik évben azonban a csontvelő vizsgálat myelodysplasia-ra utaló eltérést igazolt, emiatt a gyermek ismételtén őssejttranszplantációs programba került.



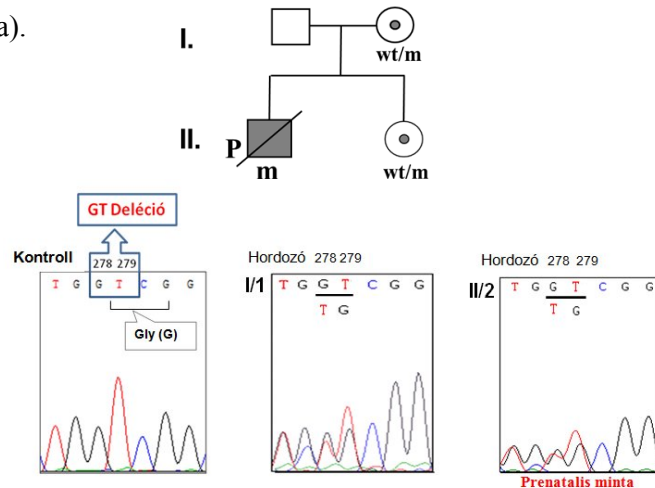
11. ábra. A beteg (P) családfája. wt/m, hordozó; wt/wt, vad típus; P, proband; m, mutáció.



12. ábra. A beteg (P) és családtagok genetikai vizsgálati eredményei. A WAS gén kettes exonján ismert, hotspot mutációt (Arg/His, Arginin/Hisztidin) találtunk.

A négy évesen exitált beteg (2-3. táblázat No. 39.)

A beteg a klasszikus WAS tüneteitől szenvedett, de részletes anamnézise és laboratóriumi eredményei nem állnak a rendelkezésünkre. A gyermek genetikai vizsgálata külföldön történt, amely a hármas exon elején található GT bázisok delécióját eredményezte [Zhu, 1997; Jin, 2004]. A beteg kuratív kezelés nélkül, négy éves korában súlyos infekciós szövődmény következtében hunyt el. Tanszékünkön a gyermek édesanyjánál, majd a későbbiekben prenatális vizsgálat keretében, a születendő leány testvérében is igazoltuk a génhibát (13. ábra).



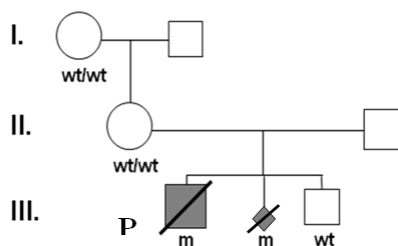
13. ábra. A beteg (P) családfája és a női családtagok genetikai eredményei. wt/m, hordozó; P, proband; m, mutáció; Gly, glicin. A családra jellemző génhiba a hármas exon elején található GT bázisok delécióját eredményezte.

A hét hónapos korában exitált kisfiú (2-3. táblázat No 53.)

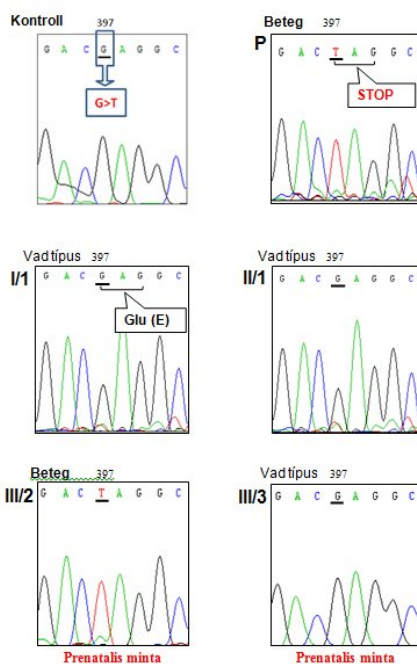
A gyermek 39. terhességi héten, 3400 grammal született per vias naturales APGAR 10/10 státusszal. Születésekor bőrén testszerte haematomákat észleltek, az elvégzett vékép vizsgálat thrombocytopeniát igazolt (thrombocytaszám: 49 G/L; Referencia tartomány: 150-400 G/L). Intrauterin infekció gyanúja miatt parenterális antibiotikumot kapott, a kezelés mellett a thrombocytaszám minimális emelkedést mutatott. Egy hónapos korától kezdődően több alkalommal zajlott purulens conjunctivitis, székletében számos alkalommal láttak friss vért. Ezzel egyidőben bőrén ekcémás bőrtünetek is megjelentek. Súlyos trombocytopenia és anaemia miatt több alkalommal részesült transzfúzióban, de thrombocytaszáma továbbra is átlagosan 10 G/L körül volt mérhető csökkent thrombocyta térfogat mellett (MPV: 6.3-6,8 fl; Referencia tartomány: 7.2-11.2 fl). A beteg genetikai vizsgálatára 2 hónapos korában került sor, amely során a WASP gén 4. exonján G/T cserével járó nonszensz mutációt igazolt, amely génhiba az irodalomban korábban még nem került leírásra. A gyermek édesanyjában és anyai nagymamájában a mutáció nem volt kimutatható. A családi anamnézis WAS irányában negatív.

A kisfiú haploidentikus allogén őssejtátültetésben részesült 6 hónapos korában, azonban súlyos komplikációk léptek fel és a gyermek egy hónappal a beavatkozást követően elhunyt. Későbbiekben a család ismételten gyermeket vállalt, a prenatalis vizsgálat azonban a fiú magzatnál ugyanazt a mutációt igazolta, mint a 39. számú betegben, így a terhességet megszakították. A harmadik terhességben elvégzett prenatalis genetikai szűrés végre megnyugtató eredményt hozott, az ugyancsak fiú magzat ezúttal vad típusnak bizonyult és egészségesen jöhetett a világra (14. ábra).

A)



B)

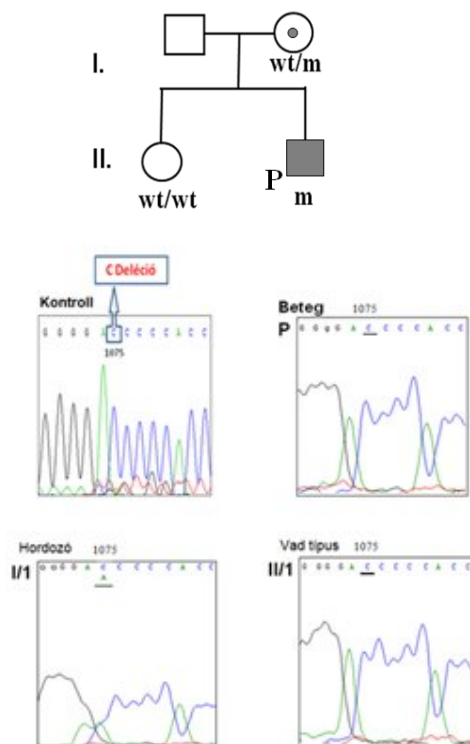


14. ábra. A beteg (P) családfája (A) valamint a családtagok genetikai vizsgálatainak eredményei (B). wt/wt, vad típus; P, proband; m, mutáció. A betegben a WAS gén 4. exonján G/T cserével járó nonszensz mutációt találtunk.

A tizenegy és fél éves beteg (2-3. táblázat No. 81.)

A kisfiú második, komplikációmentes terhességből született 3500 grammal terminusra. Thrombocytopeniájára 2 éves korában, haemorrhagiás varicella kapcsán derült fény. A gyermek ITP diagnózissal nagy dózisú IVIG kezelésben részesült, de a thrombocytaszámban érdemi változást nem észleltek (thrombocytaszám: 18-40 G/L; Referencia tartomány: 150-400 G/L). A varicella lezajlását követően testszerte ekcémás bőrjelenségek is kialakultak. Emellett elhúzódó sinusitis miatti antibiotikum kezelés szerepelt a gyermek anamnézisében. A klasszikus WAS-ra jellemző tünetegyüttes háttérében a

genetikai vizsgálat a WAS gén 10. exonján egy citozin deléciójával járó pathogén mutációt tárt fel [Zhu, 1997]. A családtagok vizsgálata az édesanya hordozói státuszát igazolta, míg a gyermek leánytestvére nem örökölte a génhibát. A kisfiú családjában korábban anyai ágon WAS beteg nem fordult elő (15. ábra).



15. ábra. A beteg (P) családfája valamint a genetikai vizsgálatok eredményei. wt/m, hordozó; wt/wt, vad típus; P, proband; m, mutáció. WAS gén 10. exonján egy citozin deléciójával járó pathogén mutációt azonosítottunk.

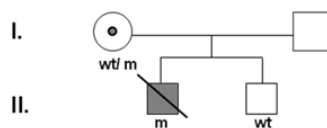
A kettő éves gyermek (2-3. táblázat No 113.)

A kisfiú 1/1 zavartalan várandóságot követően 39. hétre született 3320 grammal. A perinatális időszak eseménytelen volt, azonban a későbbiekben makacs szájpenész alakult ki a gyermekben. Egy hónapos korában a talpán és később testszerte észleltek pontszerű bőrvérzéseket, 3 hónapos korától ekcémás bőrtünetek jelentkeztek. Négy és fél hónapos korában véres hasmenés miatt hospitalizálták, az akkor készült vérkép vizsgálat transzfúziót igénylő súlyos thrombocytopeniát (Thr: 5 G/L) és anaemiát igazolt. További ellátásként IVIG

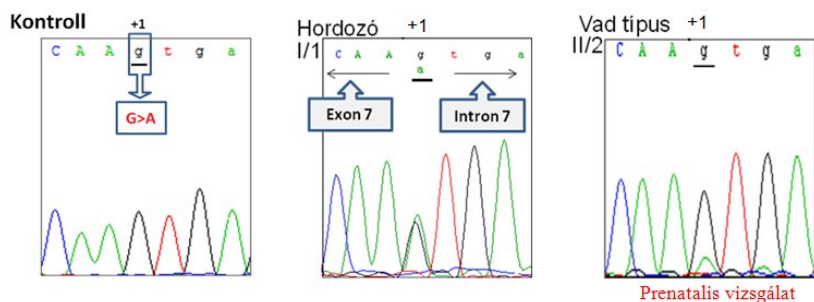
Prenatalis vizsgálat orosz hordozó nőben

Az orosz kisfiúnál (No. 107.; II/1) egy éves korában diagnosztizálták a WAS-t, a gyermek sajnos a betegség szövődményei következtében, 15 hónapos korában elhunyt. A gyermek édesanyjánál (I/1) sikerült kimutatnunk a betegséget okozó mutációt a WAS gén 7 intronján egy G>A cserével járó splice site defektus formájában, így anya a betegségre nézve hordozónak bizonyult. A későbbiekben az édesanya ismételten áldott állapotba került és prenatalis vizsgálat elvégzését kérték. A mintavétel Oroszországban történt meg, a laboratóriumunkba elküldték a magzat DNS-ét. A foetusról bebizonyosodott, hogy fiú nemű, így a genetikai vizsgálat eredménye még nagyobb hangsúlyt kapott. Az elvégzett mutáció analízis azonban szerencsére vad típust igazolt, így a kisfiú egészségesen jöhetett a világra (17. ábra).

A)



B)

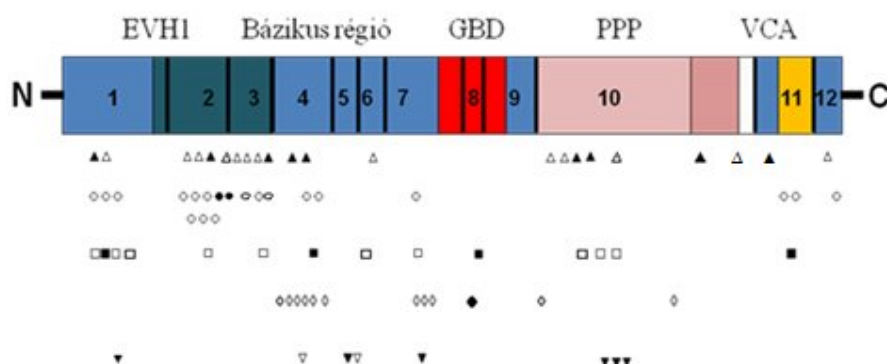


17. ábra. Orosz hordozó nő prenatalis vizsgálata, amely egészséges fiút igazolt. A) családfa, wt/m, hordozó; m, mutáció, wt; vad típus, B) genetikai vizsgálat eredményei.

A továbbiakban az eredmények közlését a 14 országból származó, 114 betegét reprezentáló nagy WAS betegcsoportban végzett genetikai vizsgálatok összefoglalásával folytatjuk.

A WAS gén mutációk típusai

A vizsgált közép-kelet-európai, orosz, török és azerbajdzsáni betegeket reprezentáló WAS beteg populációban összesen 77 különböző WAS gén mutációt azonosítottunk, ebből 22 mutációt az irodalomban eddig még nem írtak le. A kimutatott mutációk közül 34 egyszerű bázispár cserével járó mutáció (20 misszensz és 14 nonszensz mutáció), 20 kisméretű, 2 nagy deléció és 1 komplex (InDel) mutáció, 12 splice site defektus és 8 kisméretű inszerció volt (18. ábra, 3. táblázat).



18. ábra. A WAS gén domén szerkezete és az azonosított mutációk elhelyezkedése. EVH1, Enabled/VASP (vasodilator-stimulated protein) homology 1; GBD, GTPase-binding domain; PPP, Proline rich region; VCA, Verprolin homology, cofilin homology, and acidic domains. A szimbólumok jelentése: deléciók (Δ), misszensz (\circ), nonszensz (\square), splice site defektusok (\diamond) és inszerciók (∇) mutációk. A fekete színnel kitöltött jelek az új mutációkat jelölik.

3. táblázat. A vizsgált WAS betegek demográfiai adatai és mutációi.

Bet. No.	Ország	Életkor (év)		Exon	Nucleotide változás cDNA	Mutáció típusa	Fehérje változás
		Diagnózis idején	É / †				
1.	Azerbajdzsán	3	É	1	12_13insGG	Inszerció	Gly4fsX41
2.	◀ Azerbajdzsán	2 hó	É	1	12_13insGG	Inszerció	Gly4fsX41
3.	Oroszország	8 hó	É	1	18delG	Deléció	Met6fsX44
4.	Oroszország	4 hó	19 hó †	1	37C>T	Nonszensz	Arg13Stop
5.	Ukrajna	4.5	É	1	58C>T	Nonszensz	Gln20Stop
6.	♠ Ukrajna	2.5	É	1	58C>T	Nonszensz	Gln20Stop
7.	Szerbia	9 hó	12 †	1	70T>C	Misszensz	Ser24Pro
8.	Litvánia	3	É	1	91G>A	Misszensz	Glu31Lys
9.	Oroszország	2	É	1	91G>A	Misszensz	Glu31Lys
10.	Lengyelország	1	É	1	100C>T	Nonszensz	Arg34Stop
11.	Magyarország	1 hó	É	1	107-108 delTT	Deléció	Phe36fsX36
12.	Oroszország	22 hó	É	1	116T>C	Misszensz	Leu39Pro
13.	Magyarország	4 hó	É	1	121C>T	Nonszensz	Arg41Stop
14.	Cseh Köztársaság	16 hó	4.5 †	1	121C>T	Nonszensz	Arg41Stop
15.	Oroszország	3	É	1	121C>T	Nonszensz	Arg41Stop
16.	Szlovénia	5	É	2	134C>T	Misszensz	Thr45Met
17.	Oroszország	3	É	2	134C>T	Misszensz	Thr45Met
18.	Törökország	11 hó	É	2	172-176delC	Deléció	Pro58fsX74
19.	Magyarország	4	5.5 †	2	190T>C	Misszensz	Trp64Arg
20.	Szerbia	NA	É	2	190T>C	Misszensz	Trp64Arg
21.	Szerbia	5	É	2	199G>T	Nonszensz	Glu67Stop
22.	Oroszország	14 hó	NA	2	221T>C	Misszensz	Phe74Ser

Bet. No.	Ország	Életkor (év)		Exon	Nucleotide változás cDNA	Mutáció típusa	Fehérje változás
		Diagnózis idején	É / †				
23.	Magyarország	7 hó	É	2	221T>C	Misszensz	Phe74Ser
24.	Oroszország	11	É	2	223G>A	Misszensz	Val75Met
25.	Lengyelország	13 hó	É	2	223G>A	Misszensz	Val75Met
26.	Belorusszia	5	É	2	229G>C	Misszensz	Asp77His
27.	Oroszország	4	É	2	239A>G	Misszensz	Gln80Arg
28.	Oroszország	7	É	2	239A>G	Misszensz	Gln80Arg
29.	Szerbia	5	É	2	245-246delC	Deléció	Ser82fsX126
30.	Cseh Köztársaság	4	É	2	247-249delTAC	Deléció	del83Tyr
31.	Lengyelország	NA	NA	2	256C>T	Misszensz	Arg86Cys
32. □	Lengyelország	5	É	2	256C>T	Misszensz	Arg86Cys
33.	Oroszország	3	É	2	257G>A	Misszensz	Arg86His
34.	Oroszország	1	É	2	257G>A	Misszensz	Arg86His
35.	Magyarország	2	É	2	257G>A	Misszensz	Arg86His
36.	Belorusszia	23	É	2	257G>A	Misszensz	Arg86His
37.	Belorusszia	2	É	2	257G>A	Misszensz	Arg86His
38.	Szlovákia	13 hó	É	2	262T>C	Misszensz	Tyr88His
39.	Magyarország	3.5	4 †	3	278-279 delGT	Deléció	Gly93fsX120
40.	Cseh Köztársaság	4 hó	2 †	3	291G>A	Nonszensz	Trp97Stop
41.	Belorusszia	12	É	3	314C>T	Misszensz	Leu105Pro
42.	Lengyelország	5	†	3	323-332del10bp	Deléció	Ser108fsX123
43.	Cseh Köztársaság	NA	2 †	3	326-360delC	Deléció	Pro110fsX126
44.	Cseh Köztársaság	8 hó	4 †	3	332-336delC	Deléció	Pro112fsX126

Bet. No.	Ország	Életkor (év)		Exon	Nucleotide változás cDNA	Mutáció típusa	Fehérje változás
		Diagnózis idején	É / †				
45. ♦	Cseh Köztársaság	NA	É	3	355G>A	Misszensz	Gly119Arg
46.	Cseh Köztársaság	6	É	3	355G>A	Misszensz	Gly119Arg
47. ♦	Cseh Köztársaság	6 hó	É	3	355G>A	Misszensz	Gly119Arg
48. ♦	Cseh Köztársaság	5 hó	É	3	355G>A	Misszensz	Gly119Arg
49.	Oroszország	4	É	3	359delA	Deléció	Asp120fsX126
50.	Lengyelország	6	É	4	397G>A	Misszensz	Glu133Lys
51. ♢	Lengyelország	NA	NA	4	397G>A	Misszensz	Glu133Lys
52.	Oroszország	11 hó	É	4	397G>A	Misszensz	Glu133Lys
53.	Magyarország	2 hó	7 hó †	4	397G>T	Nonszensz	Glu133Stop
54.	Lengyelország	1	É	4	400G>A	Misszensz	Ala134Thr
55.	Törökország	6 hó	É	4	413-415delG	Deléció	Arg138fsX260
56.	Oroszország	2	NA	4	437-443insA	Inszerció	Gln146fsX168
57.	Szerbia	12	22†	5	478-483insC	Inszerció	Pro160fsX168
58. #	Szerbia	8	16 †	5	478-483insC	Inszerció	Pro160fsX168
59.	Cseh Köztársaság	13	É	5	501-502insT	Inszerció	Glu168fsX168
60. □	Cseh Köztársaság	9 hó	É	5	501-502insT	Inszerció	Glu168fsX168
61.	Oroszország	2	4 †	6	531delG	Deléció	Lys177fsX260
62.	Cseh Köztársaság	3 hó	É	6	553C>T	Nonszensz	Gln185Stop
63.	Oroszország	9 hó	É	7	631C>T	Nonszensz	Arg211Stop
64.	Oroszország	8 hó	É	7	631C>T	Nonszensz	Arg211Stop
65.	Lettország	8 hó	É	7	631C>T	Nonszensz	Arg211Stop

Bet. No.	Ország	Életkor (év)		Exon	Nucleotide változás cDNA	Mutáció típusa	Fehérje változás
		Diagnózis idején	É / †				
66.	Lengyelország	18 hó	†	7	631C>T	Nonszensz	Arg211Stop
67.	Ukrajna	NA	NA	7	645-648insC	Inszerció	Lys215fsX260
68.	Oroszország	2 hó	É	7	671A>G	Misszensz	Asp224Gly
69.	Oroszország	3 hó	É	7	671A>G	Misszensz	Asp224Gly
70.	Litvánia	2 hó	†	7	671A>G	Misszensz	Asp224Gly
71.	Lengyelország	3 hó	É	7	671A>G	Misszensz	Asp224Gly
72.	Lengyelország	1	†	7	671A>G	Misszensz	Asp224Gly
73.	Szlovákia	33 hó	†	8	763C>T	Nonszensz	Gln255Stop
74.	Ukrajna	9	É	10	961C>T	Nonszensz	Arg321Stop
75.	Belorusszia	2	É	10	961C>T	Nonszensz	Arg321Stop
76.	Belorusszia	3	É	10	964G>T	Nonszensz	Gly322Stop
77.	Szlovákia	NA	É	10	1037delC	Deléció	Pro346fsX444
78. Δ	Szlovákia	7 hó	É	10	1037delC	Deléció	Pro346fsX444
79.	Oroszország	3 hó	É	10	1046-1047ins T	Inszerció	Ile349fsX494
80.	Cseh Köztársaság	3 hó	É	10	1070-1074insG	Inszerció	Gly358fsX494
81.	Magyarország	2.5	É	10	1075delC	Deléció	Pro359fsX444
82.	Lengyelország	4	É	10	1090C>T	Nonszensz	Arg364Stop
83.	Cseh Köztársaság	3	É	10	1097delG	Deléció	Gly366fsX444
84.	Ukrajna	5	É	10	1157delC	Deléció	Pro386fsX444
85.	Ukrajna	3	4†	10	1223-1224delAT	Deléció	Ser408fsX494
86.	Cseh Köztársaság	3 hó	É	10	1237-1241insC	Inszerció	Lys415fsX494
87.	Románia	6 hó	É	IVS10 +E10+ IVS11 +E11	g.5247_6841 del1595insA	Komplex	frameshift

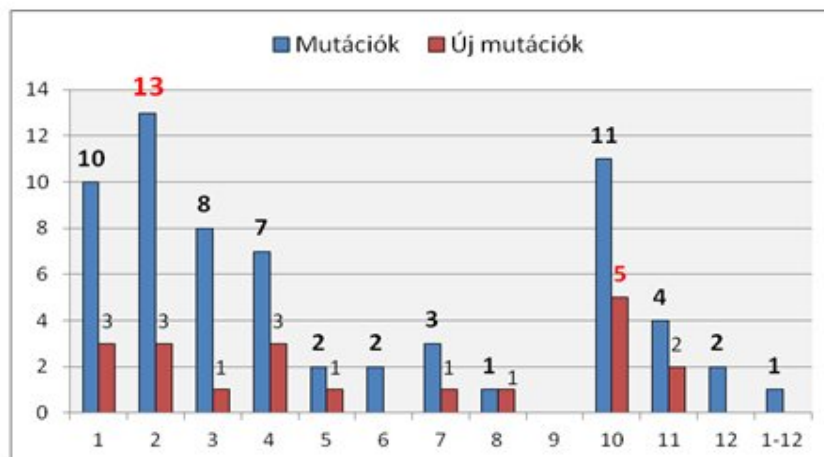
Bet. No.	Ország	Életkor (év)		Exon	Nucleotide változás cDNA	Mutáció típusa	Fehérje változás
		Diagnózis idején	É / †				
88.	Cseh Köztársaság	NA	4.3 †	11	1361C>G	Nonszensz	Ser454Stop
89.	Oroszország	20	NA	11	1378C>T	Misszensz	Pro460S
90.	Ukrajna	10	É	11	1386-87delCT	Deléció	Ser462fsX493
91.	Oroszország	11	É	11	1453G>A	Misszensz	Asp485Asn
92. ■	Oroszország	12	É	11	1453G>A	Misszensz	Asp485Asn
93.	Oroszország	8 hó	8 †	12	1485delT	Deléció	Asp495fs term. codon hiánya
94.	Szlovákia	NA	É	12	1507T>C	Misszensz	Stop503Arg
95. •	Szlovákia	NA	É	12	1507T>C	Misszensz	Stop503Arg
96.	Ukrajna	1	É	IVS3+ E4	361- 1_11del11bp + 361- 371del11bp	Deléció	Asp121fsX64
97.	Oroszország	6 hó	†	IVS3+ E4+IV S4+E5	322bp deléció	Nagy deléció	fs stop 148
98.	Törökország	NA	NA	1-12	Teljes gén deléció	Nagy deléció	
99.	Oroszország	10	É	IVS3	360+1g>a	Splicing defektus	
100.	Oroszország	8 hó	É	IVS6	559+1g>t	Splicing defektus	
101.	Szerbia	3 hó	16 hó †	IVS6	559+1g>c	Splicing defektus	
102.	Szlovénia	7	8 †	IVS6	559+2 t>g	Splicing defektus	
103.	Lengyelország	6	É	IVS6	559+5 g>a	Splicing defektus	
104. ¥	Lengyelország	5	É	IVS6	559+5g>a	Splicing defektus	
105.	Oroszország	9	É	IVS6	559+5g>a	Splicing defektus	
106.	Oroszország	14	É	IVS6	559+5g>a	Splicing defektus	
107.	Oroszország	1	15 hó †	IVS7	734+1g>a	Splicing defektus	
108.	Románia	2	É	IVS7	734+2t>a	Splicing defektus	

Bet. No.	Ország	Életkor (év)		Exon	Nucleotide változás cDNA	Mutáció típusa	Fehérje változás
		Diagnózis idején	É / †				
109.	Oroszország	2	É	IVS8	777+1g>a	Splicing defektus	
110.	Ukrajna	20	É	IVS8	777+1_4delgtga	Splicing defektus	
111.	Románia	3.5	3.5 †	IVS8	777+1_4delgtga	Splicing defektus	
112.	Oroszország	4	É	IVS8	777+3_6delgagt	Splicing defektus	
113.	Magyarország	6 hó	É	IVS9	931+1g>a	Splicing defektus	
114.	Cseh Köztársaság	16	É	IVS11	1453+4a>g	Splicing defektus	

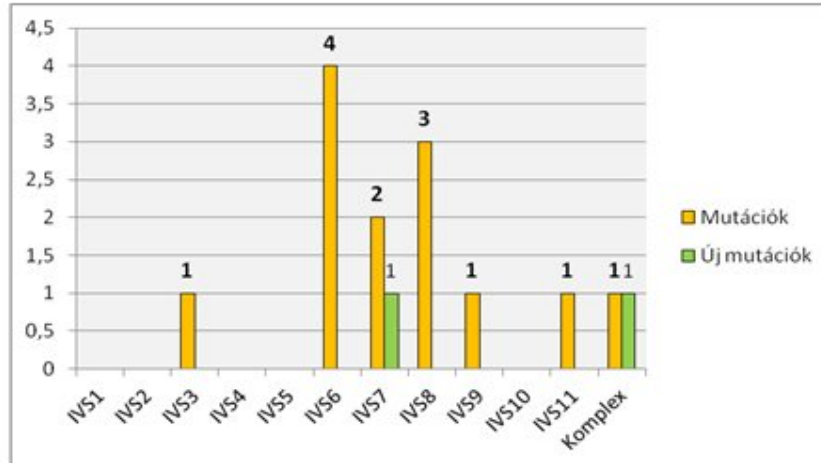
Vastaggal szedett, új mutációk; NA, nem ismert; †, elhunyt; É, életben van; fs, frameshift. cDNA: NCBI NG_007877.1; cDNS nukleotidok számozása az ATG-től történt; ◀, No.1 beteg testvére; ♦, No.5 beteg testvére; □, No.31 beteg testvére; ♦, No.46 beteg testvére és unokatestvérei; ϕ, No.50 beteg testvére; #, No.57 beteg testvére; □, No.59 beteg unokatestvére; △, No.77 unokatestvére; ■, No.91 beteg testvére, •, No.94 beteg testvére, ¥, No.104 beteg testvére.

A leggyakoribb szekvencia variánsok a kisméretű deléciók (25.9%) és misszensz (25.9%) mutációk voltak, gyakoriságban a harmadik helyen a nonszensz (18.2%) mutációk állnak, ritkábbak voltak a splice site defektus (15.6%) mutációk, inszerciók (10.4%), a nagy deléciók (2.6%) és a komplex mutáció, amely az összes mutáció 1.3%-át tette ki (5. ábra). Mind a 12 exonon találtunk mutációt a 9. exon kivételével (19. ábra, A), valamint a WAS gén hat intronikus szakaszán 12 különböző splice site mutáció volt kimutatható (19. ábra, B).

A)



B)



19. ábra. A vizsgálatunk során azonosított exonikus (A) és intronikus (B) mutációk száma az érintett exonok és intronok szerint. A) A WAS gén szinte valamennyi exonikus régióján találtunk mutációt a 9. exon kivételével. A mutációk többségét az első 4 exonon azonosítottuk, a 10. exonon találtuk a legtöbb új mutációt. A was gén teljes hiányával egy mutáció járt. B) A WAS gén intronikus szakaszai közül mindösszesen 6 intronon találtunk mutációt, ezek többsége a 6-8 intronokon helyezkedett el. Egy új splice site defektust azonosítottunk a 7. intronon. Az egy új complex mutáció 2 intront és 2 exont is magába foglalt.

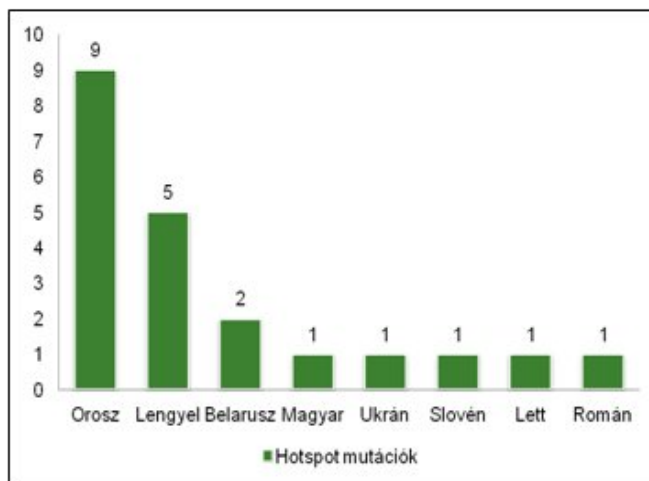
Az exonikus mutációk az összes génhiba 83%-ának feleltek meg. A mutációk több, mint a fele, 38 mutáció (59.4%) az első négy exonon volt megtalálható, a gén középső szakaszán (5-8 exon) a talált mutációk csupán 12.5%-a fordult elő, az utolsó 3 exonra a génhibák 26.5%-a jutott, a teljes gén deletálódásával járó nagy mutáció az össz exonikus mutációk 1.5%-t tette ki.

Az intronikus szakaszon jóval kevesebb génhibát azonosítottunk, az össz mutációk mindössze 15.6 % lokalizálódott erre a régióra. Elsősorban a 6-8 intronokon alakult ki mutáció a vizsgált betegekben, a legtöbb ilyen mutáció a WAS gén 6. intronján volt megtalálható.

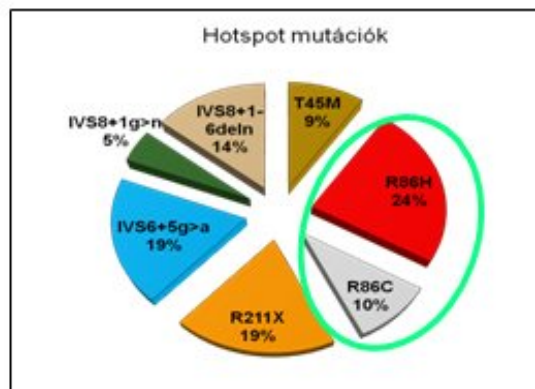
Az ismert 6 mutációs hotspot mindegyike érintett volt a vizsgált betegcsoportban (Thr45Met – 2, Arg86His – 5, Arg86C – 2, Arg211* – 4, IVS6+5g>a – 4, IVS8+1g>n - 1, IVS8 + 1-6 del gtga – 3). Ezek a mutációk 17 különböző családból származó, összesen 21 (18.4%) betegben, az összes beteg közel 1/5-ében alakultak ki (20. ábra A, B). A legtöbb hotspot mutációt az orosz betegek között találtuk, mellettük több forróponti génhiba volt megfigyelhető a lengyel és fehérorosz betegcsoportban is. Magyar, ukrán, szlovén, lett és román betegek között mindösszesen 1-1 beteg esetében igazoltunk ilyen mutációt. Az összes

hotspot mutációk 34%-a a WAS gén 2. exonon kódolt 86. számú aminosav kicserélődésével járó misszensz mutáció volt, ez a leggyakoribb hotspot mutáció. Az R211X és T45M aminosav cserével járó két exonikus forrópont összesen 28%-ban volt érintett. Az intronikus szakaszok hotspot mutációi az össz mutációk harmadát tették ki (38%).

A)



B)



20. ábra. Hotspot mutációk megoszlása a vizsgált betegcsoportban. T, treonin; M, metionin; R, arginin; H, hisztidin; C, cisztein; X, Stop; IVS6-8, 6-8. intron; g>a/n, guanin-adenin/citozin/timin csere; deln, bármely bázis deléciója. A) A hotspot mutációk elsősorban a szláv és lengyel népcsoportban domináltak. B) A leggyakoribb eltérés a 86. aminosav pozícióban elhelyezkedő arginin kicserélődésével (hisztidin/cisztein) járó misszensz mutáció volt.

A betegcsoportban a misszensz mutációk domináltak (42), annak köszönhetően, hogy ugyanaz a típusú misszensz mutáció több alkalommal ismétlődött egymással rokonságban nem álló családokban is. A leggyakrabban érintett aminosavak az Arg86 és az Asp224 volt hét illetve öt esetben. 20 különböző típusú misszensz mutációt találtunk, ezzel azonban nem a misszensz mutációk végeztek az első helyen a különböző mutáció típusok között, ugyanis deléciós mutációból kettővel többet azonosítottunk (22). A misszensz típusú mutációk többsége (16) a WAS gén első négy exonján alakult ki, csupán négy misszensz mutáció helyezkedett el a gén utolsó szakaszain, a 7, 11 és 12 exonon.

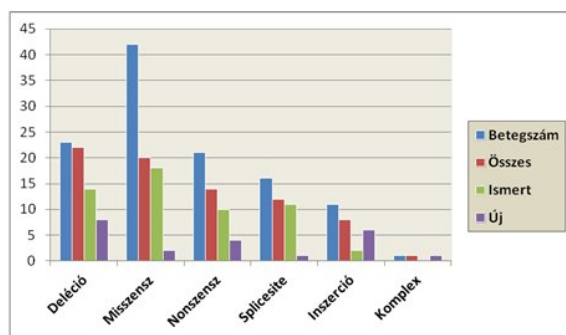
Deléciós mutációból 22 különböző típust találtunk tehát, amelyek közül csupán egy típus (1037delC) ismétlődött unokatestvérekben (No. 77, 78). A misszensz mutációkhoz hasonlóan a deléciók aránya is magas volt a vizsgált beteg populációban, de mivel szinte csak 1-1 betegben alakultak ki, összességében kevesebb beteget érintettek (23 beteg). Ezek főleg kisméretű deléciók voltak, 1-22 bázispár kivágódását okozták. Kettő esetben nagy deléció került azonosításra, amely 322 nukleotid (No.97) illetve a teljes WAS gén kiesésével járt (No. 98). A legtöbb deléció az első 6 exont érintette, öt deléciót a 10 exonon találtunk, a 11 és 12 exonon mindössze egy-egy kis deléciót mutattunk ki. A 87. számú betegben azonosított komplex mutáció által okozott nagy deléció a 10-11 exonokat is érintette. Két beteg esetében (No. 96 és 97) a deléció a hármaskonon kezdődött és a négyes exon elejét is magában foglalta, illetve a hármaskonontól egészen az ötös exonig terjedt, ez utóbbi volt az egyik nagy deléció.

Nonszensz típusú mutációt 21 betegben találtunk, ez a génhiba a WAS gén 5, 9 és 12 exonok kivételével a többi 9 kilenc kódoló szakaszon megtalálható volt. Nonszensz mutációra nézve a leggyakrabban a WAS génen az egyes exon 121 és a hetes exon 631 nukleotid pozícióiban lehetett számítani (3-4 beteg).

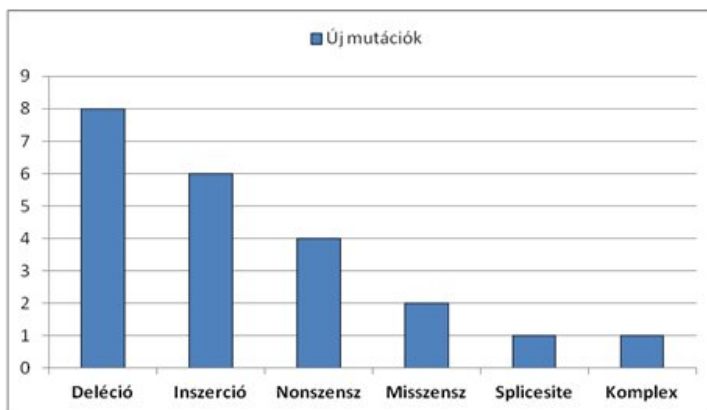
Splice site defektust 16, inszerciót 11 esetben azonosítottunk, amelyek elsősorban a gén középső részén alakultak ki. Splice site defektusok a hatos és nyolcas intronon jöttek létre a legnagyobb számban a vizsgált betegpopulációban (20. ábra). A leggyakrabban egy nukleotid inszertálódott, amely elsősorban citozin vagy timin volt. Egy testvérpár (No. 1, 2) esetében, novum génhibaként kettő guanin inszercióját azonosítottuk az egyes exonon. A mutáció típusok megoszlását a 21. ábra szemlélteti.

Az egyes exonok jellemző mutációit az alábbiakban foglaltuk össze. Az egyes exonon nonszensz mutációt találtunk a legnagyobb számban. A kettes exont főleg misszensz típusú génhibák érintették. A hármaskonon a deléciók fordultak elő a legnagyobb számban. A négyes exonon az összes típusú exonikus mutáció megtalálható volt, míg az ötös exonon

kizárólag inszerciókat azonosítottunk. A hetes exonon egy-egy inszerció, nonszensz és misszensz típusú mutáció fordul elő, de az utóbbi kettő 4 illetve 5 betegben is ismétlődött. A nyolcas exonon mindössze egyetlen nonszensz mutációt azonosítottunk. A kilences exon volt az egyedüli a WAS gén exonok közül, ahol nem találtunk mutációt a vizsgált betegek egyikében sem. A gén legnagyobb méretű exonja, a 10 exon számos mutáció helyszínéül szolgált. Itt misszensz típusú mutációt nem találtunk, a deléciók és inszerciók domináltak. Az új komplex mutáció is érintette a 10 exont, erről a mutációról a későbbiekben részletesen is szó lesz. Az utolsó két exonon kevés génhibát találtunk, többségük misszensz típusnak felelt meg.



21. ábra. A mutációk rendszerezése típus alapján. A különböző típusú mutáció számát tüntettük fel az alapján, hogy hány betegben fordultak elő, összesen hány mutációt találtunk az adott típuson belül és ezek közül mennyi volt ismert, illetve új mutáció.



22. ábra. Új mutációk típus szerinti megoszlása. Új deléciós mutációból találtuk a legtöbbet (8), míg splice site és komplex mutációból csupán 1-1 került azonosításra.

A 22 új mutációból (a 3. táblázatban vastaggal szedve) 8 deléció, 6 inszerció, 4 nonszensz, 2 misszensz, 1 splice site defektus és 1 komplex (InDel) típusú mutáció volt (22. ábra). A misszensz és splice site defektusok többsége korábban már közölt génhiba volt, az új mutációk közül csupán 2 illetve 1 volt ilyen típusú. A nonszensz és deléciós mutációk harmada, míg az inszerciók kétharmada új géndefektusnak bizonyult. Egy korábban nem ismert komplex mutáció is leírásra került.

Az új mutációkat a WAS gén 12 exonjából 9 exonon találtunk, többségük a tizes exont érintette (5), három-három új mutáció az egyes és kettes exonon alakult ki. A 4 és 11 exonon kettő-kettő, a 3, 5, 7, 8 exonon, a 7 intronon és a 3 intron-4 exon határon egy-egy új mutáció igazolódott (ez utóbbi mutációt az ábrán a négyes exonnál jelenítettük meg) (19. ábra, A). Az első testvérpár (No.1, 2) esetében kettő guanin inszercióját azonosítottuk a WAS gén egyes exonján. A mutáció eredménye a leolvasási keret eltolódását okozta, ami a fehérje szintézist a 41. aminosavnál lezárta. A következő betegben (No. 3) szintén kereteltolódást (frameshift) és a WAS protein szintézisének korai terminációját okozta a 18. guanin (c.18delG) deléciója. Az ukrán testvérpárnál (No. 5, 6) az eredetileg igazolt nonszensz mutáció (c.58C>T) mellett a későbbiekben másodlagos mutációk is leírásra kerültek (c.59A>G, c.60G>C és c.60G>T) [Boztug, 2008]. A 27. számú betegben c.239A>G cserével járó misszensz mutáció glutamin helyett arginint eredményezett a 80. aminosav pozícióban. Egy teljes nukleotid triplet (TAC) vágódott ki a 2 exonból egy tirozin kiesését okozva az eredeti fehérje szerkezetből a 30. számú beteg esetében. Ugyancsak a 2 exonon alakult ki az új misszensz mutáció (No. 38), amely tirozin-hisztidin cserét okozott a 88. aminosav pozícióban. A harmas exonon létrejött új mutációnál egy citozin deletálódott öt citozinból álló szekvenciából frameshiftet és a fehérjeszintézis korai leállítását okozva a 44. számú betegnél. Két új mutációt találtunk a WAS gén négyes exonikus szakaszán, egy nonszensz típusú mutációt (No. 53) és egy guanin delécióval járó génhibát a 55. sorszámú betegben. Az új típusú mutációk az ötös és hetes exonon timin és citozin inszercióval járó, ugyancsak kereteltolódással és korai stop kodon képződést okozó mutációk voltak a 59. és 67. sorszámú betegben. A nyolcas exon egyedüli mutációja is novum, amely a 763 pozícióban lévő citozin nukleotid timinre cserélődése révén a 255. glutamin helyett stop kodont eredményezett. A WAS gén legnagyobb szakaszán, a tizes exonon összesen öt új mutáció, három inszerció és két deléció volt megtalálható, amelyek mind a transláció korai lezáródását váltották ki (No. 79, 80, 83, 85 és 86). Komplex mutáció alakult ki a 10 intront és exont, valamint a 11 exont és intront érintve 1595 bp deléciójával és egy adenin inszerciója által. A 454 pozícióban szerint kódoló bázistriplet stop

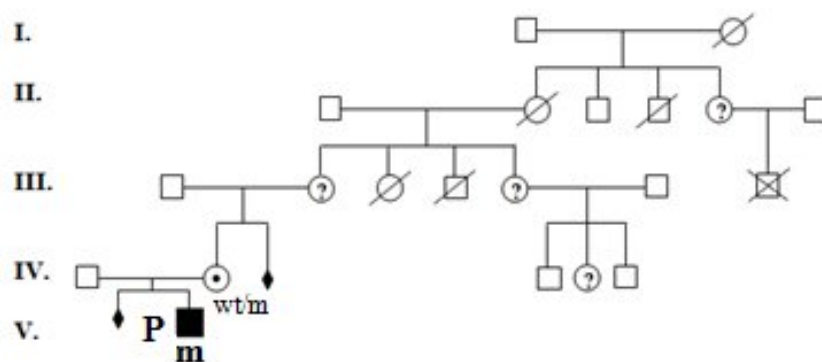
kodonra változott a 11 exonon létrejött új mutáció kapcsán a 88. számú betegben. A 11 bázispár delécióval járó mutáció, amely magában foglalta a harmas intron végét és a négyes exon elejét, szintén új mutációként lett azonosítva a 96. számú betegben. Végül a hetes intron +2 nukleotid pozícióban a vad típusra jellemző timin adeninre cserélődött, új splice site defektust okozva egy román betegben (No. 108).

A vizsgált betegpopulációban a kisméretű deléciós mutációk gyakoriak voltak. Korábban leírt, súlyos fenotípussal járó nagy deléciós mutációkat mindössze két beteg esetében igazoltunk. Új mutációként ugyancsak egy nagy deléciót is magában foglaló, valamint egy adenin nukleotid inszerciójával komplikálódó génhibát találtunk egy román kisfiúban, az ő kivizsgálását az alábbiakban, a klinikummal együtt, részletesen is ismertettük.

Új nagy deléciós WASP mutáció

Esetismertetés

A vizsgált fiúgyermek (3. táblázat. No. 87.) az édesanyja második, eseménytelen terhességéből született. A szülők klinikailag egészségesek. Az édesanyának az első terhessége az 5. terhességi héten spontán abostrusszal végződött (23. ábra).

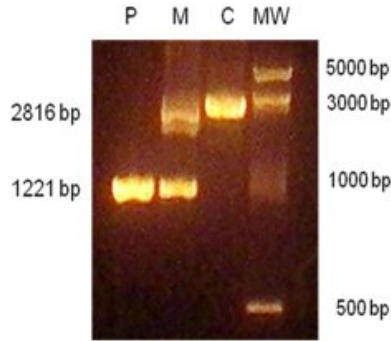


23. ábra. A fiú proband (V/2) családfája a hordozó édesanyával (IV/2) és a lehetséges hordozó nők feltüntetésével (körök kérdőjellel). wt/m, hordozó; vad típus; P, proband; m, mutáció.

A beteg a perinatális időszakban BCG és hepatitis B elleni védőoltásokban részesült, szövődményt nem észleltek. Három hetes korában véres hasmenés és maculopapulosus kiütések jelentkeztek az arcán és a törzsén. Hat hetes korában magas lázzal és exsudatív conjunctivitissel hospitalizálták. Ekkor derült fény thrombocytopeniájára (21-85 G/l), amely eltérés az antibiotikum kezelés mellett sem javult, a thrombocyták átlagos térfogata (MPV) ekkor még fiziológiás volt (7.5-9.9 fl), ahogy a szérum immunglobulin szintek is. A csontvelő vizsgálat malignitást kizárt, a thrombopoiesis megfelelő volt. IVIG és steroid kezelést próbáltak, de ezek sem hoztak érdemi változást a vérlemezkeszámban. Három és fél hónapos korában az MPV 6.5-6.9 fl közé csökkent és a beteg véres hasmenése továbbra is fennállt. A széklettenyésztés *Klebsiella pneumoniae*-t igazolt, amelyet amoxicillin-clavulánsavval kezeltek. A beteg több alkalommal részesült thrombocyta transzfúzióban, de a vérlemezkeszám 20 G/L (Referencia tartomány: 150-400 G/L) alá csökkent, ezzel párhuzamosan a csökkenő IgG és IgM érték IVIG kezelést tett szükségessé. A lymphocyta subpopulációs vizsgálatok egyaránt alacsony CD8+ T sejt, B sejt és NK sejt számot igazoltak. A gyermekben őssejttranszplantációt kezdeményeztek, de a hat hónapos sikertelen donorkeresés megghiúsította a beavatkozást, ezért a beteg génterápiás programba került. A gyermek klinikai tünetei WAS-nak megfeleltek, a genetikai és egyéb vizsgálatokat az alábbiakban részletezem.

Vizsgálatok

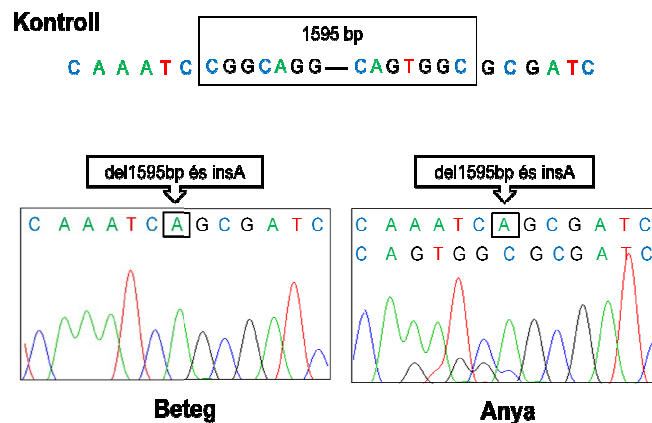
A beteg genetikai vizsgálata során a WASP gén mind a 12 exonját vizsgáltuk. Az agaróz gélelektroforézis normál hosszúságú bandeket mutatott az 1-9 és 12 exonok esetében és a nukleotid szekvencia is a vad típusnak megfelelt. A 10 és 11 exont reprezentáló amplikonok nem voltak kimutathatóak gélelektroforézissel, amely eltérés nagy deléciót sejtetett az adott szakaszokon. A mutáció felderítése érdekében a 9-12 exont magába foglaló gDNS szakaszt vizsgáltuk. Normál esetben a négy exont magába foglaló szakasz 2816 bázispár hosszúságú (kontroll minta), vizsgálataink során azonban a beteg mintájában ennél kisebb, körülbelül 1000 bázispár hosszúságú amplikont kaptunk (24. ábra).



24. ábra. WAS delécióra utaló agaróz gél elektroforézissel a beteg (P) és az anya (M) mintájában. Az egészséges kontrolltól származó minta a WAS gén 9-12 exonját reprezentáló, 2816 bázispárnyi szekvenciáját PCR-rel felszorzosítottuk és agaróz gélen megfuttatuk (C). A beteg mintájában csupán egy körülbelül 1000 bázispárnyi bandet kaptunk (P). Az édesanya esetében az elektroforézis során kettő band volt látható, amely eredmény az anyai hordozói státuszát igazolta (M).

A továbbiakban bidirekcionális szekvenálással határoztuk meg a nukleotidok sorrendjét. A vizsgálat során a beteg esetében a WAS gén 1595 bázispár deléciója és egy adenin inszerciója vált nyilvánvalóvá (25. ábra).

Az édesanya mintáján is elvégezve az amplifikációs PCR-t, majd a PCR termék agaróz gél elektroforézisét, két bandet kaptunk, amelyek a normál és a mutáns alléleknek feleltek meg (24. ábra). A szekvenálást követően az anya esetében heterozigóta mutációt igazoltunk a g.5247_6841 szakaszon 1595 bázispár deléciójával és egy adenin inszerciójával (25. ábra).



25. ábra. A WAS gén szekvenálása során igazolt InDel mutáció. A beteg mintáján elvégzett genomikus DNS szekvenálás eredményét mutató elektroferogram 1595 bázispárnyi

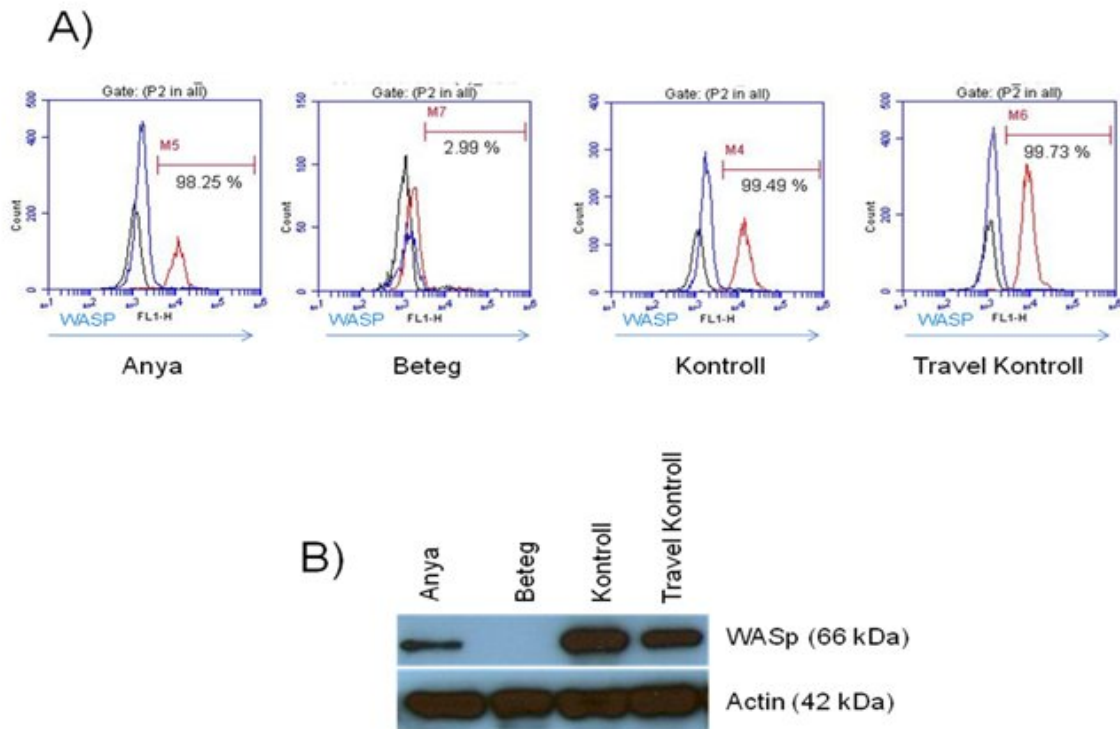
deléció és egy adenin inszerciót (zárójelben) igazolt a deléció helyén. Az édesanya mintája heterozigóta státuszt igazolt a mutációra nézve.

Az InDel mutáció a 10-11 exont és a 10-11 intront érintette, a mutáció kereteltolódást okozott, amely eredményeként a WAS fehérje szintézise károsodott (R439fs) (26. ábra).



26. ábra. Sematikus ábra a beteg mintájában a WAS génen igazolt InDel mutációról valamint a mutáció WAS fehérjére gyakorolt hatásáról. A 1595 bp deléció az 10 exon és intront valamint a 10-11 intront érintette. A mutáció hatására a leolvasási keret eltolódása jött létre és az aminosav sorrend a 439. pozíciótól károsodott. PH, pleckstrin homológ; WH, WAS homológ; GBD, GTP-áz kötő; PR, proline gazdag; VD, verprolin homológ; CD, cofilin homológ domén.

A fehérje expressziót flow cytometriával végeztük intracelluláris jelölést követően a beteg, édesanyja és kontroll mintákban. Az édesanya és a kontroll mintákban megfelelő WASP expresszió kimutatható volt, míg a beteg esetében elhanyagolható mennyiségű WASP-t detektáltunk (A/27. ábra). Western blot analízis teljes hosszúságú WASP-t (66 kDa) igazolt az anya mintájában a kontrollal megegyezően. Ezzel ellentétben a beteg PBMC sejtjeiben ezzel a vizsgálattal WAS fehérje nem volt kimutatható (B/27. ábra).



27. ábra. WASP expresszió kimutatása a beteg, édesanyja és kontrollok mintáiban.

A) Flow citometriával végzett intracelluláris WASP expresszió vizsgálata. Az ábra a WASP expressziót (piros vonal) mutatja izotípus kontroll (kék vonal) és negatív kontroll (fekete vonal) mellett. Az édesanya és egészséges kontrollok sejteiben normál WASP expressziót detektáltunk, azonban a beteg mintájában csupán elhanyagolható WASP expresszió volt kimutatható.

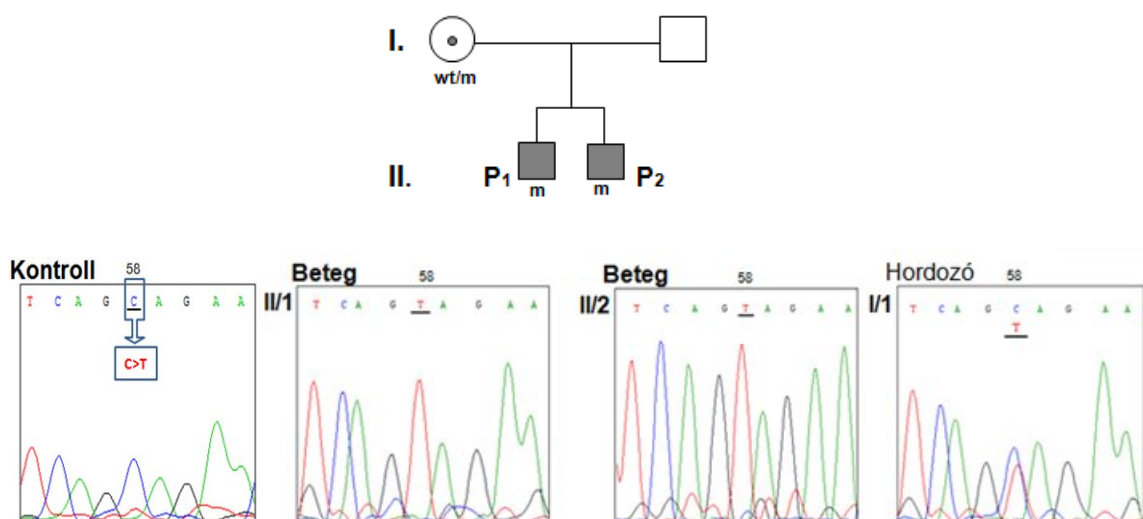
B) Western blot vizsgálat a WASP expresszió kimutatására. Az édesanya és az egészséges kontrollok sejt lizátumaiban normál mennyiségű WASP volt megfigyelhető szemben a beteg mintájával, ahol fehérje expressziót nem kaptunk.

A szomatikus reverzió ismert, de ritka jelenség WAS-ban. Betegcsoportunkban erre a ritka eseményre is találtunk példát egy ukrán testvérpár esetében.

Másodlagos mutációk és szomatikus reverzió

Esetismertetés

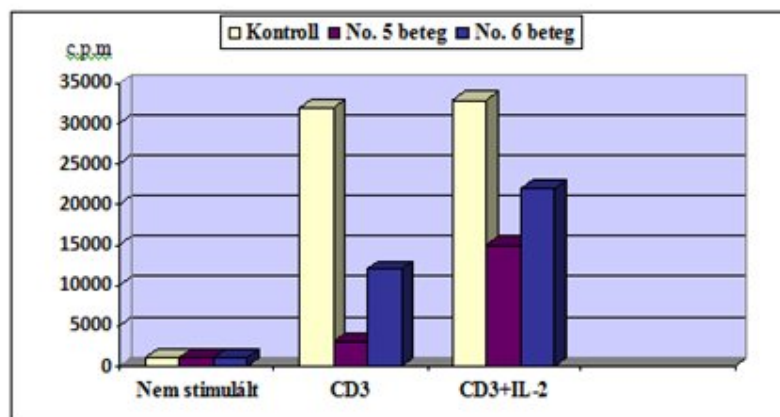
Az idősebb kisfiú (No. 5) születésétől kezdve véres hasmenésektől és ekcémától szenvedett. Három éves korában generalizált cytomegalovírus fertőzéssel kezelték. Öccsénél (No. 6) is újszülöttkortól manifesztálódott az ekcéma. Vérzékenységére recidív orrvérzések hívták fel a figyelmet. Mindkét gyermek esetében légúti fertőzések halmozódása volt megfigyelhető. A gyermekek genetikai vizsgálatát laboratóriumunkban végeztük el. A vizsgálat során a WAS gén egyes exonján új 58C>T nonszensz mutációt igazoltunk, amely génhiba a 20. glutamint kódoló triplet helyett Stop kodont eredményezett. A genetikai vizsgálatok eredményét a 28. ábrán szemléltettük.



28. ábra. Az ukrán testvérpár (P1-2) családfája és a genetikai vizsgálat eredménye. wt/m, hordozó; P, proband; m, mutáció. A WAS gén egyes exonján azonosított új nonszensz mutáció az 58. nukleotid pozícióban C>T cserét okozott. A genetikai hiba mindkét betegben kimutatható volt, az édesanyjuk pedig hordozónak bizonyult.

A betegek további kivizsgálása német kollégák bevonásával, kollaborációs munkában Hannóverben történt. A CD3-mal végzett stimulációs vizsgálatok mindkét betegben csökkent T sejt proliferációs választ igazoltak. Az eltérés humán IL-2 hozzáadásával részlegesen helyreállítható volt (29. ábra). A perifériás vérből izolált CD14+ monocyták podoszóma vizsgálata során mindkét beteg mintáiban a podoszómák teljes hiányát figyeltük meg az egészséges kontroll mintájával összevetve, ahol a monocyták 65%-a podoszóma pozitív volt.

A betegek rutin laboratóriumi eredményei thrombocytopeniát (Thrombocytaszám < 50 G/L; Referencia tartomány: 150-400 G/L), csökkent B lymphocytá számot, megfordult CD4/CD8 arányt mutattak. Az immunglobulin G szint mindkét betegben a korspecifikus normál tartományon belüli volt. A specifikus antitest szintek közül az idősebb betegben csupán tetanus toxoiddal szemben volt megfelelő antitest szint kimutatható, diftéria ellen nem. A testvérében mind a két érték a védettséget jelző tartományon belül volt mérhető.



29. ábra. T sejtek proliferációs vizsgálata az ukrán testvérpárban. A T sejt proliferáció mindkét betegben elmaradt az egészséges kontrollhoz képest. Az aktivitás IL-2 hozzáadásával részlegesen javult.

Flow cytometriával vizsgálva a betegek PBMC-t, WASP-pozitív és WASP-negatív csoportok különültek el a CD3+ lymphocyták és NK sejtek között. Az NK sejtek és a CD8+ lymphocyták többsége mindkét betegben WASP-pozitív volt. A CD4+ lymphocyták 31%-a az idősebb gyermekben, 4% a fiatalabb gyermekben mutatott WASP expressziót. A B sejtek csupán kis hányadában lehetett a fehérje jelenlétét igazolni, míg a monocyták mindegyike WASP-negatív volt mindkét betegben.

A WASP-pozitív és negatív CD3+ sejtek szétválasztását követően a két sejtcsoport WAS gén szekvenciájának meghatározását végeztük. A WASP-negatív sejtekben a korábban igazolt nonszensz mutáció volt megfigyelhető (58C>T). Ezzel szemben a WASP-pozitív sejtekben az egyes exon adott szakaszán, ahol a korábbi mutációt találtuk, a nukleotid szekvencia nem volt egyértelműen meghatározható. A jelenség arra utalt, hogy a WASP-pozitív lymphocyták között több eltérő másodlagos mutáció alakult ki ugyanazon a tripletten, mint ahol az első, betegséget okozó génhibát is felfedeztük. A további vizsgálatok az idősebb betegben a TAT triplet, míg a fiatalabb testvérében a TGG triplet dominanciáját igazolták

más, a vizsgált WASP-pozitív sejtek kisebb hányadában észlelhető triplet variációk mellett (TGG, TAC, TTG, CAG). A mutációk további vizsgálatát a lymphocyták klónozásával és ismételt szekvenálásukkal végeztük. Az idősebb beteg esetében 48, a fiatalabb betegben 52 klónt vizsgáltunk. Az első betegben a 48 klónból 23 TAT tripletet hordozott, 16 TGG, 9 pedig TAC tripletet. Testvérében az 52 klónból 36 TGG-t, 13 klón TAC tripletet, 1-1 klón pedig TTG és CAG tripletet hordozott. Az NK sejtek többségének genotípusa mindkét betegben TGG tripletnek felelt meg. A B sejtek több, mint 90%-a az eredeti mutáció jelenlétét mutatta. A revertált szakaszon az első beteg esetében CAG, TGG vagy TAC tripleteket láttunk, míg a testvérében TAT és TAC tripletek fordultak elő.

A betegek követése során a következő 18 hónapban a WAS klinikai tüneteinek csökkenését figyelhettük meg. Az ekcéma és a vérzékenység egyaránt javult, a thrombocytaszámuk pedig normál tartományba emelkedett. A fiatalabb testvér CD8+ lymphocyt- és NK sejttségében emelkedést észleltünk B sejttes lymphopeniájuk azonban nem szűnt meg és a CD4/CD8 arány sem változott (4. táblázat).

4. táblázat. Ukrán betegek (No. 5, 6) laboratóriumi paraméterei.

Labor értékek (G/L)	No. 5. Beteg			No. 6. Beteg			Normál érték (G/L)
	2006. 04.	08.	2008. 02.	2006. 04.	08.	2008. 02.	
Fehérvérsejtszám	9.7	5.2	10.6	9.9	7.9	7.1	4.8 - 10.8
Thrombocytaszám	27	45	260	22	20	280	150 - 400
Lymphocytaszám	3.2	3.8	3.8	3.5	1.3	3.1	0.9 - 4.44
CD3+ sejttség	ND	2.3	1.9	ND	0.7	3.8	0.8 - 3.5
CD3+CD4+ sejttség	ND	0.79	0.67	ND	0.3	1.2	0.4 - 2.1
CD3+CD8+ sejttség	ND	1.3	1.3	ND	0.39	2.8	0.2 - 1.2
CD19+ sejttség	ND	0.14	0.18	ND	0.09	0.08	0.2 - 0.6
CD3-CD56+ sejttség	ND	0.22	0.96	ND	0.45	2.1	0.07-1.2

MEGBESZÉLÉS

Vizsgálatunk során Wiskott-Aldrich szindrómában szenvedő betegek genetikai jellegzetességet kívántuk feltárni. Az adott betegek genetikai hátterének tisztázása érdekében molekuláris genetikai vizsgálatokat alkalmaztunk és lehetőség szerint WAS fehérje expresszió vizsgálatára is sor került. Eredményeinket több táblázatban foglaltuk össze és bizonyos betegek esetében a klinikai fenotípust és a részletes genetikai eredményt is feltüntettük.

A Wiskott-Aldrich szindróma ritka betegség, egy millió élveszületésre 4-10 beteg jut. Sajnos a betegek nem minden esetben kerülnek időben felismerésre és emiatt a kuratív kezelés is csúszhat, illetve el is marad. Mivel a betegség gyermekkori mortalitása magas, a korai felismerés fontosságát nem lehet elégszer hangsúlyozni. Magyarországon 9 WAS családot sikerült azonosítani, 9 index pácienssel. A betegség prevalenciája alapján azonban ennek a betegszámnak a valóságban magasabbnak kell lennie, vélhetőleg számos nem felismert eset kallódhat a gyermek praxisokban és kórházakban. A diagnosztizálást nehezíti a tény, hogy a gyakorló orvosok közül is kevesen ismerik a betegség pontos klinikumát, nehezen különítik el az ITP-től és a genetikai vizsgálatra is csupán az Infektológiai és Gyermekimmunológiai Tanszék Molekuláris Genetikai Laboratóriumában volt lehetőség Magyarországon az utóbbi évtizedben.

Magyarországi WAS betegek és hordozók

A kilenc magyar beteg klinikai fenotípusa egy esetben (No. 11) XLT-nek felelt meg, mivel nála csak thrombocytopenia formájában nyilvánult meg a betegség. A többi nyolc beteg a klasszikus WAS klinikai tüneteit mutatta. A legsúlyosabb formát a No. 35. beteg esetében láttunk, akiben autoimmun szövődménnyel komplikálódott az alapbetegség. Minden betegben vezető tünet volt a súlyos thrombocytopenia, amely gyakran indikált transzfúzót. A vérlemezék átlagos térfogata csökkent volt a legtöbb beteg esetében. Infekciók két beteg kivételével, az összes kisfiúban kialakultak és recidiváltak, különböző súlyossággal és gyakorisággal. Ekcéma a kilencből nyolc betegben jellemző tünet volt, a 81. számú beteg ekcémája volt a legsúlyosabb. Autoimmun illetve malignus kórkép a vizsgált időszakban csupán egy betegben alakult ki. Ennek oka az lehet, hogy a betegeink többsége az első évtizedükben jár és ezek a súlyos szövődmények általában a későbbi életévekben

manifesztálódnak. Valamint a betegek körében nagy arányban sikerrel elvégzett kuratív kezelések az autoimmun illetve tumoros rizikót jelentős mértékben csökkentik. A betegek WAS score értéke átlagosan 3-4 közötti volt. Az immunrendszer állapotáról tájékoztató laboratóriumi eredmények (lymphocyta szám, szérum immunglobulin eredmények) összességében egyik beteg esetében sem voltak teljes mértékben típusosak. Ezen megfigyelés alapján ezek a paraméterek csupán másodlagos fontosságúaknak tekinthetők a klinikai tünetek és a genetikai vizsgálat eredménye mellett. Ez a tény is hozzájárulhatott ahhoz, hogy a kezdeti időszakban szinte az összes beteg esetében téves diagnózis született, a leggyakoribb ilyen kórisme az ITP és a perinatalis infekció volt. Tény, hogy a családi anamnézis sem segítette az orvosok dolgát, hiszen mindösszesen kettő család esetében fordult elő a családban WAS korábban. A magyar betegcsoportban hét betegben végeztek őssejttranszplantációt, két beteg a transzplantációt követő fertőzések miatt exitált. Egy beteg bármilyen kuratív terápiás beavatkozás elvégzése nélkül halt meg. Egy beteg (No. 35) génterápiában részesült. Ebben a betegben, hét évvel a kezelést követően a thrombocytaszám tartósan 100 G/l feletti (Referencia tartomány: 150-400 G/l), az ekcémája megszűnt, fertőzéseinek súlyossága és gyakorisága csökkent, a beteg egészséges kortársaihoz hasonlóan jár közösségbe.

Célkitűzéseinknek megfelelően a WAS betegek genetikai vizsgálatát elvégeztük, mind a 9 magyar betegben megtaláltuk a betegséget okozó mutációt. A magyar kisfiúk közül nyolc esetben, korábban az irodalomban már leírt, ismert mutációt sikerült azonosítani a WAS génen. Hotspot mutáció egy beteg (No. 35) esetében került leírásra. A mutációk közül három esetben deléció, három betegben misszensz egy betegben pedig nonszensz mutációt találtunk. Az új mutációt az 53. számú betegben találtuk, amely eltérés a WAS gén 4. exonján a 397. bázis helyen található guanin helyett timint eredményezett. A mutáció a WASP aminosav sorrendjében 133. helyen található glutaminsavat kódoló triplet megváltozását okozta. Az eredeti GAG triplet a mutáció hatására TAG-ra módosult. Az új triplet STOP codonnak felelt meg és a fehérjeszintézis korai leállítását eredményezte. A mutáció a betegben klasszikus WAS fenotípus megjelenésével járt. A magyar betegek esetében a genetikai vizsgálat mellett WAS fehérje kimutatás rutinszerűen nem történt.

A potenciális hordozó nők felderítése érdekében családfát készítettünk, ahol lehetséges volt, kijelöltük a vizsgálandó nőket és felvilágosítást követően elvégeztük a genetikai vizsgálatokat. A kilenc magyar családban összesen 18 hordozó nőt sikerült azonosítanunk. A hordozói státusz tisztázásával lehetőség nyílt a pozitív eredményt mutató és még fertilis korban lévő nők esetében a prenatalis genetikai vizsgálatra. Ez a beavatkozás öt magyar és egy orosz család esetében segítette a családtervezést. A korionboholy mintavételre, a

magyaroknál a Debreceni Egyetem Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikáján került sor, Dr. Török Olga tanárnő szakértő segítségével. A minták feldolgozása során más intézményben kromoszóma számbeli és méretbeli meghatározás is történt, amely a születendő gyermek nemét is pontosította. A sejtekből kivont DNS segítségével a családra jellemző genetikai hibát kerestük a magzat genomjában. Hat családban, összesen 7 alkalommal, nyolc magzaton végeztük el a vizsgálatot, amely során négy fiú és négy leánymagzat WAS génvizsgálata történt meg (5. táblázat). A 35. számú beteg édesanyjánál elvégzett, első prenatalis vizsgálat (1. család) eredményei korábban közleményben megjelentek [Alapi, 2006]. Három család esetében egy-egy leány nemű magzat került felismerésre, mind a három foetus a családra jellemző mutációra nézve hordozónak bizonyult, a szülők mindhárom esetben a gyermekek világrajövetele mellett dönthettek (11, 23, 39. számú betegek testvérei; 2-4. család). Az 53. számú beteg édesanyjánál (5. család) az első alkalommal elvégzett prenatalis genetikai vizsgálat a fiú magzatban sajnos ugyanazt a betegséget okozó mutációt tárta fel, amely génhiba az 53. betegben is kimutatható volt. A szülők így a beteg gyermeket nem vállalták. Fél évvel a második terhességet követően az édesanya ismételten várandós lett, újabb prenatalis vizsgálatot végeztünk, amely ezúttal egészséges fiú magzatot igazolt. A gyermek azóta megszületett és teljesen egészséges. Egy orosz anyuka családtervezését is támogattuk a prenatalis vizsgálatokkal (6. család), amely során egészséges fiú magzat igazolódott (5. táblázat).

5. táblázat. Prenatalis genetikai vizsgálat eredményeinek összefoglalása[#]

Család szám	Magzat neme	Vizsgálat eredménye	Terhesség kimenetele
1.	leány	vad típus	szülés
1.	fiú	vad típus	szülés
2.	leány	hordozó	szülés
3.	leány	hordozó	szülés
4.	leány	hordozó	szülés
5.	fiú	beteg	művi abortusz
5.	fiú	vad típus	szülés
6.	fiú	vad típus	szülés

[#]Hat WAS családban összesen 8 magzat esetében végeztük el a vizsgálatot.

WAS gén mutációk közép-kelet-európai, orosz, törökországi és azerbajdzsáni betegekben

A Tanszék nemzetközi szakmai kapcsolatai révén lehetőségünk nyílt a közép-kelet-európai régióból valamint Oroszországból, Törökországból és Azerbajdzsánból származó WAS betegek összegyűjtésére, genetikai adataik rendszerezésére. Azok a külföldi beteg, akik hazájukban a genetikai vizsgálat hiánya miatt nem jutottak pontos diagnózishoz, Tanszékünkön kerültek kivizsgálásra. Ily módon összesen 46 külföldi személy, 26 beteg fiú és 20 hordozó nő genetikai vizsgálatára került sor Ukrajnából (8-8), Oroszországból (8-5), Törökországból (3-2), Romániából (3-2), Azerbajdzsánból (2), Lengyelországból (1-2) és Lettországból (1-1). További hét országból pedig a már diagnosztizált betegek és hordozók adatait gyűjtöttük össze. A legfiatalabb betegekben egyaránt két hónapos korukban született meg a WAS diagnózisa, a legidősebb betegben 23 évesen. A betegek átlag életkora 3.5 év volt a diagnózis felállításakor, amely másfél évvel meghaladta az irodalomból ismert átlagéletkort [Sullivan, 1994]. Huszonöt beteg a 114-ből a vizsgálat vége előtt elhunyt.

A talált exonikus mutációk több, mint a fele a WAS gén első 4 kódoló szakaszán volt megtalálható, hasonlóan az irodalomban korábban leírtakhoz [Jin, 2004]. A hotspot mutációk a vizsgált betegpopulációban az esetek közel 20%-át tették ki, hasonlóan a korábban nagy WAS betegcsoportot feldolgozó közleményhez [Jin, 2004]. A hotspot mutációk közül az Arg86His cserét okozó génhibát hordozó magyar beteg (No.35), az irodalommal ellentétben, nem az enyhe XLT fenotípust, hanem a klasszikus WAS súlyos formáját mutatta.

Az irodalmi adatokkal összhangban misszensz típusú mutáció fordult elő a legnagyobb számban a vizsgált betegek között, azonos mutációk rokoni kapcsolattól függetlenül, több betegnél is megtalálhatóak voltak. A misszensz mutációk elsősorban a WAS gén első négy exonján alakultak ki. Deléciós mutációkat is nagy számban találtunk a beteganyagban, ezek általában csak 1-1 betegben fordultak elő. A nagy deléciós mutációk ritkák voltak a mi betegeink között is, hasonlóan a korábbi közlésekhez, mindössze a betegek 2.6%-ban (3 beteg) igazoltunk ilyen génhibát. Ezek közül egy új, complex mutációt is részletesen leírtunk. Kevés inszerciót találtunk, de azok 75%-a új mutáció volt. A WAS gén 11 exonján találtunk mutációt, a 9. exon nem volt érintett a mi beteg anyagunkban. Ez az exon az irodalmi adatok alapján is csak kevés ismert mutációnak ad helyet [Jin, 2004]. Az intronikus mutációk közel fele hotspot helyen következett be.

A WAS génen összességében 77 különböző típusú mutációt azonosítottunk, ezek közül 22 az irodalomban eddig nem ismert mutáció volt. Az új mutációk 36.3%-ban deléciók,

27.2%-ban inszerciók, 18.1%-ban nonszensz, 9 %-ban misszensz, 4.5-4.5%-ban splice site defektus és komplex mutációk voltak.

A 22 új mutációból 18 frameshift deléció vagy inszerció, illetve nonszensz típusú mutáció, amelyek mindegyike a WAS protein szintézisének korai leállítását eredményezi, ezáltal betegséget okozó mutációként értékelendő. Négy ezekből a mutációkból bár különböző aminosav távolságokra (155, 136, 86 és 79) következett be a WAS protein karboxiterminális végétől, mégis ugyanúgy a 494 aminosav pozícióban okozott terminációt, csupán 9 aminosavra a WAS fehérje karboxi terminális végétől (No. 79, 80, 85 és 86). Az ilyen nagy negatív változások, amelyek a WASP prolinban gazdag régióját, a verprolin és a cytoplazmatikus doméneket is egyaránt érintették, vélhetően végzetes következménnyel jártak a fehérje funkciójára nézve. A WAS gén mutációkat rendszerező adatbázisban szerepelnek olyan WAS betegek, akikben eltérő mutáció kapcsán azonos pozícióban képződött stop kodon (kodon 494). Ezzel szemben a p.Gln80Arg és p.Tyr88His cserével járó misszensz mutáció valamint a p.del83Tyr deléció patogén mivolta nem ennyire nyilvánvaló. Az első misszensz mutáció esetében benignus, tolerálható és neutrális kimenetelre számíthatunk. Azonban két nem rokon beteg esetében is leírásra kerültek, akik egyértelmű WAS fenotípust mutattak. Ugyancsak a fenotípus alapján nevezhetjük a második misszensz mutációt is valószínűleg betegség okozó génhibának, mivel a beteg klinikai tünetei az XLT-nek megfeleltek, a génhibához közel ismert mutációs hotspot található (Arg86N), valamint korábbi közleményben ugyanezen lokalizációban, más aminosav cserével járó (Tyr88Cys), betegséget okozó mutációt már leírtak [Albert, Bittner, 2010]. A 83 aminosav pozícióban található nem poláris, aromás tirozin elvesztése a WAS protein szerkezetére lehet hatással. Érdekes, hogy mindhárom mutáció előrejelezhető módon egy vagy több illesztés-erősítő (splicing enhancer) elvesztésével jár, amelyek fontos szerepet töltenek be a megfelelő RNS splicingban. A három mutáció WASP-re gyakorolt hatásának jobb megértése céljából funkcionális elemzés szükséges. Ezzel a 22 új mutációval tovább gazdagítottuk a WAS gén mutációs adatbázist, amely több mint 300 ismert génhibát foglal magába.

A fentiekben részletezett WAS esetek esetek 80%-a korábban ismert mutációkon alapult. Ezek a mutációk változatos klinikai formában manifesztálódtak az egyes betegekben, a mutációk és a klinikai kép között ismert fenotípus/genotípus korreláció, amelyet a bevezetésben részleteztünk. A legsúlyosabb esetek hátterében általában a kereteltolódást és fehérje hiányt okozó nonszensz és deléciós mutációk állnak. A nagy delécióval járó mutációk ritkák WAS-ban, az irodalom csak néhány esetet közöl (30. ábra), de a fenotípus minden esetben súlyosnak mondható, a klinikai tünetek korán és súlyos formában manifesztálódnak.

A romániai kisfiú esete kapcsán, akiben új nagy inszerciós-deléciós mutációt találtunk, a WAS génen korábban leírt nagy deléciós mutációkat is feldolgoztuk.

A WAS gén nagy deléciós mutációi

WAS-ban észlelt deléciós mutációk többsége rövid, 1-12 bázispár hiányát okozó mutáció, a nagy deléciók ritkák. Ezek a genetikai hibák egy teljes exon hiányán túl 2 vagy akár több exon kivágódását is okozhatják érintve a köztes intronikus régiókat is, vagy akár a teljes WAS gén is deletálódhat a genomból [MacCarthy-Morrogh, 1998]. Az alábbiakban áttekintést nyújtunk a korábban leírt WAS génen bekövetkezett nagy deléciós mutációkról az irodalmi adatok alapján, kiegészítve az általunk azonosított nagy deléciós mutációval (30. ábra).

A romániai kisfiú esetében azonosított új InDel mutáció a WAS gén 3' végén található. A genetikai vizsgálat azt igazolta, hogy a deléciós mutáció a gén 10. exon, 5246 nukleotid pozíciójából indult és 1595 bázispár kivágódását valamint egy adenin inszercióját eredményezte. A károsodás során a 10. exon egy része, a teljes 10. intron és 11. exon, valamint a 11. intron részben elveszett. Flow cytometriás és Western blot vizsgálatok a WAS protein hiányát igazolták a beteg perifériás lymphocytaiban. A felhasznált antitest a fehérje C terminális végét ismeri fel (12. exon), a leírt mutáció az epitóphoz képest ellentétes irányban található. Az eredmények alapján ezért arra következtethetünk, hogy a mutáció miatt a beteg sejtei nem tartalmazhattak normál méretű illetve működőképes fehérjét, tehát az új mutáció egyértelműen betegség okozó génhibának tekinthető.

Tajváni betegben a WAS gén szabályozó régiója sérült a promóter régió és az első két exon deléciója kapcsán [Lee, 2010; Lee, 2005]. A beteg lymphocytái nem expresszáltak WASP-t a mutáció következtében, ezáltal a mitogén antigének indukálta sejtosztódás és NK sejt aktivitás károsodott. A CD4+ memória sejtek csökkenése és lymphocyták kóros proliferációja alapozta meg a beteg fokozott infekciós hajlamát és a súlyos WAS fenotípust [Lee, 2010]. Egy másik tajváni betegben az első négy exont érintette a deléciós mutáció és WASP expresszió itt sem volt kimutatható. A fehérje teljes hiánya ebben az esetben is súlyos WAS fenotípust okozott [Chien, 2004]. Egy kaukázusi betegben 15800 bázispár hosszú *Alu*-mediált deléció került leírásra, amely az 1-6. exont, a 6. intron egy részét tartalmazta, valamint a proximális és disztális WAS gén promóter régiót. A mutáció hatására a WASP teljes mértékben hiányzott a beteg PBM sejteiből súlyos klinikai tüneteket okozva [Lutskiy, 2002].

A WAS gén első 7 exonját érintő nagy deléciós mutáció kapcsán kialakult súlyos WAS fenotípust mutató beteg mononucleáris sejtjeiben és EBV-transzformált B sejt vonalakban a WASP teljes hiánya volt kimutatható [MacCarthy-Morrogh, 1998]. Egy másik betegben körülbelül 2 kb hosszú deléció került leírásra, amely a 3-7 exont érintette, a 2 és 7 intront fúzióját okozta. Ebben a betegben sem sikerült WASP-t detektálni és ennek kapcsán súlyos klasszikus WAS alakult ki autoimmun szövödményekkel [Imai, 2004; Ariga, 1997]. Egy orosz betegben 322 bázispár hosszú deléciót azonosítottak, amely eltérés a 3-4 intront és a 4-5 exont érintette [Gulácsy, 2011]. A hetes exon teljes delécióját írták le egy japán betegben, akiben a mutáció a WASP hiányát okozta, klinikailag pedig súlyos, malignitással szövődött fenotípushoz vezetett [Imai, 2004]. Egy argentin betegben a nagy deléció szintén a 7 exontól indult és egészen a 11 exon végéig tartott [El-Hakeh, 2002], míg egy másik betegben a 8 intron 3' végétől kezdődő mutáció a gén teljes további részét deletálta [Schwarz, 1996].

Kettő további nagy deléció is érintette a WAS gén 3' végét. Az első esetben a 10 introntól indult a mutáció, amely az utolsó két exont is magába foglalta (11,12 exon). A betegben klasszikus WAS alakult ki [Thompson, 1999]. A második esetben komplex mutáció kapcsán kivágódott 4.3 kb hosszú szakasz tartalmazta a 11 introntól a 12 exon végéig a WAS gén egy részét, valamint a SUV39H1 gén promóter régióját. Továbbá a nagy delécióval ellenkező irányban egy kis, 9 bázispárnnyi deléció és 151 bázispárnnyi inverzió volt megfigyelhető, amely egy adenin inszerciójával komplikálódott az invertálódott szekvencia 148. nukleotid pozíciójában. A vad típusú WAS gén 12 exon részét képező polyA szakasz is hiányzott a beteg mintájából a komplex mutáció eredményeként. Stabil, de funkcióképtelen WAS proteint mutattak ki a beteg mintájában, amely eltérés klasszikus WAS tüneteiben nyilvánult meg [Andreu, 2006]. Kettő érdekes esetben a deléciók a WAS gén nagy részét érintették. Az első betegben csupán a WAS gén utolsó, 12 exonja volt kimutatható a genetikai vizsgálat során, míg a másik beteg esetében a teljes WAS gén hiányzott [Kang, 2008; Imai, 2004]. A WASP expressziós vizsgálatok egyik betegben sem igazoltak WAS fehérjét a betegek sejtjeiben.

A nagy deléciós mutációk csupán egy töredékét képezik annak a több száz WAS gén mutációnak, amelyet 1994 óta az irodalomban leírtak. Az általunk közölt esettel a nagy deléciós mutációk sorát bővítettük. A kevés ismert esetszám miatt, nagy delécióra hajlamosító gén régiót nem tudunk megnevezni. Az összes nagy deléció a WASP teljes hiányával járt vagy megrövidült, funkcióképtelen fehérjét okozott. A mutációk mindegyike a klasszikus WAS súlyos fenotípusában fejeződött ki. Emiatt a nagy deléciók korai felismerése

elengedhetetlen a minél korábbi kuratív kezelés- összejt transzplantáció, génterápia - megkezdéséhez.

Végül a WAS-ban ritkán bekövetkező, szomatikus reverzió alapuló, spontán állapotjavulást mutató testvérpár összegzésével zárjuk a megbeszélést.

Másodlagos WAS gén mutációk és szomatikus reverzió

Az ukrán testvérpárnál, a magyarországi genetikai vizsgálatot és a WAS diagnózisának megerősítését követően, összejttranszplantációt terveztek, azonban a megfelelő donorok hiányában a beavatkozást nem végezték el egyik gyermek esetében sem. A betegek génterápiás programba kerültek és kivizsgálásuk tovább folytatódott. Prof. Dr. Klein laboratóriumában végzett WASP vizsgálat során, a mutáció alapján elvárt teljes WASP expresszió hiány helyett, mindkét beteg sejtjeiben mérhető fehérje expressziót találtunk. Ez az eredmény felvetette a szomatikus mozaicizmus és a spontán reverzió lehetőségét, amely jelenséget már korábban is leírták az irodalomban [Notarangelo, 2008; Ariga, 2012]. Spontán reverzió más primer immundefektusokban, mint az ADA deficiencia [Hirschhorn, 1996], a súlyos kombinált immunhiány [Stephan, 1996] és a leukocita adhézis deficiencia [Tone, 2007] is ismert. A leírt WAS esetek többségében a szomatikus mozaicizmus igazi reverziós mutációk eredménye volt, a másodlagosan kialakult mutációk által okozott funkciónyeres is ismert, de ritkább jelenségnek számít [Du, 2006; Wada, 2001]. A másodlagos mutációk által okozott szomatikus mozaicizmus jelenségének vizsgálata a génterápiával foglalkozó kutatóknak fontos terület, a gén korrigált sejtjeknél észlelt potenciális proliferációs előny jobb megértését szolgálja [Boztug, 2007].

Az ukrán testvérpár esetéből fontos tanulságokat vonhatunk le. Mindkét beteg esetében igazoltuk a szomatikus mozaicizmust, azáltal, hogy a betegek CD8+ lymphocytáiban és NK sejtjeiben WASP expressziót igazoltunk. Reverziós mutációval rendelkező betegekben a megfigyelések alapján a WASP-pozitív lymphocyták száma fokozatosan emelkedik [Wada, 2001], akárcsak a WAS knock out egerekben génterápia után [Klein, 2003]. A WASP-pozitív sejtek nagy száma mindkét betegben arra utalhat, hogy ezen sejtek proliferációs előnye igen kifejezett a WASP-negatív sejtekhez képest. A génszekvenálás során, az eredetileg mutáns bázis tripletek, ugyanazon a helyen igazolt, párhuzamosan jelenlevő több különböző szekvencia variáns, több párhuzamos másodlagos mutációt reprezentál. Ennek megfelelően

molekuláris szinten mindkét betegnél legalább három különböző másodlagos mutációt tudunk kimutatni. Érdekes módon a két beteg esetében a mutációk eloszlása eltérő volt a CD3+ lymphocytákban. Az idősebbik betegben a domináns triplet a TAT, míg a fiatalabbik testvérben a TGG volt. Emellett a TAT csak a No. 5. számú betegben volt kimutatható, míg a TTG és CAG triplet kizárólag a No. 6. számú betegben. Ezzel szemben a WASP-pozitív NK sejtek mindkét betegben szinte csak TGG tripletet hordoztak. További sejtes vizsgálatok a B sejtek egy kis százalékában is igazoltak másodlagos mutációt. A reverzió pontos mechanizmusa és az eseményt kiváltó tényező(k) meghatározása még várat magára. A testvérpár esetében környezeti faktorok szerepe is felmerül, mivel mindkét betegnél egyaránt létrejött a reverzió. Az ő esetükben az 1986-ban bekövetkezett csernobili atomkatasztrófa utáni fokozott radioaktivitás lehet az egyik kiváltó tényező. Logikus kérdés, hogy a módosult genotípusú sejtek által expresszált WASP funkcióképes-e. A válasz funkcionális tesztek elvégzése nélkül is egyértelműnek látszik, hiszen a betegek az utánkövés során a klinikai tünetek enyhülését mutatták, ami az általuk expresszált WASP-nak tulajdonítható. A javuló klinikai státusz miatt, egyik beteg sem kapott a későbbiekben kuratív kezelést, habár prognózisuk egyelőre nem megjósolható. Prospektív, multicentrikus, hosszútávú követéses vizsgálatok tudnák csak megválaszolni ezeket a fontos kérdéseket és tisztázni a szomatikus mozaicizmus pontos molekuláris és funkcionális hátterét.

	A WASP génen igazolt nagy deléciók sematikus ábrázolása	Score	Deléciók rövid leírása	Referencia
1)		5	WAS gén promóter régió és 1-2 exon deléciója.	23, 24
2)		3-5 ^a	WAS gén 1-4 exon deléciója.	25
3)		4/5 ^b	Xp11.23 deléció, amely a promóter, 1-6 exont, és a 6 intron egy részét érinti.	26
4)		4/5 ^b	Southern blot analízis az 1-7 exonra kiterjedő deléciót igazolt.	27
5)		5	A WAS gén 3-7 exont érintő nagy deléciója.	28, 29
6)		NA ^c	A 3 introntól kiinduló 5 exonig tartó, 322 nucleotidra kiterjedő nagy deléció.	30
7)		5	A hetes exon deléciója	28
8)		3-5 ^{ab}	A WAS gén 7-11 exonig terjedő nagy deléciója.	31
9)		NA ^c	A 8 introntól a gén végéig tartó nagy deléció.	32
10)		3-5 ^a	A 11-12 exont érintő deléciós mutáció.	33
11)		4	A gén 1347 bp-t érintő nagy deléciója, amely magába magába foglalta a 11-12 exont, 11 intront és a 3' UTR-t.	34
12)		3	A WAS gén első 11 exonját érint nagy deléciója.	35
13)		3-5 ^a	A teljes WAS gén deléciójával járó mutáció.	28
14)		3	1595 bp deléció, g.5247_6841 és adenine inszerció új közlemény	

30. ábra. Az irodalomban korábban megjelent, valamint az esetben közölt nagy deléciós mutációk rövid leírása és sematikus ábrázolása

a WAS génen. NA, adat nem elérhető; ^a classical WAS fenotípus, score nem meghatározható; ^b Súlyos fenotípus, score nem meghatározható;

^c A beteg tüneteiről adat nem állt rendelkezésünkre.

ÖSSZEFOGLALÁS

Újszülött- és csecsemőkori thrombocytopeniás vérzések, családon belül fiúgyermekek halmozott mortalitása esetén mindenképpen gondolnunk kell a WAS lehetőségére is. A WAS-ra jellemző klasszikus tüneti triászt a thrombocytopeniás vérzések, a visszatérő infekciók és az ekcéma alkotja. A diagnózisban a klinikai és a laboratóriumi leleteken kívül fontos a genetikai vizsgálat, hiszen a *WASP* gén mutációjának kimutatásával egyértelműen bizonyíthatjuk a WAS diagnózisát. Genetikai vizsgálattal az enyhébb fenotípusok (XLT, XLN, intermittáló thrombocytopenia) etiológiája is kétséget kizáróan tisztázható. Mivel anyai ágon öröklődő genetikai betegségről van szó, a probandus mutációanalízise után meg kell vizsgálni a még élő női rokonokat is, lehetséges hordozókat keresve [Alapi, 2006]. A WAS kuratív terápia nélkül halálos betegség, jelenleg pedig a csontvelő-transzplantáció az egyedüli elfogadott és hatékony oki terápiája. A beavatkozás azonban szigorú kritériumokhoz kötött, és súlyos mellékhatásokkal is járhat amellett, hogy nem mindig sikeres. Új alternatívát a génterápia jelenthet, amely szintén végleges gyógyulást hozhat a WAS-ban szenvedő betegeknek.

Kutatómunkánk során Magyarországon 9 család esetében sikerült egy-egy index beteg kapcsán a WAS gén mutációt igazolni. A családszűrések során összesen 18 hordozó nő került felismerésre, 5 magyar és egy orosz család esetében prenatalis vizsgálattal segítettük a családtervezést. Emellett 12 közép-kelet-európai országból, Oroszországból, Törökországból és Azerbajdzsánból származó, WAS-ban szenvedő betegek és a mutációt hordozó nők genetikai vizsgálatát végeztük el, illetve a korábban, más laboratóriumban diagnosztizált személyek genetikai eredményeit gyűjtöttük össze. A genetikai vizsgálat során bidirekcionális DNS szekvenálással kerestük a betegséget okozó mutációt a WAS génen a betegek és a betegek családtagjainak mintáiban. A vizsgálatba 114 beteg fiú és 63 hordozó nő került bevonásra, összesen 77 különböző mutációt sikerült azonosítani, amelyből 22 génhiba új mutációnak bizonyult. A talált mutációk jellegzetességei, a mutációtípusok gyakorisága, a WAS génen való lokalizációjuk, az irodalmi adatokkal összességében összhangban voltak. Az új mutációk többsége egyértelműen betegséget okozó mutációnak felelt meg, három mutáció esetében további vizsgálatok szükségesek azok pathogenitásának igazolására. Egy új komplex mutáció kapcsán a WAS gén korábban leírt nagy deléciós mutációit is áttekintettük. Egy testvérpár esete pedig a szomatikus reverzió révén a WAS spontán javulására hívta fel a figyelmünket.

A tanulmány során az eddig vizsgált legnagyobb WAS-val diagnosztizált közép-kelet-európai betegcsoportot mutattuk be. Az ismert primer immunhiányos betegségek száma napjainkban meghaladja a 200-t, de számos esetben a genotípust még homály fedi. A primer immunhiányos betegségek jobb megértését, a genetikai diagnosztika kiterjesztését célozzák az olyan nemzetközi kezdeményezések, mint a J Projekt, amely segítségével a szegényebb kelet-európai országokban is könnyebbé válhat a primer immunhiányos betegségek felismerése és hatékonyabb kezelése.

SUMMARY

The diagnosis of WAS should be considered in every case of male patients with thrombocytopenia and early death of male infants in the family. The typical clinical triad of WAS consist of microthrombocytopenia, recurrent infections and eczema. Molecular genetic analysis is essential in WAS beside the clinical and laboratory findings. Genetic analysis helps to find out the background of milder forms (XLT, iXLT) as well. As in every X-linked genetic disorder, analysis of potential carrier females is also important in WAS. WAS is a life threatening disease and at present the only curative treatment is stem cell transplantation. Due to the limitations (donor problem, severe immunosuppression) of this procedure, new curative treatments, as genetherapy are urgently needed in WAS.

In this review we presented the genetic diagnosis of 9 Hungarian families with WAS. Family screening revealed 18 carrier females and prenatal diagnosis was made in 5 cases in the Hungarian group and in 1 case of a Russian woman. Results of genetic analysis of patients and carriers from 12 ECE countries, Turkey and Azerbaijan were also summarized. Disease causing mutations of WAS gene were analysed with bidirectional DNA sequencing in patients and their family members. Totally 114 male patients and 63 carrier females were involved, 77 different types of WAS gene mutations were found with 22 novel gene defects. The features of mutations fitted to literature. Most of the novel mutations were obviously disease causing mutations, in the case of 3 novel mutations further examinations are needed. Large deletion mutations of WAS gene were also reviewed in conjunction with the analysis of novel complex InDel mutation. Somatic reversion due to independent, second-site mutations were find in Ukrainian brothers and presented. This study has covered the largest group of patients with WAS from ECE countries according to our knowledge. The number of known PIDs exceeds 200, but much remains to be learned about genotypes and phenotypes individual PIDs, as these conditions are often rare. Specific approaches, such as The J Project, are required to investigate PID gene mutations in various populations and joint projects should be implemented in countries with lower socioecologic conditions like Eastern Europe.

IRODALOMJEGYZÉK

Aiuti, A., Bacchetta, R., Seger, R. és mtsai: Gene therapy for primary immunodeficiencies: Part 2. *Curr Opin Immunol*, 2012, *24*, 585-591.

Alapi, K., Erdős, M., Maródi, L.: Wiskott–Aldrich szindróma génjének mutációja congenitális thrombocytopeniás csecsemőben. *Gyermekegyógyászat*, 2005, *56*, 51–55.

Alapi, K., Erdős, M., Török, O. és mtsai: Prenatal diagnosis of the WAS R86H sequence variation in heterozygous twins. *Clin Chem*, 2006, *52*, 901–903.

Albert, M. H., Notarangelo, L. D., Ochs, H. D.: Clinical spectrum, pathophysiology and treatment of the Wiskott-Aldrich syndrome. *Curr Opin Hematol*, 2010, *18*, 42-48.

Albert, M. H., Bittner, T. C., Nonoyama, S. és mtsai: X-linked thrombocytopenia (XLT) due to WAS mutations: clinical characteristics, long-term outcome, and treatment options. *Blood*, 2010, *115*, 3231-3238.

Aldrich, R. A., Steinberg, A. G., Campbell, D. C.: Pedigree demonstrating a sex-linked recessive condition characterized by draining ears, eczematoid dermatitis and bloody diarrhea. *Pediatrics*, 1954, *13*, 133–138.

Ancliff, P. J., Blundell, M. P., Cory, G. O. és mtsai: Two novel activating mutations in the Wiskott–Aldrich syndrome protein result in congenital neutropenia. *Blood*, 2006, *108*, 2182–2189.

Andreu, N., Pujol-Moix, N., Martinez-Lostao, L. és mtsai: Wiskott-Aldrich syndrome in a female with skewed X-chromosome inactivation. *Blood Cells Mol Dis*, 2003, *31*, 332-337.

Andreu, N., García-Rodríguez, M., Volpini, V. és mtsai: A novel Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP) complex mutation identified in a WAS patient results in an aberrant product at the C-terminus from two transcripts with unusual polyA signals. *Hum Genet*, 2006, *51*, 92-97.

Andreu, N., Matamoros, N., Escudero, A., Fillat, C.: Two novel mutations identified in the Wiskott-Aldrich syndrome protein gene cause Wiskott-Aldrich syndrome and thrombocytopenia. *Int J Mol Med*, 2007, *19*, 777-782.

Ariga, T., Yamada, M., Ito, S. és mtsai: Characterization of a deletion mutation involving exons 3–7 of the WASP gene detected in a patient with Wiskott-Aldrich syndrome. *Hum Mutat*, 1997, *10*, 310–316.

Ariga, T.: Wiskott-Aldrich syndrome; an X-linked primary immunodeficiency disease with unique and characteristic features. *Allergol Int*, 2012, *61*, 183-189.

Bienemann, K. Gudowius, S., Niehues, T.: Topical tacrolimus is effective against eczema in Wiskott-Aldrich syndrome (WAS). *Acta Paediatr*, 2007, *96*, 312-314.

Bosticardo, M., Marangoni, F., Aiuti, A. és mtsai: Recent advances in understanding the pathophysiology of Wiskott-Aldrich syndrome. *Blood*, 2009, *113*, 6288-6295.

Boztug, K., Dewey, R. A., Klein, C.: Development of hematopoietic stem cell gene therapy for Wiskott–Aldrich syndrome. *Curr Opin Mol Ther*, 2006, *8*, 390–395.

Boztug, K., Germeshausen, M., Avedillo Díez, I., Gulacsy, V. és mtsai: Multiple independent second-site mutations in two siblings with somatic mosaicism for Wiskott-Aldrich syndrome. *Clin Genet*, 2008, *74*, 68-74.

Boztug, K., Schmidt, M., Schwarzer, A. és mtsai: Stem-cell gene therapy for the Wiskott-Aldrich syndrome. *N Engl J Med*, 2010, *363*, 1918-1927.

Burns, S., Cory, G. O., Vainchenker, W. és mtsa: Mechanisms of WASp-mediated hematologic and immunologic disease. *Blood*, 2004, *104*, 3454–3461.

Calle, Y., Jones, G. E., Jagger, C. és mtsai: WASp deficiency in mice results in failure to form osteoclast sealing zones and defects in bone resorption. *Blood*, 2004, *103*, 3552–3561.

Catucci, M., Castiello, M. C., Pala, F. és mtsai: Autoimmunity in wiskott-Aldrich syndrome: an unsolved enigma. *Front Immunol*, 2012, 3, 209.

Cines, D. B., Bussel, J. B., McMillan, R. B. és mtsa: Congenital and acquired thrombocytopenia. *Hematology*, 2004, 390–406.

Chien, Y. H., Hwu, W. L., Ariga, T. és mtsai: Molecular diagnosis of Wiskott-Aldrich syndrome in Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect*, 2004, 34, 276-281.

Daza-Cajigal, V., Martínez-Pomar, N., Garcia-Alonso, A.: X-linked thrombocytopenia in a female with a complex familial pattern of X-chromosome inactivation. *Blood Cells Mol Dis*, 2013, 51, 125-129.

den Dunnen, J. T., Antonarakis, S. E.: Mutation nomenclature. *Curr Protoc Hum Genet*, 2003, 7, 7.13.1-7.13.8.

De Noronha, S., Hardy, S., Sinclair, O. J. és mtsai: Impaired dendritic-cell homing in vivo in the absence of Wiskott–Aldrich syndrome protein. *Blood*, 2005, 105, 1590–1597.

Derry, J. M., Ochs, H. D., Francke, U.: Isolation of a novel gene mutated in Wiskott–Aldrich syndrome. *Cell*, 1994, 76, 635–644.

Devriendt, K., Kim, A. S., Mathijs, G. és mtsai: Constitutively activating mutation in WASP causes X-linked severe congenital neutropenia. *Nat Genet*, 2001, 27, 313–316.

Dewey, R. A., Avedillo Díez, I., Ballmaier, M. és mtsai: Retroviral WASP gene transfer into human hematopoietic stem cells reconstitutes the actin cytoskeleton in myeloid progeny cells differentiated in vitro. *Exp Hematol*, 2006, 34, 1161-1169.

Dupuis-Girod, S., Medioni, J., Haddad, E. és mtsai: Autoimmunity in Wiskott-Aldrich syndrome: risk factors, clinical features, and outcome in a single-center cohort of 55 patients. *Pediatrics*, 2003, 111, 622-627.

El-Hakeh, J., Rosenzweig, S., Oleastro, M. és mtsai: Wiskott-Aldrich syndrome in Argentina: 17 unique, including nine novel, mutations. *Hum Mutat*, 2002, *19*, 186-187.

Erdei, A., Sármai, G., Prechl, J.: *Immunológia. Medicina*, 2012.

Fischer, A., Hacein-Bey-Abina, S., Cavazzana-Calvo, M.: Gene therapy of primary T cell immunodeficiencies. *Gene*, 2013, *525*, 170-173.

Galy, A., Thrasher, A. J.: Gene therapy for the Wiskott-Aldrich syndrome. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2011, *11*, 545-550.

Gismondi, A., Cifaldi, L., Mazza, C. és mtsai: Impaired natural and CD16-mediated NK cell cytotoxicity in patients with WAS and XLT: ability of IL-2 to correct NK cell functional defect. *Blood*, 2004, *104*, 436-443.

Gulácsy, V., Freiburger, T., Shcherbina, A. és mtsai: Genetic characteristics of eighty-seven patients with the Wiskott-Aldrich syndrome. *Mol Immunol*, 2011, *48*, 788-792.

Gulácsy, V., Maródi, L.: Wiskott-Aldrich-szindróma. *Orv Hetil*, 2008, *149*, 1367-1371.

Imai, K., Morio, T., Zhu, Y., Jin, Y. és mtsai: Clinical course of patients with WASP gene mutations. *Blood*, 2004, *103*, 456-464.

Jin, Y., Mazza, C., Christie, J. R. és mtsai: Mutations of the Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP): hotspots, effect on transcription, and translation and phenotype correlation. *Blood*, 2004, *104*, 4010-4019.

Jones, G. E., Zicha, D., Dunn, G. A. és mtsai: Restoration of podosomes and chemotaxis in Wiskott-Aldrich syndrome macrophages following induced expression of WASp. *Int J Biochem Cell Biol*, 2002, *34*, 806-815.

Kang, H. J., Shin, H. Y., Ko, S. H. és mtsai: Unrelated bone marrow transplantation with a reduced toxicity myeloablative conditioning regimen in Wiskott-Aldrich Syndrome. *J Korean Med Sci*, 2008, *23*, 146-148.

Kildebeck, E., Checketts, J., Porteus, M.: Gene therapy for primary immunodeficiencies. *Curr Opin Pediatr*, 2012, *24*, 731-738.

Kim, A. S., Kakalis, L. T., Abdul-Manan N. és mtsai: Autoinhibition and activation mechanisms of the Wiskott-Aldrich syndrome protein. *Nature*, 2000, *404*, 151-158.

Klein, C., Nguyen, D., Liu, C. H. és mtsai: Gene therapy for Wiskott-Aldrich syndrome: rescue of T-cell signaling and amelioration of colitis upon transplantation of retrovirally transduced hematopoietic stem cells in mice. *Blood*, 2003, *101*, 2159-2166.

Kobayashi, R., Ariga, T., Nonoyama, S. és mtsai: Outcome in patients with Wiskott-Aldrich syndrome following stem cell transplantation: an analysis of 57 patients in Japan. *Br J Haematol*, 2006, *135*, 362-366.

Kwan, S. P., Lehner, T., Hagemann, T. és mtsai: Localization of the gene for Wiskott-Aldrich syndrome between two flanking markers, TIMP and DXS255, on Xp11.22-Xp11.3. *Genomics*, 1991, *10*, 29-33.

Lacout, C., Haddad, E., Sabri, S. és mtsai: A defect in hematopoietic stem cell migration explains the nonrandom X chromosome inactivation in carriers of Wiskott-Aldrich syndrome. *Blood*, 2003, *102*, 1282-1289.

Lanzi, G., Moratto, D., Vairo, D. és mtsai: A novel primary human immunodeficiency due to deficiency in the WASP-interacting protein WIP. *J Exp Med*, 2012, *209*, 29-34.

Lee, W. I., Huang, J. L., Jaing, T. H. és mtsai: Clinical aspects and genetic analysis of Taiwanese patients with Wiskott-Aldrich syndrome protein mutation: the first identification of X-linked thrombocytopenia in the Chinese with novel mutations. *J Clin Immunol*, 2010, *30*, 593-601.

Lee, W. I., Kuo, M. L., Huang, J. L. és mtsai: Distribution and clinical aspects of primary immunodeficiencies in a Taiwan Pediatric Tertiary Hospital during a 20-year period. *J Clin Immunol*, 2005, *25*, 132-173.

Liu, C. H., Wu, K. H., Lin, T. Y. és mtsai: Wiskott-Aldrich syndrome with IgA nephropathy: a case report and literature review. *Int Urol Nephrol*, 2013, *45*, 1495-1500.

Longhurst, H. J., Taussig, D., Haque, T. és mtsai: Non-myeloablative bone marrow transplantation in an adult with Wiskott–Aldrich syndrome. *Br J Haematol*, 2002, *116*, 497–499.

Lutskiy, M. I., Sasahara, Y., Kenney, D. M. és mtsai: Wiskott-Aldrich syndrome in a female. *Blood*, 2002, *100*, 2763-2768.

Lutskiy, M. I., Jones, L. N., Rosen, F. S. és mtsa: An Alu-mediated deletion at Xp11.23 leading to Wiskott-Aldrich syndrome. *Hum Genet*, 2002, *110*, 515–519.

Lutskiy, M. I., Rosen, F. S., Remold-O'Donnell, E.: Genotype-proteotype linkage in the Wiskott-Aldrich syndrome. *J Immunol*, 2005, *175*, 1329-1336.

MacCarthy-Morrogh, L., Gaspar, H. B., Wang, Y. C. és mtsai: Absence of expression of the Wiskott-Aldrich syndrome protein in peripheral blood cells of Wiskott-Aldrich syndrome patients. *Clin Immunol Immunopathol*, 1998, *88*, 22–27.

Mahlaoui, N., Pellier, I., Mignot, C. és mtsai: Characteristics and outcome of early-onset, severe forms of Wiskott-Aldrich syndrome. *Blood*, 2013, *121*, 1510-1516.

Maillard, M. H., Cotta-de-Almeida, V., Takeshima, F. és mtsai: The Wiskott-Aldrich syndrome protein is required for the function of CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) regulatory T cells. *J Exp Med*, 2007, *204*, 381-391.

Matsukura, H., Kanegane, H., Miya, K. és mtsai: IgA nephropathy associated with X-linked thrombocytopenia. *Am J Kidney Dis*, 2004, *43*, 7-12.

Moratto D., Giliani, S., Notarangelo, L. D. és mtsai: The Wiskott–Aldrich syndrome: from genotype–phenotype correlation to treatment. *Expert Rev Clin Immunol*, 2007, *3*, 813-824.

Moratto, D., Giliani, S., Bonfim, C. és mtsai: Long-term outcome and lineage-specific chimerism in 194 patients with Wiskott-Aldrich syndrome treated by hematopoietic cell transplantation in the period 1980-2009: an international collaborative study. *Blood*, 2011, *118*, 1675-1684.

Moulding, D. A., Blundell, M. P., Spiller, D. G. és mtsai: Unregulated actin polymerization by WASp causes defects of mitosis and cytokinesis in X-linked neutropenia. *J Exp Med*, 2007, *204*, 2213-2224.

Notarangelo, L. D., Mazza, C., Giliani, S. és mtsai: Missense mutations of the WASP gene cause intermittent X-linked thrombocytopenia. *Blood*, 2002, *99*, 2268–2269.

Notarangelo, L. D., Miao, C. H. és Ochs, H. D.: Wiskott–Aldrich syndrome. *Curr Opin Hematol*, 2008, *15*, 30–36.

Notarangelo, L. D.: In Wiskott-Aldrich syndrome, platelet count matters. *Blood*, 2013, *121*, 1484-1485.

Ochs, H. D.: The Wiskott–Aldrich syndrome. *Semin Hematol*, 1998, *35*, 332–345.

Ochs, H. D.: The Wiskott–Aldrich syndrome. *Isr Med Assoc J*, 2002, *4*, 379–384.

Ochs, H. D., Notarangelo, L. D.: Structure and function of the Wiskott–Aldrich syndrome protein. *Curr Opin Hematol*, 2005, *12*, 284–291.

Ochs, H. D., Thrasher, A. J.: The Wiskott-Aldrich syndrome. *J Allergy Clin Immunol*, 2006, *117*, 725-738.

Ochs, H. D., Filipovich, A. H., Veys, P. és mtsai: Wiskott-Aldrich syndrome: diagnosis, clinical and laboratory manifestations, and treatment. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2009, *15*, 84-90.

Ozsahin, H., Cavazzana-Calvo, M., Notarangelo L. D.: Long-term outcome following hematopoietic stem-cell transplantation in Wiskott-Aldrich syndrome: collaborative study of the European Society for Immunodeficiencies and European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Blood*, 2008, *111*, 439-445.

Parolini, O., Ressmann, G., Haas, O. A. és mtsai: X-linked Wiskott-Aldrich syndrome in a girl. *N Engl J Med*, 1998, *338*, 291-295.

Puck, J. M, Candotti, F.: Lessons from the Wiskott-Aldrich syndrome. *N Engl J Med*, 2006, *355*, 1759-1761.

Qasim, W., Gaspar, H. B., Thrasher, A. J.: Progress and prospects: gene therapy for inherited immunodeficiencies. *Gene Ther*, 2009, *16*, 1285-1291.

Rotty, J. D., Wu, C., Bear, J. E.: New insights into the regulation and cellular functions of the ARP2/3 complex. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2013, *14*, 7-12.

Schwarz, K.: WASPbase: a database of WAS- and XLT-causing mutations. *Immunol Today*, 1996, *17*, 496-502.

Serrano-Pertierra, E., Cernuda-Morollón, E., López-Larrea, C.: Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASp) and N-WASp are involved in the regulation of NK-cell migration upon NKG2D activation. *Eur J Immunol*, 2012, *42*, 2142-2151.

Shcherbina, A., Cancotti, F., Rosen, F. S. és mtsa: High incidence of lymphoma in a subgroup of Wiskott-Aldrich syndrome patients. *Br J Haematol*, 2003, *121*, 529-530.

Shimizu, M., Kanegane, H., Wada, T. és mtsai: Aberrant glycosylation of IgA in Wiskott-Aldrich syndrome and X-linked thrombocytopenia. *J Allergy Clin Immunol*, 2013, *131*, 587-590.

Stewart, D. M., Candotti, F., Nelson, D. L.: The phenomenon of spontaneous genetic reversions in the Wiskott-Aldrich syndrome: a report of the workshop of the ESID Genetics

Working Party at the XIIth Meeting of the European Society for Immunodeficiencies (ESID). Budapest, Hungary October 4-7, 2006. *J Clin Immunol*, 2007, 27, 634-639.

Sullivan, K. E., Mullen, C. A., Blaese, R. M. és mtsa: A multiinstitutional survey of the Wiskott-Aldrich syndrome. *J Pediatr*, 1994, 125, 876-885.

Thompson, L. J., Lalloz, M. R., Layton, D. M.: Unique and recurrent WAS gene mutations in Wiskott-Aldrich syndrome and X-linked thrombocytopenia. *Blood Cells Mol Dis*, 1999, 25, 218–226.

Trifari, S., Sitia, G., Aiuti, A. és mtsai: Defective Th1 cytokine gene transcription in CD4+ and CD8+ T cells from Wiskott-Aldrich syndrome patients. *J Immunol*, 2006, 177, 7451-7461.

Villa, A., Notarangelo, L., Macchi, P. és mtsai: X-linked thrombocytopenia and Wiskott-Aldrich syndrome are allelic diseases with mutations in the WASP gene. *Nat Genet*, 1995, 9, 414–417.

Wada, T., Konno, A., Schurman, S. H.: Second-site mutation in the Wiskott-Aldrich syndrome (WAS) protein gene causes somatic mosaicism in two WAS siblings. *J Clin Invest*, 2003, 111, 1389–1397.

Westerberg, L., Larsson, M., Hardy, S. J. és mtsai: Wiskott-Aldrich syndrome protein deficiency leads to reduce B-cell adhesion, migration, and homing, and a delayed humoral immune response. *Blood*, 2005, 105, 1144–1152.

Wiskott, A.: Familiärer, angeborener Morbus Werlhoffi? *Monatsschrift für Kinderheilkunde*, 1937, 68, 212–216.

Zhang, L., Thrasher, A. J., Gaspar, H. B.: Current progress on gene therapy for primary immunodeficiencies. *Gene Ther*, 2013, 20, 963-969.

Zhu, Q., Watanabe, C., Liu, T. és mtsai: Wiskott–Aldrich syndrome/ X-linked thrombocytopenia: WASP gene mutations, protein expression, and phenotype. *Blood*, 1997, *90*, 2680–2689.

Iktatószám: DEENKÉTK/374/2013.
Tételszám:
Tárgy: Ph.D. publikációs lista

Jelölt: Gulácsy Vera

Neptun kód: NKAWMO

Doktori Iskola: Petrányi Gyula Klinikai Immunbiológiai és Allergológiai Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Gulácsy, V.**, Freiburger, T., Shcherbina, A., Pac, M., Chernyshova, L., Avcin, T., Kondratenko, I., Kostyuchenko, L., Prokofjeva, T., Pasic, S., Bernatowska, E., Kutukculeri, N., Rascon, J., Iagaru, N., Mazza, C., Tóth, B., Erdős, M., van der Burg, M., Maródi, L., The J Project Study Group: Genetic characteristics of eighty-seven patients with the Wiskott-Aldrich syndrome. *Mol. Immunol.* 48 (5), 788-792, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2010.11.013>
IF:2.897
2. Boztug, K., Germeshausen, M., Avedillo Díez, I., **Gulácsy, V.**, Diestelhorst, J., Ballmaier, M., Welte, K., Maródi, L., Chernyshova, L.I., Klein, C.: Multiple independent second-site mutations in two siblings with somatic mosaicism for Wiskott-Aldrich syndrome. *Clin. Genet.* 74 (1), 68-74, 2008.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-0004.2008.01019.x>
IF:3.206



További Közlemények

3. **Gulácsy V.**, Maródi L.: Szubkután immunglobulin-pótlás és -terápia.
Orv. Hetil. 152 (2), 64-67, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/OH.2011.28940>

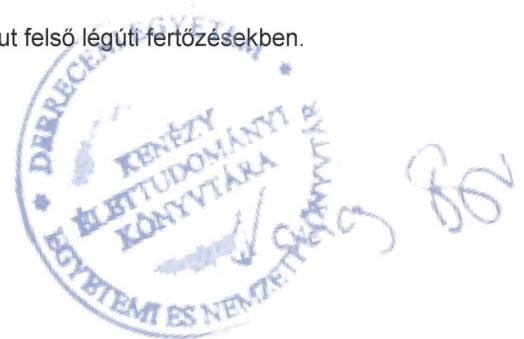
4. Liu, L., Okada, S., Kong, X., Kreins, A.Y., Cypowyj, S., Abhyankar, A., Toubiana, J., Itan, Y., Audry, M., Nitschke, P., Masson, C., Tóth, B., Flatot, J., Migaud, M., Chrabieh, M., Kochetkov, T., Bolze, A., Borghesi, A., Toulon, A., Hiller, J., Eyerich, S., Eyerich, K., **Gulácsy, V.**, Chernyshova, L., Chernyshov, V., Bondarenko, A., Cortés Grimaldo, R.M., Blancas-Galicia, L., Madrigal Beas, I.M., Roesler, J., Magdorf, K., Engelhard, D., Thumerelle, C., Burgel, P., Hoernes, M., Drexel, B., Seger, R., Kusuma, T., Jansson, A.F., Sawalle-Belohradsky, J., Belohradsky, B., Jouanguy, E., Bustamante, J., Bué, M., Karin, N., Wildbaum, G., Bodemer, C., Lortholary, O., Fischer, A., Blanche, S., Al-Muhsen, S., Reichenbach, J., Kobayashi, M., Espinosa Rosales, F., Lozano, C.T., Sebnem Kilic, S., Matias, O., Etzioni, A., Traidl-Hoffmann, C., Renner, E.D., Abel, L., Picard, C., Maródi, L., Boisson-Dupuis, S., Puel, A., Jean-Laurent, C.: Gain-of-function human STAT1 mutations impair IL-17 immunity and underlie chronic mucocutaneous candidiasis.
J. Exp. Med. 208 (8), 1635-1648, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20110958>
IF:13.853

5. Constantin T., Székely A., Ponyi A., **Gulácsy V.**, Ambrus C., Kádár K., Vastagh I., Dajnoki A., Tóth B., Bokrétás G., Müller V., Katona M., Medvecz M., Fiedler O., Széchezy R., Varga E., Rudas G., Kertész A., Molnár S., Kárpáti S., Nagy V., Magyar P., Mohamed M., Rákóczi É., Németh K., Bereczki D., Garami M., Erdős M., Maródi L., Fekete G.: Fabry-betegség - terápias útmutató.
Orv. Hetil. 151 (31), 1243-1251, 2010.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/OH.2010.28796>

6. **Gulácsy V.**, Maródi L.: Felső légúti fertőzések.
Gyermekorv. Továbbk. 9 (4), 168-171, 2010.

7. **Gulácsy V.**, Maródi L.: Antibiotikum-terápia gyermekkori akut felső légúti fertőzésekben.
Gyermekorv. Továbbk. 1 (8), 34-38, 2009.

8. **Gulácsy V.**, Maródi L.: Wiskott-Aldrich-szindróma.
Orv. Hetil. 149 (29), 1367-1371, 2008.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/OH.2008.28377>

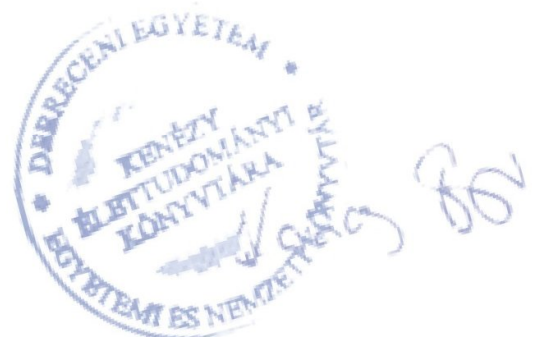


A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 19.956

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
6.103**

A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár a Jelölt által a Publikációs Adatbázisba feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2013.11.25



A dolgozat alapjául szolgáló egyéb közlemény:

Gulácsy, V., Soltész, B., Petrescu, C., Bataneant, M., Gyimesi, E., Serban, M., Maródi, L., Tóth, B.: A novel large deletion and single nucleotide insertion in the Wiskott-Aldrich syndrome protein gene. *Eur J Haematol*, 2014, Manuscript: EJM-2014-520 - (737).

Közlemény elbírálás alatt.

TÁRGYSZAVAK

Magyar nyelvű tárgyszavak:

Wiskott-Aldrich szindróma, Wiskott-Aldrich szindróma protein, thrombocytopenia, visszatérő fertőzések, ekcéma, génmutáció, génterápia

Angol nyelvű tárgyszavak:

Wiskott-Aldrich syndrome, Wiskott-Aldrich syndrome protein, thrombocytopenia, recurrent infections, eczema, gene mutation, gene therapy

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet fejezem ki mindenkeltőtt témavezetőmnek, Lajszné Dr. Tóth Beátának és korábbi témavezetőmnek, Prof. Dr. Maródi László egyetemi tanárnak, az Infektológiai és Gyermekimmunológiai Tanszék vezetőjének, akik hozzáértő szakmai segítségükkel elméleti és gyakorlati munkámat egyaránt lelkiismeretesen irányították.

Külön megköszönöm a hannoveri Orvostudományi Egyetem Gyermekhematológiai részleg vezetőjének Prof. Dr. Christoph Klein professzor úrnak és munkatársainak az eredményes együttműködést.

Köszönettel tartozom kollégáimnak, Csorba Gabriellának, Soltész Beátának valamint az Infektológiai és Gyermekimmunológiai Tanszék minden munkatársának önzetlen segítségükért.

Külön köszönet illeti a szakmai együttműködésért a J Project valamennyi résztvevő centrumát és munkatársait.

Köszönetet mondok a betegek és családtagjaiknak a készséges együttműködésükért.

Végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni a Páromnak és családtagjaimnak az általuk tanúsított megértést és a támogatást.

FÜGGELÉK